



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

MAPEAMENTO MULTIELEMENTAR DE ÚLCERAS INDUZIDAS

UTILIZANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

**LETICIA DINIZ VIEIRA**

**PROF. DR. JOEL MESA HORMAZA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Processos e Sistemas*.

**BOTUCATU – SP  
2018**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil  
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vieira, Letícia Diniz.

Mapeamento multielementar de úlceras induzidas utilizando fluorescência de raios X / Letícia Diniz Vieira. - Botucatu, 2018.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Joel Mesa Hormaza

Capes: 10507167

1. Úlcera gástrica - Tratamento. 2. Plantas medicinais. 3. Extratos vegetais. 4. Radiação sincrotrônica. 5. Fluorescência de raios X. 6. Elementos químicos.

Palavras-chave: extratos vegetais; luz síncroton; mapeamento multielementar; úlcera gástrica;  $\mu$ XRF.

Aos meus pais, Luiz Otávio e Juliana,  
e à minha irmã, Marília.

## **Agradecimentos**

A Deus, pela persistência.

Aos meus pais, Juliana e Luiz Otávio, e minha irmã, Marília, pela permanente torcida e incontestáveis incentivo e apoio. E ao meu irmão, Guto, que também faz parte de tudo. Amo vocês!

À minha avó, tios, padrinhos, primos e amigos, pelo carinho de sempre.

Às “mulheres ricas”, Luana e Jéssica, por me receberem de laje e portas abertas e por todo companheirismo nesses anos. Jéssica, sua ajuda com o inglês foi sensacional!

À Lívia, por toda amizade a qualquer momento e para qualquer coisa, de almoços duplos à consultoria de estatística.

A Emanuel, por sempre escutar e embarcar nos meus devaneios, compartilhar mil e uma ideias e me ensinar de tudo um pouco.

A Marcelo, por toda parceria e irmandade no trabalho e nos rolês.

À Luana, Camélia (Nelson e João), Elisângela (Renan e Sophia), Anna (Murilo) e Mariana (Rafael), minha segunda família, pelos ótimos momentos juntos.

À Natália, pela república, amizade e roladas.

Aos professores, aos funcionários e à galera do Departamento de Física e Biofísica, Natália, Andrea, Tahila, Rodrigo, Fabio, Guilherme e Paula, Rafael B., Luis Augusto e Patricia, Carlos F., Thiago, Rafael S., Antoniel, Carlos N. e Edson, por toda ajuda, café e almoço compartilhados. A Guilherme e Káthia, por toda ajuda, mesmo não estando mais lá agora.

A Marcelo, Vicente, Ana Lucia, Leticia, Luana, Danisley, Fabio, Gustavo, Maria Fernanda, Rubens, Ariadne, Bruno, Willian e Silas, por fazerem o trabalho ficar mais leve e divertido. À direção, coordenação, administração e docentes da Fatec Botucatu, por todo apoio na finalização deste trabalho.

A todos os meus alunos, por me fazerem aprender cada dia mais.

À Dra. Clélia A. Hiruma-Lima, Dr. Hélio Kushima (Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais - IBB/UNESP) e Dr. Carlos A. Perez (LNLS/CNPq), por todo o suporte no preparo e medida das amostras.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo suporte financeiro.

E ao professor Joel Mesa, pela paciência, não desistência, ensinamentos e ajuda na orientação e realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte deste trabalho, o meu ‘muito obrigada’!!!

*“A ciência progride de duas maneiras: adicionando fatos novos e simplificando os existentes...”*

Claude Bernard

## Resumo

A úlcera péptica é provocada pelo desequilíbrio entre fatores lesivos e protetores das mucosas gástrica e duodenal, em consequência a fatores endógenos ou exógenos aos tecidos. Para seu tratamento, algumas plantas são popularmente empregadas e demonstram eficácia semelhante ou superior aos fármacos geralmente utilizados, ocasionando menores efeitos adversos. Apesar de várias pesquisas na área, a compreensão do mecanismo gastroprotetor dos compostos fitoterápicos ainda não é completa. Assim, com o objetivo de contribuir para a compreensão da ação farmacológica dos extratos de três plantas medicinais (*Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*), foi realizada uma análise da distribuição elementar dos constituintes das amostras de mucosas gástricas de ratos tratados com os extratos vegetais e que tiveram úlceras gástricas induzidas por álcool ou por droga anti-inflamatória não-esteroidal (DAINE). O experimento foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e permitiu a análise dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn que contem relação com a formação ou neutralização das úlceras. De acordo com os mapas da distribuição dos elementos, foi possível detectar alta concentração de Fe, Cu e Zn no interior da lesão das amostras de úlcera induzida por DAINÉ, e de Cu, Zn e Cl no interior da lesão das amostras induzidas por álcool. Nas amostras de úlcera induzida por DAINÉ e tratadas com *Alchornea glandulosa*, as concentrações de Ca, Cu e Fe aumentaram. Nas amostras de úlcera induzida por DAINÉ tratadas com *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, as concentrações de Ca, Mn e Zn foram aumentadas. Nas amostras de úlcera induzida por álcool tratadas com *Alchornea glandulosa*, as concentrações de todos os elementos analisados foram elevadas. Nas amostras tratadas com *Davilla elliptica*, as concentrações dos elementos Cu e Mn diminuiram. E nas tratadas com *Davilla nitida*, somente a concentração de Mn não foi elevada. Estas variações podem indicar um favorecimento do deslocamento desses elementos pelo mecanismo gastroprotetor estimulado pelos extratos utilizados. De acordo com a análise de agrupamento, pode-se sugerir também que os extratos, utilizados como tratamento, restauram as correlações elementares às ocorridas no tecido sem úlcera induzida, auxiliando em suas ações gastroprotetoras.

**Palavras-chave:** mapeamento multielementar, extratos vegetais, úlcera gástrica,  $\mu$ XRF, luz síncrotron

## Abstract

The peptic ulcer is caused by the imbalance between harmful and protective factors of the gastric and duodenal mucosa, as a consequence of factors endogenous or exogenous to the tissues. For its treatment, some plants are popularly employed and demonstrate efficacy akin or superior to the drugs normally used, leading to less adverse effects. Although much research has been conducted in the field, the understanding of the gastroprotective mechanism of phytotherapeutic compounds is still not complete. Therefore, aiming to advance the understanding of the pharmacological action of the extracts of three medicinal plants (*Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*), we conducted an analysis of the elemental distribution of constituents within samples of gastric mucosa from rats treated with phytotherapeutic extracts and affected with gastric ulcers induced by alcohol or nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The experiment was performed at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) and allowed for the analysis of the elements Cl, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn that are connected to ulcers development or inhibition. According to the elemental distribution maps, it was possible to detect high concentrations of Fe, Cu and Zn inside the lesion from the NSAID-induced ulcer samples, and of Cu, Zn and Cl inside the lesion from the alcohol-induced ulcer samples. In NSAID-induced ulcer samples treated with *Alchornea glandulosa*, Ca, Cu and Fe concentrations were augmented. In NSAID-induced ulcer samples treated with *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*, Ca, Mn and Zn concentrations were augmented. In alcohol-induced ulcer samples treated with *Alchornea glandulosa*, the concentrations of all the analyzed elements were augmented. In alcohol-induced ulcer samples treated with *Davilla elliptica*, Cu and Mn concentrations were decreased. In alcohol-induced ulcer samples treated with *Davilla nitida*, only Mn concentrations were not augmented. These variations potentially indicate facilitation of these elements displacement by a gastroprotective mechanism stimulated by used extracts. According to clustering analysis, it can also be suggested that the extracts used as ulcer treatment restore the elements correlations to those occurring in the tissue without induced ulcer, facilitating gastroprotective actions.

**Key-words:** multielemental mapping, plant extracts, gastric ulcers,  $\mu$ XRF, synchrotron radiation

## Lista de Figuras

Figura 1: Úlceras e suas localizações .....	11
Figura 2: <i>Alchornea glandulosa</i> .....	19
Figura 3: <i>Davilla elliptica</i> .....	19
Figura 4: <i>Davilla nitida</i> .....	20
Figura 5: Processos básicos da XRF .....	21
Figura 6: Geometria de excitação-deteção da WDXRF .....	22
Figura 7: Geometria de excitação-deteção da EDXRF e TXRF.....	23
Figura 8: Geometria de excitação-deteção da $\mu$ XRF.....	23
Figura 9: Visão do anel de armazenamento do feixe do LNLS.....	26
Figura 10: Arranjo experimental para excitação e deteção dos raios X .....	28
Figura 11: Espectro de $\mu$ XRF de uma das amostras analisadas .....	30
Figura 12: Imagem de uma amostra de mucosa gástrica sem úlcera induzida (sham) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra. ....	32
Figura 13: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por DAINE (1A) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra.....	33
Figura 14: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por álcool (1B) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra.....	34
Figura 15: Concentração dos elementos em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, nas amostras sem indução (sham) e com indução de úlcera por DAINE (1A) e por álcool (1B). ....	36
Figura 16: Resultado da análise de agrupamento ( <i>cluster</i> ) hierárquico para grupos sham, 1A (úlceras induzidas por DAINE) e 1B (úlceras induzidas por álcool) com as respectivas associações entre os elementos. ....	37
Figura 17: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por DAINE e tratada com <i>Alchornea glandulosa</i> (2A) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra .....	39
Figura 18: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por DAINE e tratada com <i>Davilla elliptica</i> (3A) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra.....	40
Figura 19: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por DAINE e tratada com <i>Davilla nitida</i> (4A) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra .....	41



Figura 20: Concentração dos elementos em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, entre as amostras que tiveram úlcera induzida por DAINÉ (1A) e tratadas com <i>A. glandulosa</i> (2A), <i>D. elliptica</i> (3A) e <i>D. nitida</i> (4A) .....	43
Figura 21: Resultado da análise de agrupamento ( <i>cluster</i> ) hierárquico para grupos de úlceras induzidas por DAINÉ (1A) e tratadas com <i>A. glandulosa</i> (2A), <i>D. elliptica</i> (3A) e <i>D. nitida</i> (4A).....	45
Figura 22: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por álcool e tratada com <i>Alchornea glandulosa</i> (2B) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra .....	47
Figura 23: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por álcool e tratada com <i>Davilla elliptica</i> (3B) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra.....	48
Figura 24: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por álcool e tratada com <i>Davilla nitida</i> (4B) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra .....	49
Figura 25: Concentração dos elementos em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, entre as amostras que tiveram úlcera induzida por álcool (1B) e tratadas com <i>A. glandulosa</i> (2B), <i>D. elliptica</i> (3B) e <i>D. nitida</i> (4B).....	51
Figura 26: Resultado da análise de agrupamento ( <i>cluster</i> ) hierárquico para grupos de úlceras induzidas por álcool (1B) e tratadas com <i>A. glandulosa</i> (2B), <i>D. elliptica</i> (3B) e <i>D. nitida</i> (4B).....	53

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Grupos experimentais com seus respectivos tratamentos e induções de úlcera. ....	27
Tabela A.1: Concentração elementar (média $\pm$ desvio padrão) do material certificado NIST 1577b (fígado bovino).....	62
Tabela A.2: Concentração média ( $\mu\text{g/g}$ ) dos elementos Ca, Cl, Cu, Fe, Mn e Zn nas em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, nas amostras dos grupos sham (sem úlcera induzida), 1A (úlcera induzida por DAINE sem tratamento), 2A (úlcera induzida por DAINE e tratada com <i>Alchornea glandulosa</i> ), 3A (úlcera induzida por DAINE e tratada com <i>Davilla elliptica</i> ) e 4A (úlcera induzida por DAINE e tratada com <i>Davilla nitida</i> ).....	63
Tabela A.3: Concentração média ( $\mu\text{g/g}$ ) dos elementos Ca, Cl, Cu, Fe, Mn e Zn nas em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, nas amostras dos grupos sham (sem úlcera induzida), 1B (úlcera induzida por álcool sem tratamento), 2B (úlcera induzida por álcool e tratada com <i>Alchornea glandulosa</i> ), 3B (úlcera induzida por álcool e tratada com <i>Davilla elliptica</i> ) e 4B (úlcera induzida por álcool e tratada com <i>Davilla nitida</i> ).....	65

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

- $\mu$ XRF Microfluorescência de raios X (*Micro X-Ray Fluorescence*)
- DAINE Droga anti-inflamatória do tipo não esteroidal
- EDXRF Fluorescência de raios X por dispersão de energia (*Energy Dispersive X-ray Fluorescence*)
- LNLS Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
- TXRF Fluorescência de raios X por reflexão total (*Total Reflection X-ray Fluorescence*)
- WDXRF Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (*Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence*)
- XRF Fluorescência de raios X (*X-ray Fluorescence*)

## Sumário

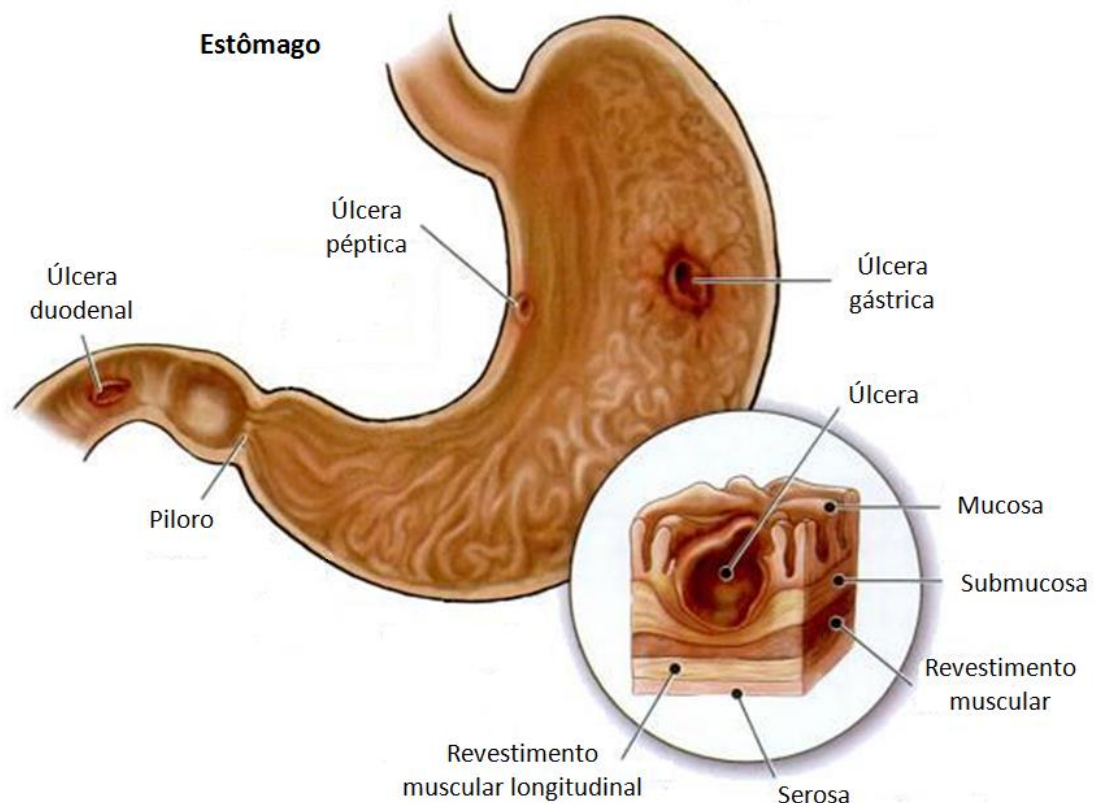
1. Introdução.....	11
1.1. Motivação .....	11
2. Objetivos.....	15
3. Fundamentos Teóricos.....	16
3.1. Elementos relacionados às úlceras.....	16
3.2. Plantas medicinais utilizadas .....	18
3.3. Fluorescência de raios X.....	21
3.3.1. Microfluorescência de raios X.....	23
3.4. Radiação síncrotron .....	25
4. Material e Métodos.....	26
4.1. Preparação das amostras .....	26
4.2. Arranjo experimental .....	28
4.3. Análise estatística .....	29
4.3.1. Análise de agrupamento ( <i>cluster</i> ).....	29
5. Resultados e Discussão.....	30
5.1. Análise das amostras de úlceras induzidas .....	30
5.2. Análise das amostras de úlceras induzidas por DAINE e tratadas com extratos vegetais .....	38
5.3. Análise das amostras de úlceras induzidas por álcool e tratadas com extratos vegetais .....	46
6. Conclusão .....	54
7. Referências .....	56
APÊNDICE A .....	61
APÊNDICE B.....	66

## 1. Introdução

### 1.1. Motivação

Distúrbios em fatores lesivos e protetores das mucosas gástrica e duodenal desencadeiam lesões chamadas úlceras pépticas (Figura 1). Estas lesões atingem um considerável número de pessoas no mundo inteiro e sua manifestação ou agravo pode ocorrer em resposta ao estresse crônico, tabagismo, uso de álcool, uso de drogas anti-inflamatórias do tipo não esteroidais (DAINEs) e presença de *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal. Atualmente, estudos apontam a presença de *H. pylori* e o uso de DAINE como as causas mais comuns da incidência deste tipo de lesão (Bashinskaya, Nahed et al, 2011; Lau, Sung et al., 2011; Soreide, Thorsen et al., 2015; Levenstein, Rosenstock et al., 2015).

Figura 1: Úlceras e suas localizações



Fonte: Aschenbrenner e Venable, 2009.

No Brasil, foram estimados mais de 289000 casos de úlceras, em 2008, e mais de 22750 internações no Sistema Único de Saúde (SUS), representando 10% do total de

internações no país. Sua incidência foi maior na população masculina com idade superior a 60 anos (Oliveira, Carvalho et al., 2015).

Como consequência das úlceras, pode ocorrer a perfuração das lesões, hemorragias e obstruções, ocasionando grandes situações de emergências, inclusive cirúrgicas, para esta patologia (Lau, Sunget al., 2011; Soreide, Thorsen et al., 2015).

Para o diagnóstico das úlceras, o método mais utilizado é a endoscopia, que também possibilita a realização de biópsias para descarte de outras patologias. Para o tratamento, são utilizados medicamentos antiácidos, inibidores de secreção ácida, bloqueadores da liberação de ácido clorídrico e/ou antibióticos para a eliminação da *H. pylori* (Monici, Zeitune et al., 2003).

De acordo com pesquisas etnofarmacológicas, muitas plantas também têm sido utilizadas para o tratamento das úlceras gástricas e duodenais e demonstram eficácia semelhante ou superior aos fármacos geralmente utilizados e ocasionam menores efeitos adversos, sendo utilizadas como fonte de novas drogas (Bi, Man, Man, 2014).

A ação gastroprotetora das plantas é identificada como resposta ao estímulo de proliferação celular da mucosa gástrica, de diminuição da liberação do ácido gástrico e do aumento da produção de muco, além de suas atividades antioxidantes e antimicrobianas (Bi, Man, Man, 2014; Gohar, Zaki, 2014; Silva, Angelis et al., 2015; Reddy, Kumar, 2016). Estas atividades são atribuídas a compostos, como flavonoides, terpenos, saponinas e taninos, constituintes dos extratos vegetais das plantas (Bonamin, Moraes et al., 2014; Silva, Angelis et al., 2015).

Apesar de vários estudos na área, a compreensão do mecanismo gastroprotetor dos compostos fitoterápicos produzidos a partir de plantas ainda não é completa. Neste sentido, a contribuição de nossos trabalhos no esclarecimento dessa problemática está centrada no estudo da composição e mapeamento multielementar do tecido gástrico de animais tratados com esses extratos e com úlceras induzidas por dois diferentes fatores etiológicos da doença no homem: álcool e DAINE.

A análise da composição multielementar de amostras biológicas é importante e necessária, pois determina quais são seus elementos químicos constituintes, assim como a proporção com a qual os mesmos aparecem. Estes elementos têm um papel fundamental em

todos os sistemas biológicos, participando de todos os processos metabólicos, como componentes de diferentes enzimas, catalisando reações químicas em células vivas, entre outros processos (Sahu, Ray, Chand, 2014).

