

Letícia Diniz Vieira

Análise multielementar da mucosa gástrica de roedores tratados com *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* pela técnica de fluorescência de raios-X por reflexão total

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Orientador: Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

**Botucatu
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Vieira, Letícia Diniz.

Análise multielementar da mucosa gástrica de roedores tratados com *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* pela técnica de fluorescência de raios-X por reflexão total/ Letícia Diniz Vieira. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010

Orientador: Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

Assunto CAPES: 21000000

1. Úlcera péptica - Tratamento 2. Farmacologia

Palavras-chave: Análise multielementar; Extratos fitoterápicos; Luz síncrotron; TXRF; Úlcera péptica

Aos meus pais, Luiz Otávio e Juliana,
e meus irmãos, Antônio Augusto e Marília.

Agradecimentos

A Deus, por sempre guiar meus passos.

Aos meus pais, Juliana e Luiz Otávio, por serem meu exemplo, minha base, meu apoio e, principalmente, meu amor incondicional. Aos meus irmãos, Antônio Augusto e Marília, pelo amor, amizade, cumplicidade e cuidado de sempre.

À minha avó, tios, padrinhos, primos e amigos, pelo carinho e torcida ao longo desses anos. (E vovô, sua universitária conseguiu...)

Às minhas amigas de república, tanto as atuais, Camélia Felice (minha sempre companheira de Botucatu), Larissa Santos, Fernanda Gomes (e Marcelo), quanto as mais antigas, Beatriz Magro, Milena Fioravante, Mariana Cechinato, Natália Baraldi, Fernanda Velo e Natália Ferreira, por serem minha família aqui e por todo companheirismo, amizade e histórias em nossa casa.

Aos meus amigos Rafael dos Santos, Marina Moreno e Virgínia Góis, que mesmo estando longe, sempre se fizeram presentes.

À Amanda Bravim, pela valiosa amizade a toda hora e a todo momento, não importando a distância e o lugar.

À Káthia Takeda, pela ajuda no estágio, pelo companheirismo, carinho e amizade super especiais.

À Milena Giglioli, pela importante amizade e companhia feminina na “liderança” de um laboratório cheio de homens.

Ao Rodolfo Lou, pela amizade, conselhos, ensinamentos e conversas de toda hora.

À galera do Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional, Danilo Anacleto, Guilherme Inocente, Maurício Pazzianotto, Marcos Calabresi, Luis Augusto Bovolenta, Márcio Acencio (e Denise), Pedro Costa, Ralph Pinotti e Tiago Tardelli, e ao pessoal do Depto. de Física e Biofísica, Paulo Fonseca, Anderson Arima, Juliana Santos, Agnes Takeda, Carlos Fernandes, Patricia Shimabuku, Andréa Barros, Rafael Borges, Ivan Pagotto, Uilian de Andreis, Giovana Evangelista, Fabiano Paixão, Marcelo Agostinho, Caio Quini e Danny Grossklauss, por toda ajuda, idas ao Giga (valeu, Rafa!), conhecimento dividido e inúmeros momentos de descontração que tornaram o Departamento bem mais divertido.

Aos meus companheiros de Pós-graduação, Cicília Carvalho, Martin Stivalet, Léo Seito, Celso Costa, Flávia Bonamin, Carlos Alberto Ribeiro, Raquel Santos, Filipe Galvão, Lara Genovez, Lígia Ferreira, Tainara Ferrari, Leticia Solto, Eros Carbi, Daniel Donini, Juliana Akinaga, Carina Leoni, Fábio Florença, pelas risadas, ajudas e parceria também durante a organização do Workshop da Pós.

À Elisângela Campos, Estela Ribeiro e as meninas da Rep. Naxincha, Enio Pacini e os meninos da Rep. Ressaca, Lilian Matshuhashi, por todas as acolhidas, conversas e vários momentos de risadas e diversão.

À IV Turma de Física Médica, por sua paciência e por todo meu aprendizado durante o estágio de docência.

À Dra. Clélia A. Hiruma-Lima e Hélio Kushima (Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais – IBB/UNESP), Dr. Virgílio F. Nascimento Filho e Eduardo de Almeida (Laboratório de Instrumentação Nuclear – Cena/USP), e Dr. Carlos A. Perez (LNLS/CNPq), por todo o suporte no preparo e medida das amostras.

Aos funcionários do Depto. de Física e Biofísica, do SAEPE e da Seção de Pós-Graduação, por todas as conversas e ajudas nos momentos mais oportunos.

Aos professores Ney Lemke, José Ricardo Miranda, Roberto Fernandez, Vladimir Costa, Ivan Guerrini, Paulo Ramos, Marcos Fontes, José Roberto Saglietti e Marcos Rezende, do Depto. de Física e Biofísica, por toda ajuda e conselhos ao longo desses anos.

E, principalmente, ao professor Joel Mesa, pela amizade, ensinamentos, paciência, ajuda e confiança, durante esses anos e na realização deste trabalho.

*“Não se preocupe apenas em ser melhor que
os seus contemporâneos ou predecessores.
Tente ser melhor do que você mesmo”*

William Faulkner

Resumo

As úlceras pépticas são lesões provocadas pelo desequilíbrio entre fatores lesivos e protetores das mucosas gástrica e duodenal. Existe um grande número de plantas que são empregadas popularmente para o tratamento deste tipo de doença. Com este trabalho, pretende-se contribuir para a compreensão da ação farmacológica dos extratos de duas dessas plantas: a *Alchornea glandulosa* e a *Davilla elliptica*, assim como a *Davilla nitida*, que não é empregada na etnofarmacologia, mas pertence ao mesmo gênero de plantas com a função gastroprotetora. Neste sentido, foi realizada uma análise da composição multielementar destes compostos utilizando a técnica analítica de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF). Foram analisadas, também, amostras de mucosas gástricas de ratos tratados com estes extratos fitoterápicos e que tiveram úlceras pépticas induzidas por dois protocolos: indução por etanol ou indução por Indometacina, uma droga anti-inflamatória não esteroide (DAINE). As análises exploratórias e qualitativas foram efetuadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). A determinação das concentrações dos elementos P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br e Rb foi efetuada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

Palavras-chave: análise multielementar, extratos fitoterápicos, úlcera péptica, TXRF, luz síncrotron

Abstract

Peptic ulcers are lesions caused by the disequilibrium between harmful and protective factors of gastric and duodenal mucosa. There are several plants that are commonly used for the treatment of this disease. The purpose of this work is contribute for the comprehension of the pharmacological action of extracts of two types of these plants: *Alchornea glandulosa* and *Davilla elliptica*, as *Davilla nitida*, which is not used in the ethnopharmacology, but it belongs to the same genus of plants, with gastroprotective activity. So, we have done an analysis of the multielemental composition of these compounds using the analytical technique of total reflection X-ray fluorescence (TXRF). We also analyzed samples of gastric mucosa of rats treated with herbal extracts, which had peptic ulcers induced by two protocols: induction by ethanol or by indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID). The exploratory and qualitative analyzes were performed at the Nuclear Instrumentation Laboratory of the Brazilian Center for Nuclear Energy and Agriculture (CENA / USP). The concentrations of elements P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br and Rb were determinated at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS).

Key words: multielemental analysis, plant extracts, peptic ulcer, TXRF, synchrotron radiation

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração da úlcera péptica e de sua localização (Aschenbrenner e Venable, 2009).....	16
Figura 2: <i>Alchornea glandulosa</i> (Lorenzi, 1998).....	17
Figura 3: <i>Davilla elliptica</i> (Korndörfer, 2006)	18
Figura 4: <i>Davilla nitida</i> (© Tomas Pickering and Graham Wyatt, 2006)	19
Figura 5: Ilustração dos processos básicos da XRF (Serpa, 2007).....	26
Figura 6: Diagrama de transições quânticas entre os níveis K, L M e N (Serpa, 2007)	27
Figura 7: Ilustração da emissão dos raios-X característicos	28
Figura 8: Geometria de excitação-deteção da EDXRF, com linhas contínuas representando os raios-X incidentes e espalhados; e os tracejados, os raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999)	29
Figura 9: Geometria de excitação-deteção da TXRF, com linhas contínuas representando os raios-X incidentes e espalhados; e os tracejados, os raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999)	30
Figura 10: Representação da refração e reflexão de um feixe de radiação em função do ângulo de incidência.....	31
Figura 11: Visão do anel de armazenamento de partículas do LNLS	35
Figura 12: Esquema da preparação de amostras	38
Figura 13: Aparato experimental do Laboratório de Instrumentação Nuclear (CENA/USP).....	39
Figura 14: Aparato experimental da Linha D09B – XRF (LNLS)	40
Figura 15: Espectro da análise qualitativa do extrato de <i>Alchornea glandulosa</i>	43
Figura 16: Espectro da análise qualitativa do extrato de <i>Davilla elliptica</i>	44
Figura 17: Espectro da análise qualitativa do extrato de <i>Davilla nitida</i>	44

Figura 18: Curva de sensibilidade relativa	46
Figura 19: Limite de detecção calculado a partir das amostras certificadas	47
Figura 20: Concentração de P nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	48
Figura 21: Concentração de S nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	49
Figura 22: Concentração de Cl nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	49
Figura 23: Concentração de K nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	50
Figura 24: Concentração de Ca nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	50
Figura 25: Concentração de Ti nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	50
Figura 26: Concentração de Cr nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	51
Figura 27: Concentração de Mn nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	51
Figura 28: Concentração de Fe nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	52
Figura 29: Concentração de Ni nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	52
Figura 30: Concentração de Cu nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	52
Figura 31: Concentração de Zn nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	53
Figura 32: Concentração de Se nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	53

Figura 33: Concentração de Br nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	53
Figura 34: Concentração de Rb nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média).....	54
Figura 35: Concentração de P nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	56
Figura 36: Concentração de S nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	56
Figura 37: Concentração de Cl nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	57
Figura 38: Concentração de K nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	57
Figura 39: Concentração de Ca nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	57
Figura 40: Concentração de Ti nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	58
Figura 41: Concentração de Cr nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	58
Figura 42: Concentração de Mn nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	58
Figura 43: Concentração de Fe nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	59
Figura 44: Concentração de Ni nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	59
Figura 45: Concentração de Cu nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	59
Figura 46: Concentração de Zn nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	60
Figura 47: Concentração de Se nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	60