Os compostos e elementos químicos contidos nas plantas medicinais podem ser disponibilizados para o corpo humano em qualquer tipo de consumo de plantas e seus extratos. Por conta disso e da crescente utilização de extratos vegetais, a análise e a determinação da composição multielementar de plantas medicinais têm despertado interesse para a avaliação do potencial farmacológico e toxicológico de determinadas espécies (Tsang, Ho et al., 2011).

Mesmo que nem todos os elementos químicos presentes nas amostras tenham suas funções biológicas totalmente descritas, alguns elementos apresentam atividades relacionadas diretamente com a neutralização de úlceras. De acordo com pesquisas, elementos como Zn, Ca, Cu, Mn, Bi e Cl apresentam efeitos positivos no tratamento e prevenção das úlceras (Tsang, Ho et al., 2011; Mei, Xu et al., 2013; Baran, 2014; Gawel, Lipkowska et al., 2014; Aihara, Montrose, 2014; Skrovanek, Diguilio et al., 2014).

A partir disso e com o intuito de contribuir para o entendimento das ações farmacológicas dos extratos vegetais, em trabalhos prévios, com o emprego da técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF, *Total Reflection X-ray Fluorescence*), utilizando radiação síncrotron, foram determinadas as concentrações dos elementos contidos nos extratos de *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, plantas popularmente utilizadas para o tratamento das úlceras (Vieira, da Silva et al., 2018). Posteriormente, com a mesma técnica, também foram determinadas as concentrações elementares dos tecidos gástricos de animais, tratados com os extratos e que tiveram úlceras gástricas induzidas por álcool ou por DAINÉ, dois fatores etiológicos da doença no homem (Vieira, da Silva et al., 2017). Após as análises, foi possível observar que as amostras de úlceras induzidas por DAINÉ apresentam principalmente uma forte correlação dos elementos P, S e Cl com o elemento Zn, que é importante no tratamento e prevenção das úlceras. As amostras de úlceras induzidas por álcool, apresentam principalmente uma forte correlação dos elementos P, S e Cl com o elemento Ca, que participa da regeneração da mucosa danificada (Vieira, da Silva et al., 2017).

Com os resultados obtidos, pode-se sugerir uma relação entre os elementos fortemente correlacionados e a atividade antiulcerogênica dos extratos vegetais, demonstrando possíveis bioindicadores de suas efetivas funções gastroprotetoras.

Neste trabalho, dando continuidade ao estudo, as mucosas gástricas com úlceras induzidas e tratadas com extratos vegetais serão analisadas através da distribuição dos elementos de suas amostras, a fim de analisar sua constituição elementar. É a primeira vez que o mapeamento de amostras de mucosas gástricas será realizado.



## 2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral aprofundar a compreensão do mecanismo gastroprotetor dos extratos de *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, plantas popularmente utilizadas no tratamento de úlceras, através da análise do mapeamento elementar em mucosa gástrica de animais com úlceras induzidas.

Os objetivos específicos são:

- Induzir, em animais, úlceras com uso de álcool e DAINÉ e analisar os tecidos de mucosa gástrica utilizando a técnica de microfluorescência de raios X ( $\mu$ XRF - *Micro X-Ray Fluorescence*) para obter sua distribuição elementar química.
- Analisar tecidos de mucosa gástrica com úlcera induzida e tratada com os extratos vegetais e correlacionar a composição elementar no local das lesões com a atividade gastroprotetora das plantas analisadas.
- Correlacionar a composição elementar das lesões avaliadas com a atividade gastroprotetora das plantas analisadas.
- Correlacionar as diferenças elementares em diferentes locais da lesão para diferentes modos de indução da úlcera com a efetividade gastroprotetora de cada fitoterápico.

### 3. Fundamentos Teóricos

#### 3.1. Elementos relacionados às úlceras

Os elementos químicos podem ser classificados de acordo com seus níveis de constituição em uma amostra. São classificados como elementos majoritários, quando sua concentração é maior que 100 µg/g; como elementos traço, quando sua concentração está entre 0,01 e 100 µg/g; e como elementos ultra-traços, quando a concentração é menor que 0,01 µg/g (Lindhu, 1991). De acordo com sua função em um organismo, os elementos também podem ser classificados como essenciais ou não essenciais (Cesareo, 1988).

Os tecidos humanos apresentam 15 elementos traço considerados essenciais: Ca, Cu, Cl, F, Fe, I, Mg Mn, Mo, N, P, K, Na, S e Zn (Tolgyessy, Havranek e Dejmekova, 1990). É reconhecido que o excesso ou a deficiência destes elementos, em relação ao nível fisiológico humano, ocorre em portadores de certas doenças (Cesareo, 1988).

Dentre os elementos traço nos tecidos humanos, Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn são nutrientes ou metais essenciais e, por isso, as células têm mecanismos para adquiri-los do seu ambiente extracelular (Martinez-Finley, Chakraborty et al., 2012). Além disso, apresentam atividades relacionadas com o surgimento ou inibição de úlceras.

O elemento Ca demonstra influência na regeneração e proliferação das mucosas danificadas e o Zn se relaciona com a diminuição da secreção gástrica e cicatrização dos tecidos, diminuindo a ocorrência das lesões (Mei, Xu et al, 2013; Aihara, Montrose, 2014).

O Cu em complexos também possui atividade antiulcerogênica promovendo aumento da resistência da mucosa, atenuação da produção do ácido e da secreção do suco gástrico (Tuorkey, Abdul-Aziz, 2009; Baran, 2014). Este elemento também apresenta relação direta com a absorção de Fe e associação à eliminação desses radicais livres (Tapiero, Townsend et al., 2003).

O Mn também apresenta relação com a inibição de úlceras gástricas, diminuindo a produção de muco e promovendo o aumento dos níveis antioxidantes locais (Salami, Adeola et al., 2015; Ibrahim, Hashim, 2016).

O elemento Ferro, por sua vez, tem relação com a formação das úlceras, contribuindo para a perpetuação e/ou ampliação do dano oxidativo das lesões. Além disso, a mucosa

inflamada de pacientes com úlceras contém mais Fe que as áreas não inflamadas (Sturniolo, Mestriner e D'Incà, 2000). Assim como o Fe, o Cl também está relacionado com a formação das lesões, pois é constituinte do ácido gástrico, um dos principais fatores endógenos das úlceras (Soreide, Thorsen et al., 2015).

É bem estabelecido que o ácido gástrico, normalmente produzido, facilita a digestão de proteínas e absorção de elementos químicos e vitamina B-12, além de prevenir o desenvolvimento bacteriano e outras infecções entéricas (Schubert, Peura, 2008).

Neste sentido, as secreções gástricas ácidas ocasionam um aumento da solubilidade dos metais e, apesar do estômago não ser um local de grandes absorções de elementos traços, estes elementos interagem no local e podem ser absorvidos (Cousins, Liuzzi, 2018).

Além do aumento da solubilidade, a absorção de Ca também é facilitada por um baixo pH, assim, na presença da secreção gástrica, sua incorporação torna-se mais eficiente (Soetan, Olaiya et al., 2010). O aumento da concentração deste elemento pode promover o incremento da secreção ácida pelas células parietais, crescendo a necessidade de incorporação de Zn (Soetan, Olaiya et al., 2010; Di Mario, Goni, 2014).

O Cl está envolvido com o equilíbrio de fluidos e eletrólitos e com o fluido gástrico. O cloreto das secreções gástricas é derivado do cloreto sanguíneo e é normalmente reabsorvido durante os últimos estágios de digestão no intestino delgado (Hays and Swenson, 1985; Murray et al., 2000; Soetan, Olaiya et al., 2010).

As DAINES, um dos agentes etiológicos das úlceras no homem, irritam diretamente a mucosa gástrica, interferem de forma negativa na síntese de prostaglandinas e, assim, promovem o incremento da secreção de ácido gástrico e redução da secreção de bicarbonato e o fluxo sanguíneo da mucosa, contribuindo, assim, com o aumento do risco de ulceração (Bhattacharyya, Chattopadhyay et al., 2014). Estas ações estão associadas à inibição das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) (Wallace et al., 2000; Takeuchi, 2012).

O aumento do estresse oxidativo, além da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*), é promovido tanto pela indução de úlceras por DAINE quanto pela indução por álcool (Bhattacharyya, Chattopadhyay et al., 2014).

O álcool é definido como um dos principais fatores para o desenvolvimento de úlceras (Sener, Paskaloglu et al., 2004), diminuindo a liberação de bicarbonato e suprimindo a

produção da mucosa gástrica (Al Batran, Al Bayaty et al., 2013). Além disso, também contribui com o aumento do acúmulo intracelular de Ca (Massignani, Lemos et al., 2009) e de radicais livres (Hernandez-Munoz, Montiel-Ruiz et al., 2000), promovendo danos gástricos.

Uma parte do álcool ingerido é oxidado nas células da mucosa gástrica pela álcool desidrogenase, uma enzima zinco-dependente (Ineu, Oliveira, 2013). O Zn é constituinte de várias enzimas, como a anidrase carbônica, presente na mucosa gastrointestinal e relacionada com a secreção do bicarbonato (Soetan, Olaiya et al., 2010). O elemento apresenta também uma ação antiulcerogênica que ainda não é totalmente esclarecida, mas que está associada à resistência da mucosa gástrica, atuando sobre a liberação do muco e a síntese de prostaglandinas. Além disso, o Zn está relacionado ao retardo de reações dos radicais livres, atuando contra o estresse oxidativo (Arda-Pirincci, Bolkent et al., 2006; Opoka, Adamek et al., 2010).

A semelhança química entre Mn e Fe é responsável por muitas analogias em seus metabolismos. Dessa forma, é sugerido que a deficiência de Fe pode influenciar a deposição de Mn (Cousins, Liuzzi, 2018). Sua absorção também é influenciada pela presença de quantidades excessivas de Ca e P na dieta (Soetan, Olaiya et al., 2010).

### **3.2. Plantas medicinais utilizadas**

Os extratos vegetais analisados neste estudo são de plantas popularmente utilizadas, por comunidades ribeirinhas do Brasil, para o tratamento de doenças gástricas, incluindo as úlceras.

Da família Euphorbiaceae, a *Alchornea glandulosa* é uma árvore conhecida como tapiá, tanheiro de folha redonda, tanheiro ou canela-raposa (Figura 2). Possui de 10 a 20 m de altura e pode ser encontrada nas regiões sul e sudoeste do Brasil, principalmente na região de Mata Atlântica e de vegetação ciliar (Lorenzi, 1998; Calvo, Lima et al., 2007; Bi, Man, Man, 2014).

De acordo com estudos etnofarmacológicos, algumas espécies do gênero *Alchornea* são empregadas para o tratamento de doenças gástricas (Osabede e Okoye, 2003; Calvo, Lima et al., 2007).

Figura 2: *Alchornea glandulosa*

Fonte: Lorenzi, 1998

Nestes estudos, animais tratados com extrato metanólico obtido das folhas de *A. glandulosa*, numa dose de 500 mg/kg, demonstraram uma redução de 57% das úlceras gástricas induzidas por etanol em relação ao grupo controle. Este tratamento também demonstrou redução das lesões induzidas por solução de HCl/Etanol (46%) e por DAINÉ (34%) (Calvo, Lima et al., 2007).

Figura 3: *Davilla elliptica*

Fonte: Korndörfer, 2006

A espécie *Davilla elliptica* (Figura 3), da família Dilleniaceae, é encontrada freqüentemente no cerrado e conhecida popularmente como sambaibinha, muricizinho, lixeirinha, lixeira e lixinha. É uma planta arbustiva de até 3 m de altura, indicada, entre outras coisas, para tratamento de diarreia e úlceras gástricas (Silva, Silva et al., 2001; Rodrigues e Carvalho, 2001; Kushima, Nishijima et al., 2009; Bi, Man et al., 2016).

Num modelo de úlcera induzida por etanol em animais, o tratamento com o extrato etanólico de *D. elliptica*, na dose de 500 mg/kg, apresentou 95% de proteção da mucosa gástrica, em relação ao grupo controle. E no modelo de úlcera induzida por DAINE, o extrato de *D. elliptica*, na mesma dose, também apresentou efeito gastroprotetor, promovendo 77% de proteção (Kushima, Nishijima et al., 2009).

Outra espécie da família Dilleniaceae é a *Davilla nitida* (Figura 4), conhecida popularmente como sambaibinha ou cipó-de-fogo. É um arbusto trepador encontrado no cerrado e pode atingir 4 m de altura (Kushima, Nishijima et al., 2009; Bi, Man et al., 2016).

Figura 4: *Davilla nitida*



Fonte: Pickering, Wyatt, 2006.

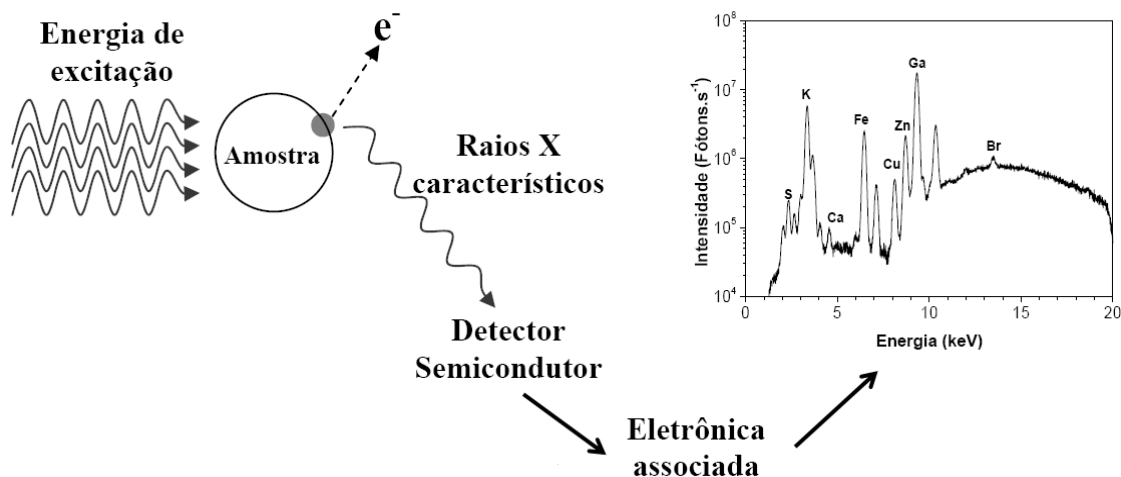
Apesar de poucos estudos com esta planta, Kushima, Nishijima e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento de animais com o extrato metanólico de *D. nitida* apresentou uma ação efetiva na redução de úlceras induzidas por etanol, promovendo 88% de proteção em relação ao grupo controle. Com a mesma dose, o extrato apresentou 67% de proteção em relação a úlceras induzidas por DAINE.

### 3.3. Fluorescência de raios X

A fluorescência de raios X (XRF, *X-ray Fluorescence*) é uma técnica de análise utilizada para a caracterização, qualitativa e quantitativa, dos elementos constituintes de uma amostra. O método se baseia na detecção de raios X produzidos pelos elementos da amostra quando devidamente excitada (Figura 5) (Nascimento-Filho, 1999; Marguí, Zawisza, Sitko, 2014; Klockenkämper, Von Bohlen, 2015).

Quando um determinado elemento da amostra é irradiado por um fóton incidente com energia igual ou superior à energia de ligação do elétron de um dado orbital, este fica num estado excitado e tende a ejetar os elétrons dos níveis mais internos dos átomos, produzindo uma lacuna. Como consequência, elétrons dos níveis de maiores energias realizam um salto quântico para preencher a vacância. Por passarem de um nível mais energético para um menos energético, eles emitem energia excedente na forma de fótons de raios X, com energia característica e bem definida de cada elemento (Nascimento-Filho, 1999; Klockenkämper, Von Bohlen, 2015).

Figura 5: Processos básicos da XRF



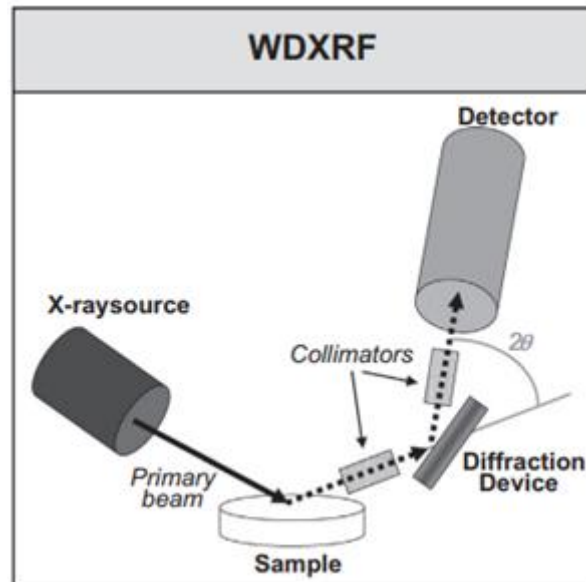
Fonte: Serpa, 2007.

A XRF apresenta duas variantes: a WDXRF (*Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence* - fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda) e a EDXRF (*Energy Dispersive X-ray Fluorescence* - fluorescência de raios X por dispersão de energia) (Marguí, Zawisza, Sitko, 2014).

A WDXRF é realizada por espectrômetros e o movimento sincronizado e preciso entre o cristal difrator e o detector se faz necessário (Figura 6). Nesta técnica, a radiação

característica é selecionada pelo cristal difrator de acordo com seus comprimentos de onda (Jenkins, 1981; Nascimento-Filho, 1999; Marguí, Zawisza, Sitko, 2014).

Figura 6: Geometria de excitação-deteccção da WDXRF



Fonte: Marguí, Zawisza, Sitko, 2014.

A EDXRF é realizada por detectores semicondutores, possibilitando a distinção dos raios X com energias bem próximas. A radiação é selecionada através de pulsos eletrônicos produzidos no detector, diretamente proporcionais às suas energias (Jenkins, 1981; Nascimento-Filho, 1999; Marguí, Zawisza, Sitko, 2014).

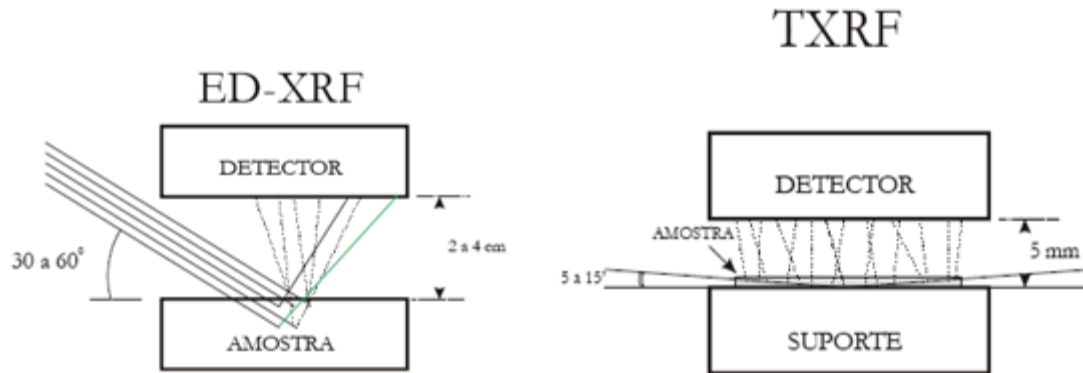
Embora a EDXRF seja menos complexa que a WDXRF, as duas técnicas apresentam como desvantagem a necessidade de métodos para correção do efeito matriz (absorção e reforço dos raios X característicos pelas interações entre os elementos constituintes da amostra) (Nascimento-Filho, 1999). Essa necessidade não é necessária na fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF, *Total Reflection X-ray Fluorescence*), uma variante da técnica de EDXRF.

A TXRF se baseia na excitação de raios X característicos de uma amostra por radiação também de raios X, com certo ângulo de incidência mínimo para que o feixe incidente não interaja com o suporte e atravesse toda a amostra (Figura 7) (Nascimento-Filho, 1999; Klockenkämper, Von Bohlen, 2015). Aplica-se o efeito da reflexão total para diminuir a intensidade da radiação e fundo e aumentar o sinal de fluorescência. Outra característica da técnica é a pequena distância entre o detector e a amostra (alguns mm), proporcionando uma



deteção eficiente da fluorescência dos elementos da amostra (Klockenkämper, Von Bohlen, 2015).

Figura 7: Geometria de excitação-deteção da EDXRF e TXRF



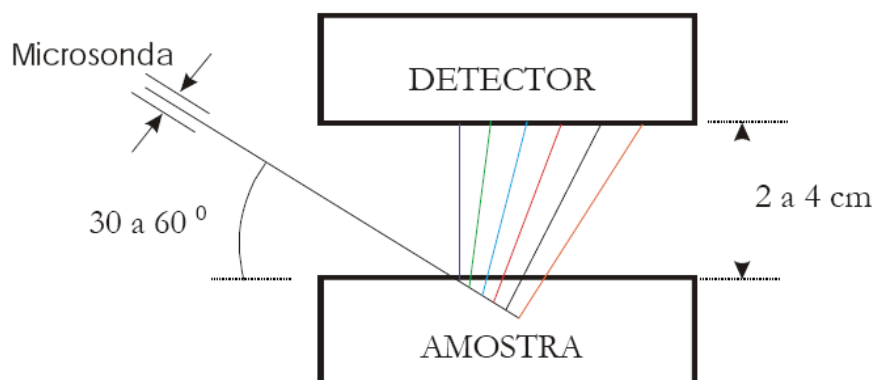
Fonte: Nascimento-Filho, 1999.

### 3.3.1. Microfluorescência de raios X

Outra subvariante da EDXRF é a microfluorescência de raios X ( $\mu$ XRF, *Micro X-ray Fluorescence*), que será utilizada neste trabalho.

Esta técnica difere da EDXRF principalmente na geometria e nas dimensões do feixe (focalizado por um capilar da ordem de  $\mu\text{m}$ ), e possui a capacidade de análise espacial, ou seja, é capaz de produzir mapas bidimensionais, demonstrando a localização dos elementos constituintes da amostra irradiada (Figura 8) (Bernasconi, Haselberger, Markowicz, 1994; Vergucht, Samber et al., 2015; Rezende, Bönecker, 2016).

Figura 8: Geometria de excitação-deteção da  $\mu$ XRF



Fonte: Bernasconi, Haselberger, Markowicz, 1994.

Na  $\mu$ XRF, a excitação de raios X característicos da amostra é também realizada pela radiação eletromagnética, que apresenta vantagens em relação a outras fontes, como baixa energia de dissipação; e redução do background, melhorando os limites de detecção (Prins, 1984; Vergucht, Samber et al., 2015).

Para a obtenção do mapa elementar, a área a ser analisada é dividida em pixels e, em cada um, obtém-se um espectro de fluorescência de raios X (Prins, 1984; Vergucht, Samber et al., 2015).

Após a obtenção dos espectros, a análise por  $\mu$ XRF requer métodos para correção do efeito matriz, como absorção e reforço dos raios X característicos, devido às interações entre os elementos constituintes da amostra.

Quando é utilizada a excitação por radiação eletromagnética monoenergética, tem-se:

$$I = c \cdot S \cdot A \quad (1)$$

na qual  $I$  representa a intensidade total dos raios X característicos (cps),  $c$  é a concentração ( $\text{g}\cdot\text{cm}^2$ ),  $S$  é a sensibilidade elementar ( $\text{cps}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^2$ ) e  $A$  é o fator de absorção (adimensional) para o elemento de interesse.

A sensibilidade elementar  $S$  é dada por:

$$S = \tau \cdot w \cdot f \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot G \cdot \varepsilon \quad (2)$$

na qual  $\tau$  representa o coeficiente de absorção do elemento para o efeito fotoelétrico na energia da radiação incidente ( $\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $w$  é o rendimento da fluorescência para os raios X K (fração),  $f$  é a fração dos fótons emitidos como raios X  $K_\alpha$ ,  $\left(1 - \frac{1}{j}\right)$  é a razão de *jump* no corte de absorção K,  $G$  é o fator geométrico e  $\varepsilon$  é a eficiência do detector para os raios X característico emitido pelo elemento.

E o fator de absorção  $A$  é dado pela equação:

$$A = \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi \cdot \rho_0 \cdot D} \quad (3)$$

na qual  $\rho_0$  é a densidade da amostra ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $D$  é a espessura da matriz (cm) e  $\chi$  é o coeficiente de absorção total da matriz ( $\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ), que é dado pela equação:

$$\chi = \frac{\mu_0}{\text{sen}\theta_0} + \frac{\mu}{\text{sen}\theta} \quad (4)$$

na qual  $\mu_0$  e  $\mu$  são os coeficientes de absorção da matriz ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) para as energias da radiação incidente e dos raios X característicos, respectivamente, e  $\theta_0$  e  $\theta$  são os ângulos das radiações incidente e emergente, respectivamente, em relação à superfície da amostra.

Ao multiplicar toda a equação (1) por  $\frac{\rho_0 D}{\rho_0 D}$ , tem-se que:

$$I = c \cdot S \cdot A \cdot \frac{\rho_0 D}{\rho_0 D} \quad (5)$$

e considerando que:

$$C = \frac{c}{\rho_0 D} \quad (6)$$

e

$$A = A' \cdot \rho_0 \cdot D \quad (7)$$

a equação (5) pode ser reescrita na forma de:

$$I = C \cdot S \cdot A' \quad (8)$$

na qual  $C$  representa a fração da concentração e  $A'$  é o novo fator de absorção dimensional ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Para amostras consideradas finas, tem-se que  $A = 1$  e para amostras consideradas espessas,  $A = \frac{1}{\chi \cdot \rho_0 \cdot D}$  (Nascimento-Filho, 1999; Vergucht, Samber et al., 2015).

Portanto, a determinação da concentração de dado elemento em uma amostra pode ser efetuada através da medida da intensidade da radiação fluorescente, do conhecimento da sensibilidade do sistema (obtida por amostras-padrão) e da absorção da radiação na amostra.

### 3.4. Radiação síncrotron

Para análises quantitativas, utiliza-se a luz síncrotron associada à técnica de  $\mu\text{XRF}$ . A luz síncrotron é a radiação eletromagnética de alta intensidade emitida por partículas carregadas e aceleradas numa trajetória circular. Por ação de dipolos magnéticos, quando essas partículas mudam de direção, emitem intensa radiação, denominada luz, ou radiação, síncrotron (Gordon, Hanson et al., 1990; Klockenkämper e Von Bohlen, 2015).

Este tipo de radiação apresenta elevada intensidade espectral, quando comparada com a radiação produzida num tubo de raios X convencionais, e elevada polarização, possibilitando um reduzido *background* espectral. Possui também diferentes energias e comprimentos de ondas espectrais, abrangendo do infravermelho aos raios X. Além disso, o uso deste tipo de fonte de radiação permite o alcance de baixos limites de detecção, quando comparados com o uso de tubos de raios X de alta potência (Klockenkämper e Von Bohlen, 2015).

Este tipo de radiação é encontrado em laboratórios devidamente equipados, como o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas/SP, sendo o único existente na América Latina (Figura 9).

O LNLS é formado por 17 estações experimentais, com feixes de raios X, infravermelho ou radiação ultravioleta, fornecendo a usuários do Brasil e do exterior uma excelente infraestrutura para o desenvolvimento de pesquisas (LNLS, 2018).

Figura 9: Visão do anel de armazenamento do feixe do LNLS



## 4. Material e Métodos

### 4.1. Preparação das amostras

As amostras foram preparadas no Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais – UNESP/Botucatu.

Para a preparação dos extratos, folhas de *A. glandulosa*, *D. elliptica* e *D. nitida* foram extraídas por metanol. Folhas secas de *A. glandulosa* foram extraídas durante 48 h e folhas secas de *D. elliptica* e *D. nitida* foram extraídas durante 1 semana. Após a evaporação do

solvente, os extratos metanólicos foram obtidos e mantidos a 5°C até as administrações nos animais (Calvo, Lima et al., 2007; Kushima, Nishijima et al., 2009).

Para as análises das composições elementares das mucosas gástricas com úlceras induzidas e tratadas com os extratos de função gastroprotetora, foram utilizados ratos machos Wistar (181-285 g), provenientes do Biotério Central – UNESP/Botucatu. Esses animais foram aclimatados às condições do biotério, num ciclo de claro-escuro de 12 horas controlado, e ração e água *ad libitum*. Antes do experimento, os animais foram submetidos a jejum por 24 horas.

Os animais (n=27) foram divididos em 9 grupos (n=3), de acordo com a Tabela 1: Grupos experimentais com seus respectivos tratamentos e induções de úlcera.. Os animais do grupo sham não foram tratados nem tiveram úlceras induzidas, somente passaram pelo estresse do experimento.

Tabela 1: Grupos experimentais com seus respectivos tratamentos e induções de úlcera.

Grupo sham					
Sem tratamento e sem indução					
Grupo A			Grupo B		
	Tratamento	Indução		Tratamento	Indução
<b>1A (controle)</b>	Solução salina		<b>1B (controle)</b>	Solução salina	Á
<b>2A</b>	<i>A. glandulosa</i>	D	<b>2B</b>	<i>A. glandulosa</i>	L
<b>3A</b>	<i>D. elliptica</i>	A	<b>3B</b>	<i>D. elliptica</i>	C
<b>4A</b>	<i>D. nitida</i>	I			O
		N			O
		E			L
			<b>4B</b>	<i>D. nitida</i>	

Antes das induções de úlcera, os grupos controles (1A e 1B) receberam a administração de solução salina, por via oral, num volume de 10 ml/kg, e os outros animais, separados em 3 grupos, foram tratados com extrato vegetal administrado, por via oral, num volume de 10 ml/kg, na dose de 500 mg/kg (Calvo, Lima et al., 2007; Kushima, Nishijima et al., 2009).

Após o tratamento, o grupo A teve indução de úlcera por indometacina (DAINE) e os animais receberam uma dose de 50 mg/kg, administrada no volume de 10 ml/kg. Após 4

horas, esses animais foram sacrificados e seus estômagos retirados (Calvo, Lima et al., 2007; Kushima, Nishijima et al., 2009).

No grupo B, que teve úlcera induzida por álcool, o etanol 100% foi utilizado, sendo administrado 1 ml por via oral em cada animal. Após 30 minutos, esses animais foram sacrificados e seus estômagos retirados (Calvo, Lima et al., 2007; Kushima, Nishijima et al., 2009).

Os estômagos obtidos foram abertos ao longo da grande curvatura e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

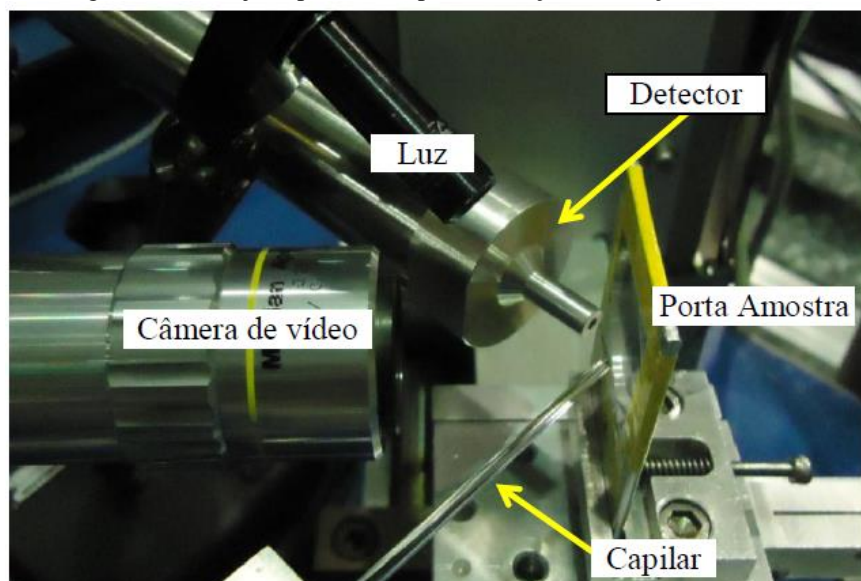
Para obtenção das secções, as amostras foram posicionadas em um micrótomo manual e seccionadas na espessura de 60  $\mu\text{m}$ . A seguir, os cortes foram colocados sobre filme Ultralene<sup>®</sup> e congelados.

#### 4.2. Arranjo experimental

As medidas foram realizadas na Linha D09B - XRF, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas/SP.

Para as medidas, as amostras colocadas sobre filme Ultralene<sup>®</sup> foram posicionadas no suporte alocado a 45° em relação ao detector e ao feixe de radiação incidente, um feixe branco com energias entre 4 e 23 keV (Figura 10). Cada amostra foi mapeada de acordo com sua dimensão, e o tempo de contagem para cada pixel foi de 1 s.

Figura 10: Arranjo experimental para excitação e detecção dos raios X



A detecção dos raios X característicos produzidos em cada pixel foi realizada por um detector Si(Li), com resolução de 165 eV em 5,9 keV, posicionado a 90° em relação ao feixe incidente, no plano da órbita dos elétrons, com o objetivo de minimizar a radiação de fundo espectral (Pérez, Radtke et al., 1999).

Os espectros da radiação obtidos foram analisados utilizando os *softwares* PyMca (SOLE, 2007) e Surfer (Golden Software Inc.), obtendo-se o mapeamento dos elementos químicos nas amostras.

Para validação da metodologia, foi utilizada uma amostra certificada de fígado bovino (NIST 1577b), do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), analisada da mesma forma que as outras amostras, com um tempo de contagem para cada pixel de 10 s. Os espectros obtidos para esta amostra também foram analisados pelo *software* PyMca.

Após a aquisição dos espectros de radiação, mapas da distribuição elementar de cada amostra foram gerados, de acordo com a concentração de cada elemento constituinte. Analisando a distribuição espacial dos elementos nas amostras e comparando com suas imagens correspondentes, podemos verificar o comportamento das concentrações elementares dentro e fora das lesões ulcerativas.

### **4.3. Análise estatística**

As concentrações dos elementos foram analisadas, estatisticamente, pelo método de análise de variância (ANOVA) para comparação de mais de duas amostras.

Após ANOVA, a análise foi complementada com comparação múltipla de Bonferroni, utilizando nível de significância de 5%. Esta análise foi realizada no programa R, versão 3.4.2 (*The R Foundation for Statistical Computing*).

#### **4.3.1. Análise de agrupamento (*cluster*)**

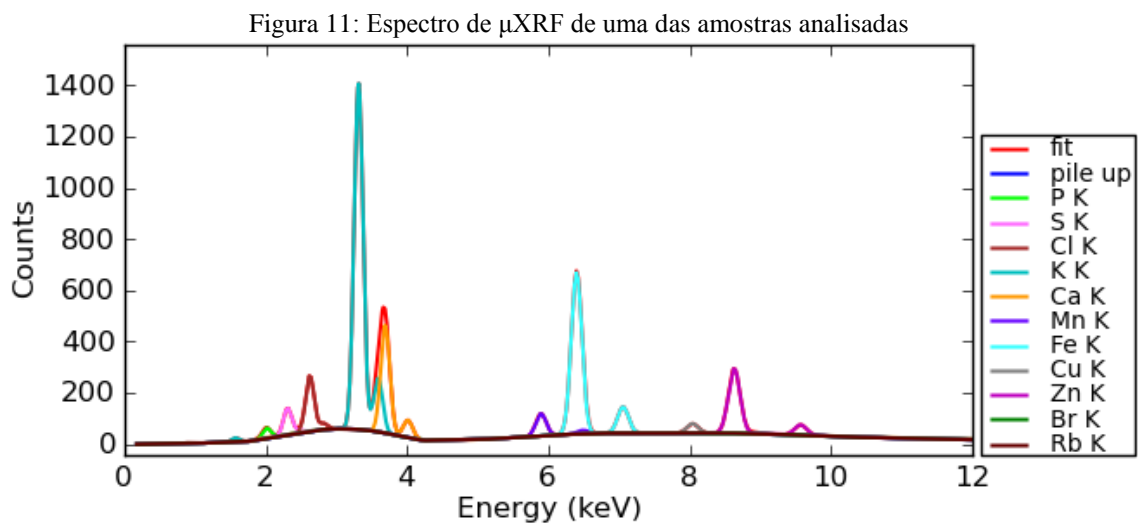
Com a obtenção das intensidades dos diferentes elementos, a análise de agrupamento (*cluster*) também foi realizada com o objetivo de agrupar as amostras, de tal forma que os grupos apresentam alta homogeneidade interna e alta heterogeneidade externa (Mingoti, 2005).

Para a análise, foram utilizados a distância euclidiana e o método de agrupamento hierárquico de Ward. Os grupos criados foram representados em dendrogramas, nos quais distâncias de dissimilaridade podem ser observadas. Quanto maior for a medida de dissimilaridade, menor será a semelhança entre os grupos.

Os cálculos da análise de grupamento foram realizados no programa R, versão 3.4.2 (*The R Foundation for Statistical Computing*).

## 5. Resultados e Discussão

A Figura 11 apresenta um exemplo do espectro de  $\mu$ XRF de uma amostra analisada. Com as condições experimentais previamente descritas, foi possível detectar os elementos P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br e Rb.



Como dito anteriormente, os elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn apresentam atividades relacionadas com o surgimento ou inibição das úlceras. Dessa forma, os resultados foram analisados para esses elementos.

A metodologia foi validada pela análise de amostra certificada de fígado bovino (NIST 1577b) e os resultados estão apresentados na Tabela A1, do Apêndice.

### 5.1. Análise das amostras de úlceras induzidas

O impacto na distribuição dos elementos no tecido gástrico a partir de protocolos de indução de úlceras, baseados em dois fatores etiológicos da doença no homem, foi



investigado, juntamente com a análise de amostras sem úlcera induzida. As Figuras 12, 13 e 14 apresentam os mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn nas amostras dos grupos sham (sem indução de úlcera), 1A (úlcera induzida por DAINÉ) e 1B (úlcera induzida por álcool), respectivamente.

A partir de uma inspeção simples nos mapas da distribuição espacial dos elementos na superfície do tecido gástrico, do grupo sham (Figura 12), pode-se verificar que todos os elementos analisados apresentam suas concentrações distribuídas uniformemente, não sendo possível identificar heterogeneidade na disposição das mesmas.

Quando houve a indução de úlcera pelos dois protocolos utilizados, a distribuição da concentração de alguns elementos foi alterada (Figuras 13 e 14).

Nas amostras de úlcera induzida por DAINÉ (Figura 13), foram constatados níveis de concentração maiores dos elementos Fe, Cu e Zn no interior da úlcera, quando comparados com os valores determinados na região fora da lesão. Por outro lado, os elementos Cl, Ca e Mn apresentaram concentrações semelhantes dentro e fora da lesão.

Nas amostras de úlcera induzida por álcool (Figura 14), os elementos Cl, Cu e Zn apresentaram maiores concentrações no interior da lesão, enquanto Ca, Mn e Fe demonstraram concentrações análogas dentro e fora dela.

Como resultado da análise por simples inspeção da distribuição espacial das concentrações elementares em tecidos gástricos com úlceras induzidas, pode-se observar que os elementos Cu e Zn apresentaram maior concentração no interior da lesão, independente do protocolo utilizado. Adicionalmente, o elemento Fe e o elemento Cl também apresentaram concentração maior no interior da lesão induzida por DAINÉ e induzida por álcool, respectivamente.