Figura 48: Concentração de Br nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	60
Figura 49: Concentração de Rb nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média).....	61
Figura 50: Concentração de P nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	73
Figura 51: Concentração de S nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	74
Figura 52: Concentração de Cl nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	74
Figura 53: Concentração de K nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	74
Figura 54: Concentração de Ca nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	75
Figura 55: Concentração de Ti nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	75
Figura 56: Concentração de Cr nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	75
Figura 57: Concentração de Fe nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	76
Figura 58: Concentração de Ni nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	76
Figura 59: Concentração de Cu nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	76
Figura 60: Concentração de Zn nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	77
Figura 61: Concentração de Se nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	77
Figura 62: Concentração de Br nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....	77

Figura 63: Concentração de Rb nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média).....78

Lista de Tabelas

Tabela 1: Grupos experimentais com seus respectivos tratamentos e induções de úlcera 37

Tabela 2: Constituição das diferentes diluições da solução padrão, e suas respectivas concentrações (ppm).....45

Tabela 3: Análise estatística entre as médias das concentrações dos extratos fitoterápicos.....55

Tabela 4: Análise estatística entre as médias das concentrações das mucosas gástricas do grupo Sham e das pré-tratadas que tiveram úlceras induzidas por DAINE 62

Tabela 5: Análise estatística entre as médias das concentrações das mucosas gástricas pré-tratadas que tiveram úlceras induzidas por DAINE 63

Tabela 6: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas sem tratamento e sem indução de úlcera (grupo Sham) 64

Tabela 7: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com salina e que tiveram úlcera induzida por DAINE 65

Tabela 8: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *A. glandulosa* e que tiveram úlcera induzida por DAINE.....66

Tabela 9: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *D. elliptica* e que tiveram úlcera induzida por DAINE 67

Tabela 10: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *D. nitida* e que tiveram úlcera induzida por DAINE 68

Tabela 11: Correlações de Pearson entre os elementos constituintes das amostras que tiveram úlcera induzida por DAINE 73

Tabela 12: Análise estatística entre as médias das concentrações das mucosas gástricas do grupo Sham e das pré-tratadas que tiveram úlceras induzidas por álcool 79

Tabela 13: Análise estatística entre as médias das concentrações das mucosas gástricas pré-tratadas que tiveram úlceras induzidas por álcool.....80

Tabela 14: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com salina e que tiveram úlcera induzida por álcool.....	82
Tabela 15: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com <i>A. glandulosa</i> e que tiveram úlcera induzida por álcool	83
Tabela 16: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com <i>D. elliptica</i> e que tiveram úlcera induzida por álcool.....	84
Tabela 17: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com <i>D. nitida</i> e que tiveram úlcera induzida por álcool	85
Tabela 18: Correlações de Pearson entre os elementos constituintes das amostras que tiveram úlcera induzida por álcool	87

Sumário

1 - Introdução	16
1.1 Úlcera péptica	16
1.2 Plantas medicinais	17
1.3 Composição multielementar	20
1.4 Relevância	23
2 - Objetivo	25
3 - Fundamentos Teóricos	26
3.1 Fluorescência de raios-X	26
3.1.1 Análise por XRF	28
3.2 Fluorescência de raios-X por reflexão total	30
3.2.1 Limite de detecção	33
3.3 Radiação síncrotron	34
4 – Materiais e Método	36
4.1 Amostras	36
4.1.1 Preparação das amostras de mucosa	36
4.2 Arranjo experimental	38
4.2.1 Análise qualitativa	38
4.2.2 Análise quantitativa	39
4.3 Análise estatística	41
4.4 Análise do coeficiente de correlação de Pearson	41
5 – Resultados e Discussão	43
5.1 Análise qualitativa	43
5.2 Cálculo das sensibilidades relativas	45
5.3 Limite de detecção	46
5.4 Análise das amostras	47
5.4.1 Extratos fitoterápicos	48

5.4.2 Mucosas gástricas com úlceras induzidas por DAINÉ.....	56
5.4.3 Mucosas gástricas com úlceras induzidas por álcool	73
6 – Conclusões.....	88
7 – Perspectivas Futuras.....	90
8 – Referências Bibliográficas.....	91

1 - Introdução

1.1 Úlcera péptica

Úlceras pépticas são lesões provocadas pela instabilidade de fatores lesivos e protetores das mucosas gástrica e duodenal (Figura 1). Isto é, o desequilíbrio entre o poder digestivo do ácido clorídrico e da pepsina e a resistência das mucosas a essa agressão. A manifestação e o agravamento dessas lesões podem 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 (Go, 1997; Kushima, 2006).

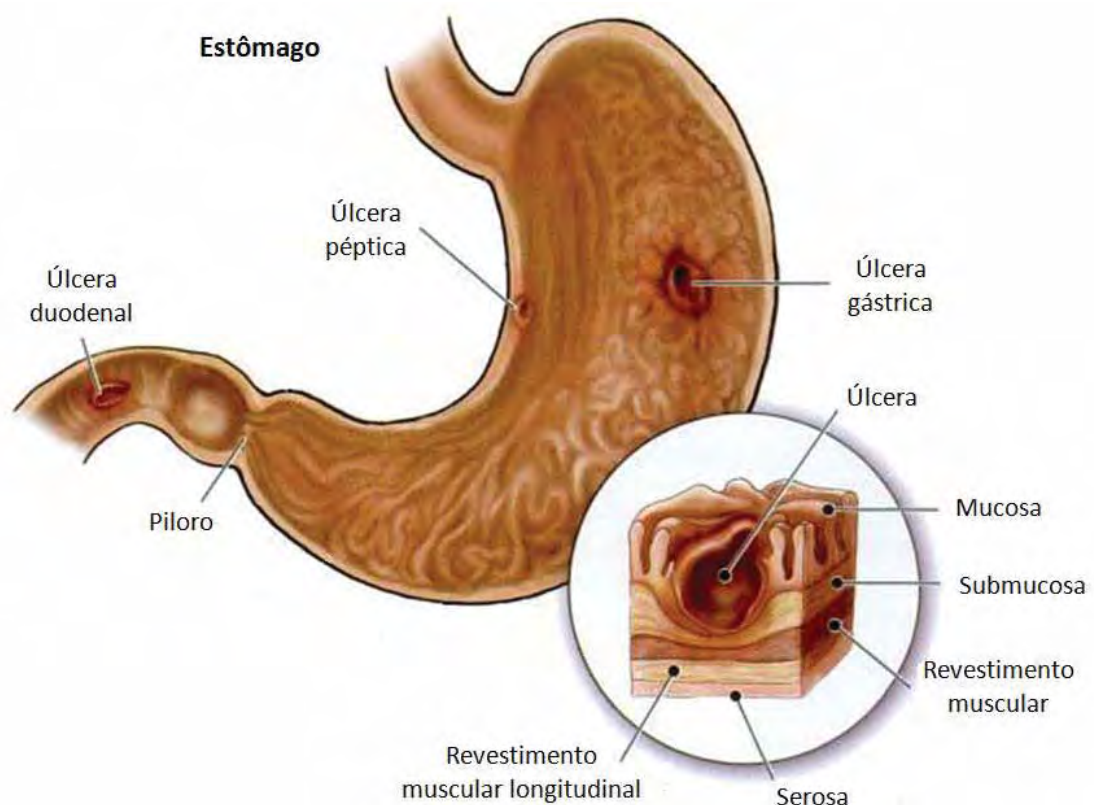


Figura 1: Ilustração da úlcera péptica e de sua localização (Aschenbrenner e Venable, 2009)

Para o tratamento das úlceras gástricas, extratos de plantas têm produzido resultados promissores e são atrativas fontes de novas drogas (Lewis e

Hanson, 1991; Borrelli e Izzo, 2000). Na medicina tradicional, por exemplo, muitas plantas e ervas têm sido utilizadas no tratamento de desordens do trato gastrointestinal (Gracioso, Hiruma-Lima e Souza-Brito, 2000; Hiruma-Lima, Gracioso, *et al.*, 2002; Toma, Gracioso, *et al.*, 2003). Por isso a importância da investigação dos efeitos promovidos por plantas que são tradicionalmente utilizadas no tratamento de doenças gástricas.

A investigação dos efeitos é realizada por diversos grupos de pesquisa a partir de estudos farmaco e toxicológicos, determinando a eficácia e segurança pré-clínica de importantes produtos vegetais utilizados no Brasil como analgésico e/ou antiulcerogênico.

1.2 Plantas medicinais

Dentre as plantas estudadas, encontram-se a *Alchornea glandulosa*, a *Davilla elliptica* e a *Davilla nitida*.

A *Alchornea glandulosa* (Figura 2), planta da família Euphorbiaceae, é conhecida como tapiá, tanheiro de folha redonda, tanheiro ou canela-raposa. É uma árvore de 10-20 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).



Figura 2: *Alchornea glandulosa* (Lorenzi, 1998)

Estudos etno-farmacológicos indicam que algumas espécies do gênero *Alchornea* são comumente empregadas para o tratamento de doenças gástricas (Osabede e Okoye, 2003; Calvo, Lima, *et al.*, 2007).

Ratos pré-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 pré-tratamento em ratos também demonstrou redução das lesões induzidas por solução de HCl/Etanol (46 %) e por DAINE (34 %) (Calvo, Lima, *et al.*, 2007).

A espécie *Davilla elliptica* (Figura 3), da família Dilleniaceae, é uma planta arbustiva de até 3 m de altura, encontrada freqüentemente no cerrado. Conhecida popularmente como sambaibinha, muricizinho, lixeirinha, lixeira e lixinha, apresenta como indicações medicinais o uso da infusão da planta em banhos para tratar de hematomas; as raízes servem para o tratamento de hemorróidas, possui ainda efeito adstringente, tônico e laxativo sob a forma de infusão (Silva, Silva, *et al.*, 2001; Kushima, 2006).