Dessa forma, pode-se sugerir uma distinção entre o efeito dos dois protocolos de indução de úlcera levando em consideração a diferença nas concentrações dos elementos Fe e Cl, no interior e fora da lesão ulcerativa, de acordo com o modelo de indução utilizado.

Figura 12: Imagem de uma amostra de mucosa gástrica sem úlcera induzida (sham) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra.

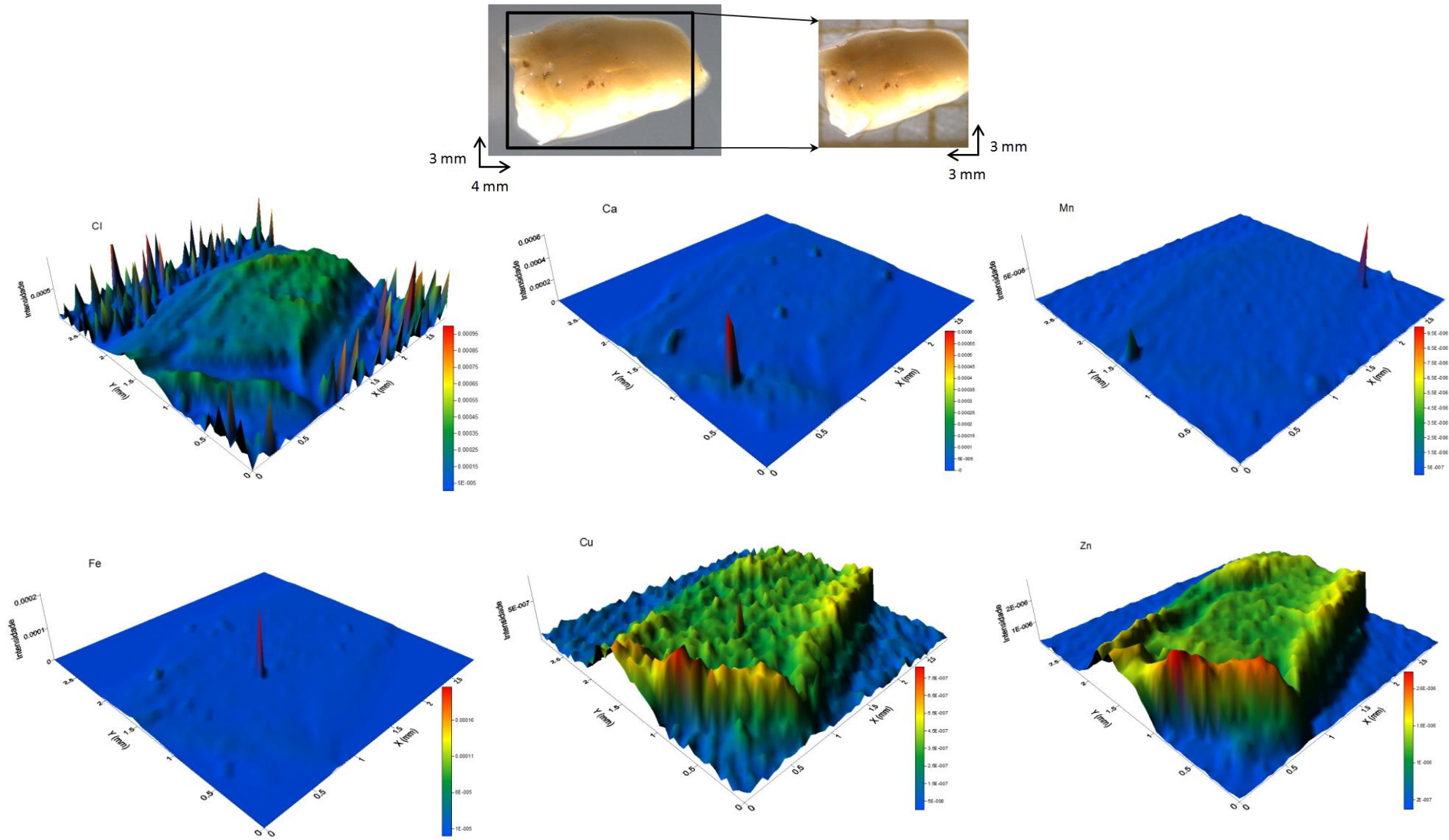


Figura 13: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por DAINÉ (1A) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra

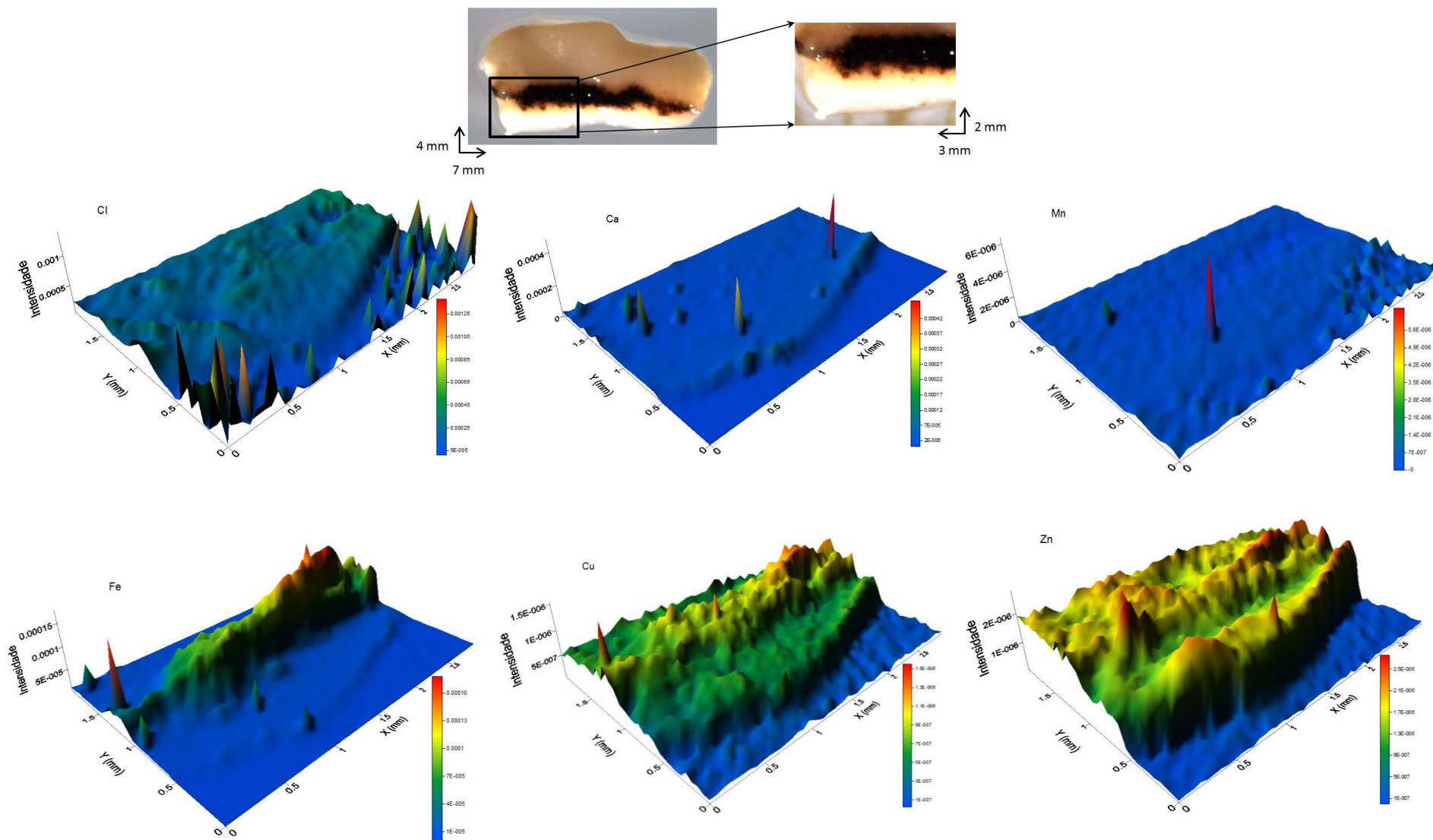
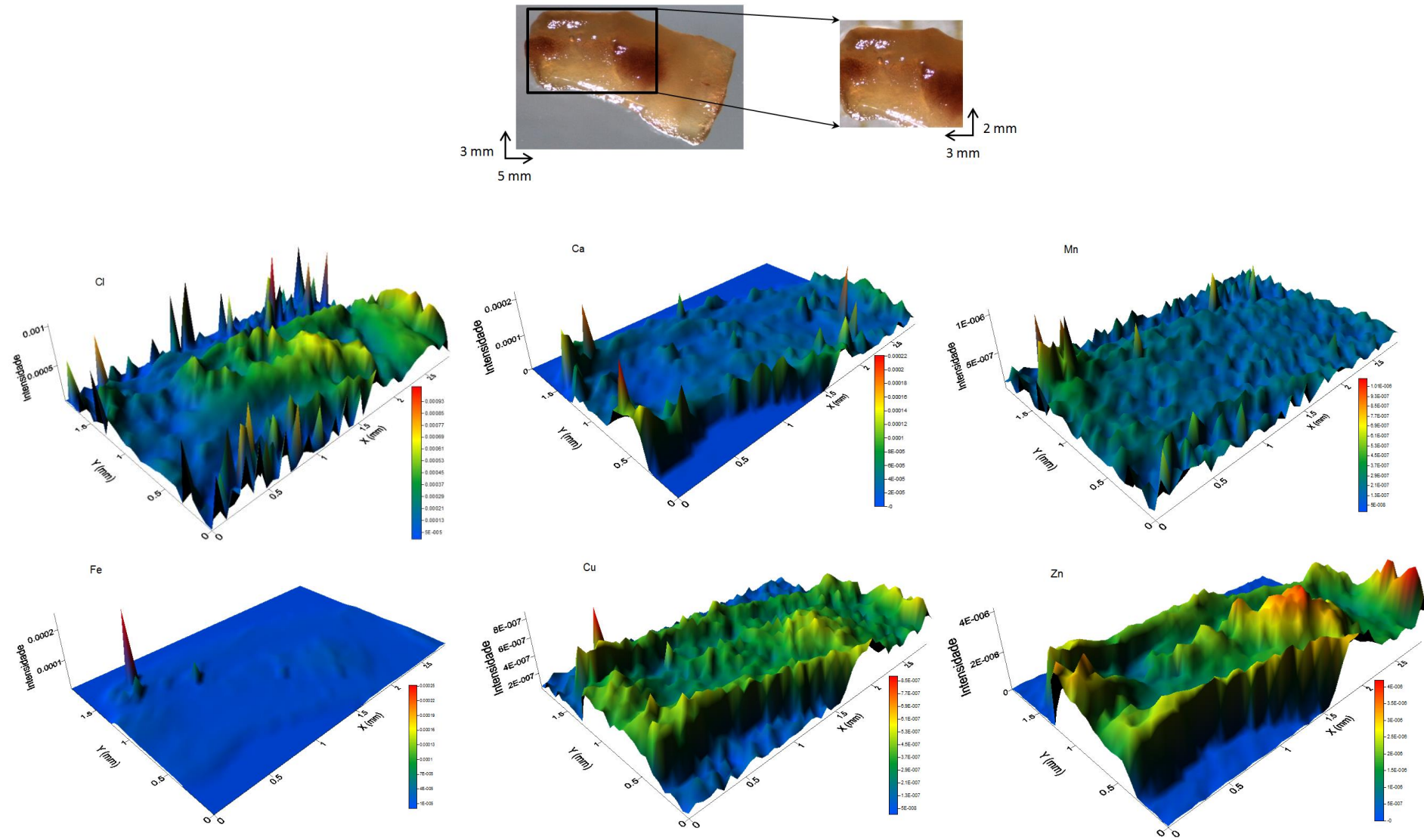


Figura 14: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por álcool (1B) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra



Para verificar esses resultados, foi realizada uma análise estatística das concentrações dos elementos em regiões definidas, dentro e fora das lesões. Para cada grupo, foram identificadas regiões dentro e fora da lesão e, para cada uma, foram tomadas três amostras representativas, numa dimensão de  $180 \times 180 \mu\text{m}^2$ . Os resultados das intensidades determinadas para os elementos Ca, Cl, Mn, Fe, Cu e Zn estão demonstrados, na forma de *boxplot*, na Figura 15.

Nesta análise, pode-se verificar que a maior concentração de Ca foi obtida fora da lesão induzida por etanol (1B), apesar de não apresentar diferença estatística com a concentração no interior da lesão. A menor concentração do elemento foi demonstrada nas amostras do grupo sham, que apresentou diferenças estatísticas com os valores obtidos dentro e fora da lesão induzida por álcool (1B) ( $p < 0,05$ ) e foi semelhante às concentrações das amostras induzidas por DAINÉ (1A), tanto dentro quanto fora da lesão.

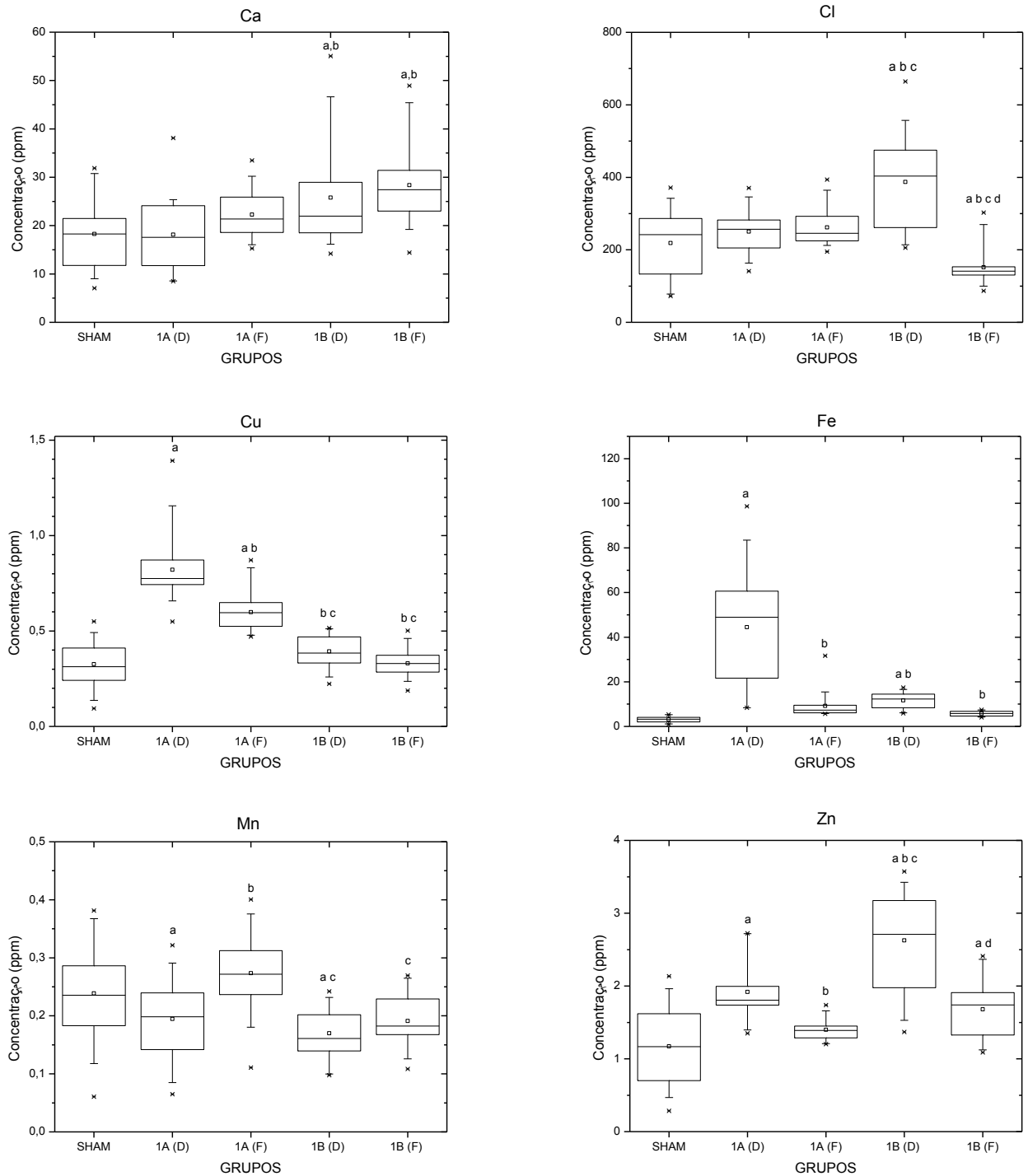
A maior concentração de Cl ocorreu no interior da lesão induzida por etanol (1B). Nas amostras do grupo sham, o elemento apresentou menor nível e diferenças estatísticas com os valores obtidos dentro e fora da lesão induzida por álcool (1B) ( $p < 0,05$ ) e foi equivalente às concentrações das amostras induzidas por DAINÉ (1A).

A maior concentração de Cu ocorreu no interior da lesão induzida por DAINÉ (1A) e a menor concentração ocorreu no grupo sham, apesar de não apresentar diferenças estatísticas com as concentrações do grupo induzido por álcool (1B), tanto dentro quanto fora da lesão.

Assim como o Cu, a maior concentração de Fe foi evidenciada dentro da lesão induzida por DAINÉ (1A). Sua menor concentração também foi verificada no grupo sham, mas apresentou diferenças estatísticas com os valores obtidos dentro das lesões induzidas pelos diferentes protocolos ( $p < 0,05$ ). A concentração de Fe dentro da lesão induzida por DAINÉ (1A) apresentou diferença estatística com a concentração obtida fora da lesão. Na amostra induzida por álcool (1B), as concentrações não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A maior e menor concentração de Mn foi demonstrada fora da lesão induzida por DAINÉ (1A) e dentro da lesão induzida por álcool (1B), respectivamente, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas com a concentração no interior da lesão.

Figura 15: Concentração dos elementos em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, nas amostras sem indução (sham) e com indução de úlcera por DAINE (1A) e por álcool (1B).



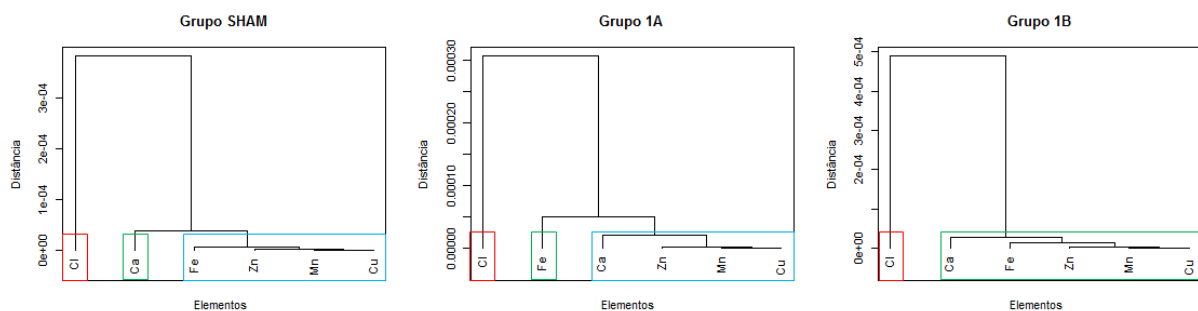
<sup>a</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo sham. <sup>b</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 1A(D). <sup>c</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 1A(F). <sup>d</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 1B(D).

A concentração de Zn nas amostras do grupo sham apresentou diferenças estatísticas com os valores apresentados nas amostras induzidas por álcool (1B), tanto dentro quanto fora

da lesão ( $p < 0,05$ ) e foi semelhante às concentrações fora da lesão das amostras induzidas por DAINE (1A).

Para analisar os elementos de acordo com sua similaridade, foi realizada a análise de agrupamento (*cluster*) sobre os dados. Como evidenciado na Figura 16, é possível identificar estruturas de agrupamentos diferentes entre os elementos em função do protocolo de indução de úlcera.

Figura 16: Resultado da análise de agrupamento (*cluster*) hierárquico para grupos sham, 1A (úlceras induzidas por DAINE) e 1B (úlceras induzidas por álcool) com as respectivas associações entre os elementos.



O grupo sham apresenta três grupos de elementos: um conjunto formado somente pelo elemento Cl, outro grupo formado somente pelo elemento Ca e o terceiro composto pelos elementos Fe, Zn, Mn e Cu. Como é estabelecido neste tipo de análise, componentes do mesmo grupo estão melhores correlacionados entre si melhor que com elementos de outros grupos. No grupo sham, a correlação entre Fe, Zn, Mn e Cu é melhor que a correlação desses elementos com Cl e Ca. Esta correlação apresentada é modificada com a indução de úlcera por DAINE (1A) e por álcool (1B).

Nos dados obtidos para as amostras com indução da úlcera por DAINE (1A), os elementos Cl e Fe formam dois grupos isolados e um terceiro grupo é identificado com os elementos Ca, Zn, Mn e Cu. Para as medidas em amostras com indução por álcool (1B), é possível identificar somente dois agrupamentos: o elemento Cl isolado e um conjunto formado pelos elementos Ca, Fe, Zn, Mn e Cu.

Pela análise de *cluster*, então, pode-se dizer que os elementos apresentam modificação em suas correlações, dependendo do tipo de protocolo de lesão induzida, principalmente nas correlações dos elementos Ca e Fe.

## 5.2. Análise das amostras de úlceras induzidas por DAINE e tratadas com extratos vegetais

A alteração da distribuição dos elementos no tecido gástrico com úlceras induzidas pela indometacina, uma DAINE, e tratado com extratos vegetais, popularmente utilizados, também foi analisada.

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam os mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn nas amostras dos grupos 2A (úlceras induzidas por DAINE e tratadas com *A. glandulosa*), 3A (úlceras induzidas por DAINE e tratadas com *D. elliptica*) e 4A (úlceras induzidas por DAINE e tratadas com *D. nitida*), respectivamente.

Nas amostras tratadas com *A. glandulosa* (Figura 17), lesões foram visíveis e apresentaram picos isolados de concentrações de Cu e Zn. Os teores dos elementos Cl, Ca, Mn e Fe foram uniformes em toda a amostra.

A ação gastroprotetora da *A. glandulosa* está associada com o aumento do mecanismo de defesa da mucosa gastrointestinal, abrangendo a participação do óxido nítrico e de compostos sulfidrílicos, que aumentam o muco e reduzem a acidez gástrica (Calvo, Lima et al., 2007).

As amostras tratadas com *D. elliptica* (Figura 18) e *D. nitida* (Figura 19) apresentaram distribuições similares: lesão visível e maior concentração dos elementos Ca, Mn, Fe e Zn e picos isolados da concentração de Cu dentro da lesão. O elemento Cl teve sua concentração uniformemente distribuída nas amostras dos dois tratamentos.

A ação gastroprotetora dos extratos de *D. elliptica* e *D. nitida* também está associada ao aumento da produção de muco.

A distribuição elementar nas amostras de úlcera induzida por DAINE, sem tratamento, demonstrou alta concentração dos elementos Fe, Cu e Zn no interior da lesão (Figura 13). Nas amostras tratadas com os extratos vegetais, essa distribuição foi alterada.

Nas amostras tratadas com *Alchornea glandulosa*, as concentrações de Cu e Zn no interior da lesão continuaram maiores que as do tecido sadio. As concentrações de Fe foram levadas a níveis semelhantes aos de tecido sadio, confirmando função anti-inflamatória do extrato.



Figura 17: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por DAINE e tratada com *Alchornea glandulosa* (2A) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra

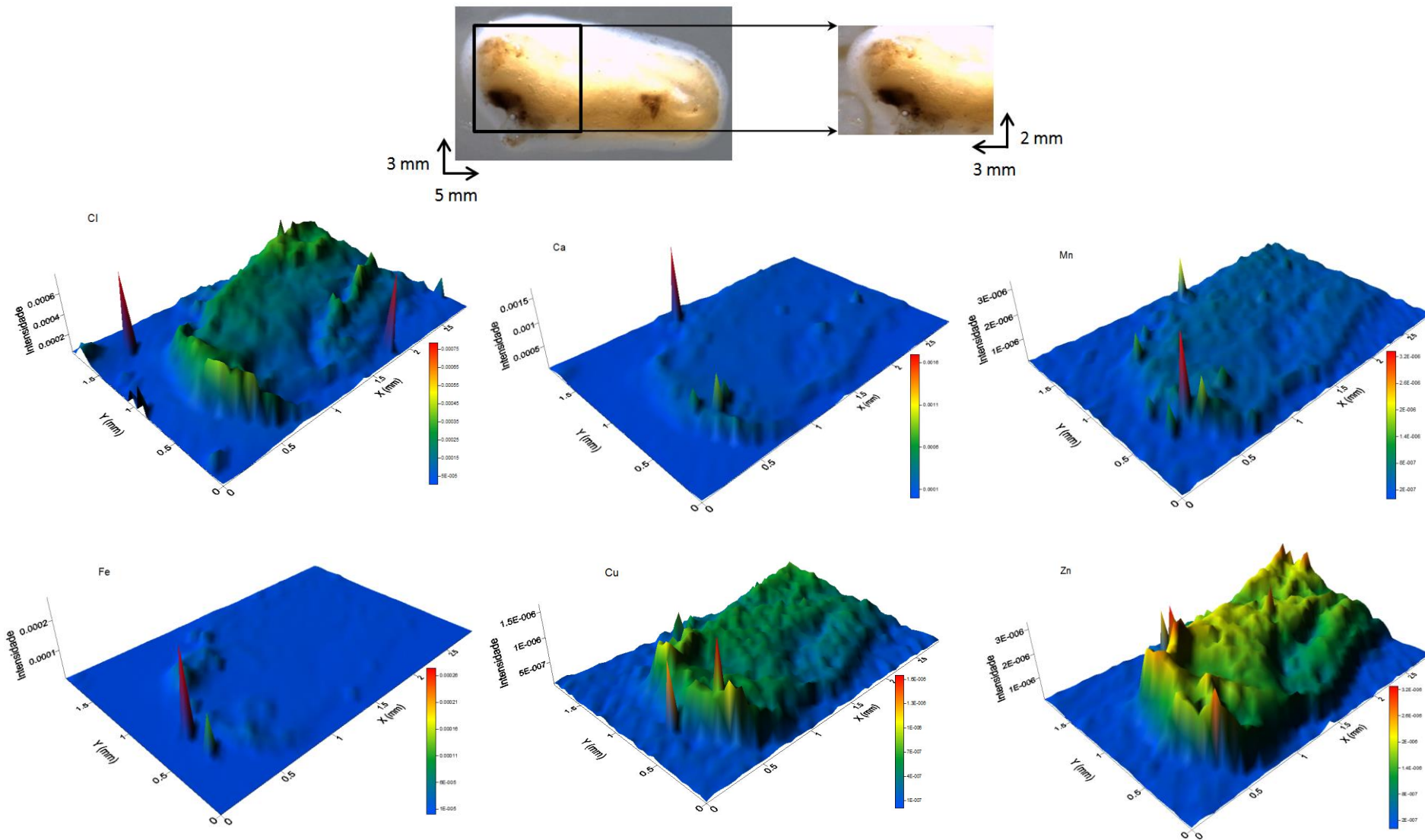


Figura 18: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por DAINÉ e tratada com *Davilla elliptica* (3A) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra

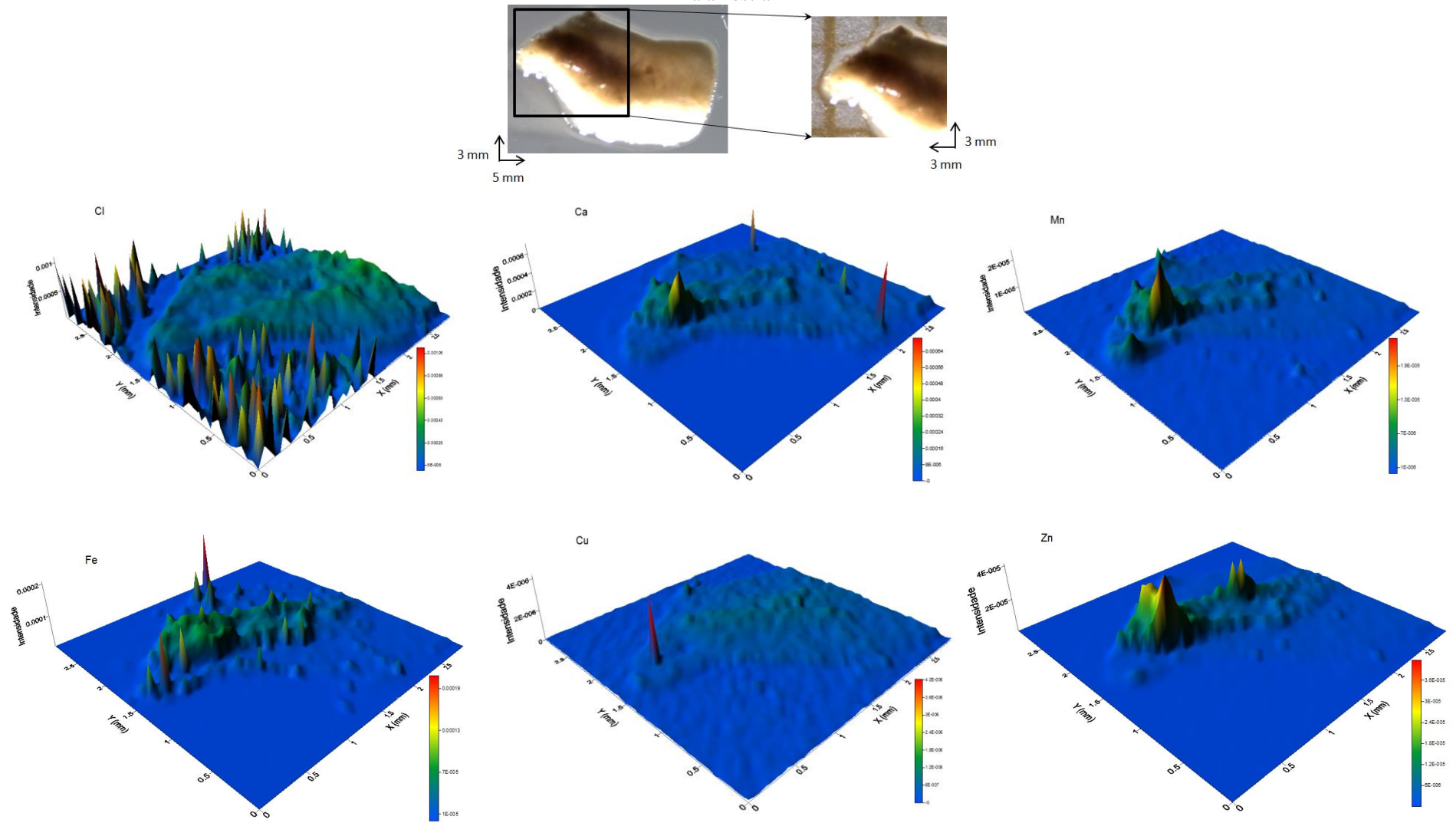
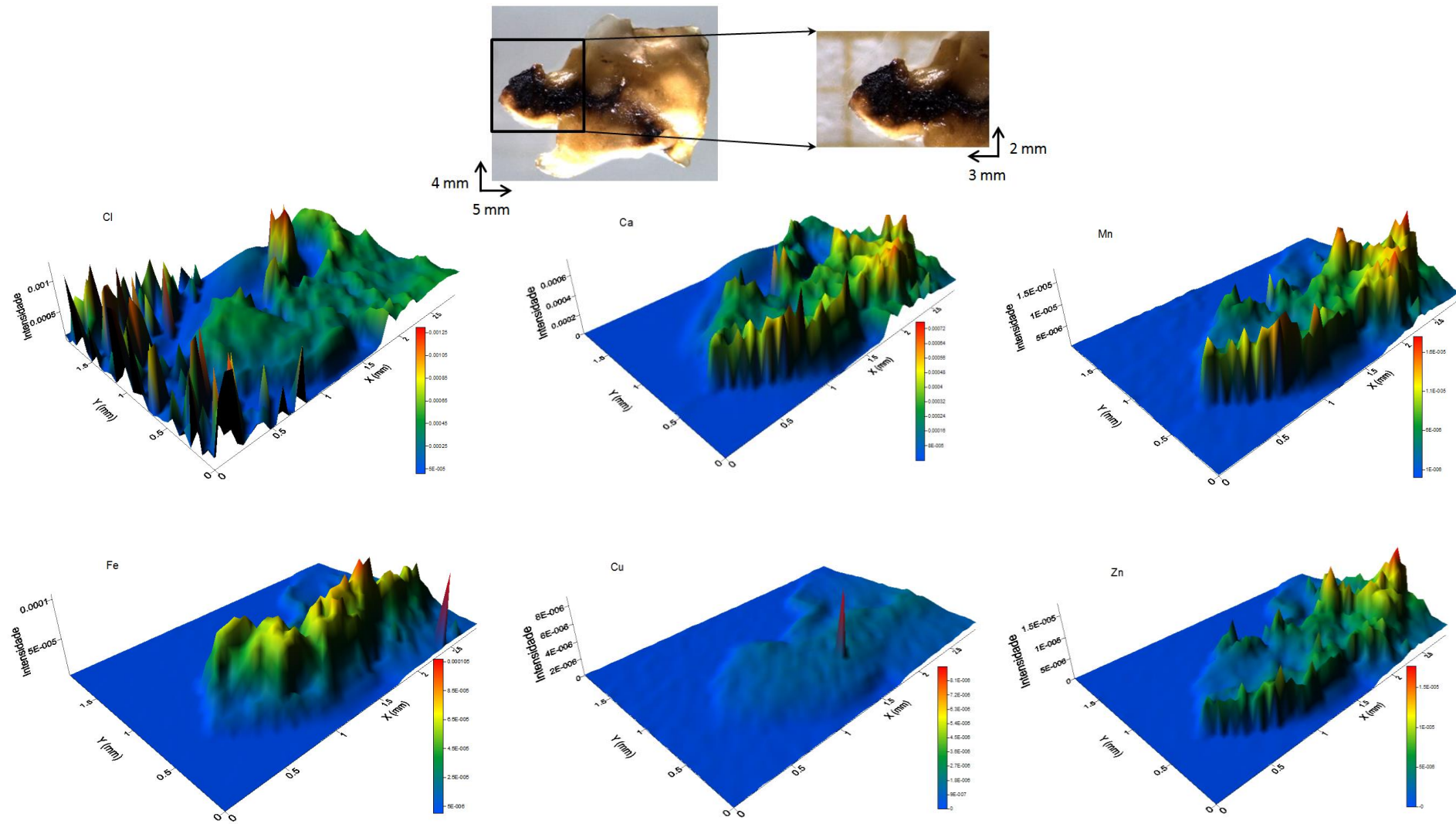


Figura 19: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por DAINÉ e tratada com *Davilla nitida* (4A) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra



Nas amostras tratadas com *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, essa distribuição elementar foi alterada, aumentando as concentrações de Mn e Ca e mantendo as concentrações de Fe e Zn no interior da lesão, quando comparadas com o tecido visualmente sadio. Isto pode indicar um favorecimento do deslocamento de Mn e Ca pelo mecanismo gastroprotetor estimulado pelos extratos.

Para verificar esses resultados, foi realizada também uma análise estatística das concentrações dos elementos em regiões definidas, dentro e fora das lesões induzidas por DAINÉ e tratada com cada um dos extratos utilizados. Para cada grupo, foram identificadas regiões dentro e fora da lesão e, para cada uma delas, foram tomadas três amostras representativas, numa dimensão de 180 x 180  $\mu\text{m}^2$ , para análise das intensidades. Os resultados determinados para os elementos Ca, Cl, Mn, Fe, Cu e Zn estão demonstrados, na forma *boxplot*, Figura 20.

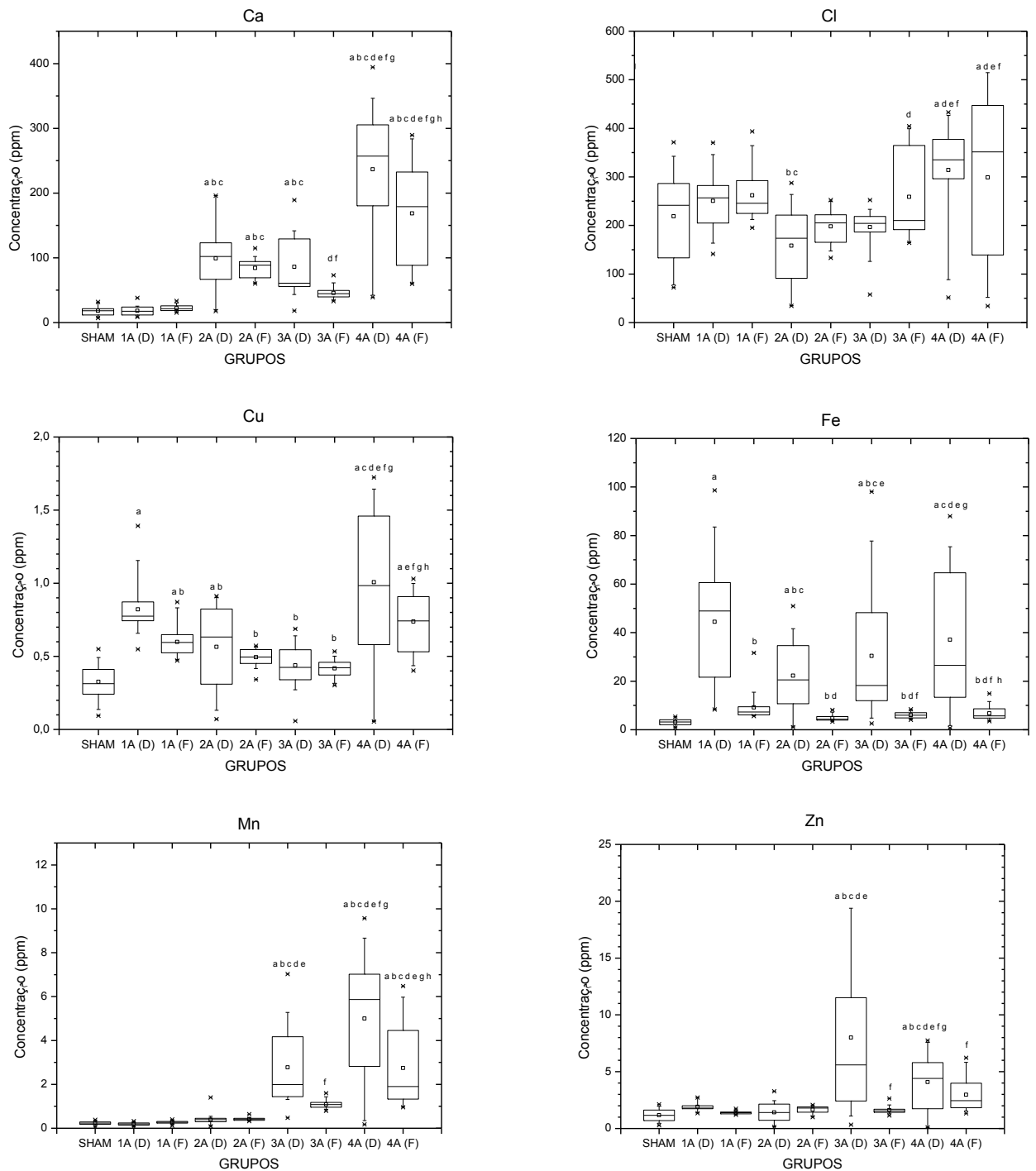
As concentrações de Ca nas amostras induzidas por DAINÉ (1A), tanto dentro quanto fora da lesão, não apresentaram diferenças estatísticas com as concentrações no grupo sham como analisado anteriormente neste trabalho.