Figura 3: *Davilla elliptica* (Korndörfer, 2006)

Esta planta é utilizada no tratamento de hérnias (cataplasma) e como anticoncepcional. O infuso das folhas é utilizado no combate a diarreia e úlceras gástricas (Pott e Pott, 1994; Silva, Silva, *et al.*, 2001; Rodrigues e Carvalho, 2001) e o banho com suas folhas frescas é indicado em caso de linfatismo, inchações e orquites (Rodrigues e Carvalho, 2001).

Num modelo de úlcera induzida por etanol em ratos, o pré-tratamento com o extrato etanólico de *D. elliptica*, na dose de 500 mg/kg, apresentou efeito gastroprotetor promovendo 96 % de proteção da mucosa gástrica, em relação ao grupo controle. E no modelo de úlcera induzida por DAINÉ, o extrato de *D. elliptica*, na mesma dose, também apresentou efeito gastroprotetor, promovendo 74 % de proteção (Kushima, 2006).

Outra espécie da família Dilleniaceae é a *Davilla nitida* (Figura 4), conhecida popularmente como sambaibinha, cipó-de-fogo e lixeirinha de rama. É um arbusto trepador encontrado no cerrado e pode atingir 4 m de altura (Kushima, 2006).



Figura 4: *Davilla nitida* (Fonte: © Tomas Pickering and Graham Wyatt, 2006)

Até o momento, há somente um trabalho (Kushima, 2006) envolvendo esta planta quanto a sua composição fitoquímica e suas propriedades farmacológicas. Porém, estudos fitoquímicos indicam que outra espécie deste mesmo gênero, a *Davilla rugosa* Poreit, apresenta atividades farmacológicas incluindo atividade antiulcerogênica do caule e estimulante dos ramos, sendo que

todas essas atividades foram atribuídas às frações mais polares (Matheucci, 1996; Guaraldo, Chagas, *et al.*, 2000; Guaraldo, Sertie e Bacchi, 2001; Kushima, 2006).

Com uma dose de 500 mg/kg, o pré-tratamento de ratos com o extrato metanólico de *D. nitida* apresentou uma ação efetiva na redução de úlceras induzidas por etanol, promovendo 89 % de proteção em relação ao grupo controle. Com a mesma dose, o extrato apresentou 58 % de proteção em relação a úlceras induzidas por DAINÉ (Kushima, 2006).

Mesmo com estes estudos, a compreensão do mecanismo gastroprotetor dos compostos fitoterápicos produzidos a partir destas plantas ainda não é completa. Neste sentido, a contribuição deste trabalho no esclarecimento dessa problemática estará centrada no estudo da composição multielementar das frações e extratos destas plantas, assim como do tecido gástrico de animais aos quais serão induzidas úlceras pépticas.

1.3 Composição multielementar

A análise da composição multielementar é importante e necessária, pois determina os elementos químicos que estão presentes na composição de uma determinada amostra. Estes elementos têm um papel fundamental em todos os sistemas biológicos, pois participam de todos os processos metabólicos, como componentes de diferentes enzimas, catalisando interações químicas em células vivas (Ivyengar, Kollmer e Browen, 1970; Carvalho, Magalhães, *et al.*, 2007).

Os elementos químicos são classificados quanto aos níveis de concentrações presentes em uma determinada amostra, como elementos ultra-traço, quando sua concentração é menor que 0,01 µg/g; elementos traço, quando a concentração está entre 0,01 e 100 µg/g; e elementos majoritários, quando a concentração é maior que 100 µg/g (Lindhu, 1991).

No organismo humano, 15 elementos traço são considerados essenciais: Ca, Cu, Cl, F, I, Fe, Mg, Mn, Mo, N, P, K, Na, S e Zn (Tolgyessy, Havranek e Dejmekova, 1990). É reconhecido que todos os tecidos do corpo apresentam uma composição semelhante destes elementos, que varia de acordo com a atividade que exercem. Além disso, é reconhecido também que o excesso ou a deficiência dos

elementos essenciais, com relação ao nível fisiológico humano, ocorre em portadores de certas doenças (Cesareo, 1988).

Para as plantas, os elementos traço essenciais são aqueles que não podem ser substituídos por outros em suas funções bioquímicas específicas e que têm uma influência direta no organismo (Kabata-Pendias, 2000).

A matéria seca das plantas geralmente é constituída por aproximadamente 44,5 % de C, 42,5 % de O, 6,5 % de H, 2,5 % de N, 1,9 % de K, 1,0 % de Ca, 0,3 % de S, 0,2 % de P e 0,2 % de Mg. Estes elementos são encontrados nas plantas em altas concentrações e, por isso, são comumente chamados de macronutrientes. Existem ainda, os micronutrientes, geralmente representados por B, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Si e Zn, que embora encontrados em pequenas quantidades, são essenciais ao desenvolvimento adequado das plantas (Markert, 1996; Yamashita, 2006)

As plantas medicinais contêm os elementos químicos que podem ser disponibilizados para o corpo humano em qualquer tipo do consumo de ervas e seus extratos. Os índices desses elementos são dependentes das características do solo onde a planta cresce e pela habilidade das plantas em acumular elementos seletivamente (Queralt, Ovejero, *et al.*, 2005).

Ainda que nem todos os elementos possuam funções biológicas totalmente descritas, a maioria deles é responsável por importantes atividades no metabolismo humano e, portanto, estão diretamente relacionados com a manutenção da saúde e o funcionamento adequado do organismo (Yamashita, 2006).

Sendo assim, alguns elementos químicos apresentam atividades relacionadas diretamente com a formação ou neutralização de úlceras pépticas.

O zinco, por exemplo, além de ser importante para o metabolismo do corpo e para o crescimento, é importante também para a redução da secreção gástrica e cicatrização de tecidos, apresentando efeitos no tratamento e prevenção da úlcera péptica (Sturniolo, Mestriner e D'Inca, 2000).

Compostos com este elemento apressam a cicatrização de úlceras gástricas, em humanos e ratos, e impedem o surgimento de vários tipos de lesões gástricas induzidas experimentalmente (Watanabe, Arakawa, *et al.*, 1995).

E em pessoas com úlcera péptica, os níveis séricos de zinco apresentam-se menor quando comparado com a população sem a patologia, enquanto a quantidade de zinco no muco gástrico mostra-se maior. Isto provavelmente ocorre devido à agregação do elemento no tecido doente (Bandyopadhyay, Banerjee, *et al.*, 1995; Yazdanpanah, Moghimi, *et al.*, 2009).

Outro elemento com função relacionada à úlcera péptica é o cálcio, que demonstra influência na regeneração e proliferação celular da mucosa danificada (Koo, 1994).

Segundo estudos, a retirada de cálcio, *in vitro*, da mucosa gástrica de sapos, tem um imenso efeito na sua restituição, por inibir a formação de complexos juncionais (Silen e Ito, 1985; Koo, 1994).

Além disso, quando canais de cálcio são bloqueados com a administração do fármaco Verapamil, úlceras em ratos induzidas por etanol, são agravadas. No entanto, em ratos que tiveram uma administração de gluconato de cálcio antes da administração de etanol, o aparecimento das úlceras ou seu agravamento foi antagonizado (Koo, Cho e Ogle, 1986).

O elemento cobre também apresenta atividade relacionada às úlceras e seus complexos têm sido investigados.

O complexo nicotinato de cobre, por exemplo, possui grande atividade antiulcerogênica contra a indução por DAINÉ, em ratos. Esta atividade é realizada pelo aumento da resistência da mucosa, atenuação da produção do ácido e da secreção do suco gástrico (Tuorkey e Abdul-Aziz, 2009).

Na indução de úlceras por etanol, complexos de cobre também apresentaram atividade antiulcerogênica em ratos. Sua associação com bases de Schiff (grupo funcional que contém uma ligação dupla carbono-nitrogênio), numa dose de 62,5 mg/kg, promove a redução de 99,66 % da área da úlcera induzida por etanol (Mustafa, Hapipah, *et al.*, 2009).

Assim como os complexos de cobre, complexos formados por níquel associado a bases de Schiff também promovem uma proteção da mucosa gástrica. Este complexo, na dose de 250 mg/kg, reduz 97,33 % da área da úlcera induzida por etanol. (Mustafa, Hapipah, *et al.*, 2009).

Outro elemento com atividade relacionada à úlcera é o bismuto. Seu composto, o subcitrato de bismuto coloidal, possui a efeito bactericida contra *H. pylori*, apresentando baixa taxa de recidiva após a cura inicial (Lambert, 1991).

Além disso, o composto do bismuto acelera a cicatrização das úlceras e provoca um acúmulo do fator de crescimento epidérmico ao redor da lesão (Lee, 1991).

O elemento selênio também apresenta efeito citoprotetor e antiulcerogênico. Em úlceras induzidas por estresse por contenção e hipotermia ou pela utilização de DAINES, o selênio, na forma de selenito de sódio, produz uma inibição significativa da lesão induzida pelos procedimentos analisados no tecido gástrico (Parmar, Tariq e Ageel, 1988). De acordo com estudos, seus efeitos de proteção gástrica pode ser consequência de suas propriedades antioxidantes (Mobarok Ali, Al-Rashed, *et al.*, 1997).

1.4 Relevância

O uso das plantas medicinais vem crescendo ao longo dos anos. No Brasil, há mais de 1000 medicamentos fitoterápicos registrados, com um valor de vendas estimado em US\$ 400 milhões, no ano de 2001 (WHO, 2005). Além disso, nas comunidades que vivem na região da Mata Atlântica, por exemplo, o uso popular de plantas medicinais é muito propagado, contando com 114 espécies de plantas utilizadas em 628 diferentes atribuições medicinais (Di Stasi, Oliveira, *et al.*, 2002).

Com isso, a análise e a determinação da composição multielementar de plantas medicinais têm despertado interesse cada vez maior na avaliação do potencial farmacológico e toxicológico de determinadas espécies.

Esta avaliação pode contribuir com estudos que buscam compreender a participação dos elementos químicos nos processos biológicos do organismo humano e nas reações de formação de substâncias farmacologicamente ativas nas plantas, como os alcalóides, terpenos, glicosídeos, flavonóides, entre outras (Yamashita, 2006).

O número de pesquisas sobre a composição elementar de plantas medicinais é grande e abrange um grande número de técnicas analíticas, com destaque para os métodos cromatográficos, espectroscópicos e biológicos. Isso se deve ao aumento da popularidade e do consumo dessas plantas e ao conhecimento necessário da função de cada elemento no organismo humano (Phillipson, 2003; Yamashita, 2006).

Apesar do grande número de pesquisas envolvendo plantas medicinais, nenhum estudo apresenta uma possível alteração da concentração elementar de um tecido na presença de seus extratos fitoterápicos. Espera-se, então, que os resultados deste trabalho possam ser relevantes para a determinação de elementos químicos como bioindicadores do desenvolvimento da úlcera péptica e da efetiva função gastroprotetora dos extratos fitoterápicos.

2 - Objetivo

Este trabalho tem como objetivo estudar a viabilidade do método analítico não-destrutivo – fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF) – em amostras de extratos fitoterápicos, além de determinar as concentrações elementares das mucosas gástricas na presença dos extratos de *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, plantas popularmente utilizadas no tratamento de úlceras pépticas, com o intuito de contribuir para o entendimento de suas ações farmacológicas.

3 - Fundamentos Teóricos

3.1 Fluorescência de raios-X

A fluorescência de raios-X (XRF, *X-ray Fluorescence*) é uma técnica de análise utilizada para a determinação qualitativa e quantitativa das concentrações dos elementos constituintes em uma amostra. Este método é baseado na medida das intensidades dos raios-X característicos emitidos pelos elementos químicos da amostra, quando devidamente excitados (Figura 5).

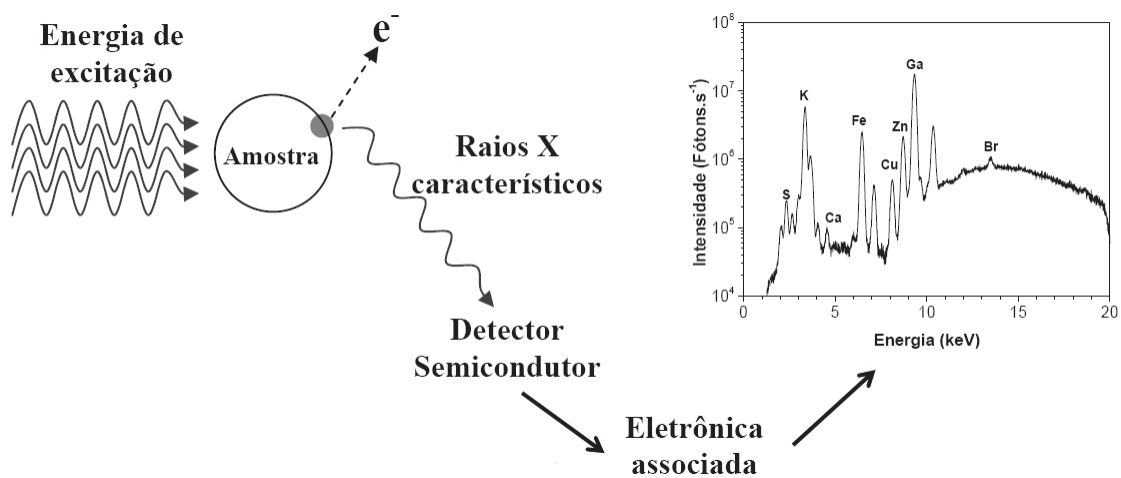


Figura 5: Ilustração dos processos básicos da XRF (Serpa, 2007)

Quando o elemento da amostra é irradiado por um fóton incidente com energia igual ou superior à energia de ligação do elétron de um determinado orbital, este fica num estado excitado e tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, produzindo uma vacância. Como consequência, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a lacuna.

Quando um elétron é ejetado do nível K, por exemplo, a vacância pode ser preenchida por elétrons dos níveis L, M, N (Figura 6). Assim, cada transição eletrônica constitui numa perda de energia do elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios-X (raios-X característicos), de energia característica e bem definida para cada elemento (Nascimento-Filho, 1999).

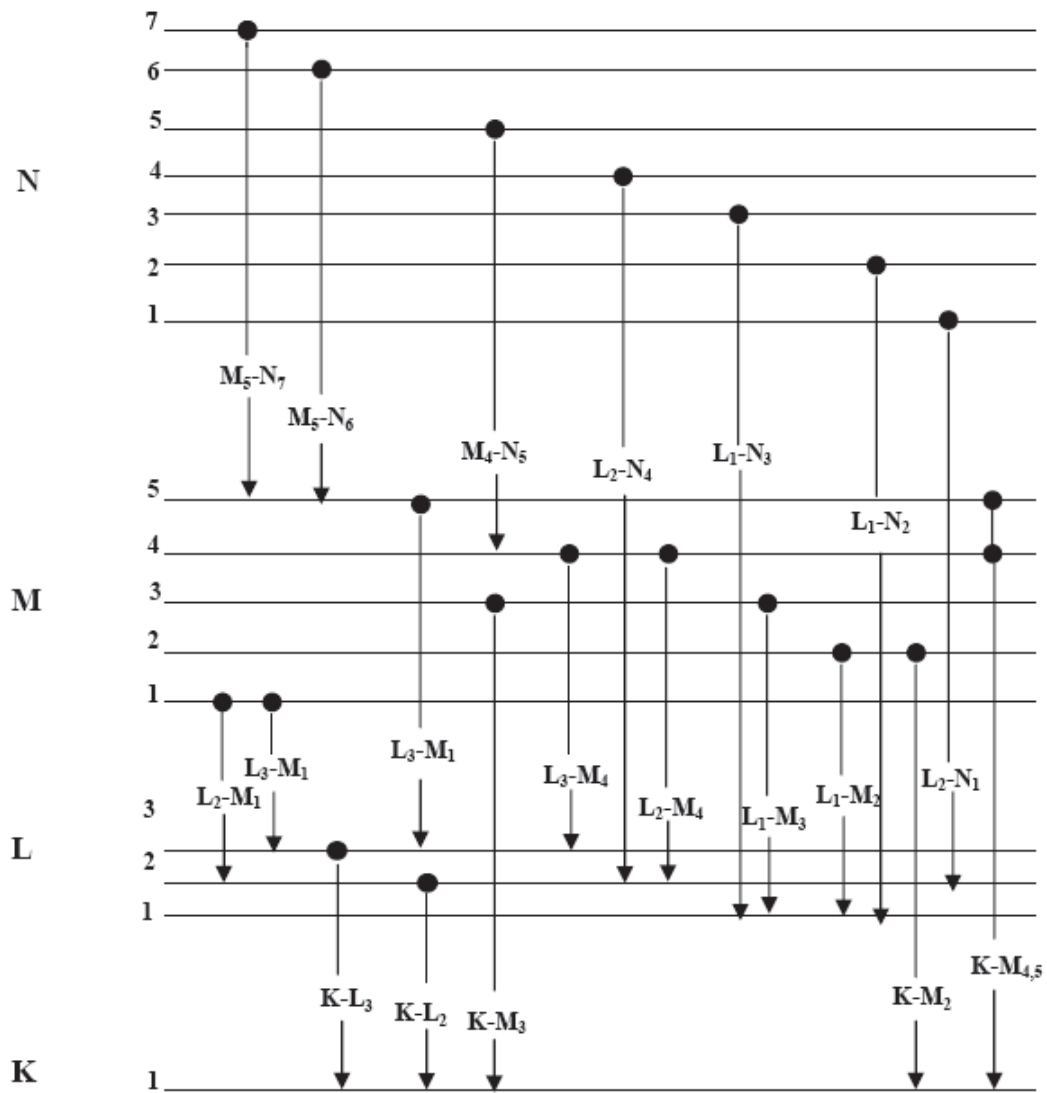


Figura 6: Diagrama de transições quânticas entre os níveis K, L, M e N (Serpa, 2007)

Os raios-X emitidos por um elemento são denominados de acordo com a origem e o destino do elétron que realiza o salto quântico para preencher a lacuna do elétron ejetado. Quando a transição ocorre da camada L para a camada K ($L \rightarrow K$), os raios-X emitidos são denominados K_α . Para a transição $M \rightarrow K$, os raios-X característicos são denominados K_β (Figura 7); para a transição $M \rightarrow L$, são denominados L_α e, assim, sucessivamente.

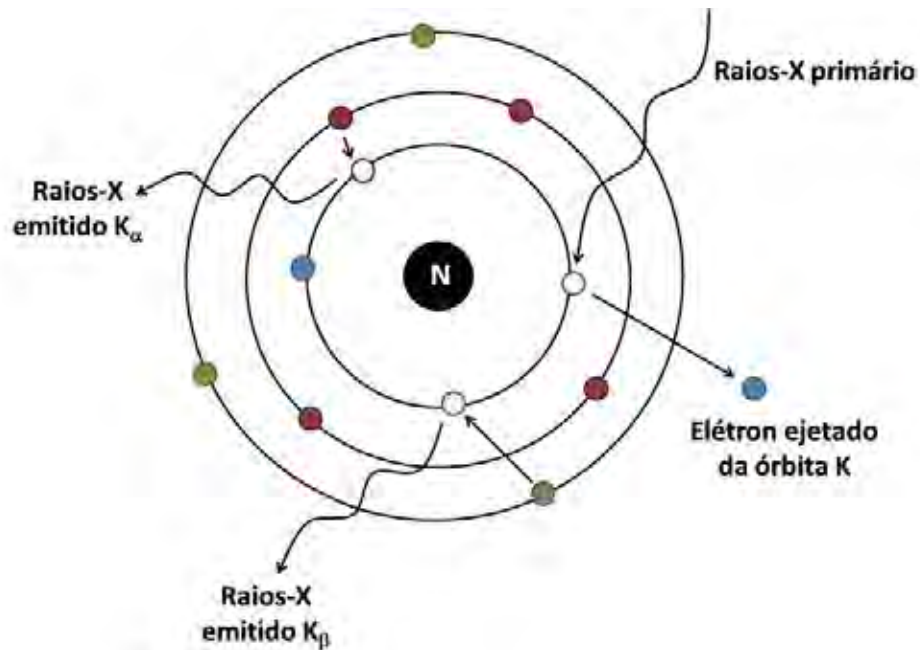


Figura 7: Ilustração da emissão dos raios-X característicos

Algumas vezes, essa radiação característica pode interagir com elétrons mais externos do próprio átomo. Com isto, são emitidos elétrons (elétrons Auger), de energias também conhecidas, ao invés da emissão de radiação característica. Uma das consequências deste efeito são as linhas do espectro de uma análise não tão intensas como previsto pelo número de vacâncias criadas no orbital associado (Nascimento-Filho, 1999).