Com o uso dos extratos vegetais, as concentrações de Ca foram elevadas em todos os tratamentos, tanto dentro quanto fora das lesões, quando comparadas às concentrações do elemento nos grupos sham e controle (1A). Dessas elevações, todas apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo sham ( $p < 0,01$ ), com exceção da concentração do elemento fora da lesão tratada com *D. elliptica* (3A), extrato que apresenta menor concentração do elemento (Vieira, da Silva et al., 2018).

Comparando-se as concentrações de Ca, dentro e fora da lesão, numa mesma amostra, as amostras tratadas com *D. elliptica* (3A) e *D. nitida* (4A) apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente).

As maiores concentrações de Cl foram demonstradas na amostra tratada com *D. nitida* (4A), que apresentaram diferenças estatísticas, tanto dentro ( $p < 0,01$ ) quanto fora ( $p < 0,05$ ) da lesão, em relação à amostra do grupo sham.

Figura 20: Concentração dos elementos em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, entre as amostras que tiveram úlcera induzida por DAINE (1A) e tratadas com *A. glandulosa* (2A), *D. elliptica* (3A) e *D. nitida* (4A)



<sup>a</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo sham. <sup>b</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 1A(D). <sup>c</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 1A(F). <sup>d</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 2A(D). <sup>e</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 2A(F). <sup>f</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 3A(D). <sup>g</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 3A(F). <sup>h</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 4A(D).

Apesar do extrato de *A. glandulosa* apresentar a maior concentração de Cl (Vieira, da Silva et al., 2018), a concentração do elemento dentro da lesão tratada com este extrato (2A)

apresentou menor índice e diferenças estatísticas quando comparada à úlcera sem tratamento (1A) e à úlcera tratada com *D. nitida* ( $p < 0,01$ ).

A maior concentração de Cu ocorreu no interior da lesão tratada por *D. nitida* (4A) e a menor concentração ocorreu no grupo sham. Entre os tratamentos, as amostras tratadas com *D. elliptica* (3A) apresentaram as menores concentrações de Cu, tanto dentro quanto fora da lesão. Este extrato apresenta a menor concentração do elemento (Vieira, da Silva et al., 2018).

Apesar das concentrações de Cu apresentarem maiores níveis dentro das lesões, quando comparadas às concentrações de fora, somente a úlcera sem tratamento (1A) e tratada com *D. nitida* (4A) apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente).

O Fe apresentou menor concentração no grupo sham. Com a indução de úlcera, seus níveis dentro das lesões foram aumentados, apresentando maior concentração na amostra de úlcera induzida sem tratamento (1A). Com os tratamentos, as concentrações de Fe foram diminuídas e seus níveis apresentaram diferenças estatísticas nos grupos tratados com *A. glandulosa* (2A) e *D. elliptica* (3A) ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Fora das lesões, as concentrações de Fe não apresentaram diferenças em relação à concentração do elemento no grupo sham.

As concentrações de Mn e Zn nas amostras tratadas com *A. glandulosa* (2A) não apresentam diferenças com as concentrações das amostras do grupo sham e das amostras que não tiveram tratamento (1A).

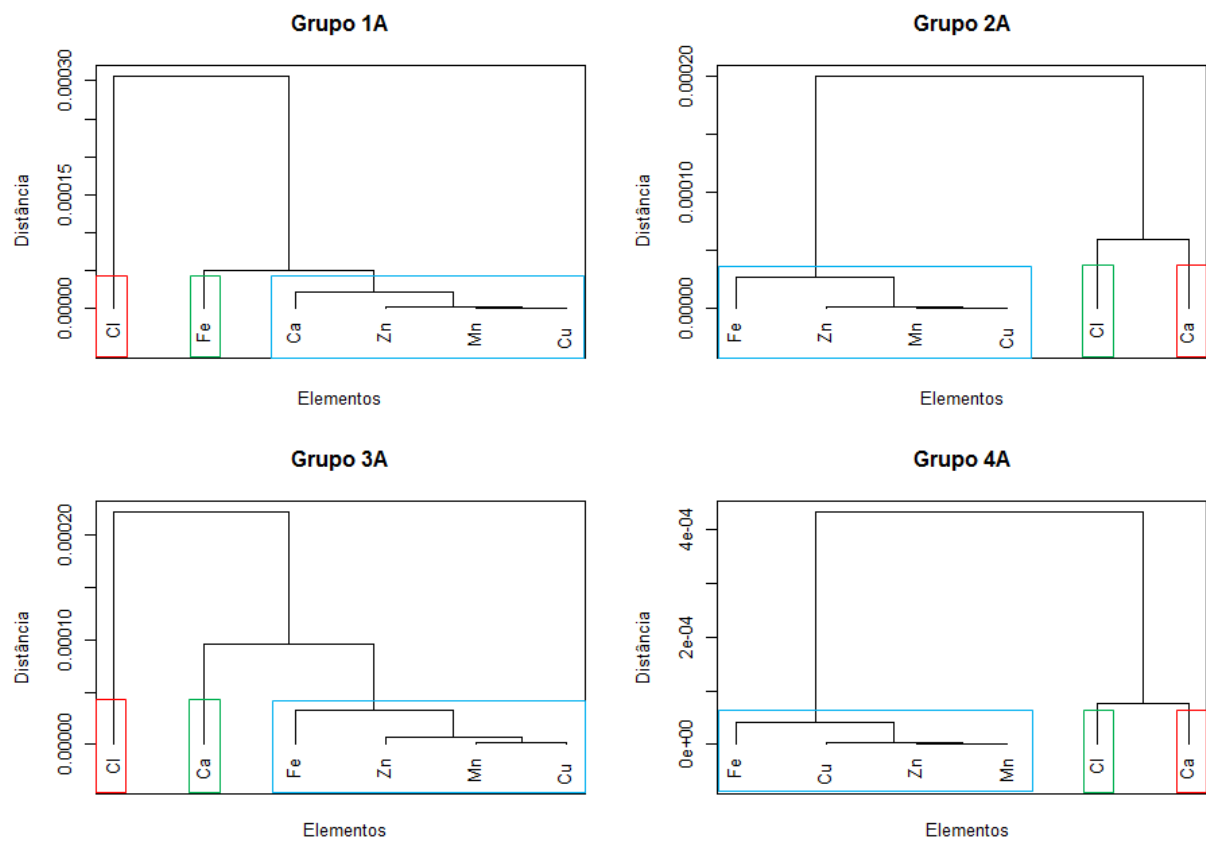
As maiores concentrações de Mn e Zn foram apresentadas pelas amostras tratadas com *D. elliptica* (3A) e *D. nitida* (4A). Nessas amostras, seus índices dentro da lesão apresentaram diferenças estatísticas quando comparados às concentrações de dentro das outras lesões ( $p < 0,01$ ). Estes extratos apresentam maiores concentrações do elemento Mn e menores concentrações do elemento Zn, quando comparadas ao extrato de *A. glandulosa* (Vieira, da Silva et al., 2018).

Analisando, então, os tratamentos e a indução de úlcera por DAINÉ, podemos verificar que o uso dos extratos vegetais alterou as concentrações dos elementos em relação aos seus níveis encontrados nas amostras sem a indução de úlcera, principalmente do elemento Ca, que apresentou concentração elevada em todos os tratamentos. As amostras

tratadas com *A. glandulosa*, além do Ca, também apresentaram maiores concentrações de Cu e Fe, no interior da lesão ulcerativa, quando comparadas às amostras que não tiveram úlcera induzida. As amostras tratadas com *D. elliptica* e *D. nitida* apresentaram maiores concentrações de Mn e Zn no interior da lesão ulcerativa. Além disso, as amostras tratadas com *D. nitida* também apresentaram maiores níveis de Cl e Cu, quando comparadas às amostras sem indução de úlcera.

Para analisar os elementos de acordo com sua similaridade, foi realizada a análise de agrupamento (*cluster*) sobre os dados. Os resultados são apresentados na Figura 21.

Figura 21: Resultado da análise de agrupamento (*cluster*) hierárquico para grupos de úlceras induzidas por DAINÉ (1A) e tratadas com *A. glandulosa* (2A), *D. elliptica* (3A) e *D. nitida* (4A).



O agrupamento da amostra 1A (úlceras induzidas por DAINÉ) apresenta três grupos: um grupo formado somente pelo Cl, outro grupo formado somente pelo Fe e um terceiro grupo formado pelos elementos Ca, Zn, Mn e Cu. Este agrupamento é diferente daqueles ocorridos nas amostras 2A (úlceras induzidas por DAINÉ e tratadas com *A. glandulosa*), 3A (úlceras induzidas por DAINÉ e tratadas com *D. elliptica*) e 4A (úlceras induzidas por DAINÉ e tratadas com *D. nitida*), que são semelhantes entre si, possuindo três grupos de elementos: um grupo formado somente pelo Cl, outro grupo formado somente pelo Ca e um terceiro grupo formado

pelos elementos Fe, Zn, Mn e Cu. Dessa forma, pode-se dizer que os grupos de elementos nas amostras de úlcera induzida por DAINÉ são modificados, igualmente, por qualquer um dos tratamentos utilizados.

Os agrupamentos ocorridos nas amostras 2A, 3A e 4A são semelhantes aos ocorridos nas amostras do grupo sham, demonstrado na Figura 16. Sugere-se, então, que os extratos utilizados para o tratamento da úlcera induzida por DAINÉ retornam as correlações elementares ocorridas no tecido sem úlcera induzida, demonstrando eficiência dos seus tratamentos.

### **5.3. Análise das amostras de úlceras induzidas por álcool e tratadas com extratos vegetais**

A alteração da distribuição dos elementos no tecido gástrico com úlceras induzidas pelo álcool etanol e tratado com extratos vegetais, popularmente utilizados, também foi avaliada.

As Figuras 22, 23 e 24 apresentam os mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn nas amostras dos grupos 2B (úlcera induzida por álcool e tratada com *A. glandulosa*), 3B (úlcera induzida por álcool e tratada com *D. elliptica*) e 4B (úlcera induzida por álcool e tratada com *D. nitida*), respectivamente.

As amostras com úlceras induzidas por etanol e tratadas com *Alchornea glandulosa* (Figura 22) não tiveram lesões visíveis e os elementos demonstraram uma distribuição espacial uniforme. Foram detectados também picos isolados nas concentrações dos elementos Fe, Cu, Mn, Ca e Zn numa mesma coordenada da amostra, podendo indicar a presença de microlesões não perceptíveis na imagem. Como o elemento Cl não apresentou tais picos, pode-se sugerir que, nesses pontos, a produção de suco gástrico ocorreu de forma semelhante ao ocorrido no restante do tecido, sendo este comportamento regulado pela ação do extrato utilizado.

As amostras que foram tratadas com *Davilla elliptica* (Figura 23) também não apresentaram lesões visíveis e demonstraram concentrações uniformemente distribuídas na amostra para todos os elementos.



Figura 22: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por álcool e tratada com *Alchornea glandulosa* (2B) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra

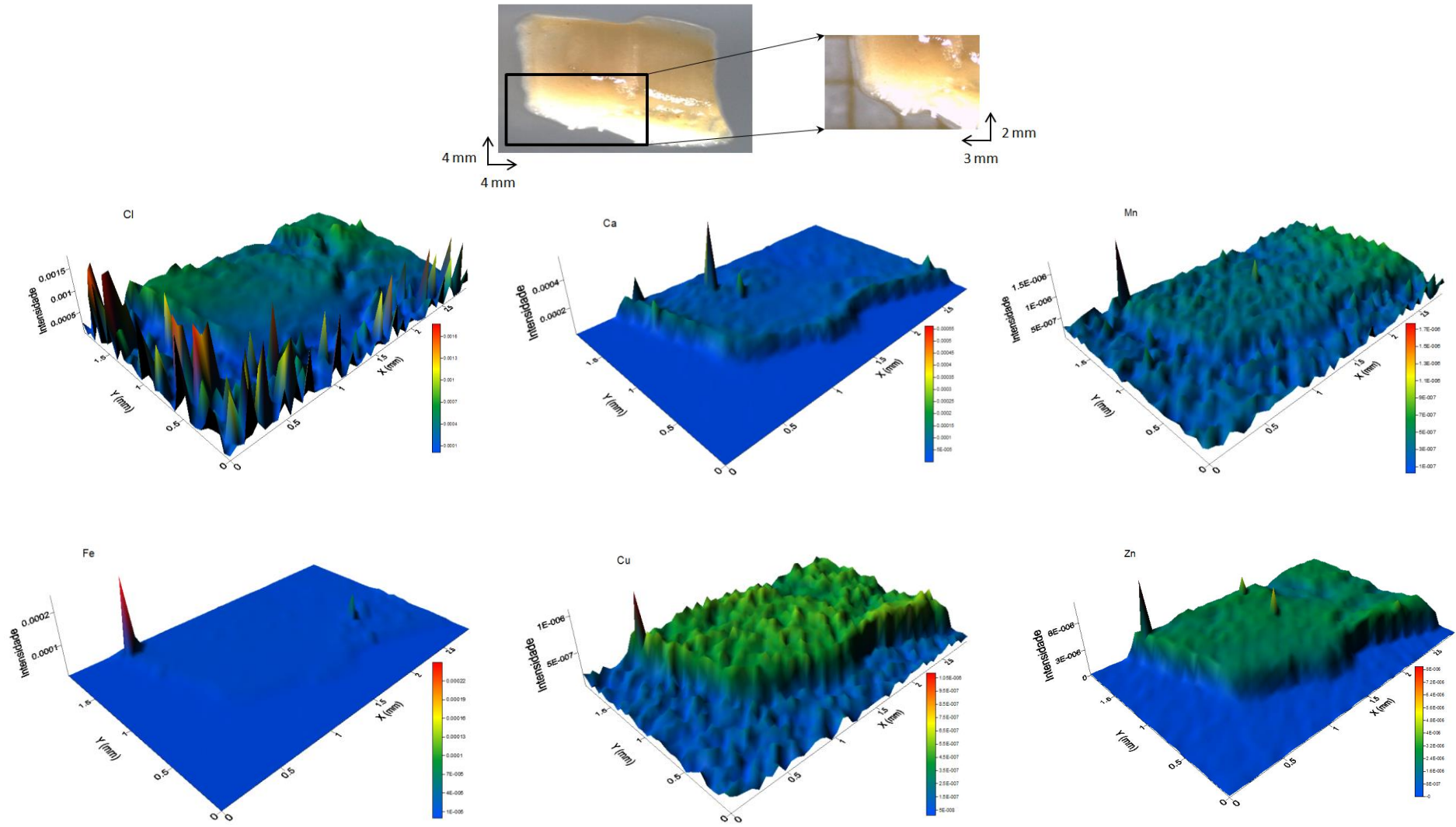


Figura 23: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por álcool e tratada com *Davilla elliptica* (3B) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra

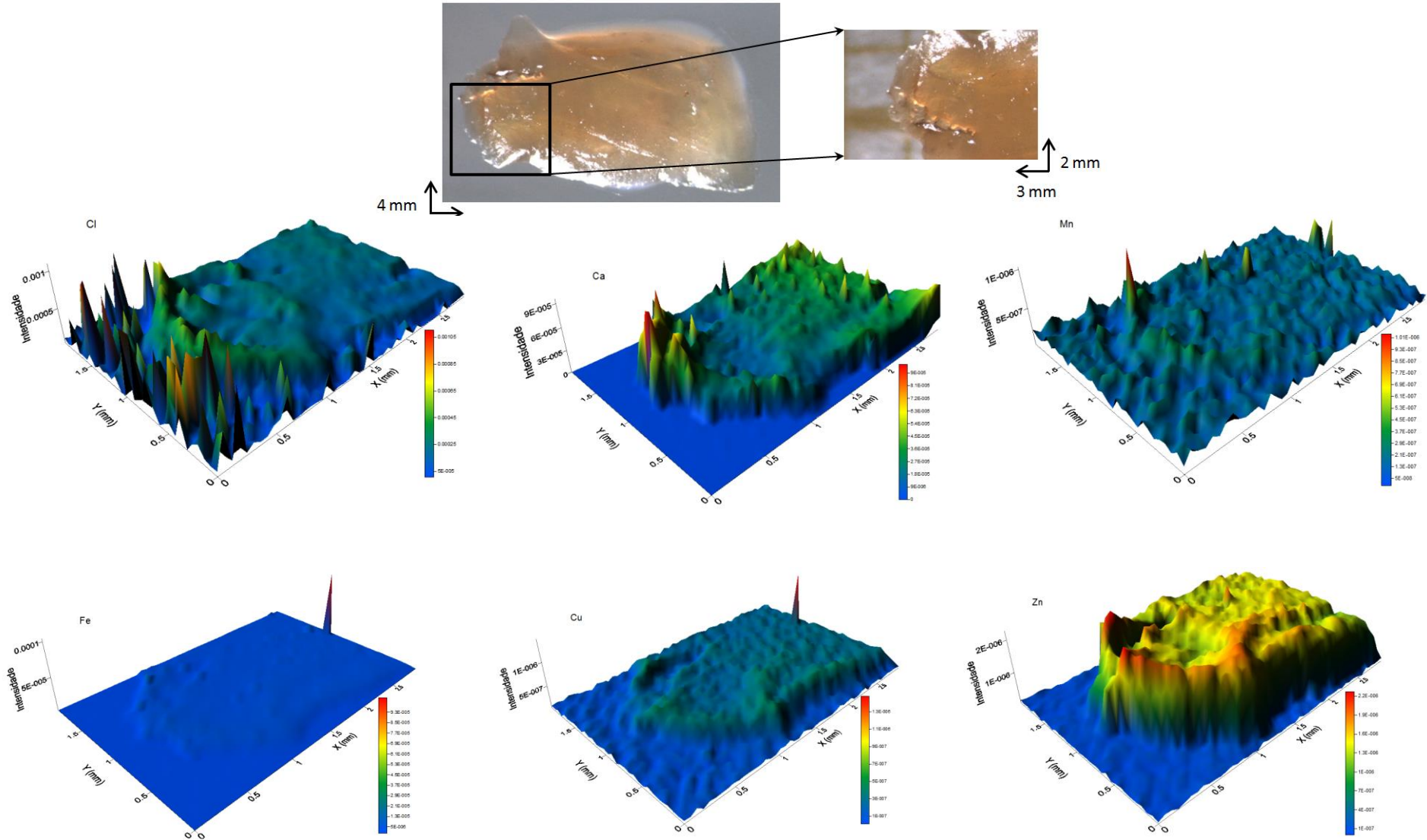
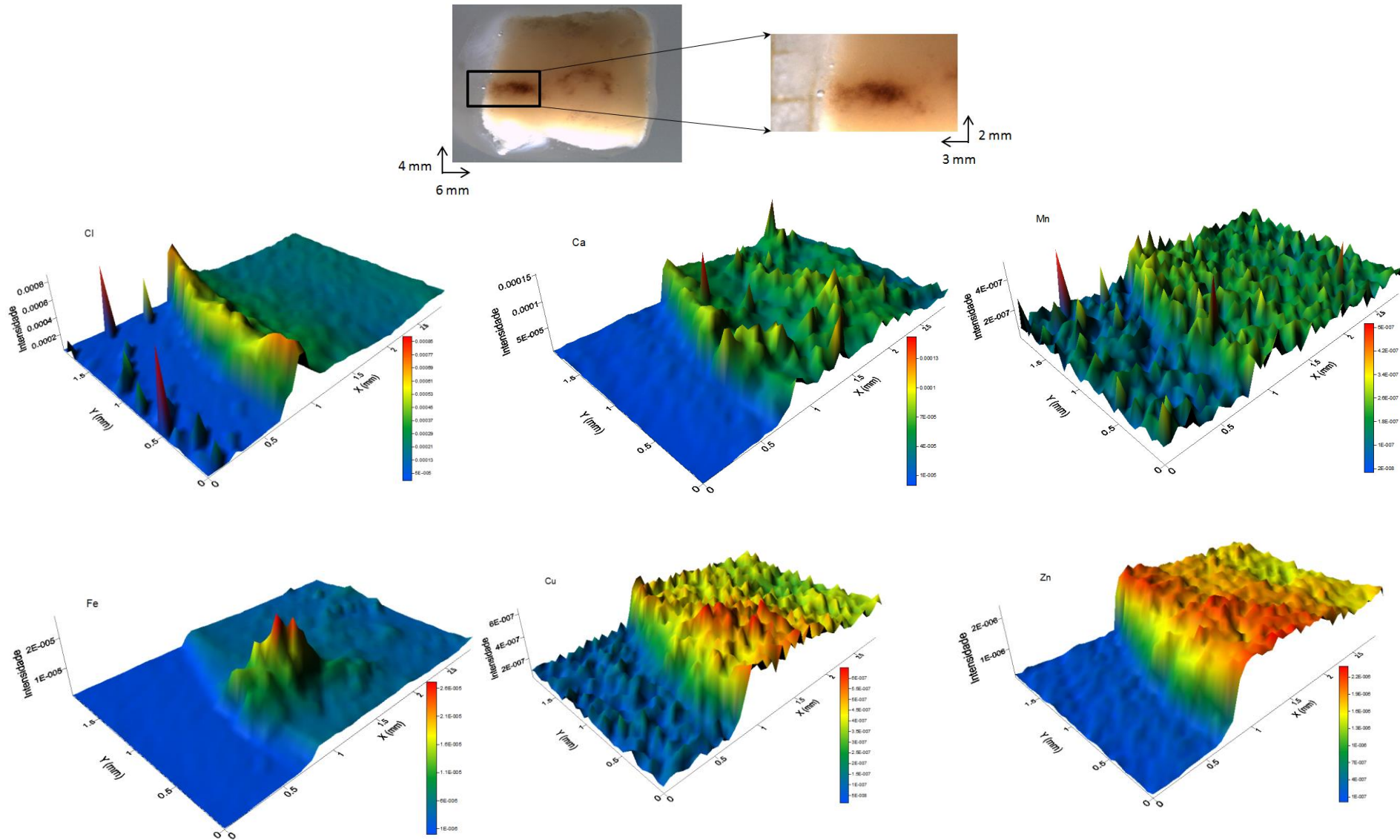


Figura 24: Imagem de uma amostra de úlcera gástrica induzida por álcool e tratada com *Davilla nitida* (4B) e mapas da distribuição dos elementos Cl, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na amostra



Nas amostras que tiveram úlceras induzidas por álcool e tratamento com *Davilla nitida* (Figura 24), a lesão é visível e demonstra maior concentração de Fe no interior da mesma, quando comparada com a região fora dela.