3.1.1 Análise por XRF

O primeiro tipo de análise por XRF foi a fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF, *Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence*), realizada por espectrômetros, a partir da dispersão por comprimento de onda. Esta técnica é baseada na Lei de Bragg, necessitando de um movimento sincronizado e preciso entre o cristal difrator e o detector (Jenkins, 1981; Nascimento-Filho, 1999).

Com a utilização da WDXRF, foi possível, por exemplo, determinar Cu e Mo em cinzas de tecido vegetal e Mn, Co, Zn e Mo, em material vegetal seco (Lazar e Beezon, 1958).

Com o aparecimento do detector semiconductor de Si(Li), foi possível o surgimento da fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF, *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*). Com este tipo de detector, é possível a discriminação dos raios-X com energias bem próximas (Figura 8) (Nascimento-Filho, 1999).

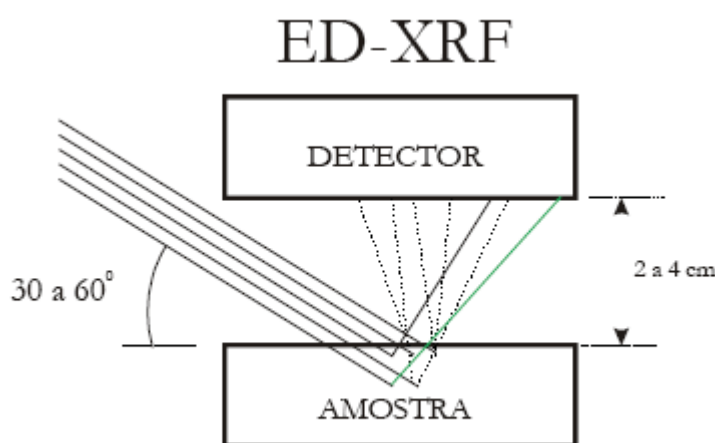


Figura 8: Geometria de excitação-deteção da EDXRF, com linhas contínuas representando os raios-X incidentes e espalhados; e os tracejados, os raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999)

Utilizando a EDXRF, puderam ser determinados, por exemplo, elementos como K, Ca, Mn, Fe, Zn, entre outros, de vinte plantas medicinais comumente utilizadas na Nigéria (Obiajunwa, Abadejo e Omobuwajo, 2002).

Uma variante desta técnica é a fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF, *Total Reflection X-ray Fluorescence*), baseada na excitação de raios-X característicos de uma amostra por radiação eletromagnética (por exemplo, os raios-X, gerados em tubos ou através da radiação síncrotron) (Figura 9) (Nascimento-Filho, 1999).

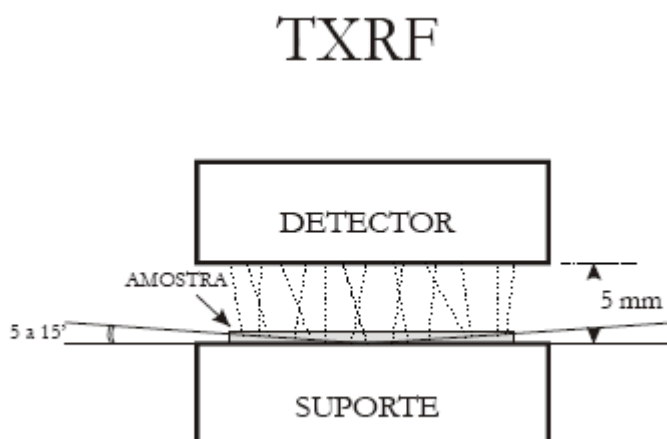


Figura 9: Geometria de excitação-deteção da TXRF, com linhas contínuas representando os raios-X incidentes e espalhados; e os tracejados, os raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999)

3.2 Fluorescência de raios-X por reflexão total

A técnica de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF) vem sendo bastante desenvolvida nos últimos anos e tem sido aplicada principalmente na análise de elementos traços (na faixa de partes por bilhão - ppb) em amostras líquidas, como em pesquisas biológicas e médicas, em análises de águas superficiais (pluviais, fluviais e marítimas) e subterrâneas, fluídos biológicos e controle de qualidade de produtos de alta pureza (Prange, Bøddeker e Kramer, 1993; Almeida, 2001; Cunha e Silva, Nascimento-Filho, *et al.*, 2002; Moraes, 2004).

A reflexão total de raios-X ocorre quando um feixe de radiação, na passagem de um meio para um material, atinge a superfície do material e é refletido por ela, em ângulo igual ao de incidência. Quando um feixe de radiação passa de um meio para outro, o processo de refração também pode acontecer; e a ocorrência de um desses processos depende da energia da radiação incidente, da densidade eletrônica do material e do ângulo de incidência da radiação (Nascimento-Filho, 1999).

Na reflexão total dos raios-X, o ângulo de refração tende a zero e o feixe refratado tangencia a interface entre os meios. Deste modo, há um ângulo de incidência mínimo (ângulo crítico) a partir do qual a refração não ocorre e toda a radiação incidente sofre reflexão total (Figura 10) (Nascimento-Filho, 1999).

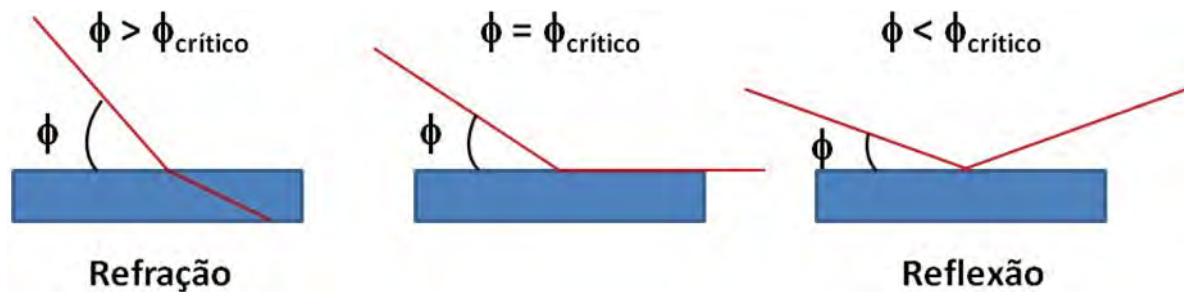


Figura 10: Representação da refração e reflexão de um feixe de radiação em função do ângulo de incidência

Deste modo, pode-se afirmar que, na técnica de TXRF, o feixe incidente não interage com o suporte, e atravessa toda a amostra, tanto no sentido da incidência como na reflexão, havendo grande probabilidade de excitar os átomos constituintes da amostra. Portanto, um fator importante nesta técnica é a espessura da amostra. Ela é considerada um fino filme, da ordem de microlitros, o que permite desprezar os efeitos de absorção da radiação presentes em outros tipos de XRF. Com isto, os cálculos das concentrações elementares, ou seja, as análises quantitativas se tornam bem mais simples (Nascimento-Filho, 1999).

Assim, a equação básica para a análise quantitativa é a relação entre a intensidade fluorescente da linha característica K_{α} , ou L_{α} , e a concentração de um elemento de interesse, conforme a equação 1:

Equação 1

na qual, I_i é a intensidade total de raios-X da linha característica K_{α} do elemento i de interesse (*cps* – contagens por segundo); S_i é a sensibilidade elementar do sistema (*cps/ μ L*); e C_i é a concentração na solução pipetada no suporte (*μ L*).

Para o cálculo das concentrações, adiciona-se um padrão interno à amostra, com a vantagem de corrigir as instabilidades do sistema, como flutuações no gerador, na emissão e detecção dos raios-X, e erros operacionais, como pipetagem e posicionamento das amostras, etc.

Os elementos utilizados como padrão interno devem ocorrer em concentrações baixíssimas nas amostras, e os mais utilizados são Ge (germânio) e Ga (gálio), para amostras líquidas e Co (cobalto) e Y (ítrio), para outros tipos de amostras.

Assim, com a utilização desse padrão interno, pode-se calcular a concentração dos elementos de interesse utilizando-se a equação 2:

Equação 2

na qual, i representa o elemento de interesse, p o elemento utilizado como padrão interno, C a concentração (ppm), S a sensibilidade relativa elementar (em relação ao elemento utilizado como padrão interno) e I a intensidade dos raios X característicos (cps).

Para o cálculo da sensibilidade elementar de cada elemento, utiliza-se uma solução padrão multielementar, contendo os mais variados elementos em baixa concentração (na faixa de ppm) e emissores de raios-X com energias não muito próximas, evitando, assim, a sobreposição de picos (Nascimento-Filho, 1999).

Assim, a partir da equação 2, tem-se:

Equação 3

Fazendo,

Equação 4

e

Equação 5

e então, substituindo as equações 4 e 5 na equação 3, tem-se a equação 6:

na qual, R_i representa a intensidade relativa e S_{Ri} a sensibilidade relativa para o elemento i .

Há ainda uma grande relação entre a sensibilidade elementar e o número atômico dos elementos químicos. Então, a partir das sensibilidades elementares dos elementos presentes na solução padrão elementar, pode-se estimar a sensibilidade para aqueles elementos presentes na amostra e não contidos na solução padrão. E, assim, estimar sua concentração na amostra de interesse (Nascimento-Filho, 1999).

3.2.1 Limite de detecção

Outro parâmetro que deve ser analisado na técnica por TXRF é o limite de detecção, que representa a menor quantidade que pode ser determinada estatisticamente em relação ao *background* de uma medida.

Em cada espectro de raios-X é observado uma linha aproximadamente contínua sob os picos característicos que constituem a amostra. Tal linha é consequência principalmente das interações das radiações espalhadas pela amostra com o detector e, também, das próprias radiações características emitidas por cada elemento. Deste modo, em cada pico no espectro de raios-X, há uma área como consequência, em parte, à intensidade dos raios-X característicos de um elemento i e, em parte, ao *background* naquela região i (Nascimento-Filho, 1999).

Assim, para o cálculo do limite de detecção, a área sob o pico de cada elemento de interesse é ajustada, obtendo-se as intensidades do *background*. Com esses valores, o cálculo é feito utilizando a equação 7 (Streli, Wobrauschek, *et al.*, 2008):

na qual, LD_i representa o limite de detecção do elemento de interesse i (*cps*), C_i a concentração desse elemento (*ppm*), I_i a intensidade desse elemento (*cps*) e BG_i a intensidade do *background* (*cps*), sob o pico do elemento de interesse i .

Geralmente, os limites de detecção para a TXRF são bem menores que os da EDXRF. Isto ocorre devido, principalmente, à baixa intensidade do *background*, devido a baixa transferência de energia ao suporte da amostra em relação à EDXRF; ao fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, que é muito mais efetivo do que na EDXRF; e à distância entre a amostra e o detector de Si que é muito maior que na EDXRF, aumentando, portanto, a eficiência de detecção dos raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999).

3.3 Radiação síncrotron

Para análises quantitativas, geralmente utiliza-se a luz síncrotron associada à técnica de TXRF.

A luz síncrotron é a intensa radiação eletromagnética emitida por partículas carregadas aceleradas em direção ao centro de uma órbita circular. Quando mudam sua direção pela ação de dipolos magnéticos, estas partículas emitem uma radiação, denominada luz síncrotron (Gordon, Hanson, *et al.*, 1990)

Este tipo de radiação possui alto brilho espectral, resultando num aumento da intensidade dos raios-X primários, quando comparados com o tubo de raios-X convencionais. Possui elevada polarização, possibilitando um reduzido *background* espectral. E possui, também, alta amplitude espectral, abrangendo do infra-vermelho 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, 1996).

Devido a essas propriedades, a luz síncrotron possibilita um grande número de aplicações e em diferentes áreas, como geologia, arqueometria, ciências médicas e biológicas, entre outras.

A utilização deste tipo de radiação é feita em laboratórios, devidamente equipados, localizados em diversas partes do mundo. O único existente na América Latina é o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas/SP.

O LNLS (Figura 11) é formado por 13 linhas de luz, com feixes de raios-X ou feixes de radiação ultravioleta, fornecendo, a usuários do Brasil e do exterior, uma excelente infra-estrutura para o desenvolvimento de pesquisas (LNLS, 2007).



Figura 11: Visão do anel de armazenamento de partículas do LNLS

4 – Materiais e Método

4.1 Amostras

Os extratos fitoterápicos de *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, utilizados neste estudo, foram cedidos pelo Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais – UNESP/Botucatu.

A preparação das amostras de mucosas gástricas tratadas com os extratos e que tiveram úlceras induzidas foi realizada em conjunto com o mesmo laboratório.

4.1.1 Preparação das amostras de mucosa

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 (177-300g), 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.

Como este estudo é uma contribuição a um estudo já feito (Kushima, 2006), os experimentos realizados obedeceram aos mesmos protocolos experimentais aprovados no estudo anterior (nº 017, 018, 019, 020, 021 e 022/04-CEEA; nº 018 e 019/05-CEEA).

Para este trabalho, os animais foram separados aleatoriamente em 3 grandes grupos de acordo com o pré-tratamento e o tipo de indução de úlcera (Tabela 1). No grupo Sham estão os animais que sofreram o estresse do experimento, mas não tiveram tratamento, nem úlceras induzidas. No grupo A estão os animais nos quais as úlceras foram induzidas a partir das drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINE) e no grupo B, os que tiveram úlceras induzidas por álcool.

As diferentes induções de úlceras, por DAINÉ ou por álcool, foram baseadas em fatores etiológicos da doença no homem (Kushima, 2006).

Antes das induções de úlcera, os animais do grupo 1 receberam a administração de salina, por via oral, num volume de 10 ml/kg, sendo o grupo controle. Os animais dos grupos 2, 3 e 4 foram pré-tratados com o extrato fitoterápico administrado, por via oral, num volume de 10 ml/kg, na dose de 500 mg/kg. Esta concentração de dose foi escolhida para os 3 diferentes tratamentos pois, de acordo com Kushima (2006), os extratos de *D. elliptica* e *D. nitida*, nesta concentração, apresentaram proteção significativa, com valores muito próximos da proteção gástrica.

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

Sham		Grupo A		Grupo B	
Tratamento	Indução	Tratamento	Indução	Tratamento	Indução
-	1A	Salina	D A I N E	1B	Salina
	2A	<i>A. glandulosa</i>		2B	<i>A. glandulosa</i>
	3A	<i>D. elliptica</i>		3B	<i>D. elliptica</i>
	4A	<i>D. nitida</i>		4B	<i>D. nitida</i>
					Á L C O O L

Após o tratamento, nos animais que tiveram úlceras induzidas por DAINÉ (grupo A), foi utilizada a Indometacina, sendo administrada no volume de 10 ml/kg, na dose de 50 mg/kg. Após 4 horas, esses animais foram sacrificados e seus estômagos retirados.

Nos animais que tiveram úlceras induzidas por álcool (grupo B), foi utilizado etanol 100 %, sendo administrado 1 ml por via oral. Após 30 minutos, esses animais foram sacrificados e seus estômagos retirados.

Os animais do grupo Sham e dos grupos tratados com salina, também foram sacrificados e seus estômagos retirados.

Após a retirada, os estômagos foram raspados para obtenção das mucosas, que foram pesadas (0,170-0,468 g). Em seguida, foram digeridas em meio

ácido, utilizando HNO_3 – 63 % e aquecidas a uma temperatura de 60 °C durante 2 horas. Depois, as amostras foram diluídas em água deionizada.

Para análise qualitativa, de cada solução, foi pipetada uma alíquota de 20 μl sobre suportes de quartzo, seguido de secagem em estufa a 60 °C.

E para as análises quantitativas, de cada solução, foi pipetada uma alíquota de 25 μl e colocada em um recipiente com 25 μl de Ga (padrão interno). E, assim, uma alíquota de 5 μl de cada amostra foi pipetada, em triplicata, sobre suportes de Si, seguido de secagem em estufa a 60 °C (Figura 12).

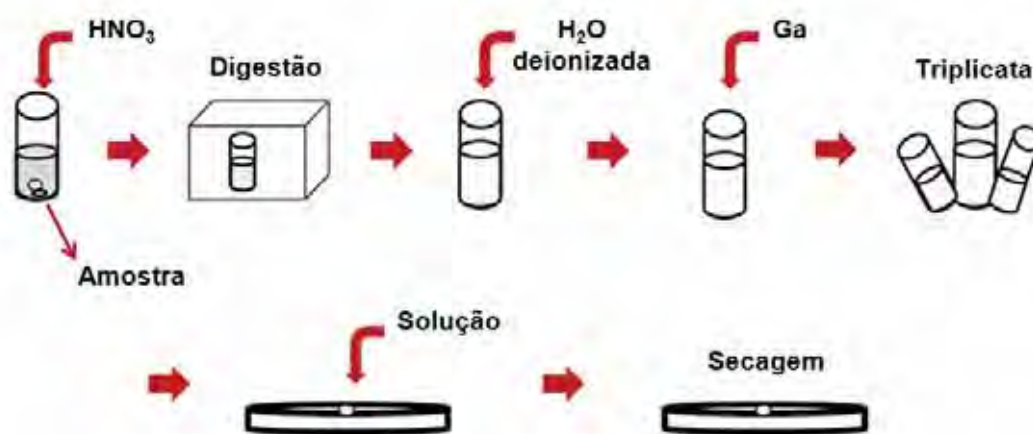


Figura 12: Esquema da preparação de amostras

4.2 Arranjo experimental

4.2.1 Análise qualitativa

Para se obter uma composição prévia dos elementos constituintes dos extratos fitoterápicos, medidas qualitativas foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear (Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, Piracicaba, SP) (Figura 13).

A excitação das amostras, no suporte de quartzo, foi feita utilizando um tubo de raios-X com alvo de Mo e filtro de Zr, operando em 30 kV e 40 mA. Para

detecção dos raios-X característicos, o equipamento possui um detector de Si(Li), com uma resolução de 165 eV para raios-X do Mn (5,9 keV).

O tempo de aquisição foi fixado em 200 s, e depois, os espectros de raios-X adquiridos foram analisados utilizando o programa AXIL (IAEA, 2006).



Figura 13: Aparato experimental do Laboratório de Instrumentação Nuclear (CENA/USP)

4.2.2 Análise quantitativa

As medidas para a análise quantitativa foram realizadas na Linha D09B – XRF (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas, SP) (Figura 14).

A excitação das amostras, no suporte de Si, foi feita utilizando radiação síncrotron, operando com um feixe de 16,5 keV, e com um detector de Si(Li) para detecção dos raios-X característicos.

O tempo de aquisição foi fixado em 100 s. E depois, os espectros de raios-X adquiridos foram analisados utilizando o programa AXIL (IAEA, 2006),

obtendo-se os dados para cálculo da concentração dos elementos constituintes da amostra.