A distribuição de concentrações elementares nas amostras de úlcera induzida por álcool (1B), sem tratamento, demonstrou alta concentração dos elementos Cu, Zn e Cl no interior da lesão (Figura 14). Nas amostras tratadas com *Alchornea glandulosa* (Figura 22) e *Davilla elliptica* (Figura 23), não houve lesão aparente e a distribuição das concentrações de todos os elementos analisados foi uniforme. Isto pode sugerir que o extrato utilizado funcionou contra o agente indutor da lesão, evitando sua formação e consequente alteração da distribuição elementar.

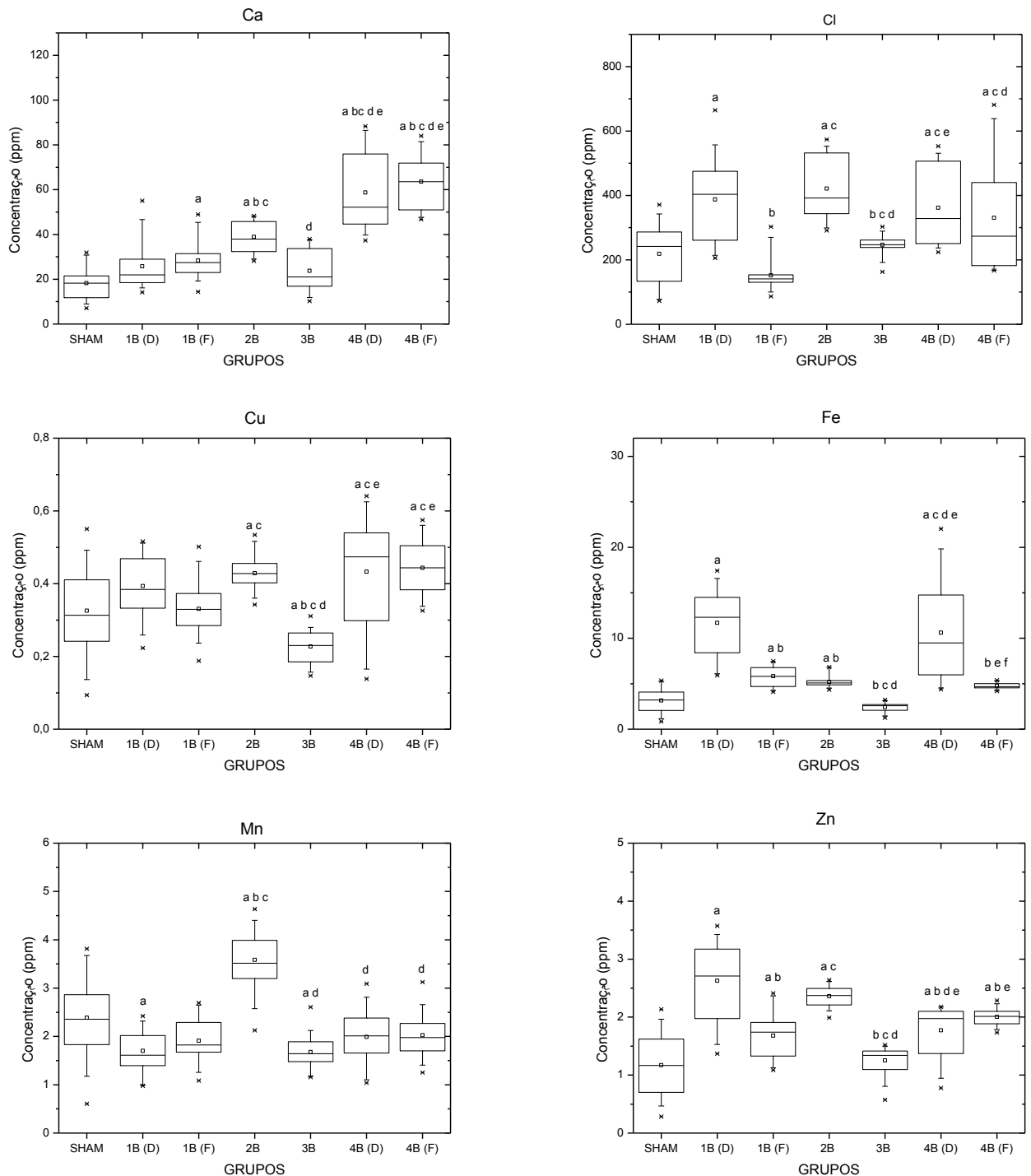
Para verificar esses resultados, foi efetuada também uma análise estatística das concentrações dos elementos em regiões definidas, dentro e fora das lesões induzidas por álcool e tratada com cada um dos extratos utilizados. Como realizado nas análises anteriores, para cada grupo, foram identificadas regiões dentro e fora da lesão e tomadas três amostras representativas, numa dimensão de  $180 \times 180 \mu\text{m}^2$ , para análise das intensidades. Os resultados determinados para os elementos Ca, Cl, Mn, Fe, Cu e Zn estão demonstrados, na forma de *boxplot*, na Figura 25.

Como comentado anteriormente, as amostras que tiveram úlcera induzida por álcool e tratadas com *A. glandulosa* (2B) e *D. elliptica* (3B) não apresentaram danos visíveis. Por esse motivo, não houve necessidade de distinguir regiões dentro e fora da lesão.

As maiores concentrações de Ca foram medidas nas amostras tratadas com *D. nitida* (4B), e apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,01$ ) tanto em relação ao grupo sem indução (sham) quanto ao grupo com indução de úlcera (1B).

Entre os tratamentos, as amostras com *D. elliptica* (3B) apresentaram as menores concentrações de Ca, sem diferença estatística com os níveis do elemento nas amostras do grupo sham e do grupo com úlcera induzida (1B). Este extrato também contém a menor concentração do elemento quando comparado aos outros extratos utilizados (Vieira, da Silva et al., 2018).

Figura 25: Concentração dos elementos em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, entre as amostras que tiveram úlcera induzida por álcool (1B) e tratadas com *A. glandulosa* (2B), *D. elliptica* (3B) e *D. nitida* (4B)



<sup>a</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo sham. <sup>b</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 1B(D). <sup>c</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 1B(F). <sup>d</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 2B(D). <sup>e</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo 2B(F). <sup>f</sup>: diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo

A maior concentração do Cl foi detectada no grupo tratado com *A. glandulosa* (2B), extrato que apresenta maior concentração deste elemento (Vieira, da Silva et al., 2018). Todos

os valores de concentrações medidos nas diferentes amostras foram maiores que os medidos no grupo sham, com exceção da concentração obtida dentro da lesão na amostra de úlcera sem tratamento (1B). As concentrações de Cl nas amostras tratadas com *D. elliptica* (3B) não apresentam diferenças estatísticas com níveis obtidos na amostra do grupo sham.

A maior concentração de Cu ocorreu fora da lesão tratada por *D. nitida* (4B) e a menor concentração ocorreu nas amostras tratadas com *D. elliptica* (3B). Entre os tratamentos, as amostras tratadas com *D. elliptica* (3B) apresentaram as menores concentrações de Cu. Este extrato possui a menor concentração do elemento (Vieira, da Silva et al., 2018).

O Fe apresentou menor concentração nas amostras tratadas com *D. elliptica* (3B), não apresentando diferença estatística com a concentração obtida no grupo sham. Nas amostras com lesões detectadas (1B e 4B), os níveis de Fe foram maiores que nas outras amostras, não demonstrando diferenças estatísticas entre si e manifestando diferenças com os outros grupos ( $p < 0,05$ ).

No caso do Mn, todas as amostras revelaram níveis de concentração menores e estatisticamente iguais aos obtidos no grupo sham, com exceção da amostra tratada com *A. glandulosa* (2B), que demonstrou maior concentração e diferença estatística com todos os grupos. Para este extrato foi determinada a menor concentração do elemento quando comparado com os outros extratos utilizados (Vieira, da Silva et al., 2018).

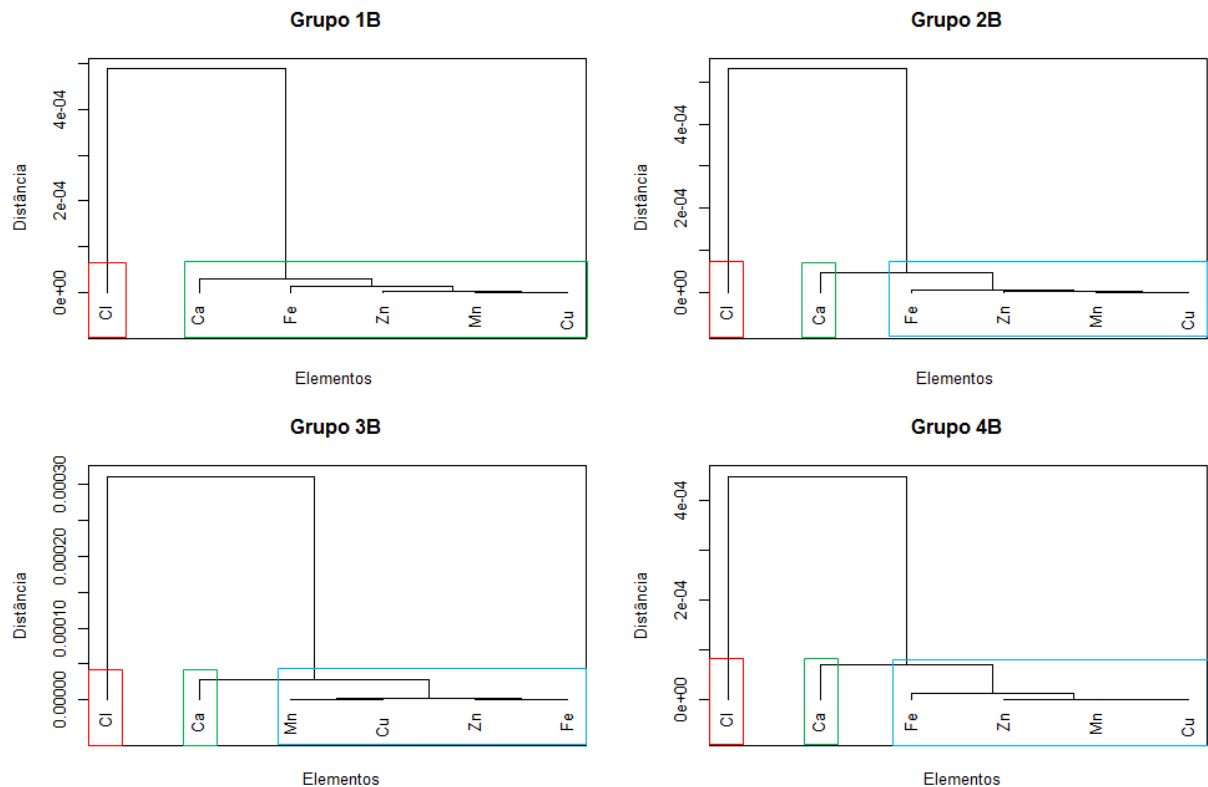
A maior concentração de Zn foi determinada no interior da lesão sem tratamento (1B), enquanto que o menor valor foi obtido nas amostras do grupo sham. Com os tratamentos utilizados, os níveis de Zn foram diminuídos e, no caso da amostra tratada com *D. elliptica* (3B), os valores são estatisticamente iguais aos do grupo sham.

Analisando, então, os tratamentos e a indução de úlcera por álcool, podemos verificar que o uso dos extratos vegetais alterou as concentrações dos elementos em relação aos seus níveis encontrados nas amostras sem a indução de úlcera, principalmente do elemento Cu, que teve sua concentração alterada em todos os tratamentos. As amostras tratadas com *A. glandulosa* apresentaram maiores concentrações de todos os elementos analisados quando comparadas às amostras que não tiveram úlcera induzida. As amostras tratadas com *D. elliptica* apresentaram menores concentrações de Cu e Mn, enquanto os outros elementos não apresentaram variação significativa, em relação às amostras sem indução de úlcera. Nas amostras tratadas com *D. nitida*, somente o elemento Mn não apresentou elevação em sua

concentração, dentro da lesão ulcerativa, quando comparada às amostras sem indução de úlcera.

Para analisar os elementos de acordo com sua similaridade, foi realizada a análise de agrupamento (*cluster*) sobre os dados. Os resultados são apresentados na Figura 26.

Figura 26: Resultado da análise de agrupamento (*cluster*) hierárquico para grupos de úlceras induzidas por álcool (1B) e tratadas com *A. glandulosa* (2B), *D. elliptica* (3B) e *D. nitida* (4B).



Os agrupamentos das amostras 2B (úlceras induzidas por álcool e tratadas com *A. glandulosa*), 3B (úlceras induzidas por álcool e tratadas com *D. elliptica*) e 4B (úlceras induzidas por álcool e tratadas com *D. nitida*) são iguais e possuem três conjuntos de elementos: um formado somente pelo Cl, outro formado somente pelo Ca e um terceiro relacionando os elementos Fe, Zn, Mn e Cu.

Estes agrupamentos são diferentes daquele ocorrido nas amostras 1B (úlceras induzidas por álcool), que apresentam dois conjuntos de elementos: um formado somente pelo elemento Cl e outro formado pelos elementos Ca, Fe, Zn, Mn e Cu. Dessa forma, pode-se dizer que os grupos de elementos nas amostras de úlcera induzida por álcool são modificados, igualmente, por qualquer um dos tratamentos utilizados.

Os agrupamentos ocorridos nas amostras 2B, 3B e 4B são semelhantes aos ocorridos nas amostras do grupo sham, demonstrado na Figura 16. Sugere-se, então, que os extratos vegetais utilizados para o tratamento da úlcera induzida por álcool retornam as correlações elementares ocorridas no tecido sem úlcera induzida, demonstrando eficiência dos seus tratamentos.

## 6. Conclusão

De acordo com a distribuição espacial dos elementos, pode-se sugerir uma distinção entre o efeito dos dois protocolos de indução de úlcera utilizado, levando em consideração principalmente a diferença nas concentrações de Fe e Cl, no interior e fora da lesão. Além dos elementos Cu e Zn, as lesões de úlcera induzida por DAINE apresentaram também maior concentração de Fe e as lesões de úlcera induzida por álcool, maior concentração de Cl. Pela análise de agrupamento, os elementos apresentam uma modificação nas suas correlações, dependendo do tipo de protocolo de lesão induzida, principalmente nas correlações dos elementos Ca e Fe.

Analisando o tratamento e as induções de úlcera por DAINE ou álcool, podemos verificar que o uso dos extratos vegetais alterou as concentrações dos elementos em relação aos seus níveis encontrados nas amostras sem a indução de úlcera por qualquer um dos protocolos.

Nas amostras que tiveram úlceras induzidas por DAINE, o uso do extrato de *Alchornea glandulosa*, elevou as concentrações de Ca, Cu e Fe, no interior da lesão ulcerativa, quando comparadas às amostras que não tiveram úlcera induzida. As amostras tratadas com *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* apresentaram maiores concentrações de Ca, Mn e Zn no interior da lesão ulcerativa. Além disso, as amostras tratadas com *D. nitida* também apresentaram maiores níveis de Cl e Cu, quando comparadas às amostras sem indução de úlcera.

Nas amostras com indução de úlcera por álcool, o uso da *A. glandulosa* elevou a concentração de todos os elementos analisados quando comparada às amostras que não tiveram úlcera induzida. As amostras tratadas com *D. elliptica* apresentaram menores concentrações de Cu e Mn, enquanto os outros elementos não apresentaram variação



significativa, em relação às amostras sem indução de úlcera. Nas amostras tratadas com *D. nitida*, somente o elemento Mn não apresentou elevação em sua concentração, dentro da lesão ulcerativa, quando comparada às amostras sem indução de úlcera.

Estas variações na concentração dos elementos constituintes das amostras pode indicar o favorecimento de seus deslocamentos pelo mecanismo gastroprotetor estimulado pelo uso dos extratos vegetais.

De acordo com a análise de grupos, as correlações obtidas nas amostras tratadas com os extratos foram diferentes daqueles ocorridos nas amostras com úlceras induzidas pelos dois protocolos utilizados e semelhantes àqueles ocorridos nas amostras do grupo sem úlcera induzida.

Sugere-se, então, que os extratos de *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, utilizados para o tratamento da úlcera, induzida por DAINÉ ou álcool, restauram as correlações elementares às ocorridas no tecido sem úlcera induzida, auxiliando suas ações gastroprotetoras.

## 7. Referências

- AIHARA, E.; MONTROSE, M. H. Importance of Ca<sup>2+</sup> in gastric epithelial restitution - new views revealed by real-time in vivo measurements. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 19, p. 76-83, 2014.
- AL BATRAN, R.; AL-BAYATY, F.; AL-OBAIDI, M. M. J. et al. In vivo anti-oxidant and antiulcer activity of *Parkia speciosa* ethanolic leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **PLoS One**, v. 8, e64751, 2013.
- ARDA-PIRINCCI, P.; BOLKENT, S.; YANARDAG, R. The role of zinc sulfate and metallothionein in protection against ethanol-induced gastric damage in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, p. 2353-60, 2006.
- ASCHENBRENNER, D. S.; VENABLE, S. J. **Drug Therapy in Nursing**. 3a. Edição. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health e Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
- BARAN, E. J. Cooper in plants: an essential and multifuncional element. In: HERMANTARANJAN, A. **Advances in plant physiology**, v. 15. Jodhpur: Scientific Publishers, 2014. cap. 10, p. 373-97.
- BASHINSKAYA, B.; NAHED, B. V.; REDJAL, N. et al. Trends in peptic ulcer disease and the identification of *Helicobacter pylori* as a causative organism: population-based estimates from the US Nationwide Inpatient Samples. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 366-70, 2011.
- BERNASCONI, G.; HASELBERGER, N.; MARKOWICZ, A. Applications of a capillary based X-ray microfluorescence system. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v.86, p.333-8, 1994.
- BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, p. 329-54, 2014.
- BI, W. P.; MAN, H. B.; MAN, M. Q. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 45, p. 17020-8, 2014.
- BI, W.; MAN, H.; HU, L.; MAN, M.Q. Antiulcerogenic benefits of herbal ingredients in ethanol-induced animal models. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 13, n. 2, p. 1-24, 2016.
- BONAMIN, F.; MORAES, T. M.; SANTOS, R. C. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of b-myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-Biological Interactions**, v.212, p. 11-9, 2014.
- CALVO, T. R.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S. et al. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 3, p. 451-9, 2007.
- CESAREO, R. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. In: CESAREO, R. **Nuclear analytical techniques in medicine**. Amsterdam: Elsevier, v. 8, 1988. COUSINS, R. J.; LIUZZI, J. P. Trace Metal Absorption and Transport. In: SAID, H. M. **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. 6.ed. Academic Press, 2018. Cap. 61, p. 1485-98.

- DI MARIO, F.; GONI, E. Gastric acid secretion: changes during a century. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, p. 953-65, 2014.
- GAWEL, M.; LIPKOWSKA, A.; HERMAN, M. et al. Chronic treatment with zinc hydroaspartate induces anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activity in rats. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 862-6, 2014.
- GOHAR, A. A., ZAKI, A. A. Assessment of some herbal drugs for prophylaxis of peptic ulcer. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 1081-6, 2014.
- GORDON, B. M.; HANSON, A. L.; JONES, K. W. et al. The application of synchrotron radiation to microprobe trace-element analysis of biological samples. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B**, v. 45, p. 527-31, 1990.
- HAYS, V. W.; SWENSON, M. J. Minerals and Bones. In: REECE, W. O. **Dukes' Physiology of Domestic Animals**. 10.ed. John Wiley and Sons, 1985, p. 449-66.
- HERNANDEZ-MUNOZ, R.; MONTIEL-RUIZ, C; VAZQUEZ-MARTINEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. **Laboratory Investigation**, v.80, p. 1161-69, 2000.
- IBRAHIM, M. Y.; HASHIM, N. M.; DHIYAALDEEN, S. M. et al. Acute toxicity and gastroprotection studies of a new schiff base derived manganese (II) complex against HCl/ethanol induced gastric ulcerations in rats. **Scientific Reports**, v. 6, 26819, p. 1-11, 2016.
- INEU, R. F.; OLIVEIRA, C. S.; OLIVEIRA, V. A. et al. Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 522-9, 2013.
- JENKINS, R. **Quantitative X-ray spectrometry**. New York: Marcel Dekker, 1981.
- KLOCKEMKÄMPER, R.; VON BOHLEN, A. **Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods**. New York: Wiley, 1997.
- KORNDÖNFER, A. P. **A importância do silício nas relações entre herbívoros e *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) St. Hil no cerrado**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.
- KUSHIMA, H.; NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M. et al. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.430-8, 2009.
- LAU, J.Y.; SUNG, J.; HILL, C. et al. Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality. **Digestion**, v. 84, p. 102-13, 2011.
- LEVENSTEIN, S.; ROSENSTOCK, S.; JACOBSEN, R. K. et al. Psychological stress increases risk for peptic ulcer, regardless of *Helicobacter pylori* infection or use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, p. 498-506, 2015.
- LINDHU, U. Nuclear microscopy. Its role and future in medicine and trace-element biology. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 54, p. 160-170, 1991.

LNLS. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. **Fonte de luz síncrotron**, 2007. Disponível em: <[www.lnls.br](http://www.lnls.br)>. Acesso em: 18mar 2018.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3a.ed. São Paulo: Platarum, 1998.

MARGUÍ, E.; ZAWISZA, B.; SITKO, R. Trace and ultratrace analysis of liquid samples by X-ray fluorescence spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 73-83, 2014.

MARTINEZ-FINLEY, E. J.; CHAKRABORTY, S.; FRETAM, S. J. B.; ASCHNER, M. (2012). Cellular transport and homeostasis of essential and non essential metals. **Metalomics**, v. 4, n. 7, p.593-605, 2012.

MASSIGNANI, J. J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L. et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**, v. 23: p. 1355-60, 2009.

MEI, X. Y.; XU, D. H.; XU, S. K. et al. Zinc(II)-curcumin accelerates the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by decreasing oxidative stress and downregulation of matrix metalloproteinase-9. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 448-54, 2013.

MINGOTI, S. A. **Análise de agrupamento Análise de dados através de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2005, p.155-212.

MONICI, L. T.; ZEITUNE, J. M. R.; LORENA, S. L. S. et al. Úlcera péptica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, p. 25-32, 2003.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's Biochemistry**. 25.ed., USA: McGraw-Hill, Health Profession Division,2000.

NASCIMENTO-FILHO, V. F. Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF)**, 1999. Disponível em: <[www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/cen-5723/EDXRF\\_TXRF.doc](http://www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/cen-5723/EDXRF_TXRF.doc)>. Acesso em: 15 dez. 2017.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, J. R.; COSTA, M. F. S. et al. Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 1, p. 145-54, 2015.

OPOKA, W.; ADAMEK, D.; PLONKA, M. et al. Importance of luminal and mucosa zinc in the mechanism of experimental gastric ulcer healing. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 581-91, 2010.

OSABEDE, P. O.; OKOYE, F. B. C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 19, 2003.

PÉREZ, C. A.; RADTKE, M.; SANCHEZ, H. J. et al. Synchrotron radiation X-ray fluorescence at the LNLS: beamline instrumentation and experiments. **X-ray Spectrometry**, v. 28, p. 320-326, 1999.

PICKERING, T.; WYATT, G. *Davilla nitida*, leaves, 2006 Disponível em: [https://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Davilla+nitida&guide=PA\\_BCI\\_Plantae\\_leaf](https://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Davilla+nitida&guide=PA_BCI_Plantae_leaf)

- PRINS, M. Trace elements analysis and element mapping by scanning X-ray fluorescence at Daresbury SRS. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v.222, p.324-28, 1984.
- REDDY, V. T.; KUMAR, S. H. H.; BAKSHI, V. Antiulcer effect of formulation of aloe vera & liquorice against aspirin induced peptic ulcer. **International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 1, p. 42-5, 2016.
- REZENDE, K. M.; BÖNECKER, M.; PEREZ, C. A.; MANTESSO, A. Synchrotron radiation x-ray micro-fluorescence: protocol to study mesenchymal stem cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, p. 149-54, 2016.
- RODRIGUES, V. E.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do Cerrado na região do Alto Rio – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102, 2001.
- SAHU, L.; RAY, D. K.; CHAND, P. K. Proton induced X-ray emission (PIXE) technique for determining multi-element composition of transformed hairy root cultures of *Boerhaavia diffusa* L.: an important medicinal herb. **The Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 300, p. 345-54, 2014.
- SALAMI, A. T.; ADEOLA, B. O.; IYIOLA, T. O. et al. Antioxidative action of manganese treatment in delayed healing of acetic acid-induced ulceration in rat stomach. **Journal of African Association of Physiological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 67-78, 2015.
- SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-60, 2008.
- SENER, G.; PASKALOGLU, K.; AYANOGLU-DÜLGER, G. Protective effect of increasing doses of famotidine, omeprazole, lansoprazole, and melatonin against ethanol-induced gastric damage in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, p. 171-4, 2004.
- SERPA, R. F. B. **Análise multielementar de tecidos cerebrais através da microfluorescência de raios-X e fluorescência de raios-X por reflexão total**. 2007. 185p. Tese (Doutorado). UFRJ, Rio de Janeiro.
- SILVA, L. P.; ANGELIS, C. D.; BONAMIN, F. et al. *Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 285-95, 2015.
- SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B. et al. **Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília: WWF, 2001.
- SKROVANEK, S.; DIGUILIO, K.; BAILEY, R. et al. Zinc and gastrointestinal disease. **World Journal Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 5, n. 4, p. 496-513, 2014.
- SOETAN, K. O.; OLAIYA, C. O.; OYEWOLE, O. E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 5 p. 200-22, 2010.
- SOLÉ, V. A.; PAPILLON, E.; COTTE, M. et al. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. **Spectrochimica. Acta Part B**, v. 62, p. 63-8, 2007.

- SOREIDE, K.; THORSEN, K.; HARRISON, E. M. et al. Perforated peptic ulcer. **Lancet**, v. 386, p. 1288-98, 2015.
- STURNIOLO, G. C.; MESTRINER, C.; D'INCÀ, R. Trace element and mineral nutrition in gastrointestinal disease. In: BODGEN, J. D.; KLEVAY, L. M. **Nutrition of the essential trace elements and minerals: the guide for health professionals**. New York: Springer Science, 2000, p.289-308.
- TAKEUCHI, K. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 8, p. 2147-60, 2012.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: copper. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 386-98, 2003.
- TOLGYESSY, T.; HAVRANEK, E.; DEJMKOVA, E. **Radionulide X-ray fluorescence**. Amsterdam: Elsevier, 1990.
- TSANG, C. N.; HO, K. S.; SUN, H.; CHAN, W. T. Tracking bismuth antiulcer drug uptake in single *Helicobacter pylori* cells. **Journal of The American Chemical Society**, v. 133, p. 7355-7, 2011.
- TUORKEY, M. J. F. A.; ABDUL-AZIZ, K. K. A pioneer study on the anti-ulcer activities of copper nicotinate complex [CuCl(HNA)<sub>2</sub>] in experimental gastric ulcer induced by aspirin-pylorus ligation model (Shay model). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 194-201, 2009.
- VERGUCHT, E.; DE SAMBER, B.; IZMER, A. et al. Study of the distribution of actinides in human tissues using synchrotron radiation micro X-ray fluorescence spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 1559-66, 2015.
- VIEIRA, L. D.; DA SILVA, K. T; GIAROLA, R. S.; INOCENTE, G. F.; KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; MESA, J. Multielement analysis of plant extracts with potential use in the treatment of peptic ulcers by synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence. **PeerJ**, 6:e5375. 2018.
- VIEIRA, L. D.; DA SILVA, K. T; KUSHIMA, H.; CAMPOS, L. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; MESA, J. Role of multielemental concentration in gastroprotective effect of *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* and *Davilla nitida* extracts in rats. **Journal of Synchrotron Radiation** (Submetido), 2017.
- WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W; REUTER, B. K.; VERGNOLLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, v. 119, p. 706-14, 2000.

## **APÊNDICE A**

### **Concentrações dos elementos nas amostras analisadas**

Tabela A.1: Concentração elementar (média  $\pm$  desvio padrão) do material certificado NIST 1577b (fígado bovino).

Elementos	Concentração certificada ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentração medida por $\mu\text{XRF}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	Erro relativo
P (Z=15)	11000 $\pm$ 300	8191 $\pm$ 1042	0,26
S (Z=16)	7850 $\pm$ 60	6518 $\pm$ 163	0,17
K (Z=19)	9940 $\pm$ 20	8066 $\pm$ 62	0,19
Ca (Z=20)	116 $\pm$ 4	88 $\pm$ 1	0,24
Mn (Z=25)	10,5 $\pm$ 1,7	9,4 $\pm$ 0,1	0,14
Fe (Z=26)	184 $\pm$ 15	182 $\pm$ 3	0,01
Cu (Z=29)	160 $\pm$ 8	151 $\pm$ 24	0,05
Zn (Z=30)	127 $\pm$ 16	121 $\pm$ 14	0,04
Rb (Z=37)	13,7 $\pm$ 1,1	9,5 $\pm$ 0,1	0,32



Tabela A.2: Concentração média ( $\mu\text{g/g}$ ) dos elementos Ca, Cl, Cu, Fe, Mn e Zn nas em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, nas amostras dos grupos sham (sem úlcera induzida), 1A (úlcera induzida por DAINE sem tratamento), 2A (úlcera induzida por DAINE e tratada com *Alchornea glandulosa*), 3A (úlcera induzida por DAINE e tratada com *Davilla elliptica*) e 4A (úlcera induzida por DAINE e tratada com *Davilla nitida*).

Ca	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	18,27	1,31	7,06	31,89	18,19
1A (D)	18,15	1,38	8,49	38,11	17,30
1A (F)	22,28	0,94	15,27	33,47	21,26
2A (D)	99,31	9,17	17,72	196,00	100,64
2A (F)	84,30	2,78	60,28	114,90	87,47
3A (D)	86,10	8,29	18,32	189,20	60,00
3A (F)	45,68	1,63	33,06	73,01	44,51
4A (D)	236,67	18,48	39,03	394,30	251,70
4A (F)	168,69	14,70	59,68	289,50	174,50
Cl	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	218,90	17,21	72,51	371,40	241,25
1A (D)	250,43	10,69	141,2	370,40	254,25
1A (F)	262,02	9,29	195,2	393,60	245,45
2A (D)	158,46	14,58	34,29	287,40	167,10
2A (F)	198,13	6,77	133,2	252,40	204,90
3A (D)	196,75	7,55	57,88	252,40	203,20
3A (F)	258,78	16,49	164,40	404,30	210,05
4A (D)	314,30	18,81	51,64	432,80	332,10
4A (F)	299,01	32,56	34,17	605,70	309,50
Cu	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	0,33	0,02	0,09	0,55	0,31
1A (D)	0,82	0,03	0,55	1,39	0,77
1A (F)	0,60	0,02	0,47	0,87	0,60
2A (D)	0,56	0,05	0,07	0,91	0,61
2A (F)	0,49	0,01	0,34	0,57	0,49
3A (D)	0,44	0,03	0,06	0,69	0,42
3A (F)	0,42	0,01	0,30	0,53	0,42
4A (D)	1,01	0,10	0,05	1,72	0,97
4A (F)	0,74	0,04	0,40	1,03	0,72
Fe	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	3,15	0,25	0,85	5,34	3,21
1A (D)	44,46	4,61	8,36	98,66	48,17
1A (F)	9,16	1,01	5,67	31,64	7,30
2A (D)	22,30	2,57	1,06	50,93	20,42
2A (F)	4,80	0,22	3,33	8,12	4,30
3A (D)	30,41	4,80	2,58	98,04	17,94
3A (F)	6,07	0,24	4,10	8,45	5,97
4A (D)	37,12	5,43	0,71	87,99	24,84
4A (F)	6,73	0,52	3,54	14,87	5,69
Mn	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	0,24	0,01	0,06	0,38	0,24
1A (D)	0,19	0,01	0,07	0,32	0,20
1A (F)	0,27	0,01	0,11	0,40	0,27
2A (D)	0,39	0,04	0,09	1,41	0,38
2A (F)	0,41	0,01	0,32	0,64	0,41
3A (D)	2,78	0,32	0,47	7,03	1,90
3A (F)	1,09	0,03	0,79	1,60	1,08
4A (D)	5,00	0,52	0,18	9,57	5,82
4A (F)	2,75	0,34	0,96	6,48	1,84

Tabela A.2: Concentração média ( $\mu\text{g/g}$ ) dos elementos Ca, Cl, Cu, Fe, Mn e Zn nas em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, nas amostras dos grupos sham (sem úlcera induzida), 1A (úlcera induzida por DAINE sem tratamento), 2A (úlcera induzida por DAINE e tratada com *Alchornea glandulosa*), 3A (úlcera induzida por DAINE e tratada com *Davilla elliptica*) e 4A (úlcera induzida por DAINE e tratada com *Davilla nitida*).

(continuação)					
Zn	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
SHAM	1,17	0,10	0,29	2,13	1,15
1A (D)	1,92	0,07	1,35	2,72	1,80
1A (F)	1,40	0,03	1,20	1,74	1,39
2A (D)	1,42	0,15	0,14	3,28	1,36
2A (F)	1,67	0,06	1,00	2,08	1,78
3A (D)	8,00	1,34	0,33	29,36	5,34
3A (F)	1,61	0,06	1,15	2,64	1,55
4A (D)	4,09	0,47	0,10	7,75	4,36
4A (F)	2,97	0,26	1,34	6,22	2,42

Tabela A.3: Concentração média ( $\mu\text{g/g}$ ) dos elementos Ca, Cl, Cu, Fe, Mn e Zn nas em regiões definidas, dentro (D) e fora (F) da lesão, nas amostras dos grupos sham (sem úlcera induzida), 1B (úlcera induzida por álcool sem tratamento), 2B (úlcera induzida por álcool e tratada com *Alchornea glandulosa*), 3B (úlcera induzida por álcool e tratada com *Davilla elliptica*) e 4B (úlcera induzida por álcool e tratada com *Davilla nitida*),

Ca (Z=)	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	18,27	1,31	7,06	31,89	18,19
1B (D)	25,77	2,03	14,20	55,07	21,68
1B (F)	28,35	1,50	14,42	48,93	27,10
2B	38,95	1,32	28,20	48,28	37,77
3B	23,78	1,77	10,25	37,95	20,83
4B (D)	58,77	3,26	37,35	88,28	51,59
4B (F)	63,56	2,23	46,78	83,99	63,49
Cl	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	218,90	17,21	72,51	371,40	241,25
1B (D)	387,43	24,17	205,80	664,60	396,30
1B (F)	151,70	9,16	86,70	302,70	140,70
2B	421,09	18,43	291,30	573,60	386,55
3B	247,16	5,39	162,80	302,70	246,15
4B (D)	361,81	22,51	224,10	553,00	327,85
4B (F)	330,36	32,76	166,90	681,10	272,90
Cu	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	0,33	0,02	0,09	0,55	0,31
1B (D)	0,39	0,02	0,22	0,52	0,38
1B (F)	0,33	0,01	0,19	0,50	0,33
2B	0,43	0,01	0,34	0,53	0,43
3B	0,23	0,01	0,15	0,31	0,23
4B (D)	0,43	0,03	0,14	0,64	0,46
4B (F)	0,44	0,01	0,33	0,57	0,44
Fe	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	3,15	0,25	0,85	5,34	3,21
1B (D)	11,69	0,66	5,91	17,43	12,25
1B (F)	5,83	0,21	4,10	7,48	5,80
2B	5,19	0,11	4,35	6,83	5,08
3B	2,42	0,09	1,26	3,22	2,56
4B (D)	10,61	0,98	4,37	22,04	9,04
4B (F)	4,78	0,06	4,19	5,39	4,67
Mn	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Sham	0,24	0,01	0,06	0,38	0,24
1B (D)	0,17	0,01	0,10	0,24	0,16
1B (F)	0,19	0,01	0,11	0,27	0,18
2B	0,36	0,01	0,21	0,46	0,35
3B	0,17	0,01	0,12	0,26	0,16
4B (D)	0,20	0,01	0,10	0,31	0,20
4B (F)	0,20	0,01	0,13	0,31	0,20
Zn	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio padrão	Valor mínimo	Máximo	Mediana
Sham	1,17	0,10	0,29	2,13	1,15
1B (D)	2,63	0,12	1,37	3,57	2,70
1B (F)	1,68	0,07	1,09	2,41	1,71
2B	2,36	0,03	1,99	2,64	2,36
3B	1,25	0,05	0,57	1,52	1,34
4B (D)	1,77	0,08	0,78	2,18	1,97
4B (F)	2,00	0,03	1,73	2,28	2,01

## **APÊNDICE B**

**Artigo publicado**