Para cálculo das sensibilidades relativas dos elementos, foram utilizadas soluções padrões multielementares conhecidas e em diferentes concentrações da solução *Multielement Atomic Spectroscopy Solution*, da marca Fluka, com o acréscimo de Ga, como padrão interno. Estas soluções foram medidas sob as mesmas condições das amostras analisadas.

Para cálculo do limite de detecção, foi utilizada a amostra certificada *Trace elements in natural water* (NIST 1640), do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).



Figura 14: Aparato experimental da Linha D09B – XRF (LNLS)

4.3 Análise estatística

Após a obtenção das concentrações dos elementos constituintes das amostras, os dados foram analisados e os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão da média.

Os resultados, em seus valores médios, foram testados através do teste “t” de Student, para a comparação de duas amostras, a Análise de Variância (ANOVA), para a comparação de mais de duas amostras.

Após a ANOVA, a análise foi complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, utilizando o nível de significância estabelecido de 5 %. Nesta análise o seguinte critério é seguido: para valores de $P < 0,0001$, há uma diferença entre as médias extremamente significativa; para valores de $P < 0,001$, a diferença é considerada muito significativa; para valores de $P < 0,05$, é significativa; e para valores de $P > 0,05$, as diferenças são consideradas não-significantes.

Os cálculos estatísticos foram realizados através do programa InStat, versão 3.02 (GraphPad Software, San Diego California, USA).

4.4 Análise do coeficiente de correlação de Pearson

A partir dos resultados das concentrações dos diferentes elementos obtidos nas amostras analisadas, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson ρ , que mede o grau da correlação (e a direção dessa correlação – se positiva ou negativa) entre duas variáveis.

Este coeficiente assume valores entre -1 e 1 e pode ser expressado em porcentagem, sendo o valor 1 (100 %) indicativo de uma correlação perfeita positiva entre duas variáveis, isto é, se uma variável aumenta, a outra sempre aumenta; e se uma delas diminui, a outra também sempre diminui. O valor -1 indica uma correlação negativa (anti-correlação de 100 %) entre as duas variáveis, ou seja, se uma variável aumenta, a outra sempre diminui, e vice-versa. No caso de ocorrer o valor 0, isto indica que as variáveis são totalmente independentes (pelo menos, linearmente).

Para obter este coeficiente de correlação, utiliza-se a equação 8:

$$\rho$$

Equação 8

na qual, n é o número de dados, x_i e y_i são os valores medidos de cada variável e $\bar{x}_i$ e $\bar{y}_i$ são os valores médios de cada variável.

Para análise correlacional é comumente empregado o seguinte critério: para valores de 70 % ou mais positivo (negativo), há uma forte correlação (anti-correlação) entre as variáveis; para valores de 30 % a 70 % positivo (negativo), há uma correlação (anti-correlação) moderada e para valores de 0 a 30 % positivo (negativo), há uma correlação (anti-correlação) fraca.

Os cálculos da correlação de Pearson foram implementados no programa Mathcad, versão 14.0 (Needham, Massachusetts, USA).

5 – Resultados e Discussão

5.1 Análise qualitativa

Com o propósito de se avaliar a composição dos extratos fitoterápicos de plantas utilizadas no tratamento de úlceras, foi realizada uma medida prévia e exploratória das amostras, obtendo seus elementos constituintes (Figura 15-17).

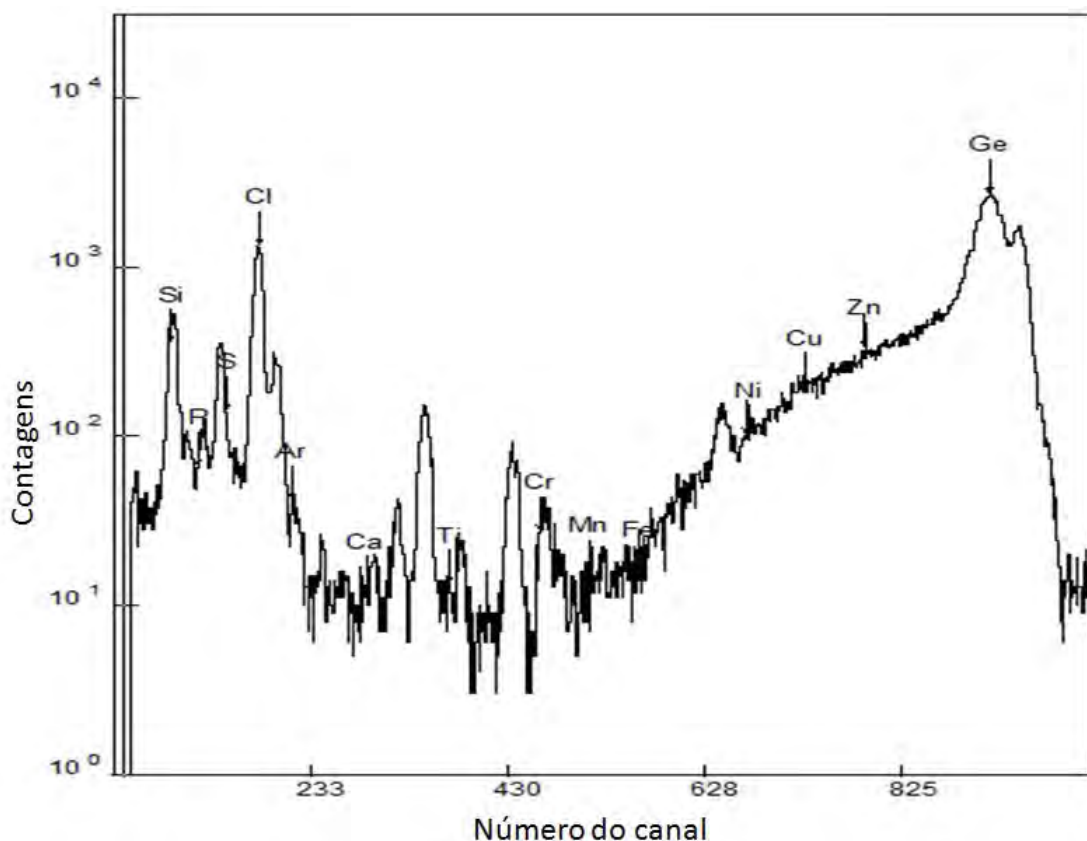


Figura 15: Espectro da análise qualitativa do extrato de *Alchornea glandulosa*

Como pode ser observado nas figuras, sob as condições experimentais apresentadas, foi possível detectar, qualitativamente, os seguintes elementos: Si, P, S, Cl, Ar, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn e Ge.

Assim, com o conhecimento prévio da constituição qualitativa das amostras, a análise quantitativa foi realizada para se obter a concentração destes elementos nos extratos fitoterápicos, bem como analisar a composição multielementar da mucosa gástrica na presença deles.

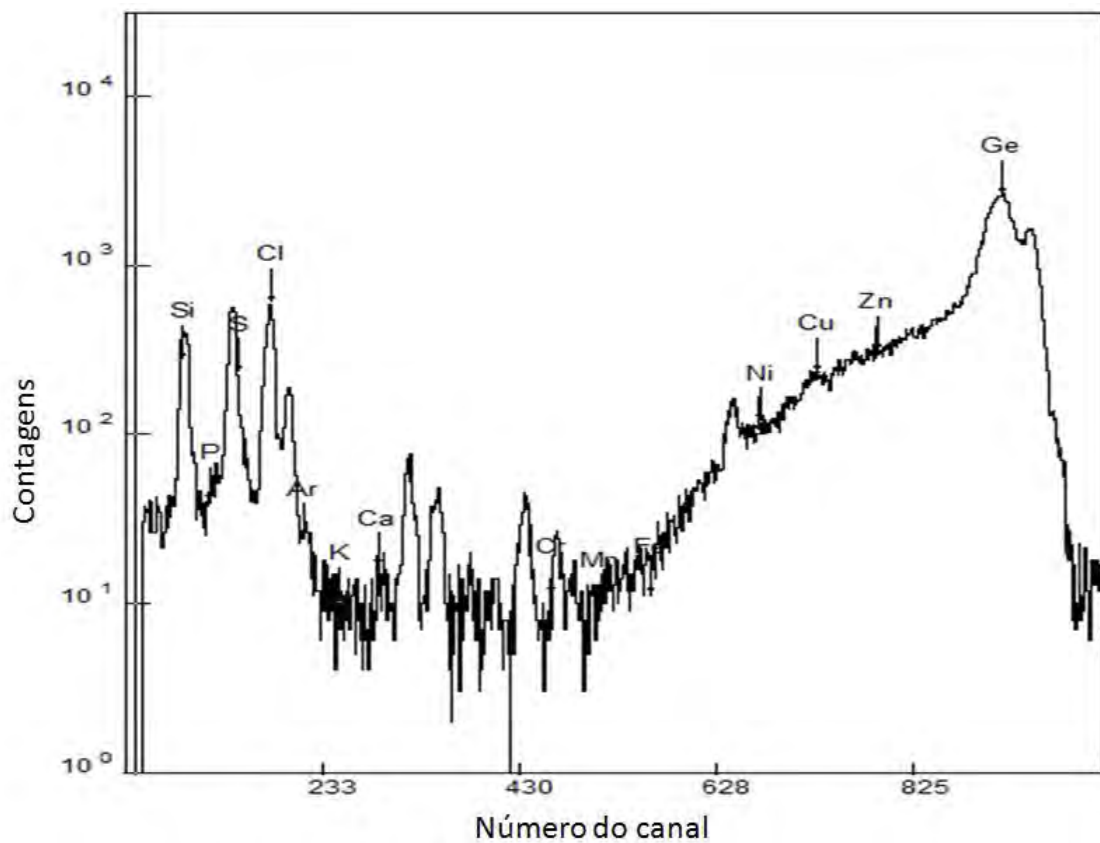


Figura 16: Espectro da análise qualitativa do extrato de *Davilla elliptica*

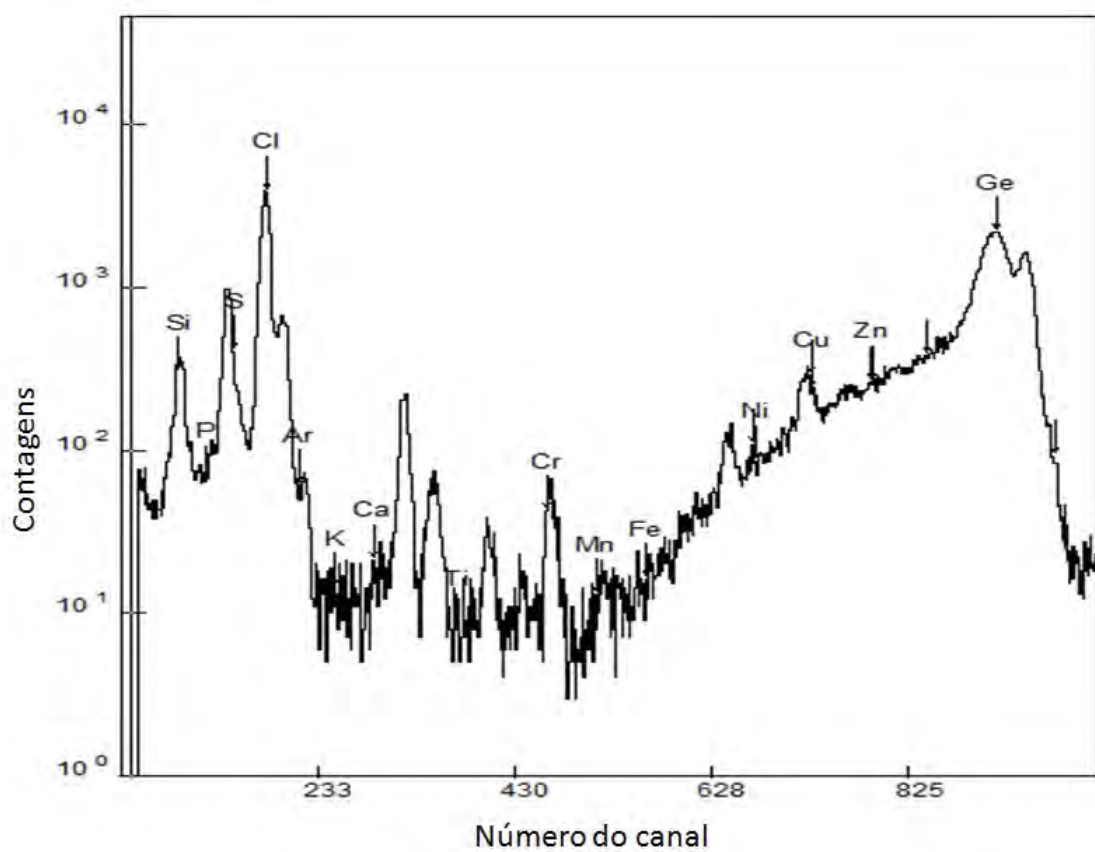


Figura 17: Espectro da análise qualitativa do extrato de *Davilla nitida*

5.2 Cálculo das sensibilidades relativas

Para este cálculo, foram utilizados 6 diferentes diluições da solução padrão, que contém elementos e concentrações conhecidos. Em todas as diluições também contém o elemento Ga, utilizado como padrão interno nas amostras a serem analisadas (Tabela 2).

Tabela 2: Constituição das diferentes diluições da solução padrão, e suas respectivas concentrações (ppm)

Elemento		Solução padrão					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6
K	(Z=19)	100,00	81,82	72,73	63,64	54,54	45,45
Ca	(Z=20)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Cr	(Z=24)	50,00	40,9	36,36	31,82	27,27	22,73
Mn	(Z=25)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Fe	(Z=26)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Ni	(Z=28)	50,00	40,90	36,36	31,82	27,27	22,73
Cu	(Z=29)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Zn	(Z=30)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Ga	(Z=31)	9,32	9,32	9,32	9,32	9,32	9,32
Sr	(Z=38)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5

A partir da relação entre intensidade relativa e concentração elementar, foi possível obter a sensibilidade relativa para cada elemento que constitui a solução padrão. Com isto, foi determinada a curva de sensibilidade relativa em função do número atômico para a linha K (Figura 18).

A equação ajustada que demonstra esta relação é dada pela equação 9:

$$S_{Ri} = 4,05 \cdot 10^1 - 8,43 \cdot Z + 7,06 \cdot 10^{-1} \cdot Z^2 - 2,97 \cdot 10^{-2} \cdot Z^3 + 6,28 \cdot 10^{-4} \cdot Z^4 - 5,27 \cdot 10^{-6} \cdot Z^5$$

Equação 9

Com esta equação, pode ser determinado o valor da sensibilidade relativa de qualquer elemento.

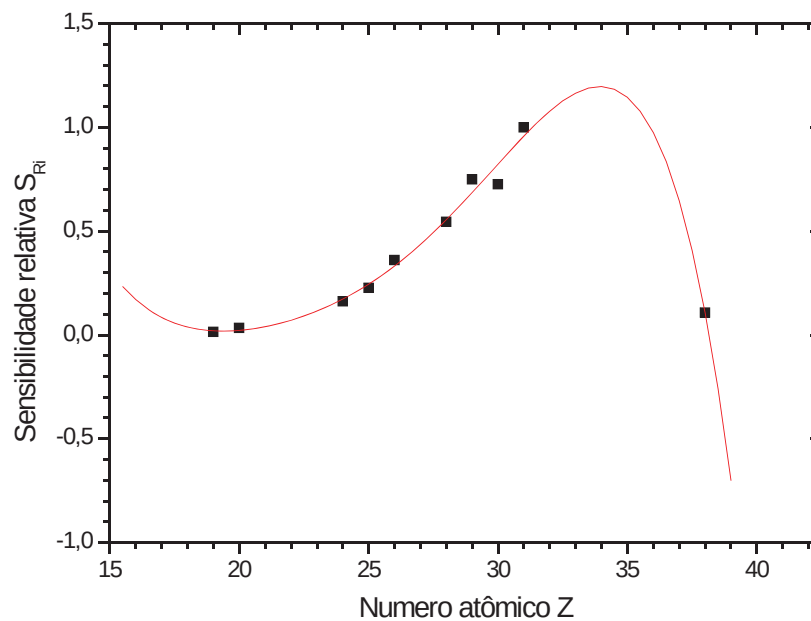


Figura 18: Curva de sensibilidade relativa

5.3 Limite de detecção

A partir da análise dos espectros obtidos da amostra padrão certificada *Trace elements in natural water* (NIST 1640), o limite de detecção foi calculado, pela equação 7, para cada elemento da amostra que possui composição conhecida. Com os valores obtidos, foi possível determinar a curva do limite de detecção em função do número atômico (Figura 19).

A equação ajustada que demonstra a relação entre limite e número atômico é dada pela equação 10:

$$DL = 1,57.10^4 - 1,92.10^3.Z + 7,76.10^1.Z^2 - 1,03.Z^3$$

Equação 10

$$R^2 = 0,862$$

Com esta equação, pode ser determinado o limite de detecção para qualquer elemento.

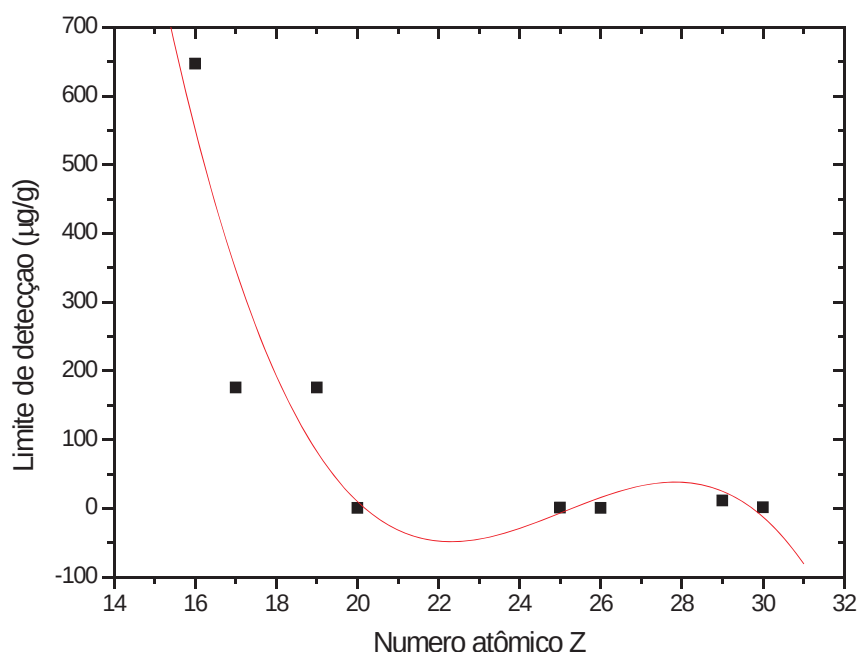


Figura 19: Limite de detecção calculado a partir das amostras certificadas

5.4 Análise das amostras

Após a análise qualitativa, as amostras de extratos fitoterápicos foram analisadas utilizando a técnica de TXRF associada à luz síncrotron. Foram realizadas, também, medidas da mucosa gástrica de animais tratados com os extratos fitoterápicos e que tiveram úlceras induzidas.

Depois destas medidas, os espectros de cada amostra foram analisados e, com as sensibilidades relativas obtidas, as concentrações dos elementos constituintes calculadas em função do elemento padrão.

Sob as condições experimentais descritas anteriormente, foi possível detectar os seguintes elementos nas amostras analisadas: P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br e Rb.

5.4.1 Extratos fitoterápicos

As Figuras 20-34 apresentam as concentrações dos elementos detectados nos extratos fitoterápicos de *Alchornea glandulosa* (A.g.), *Davilla elliptica* (D.e.) e *Davilla nitida* (D.n.).

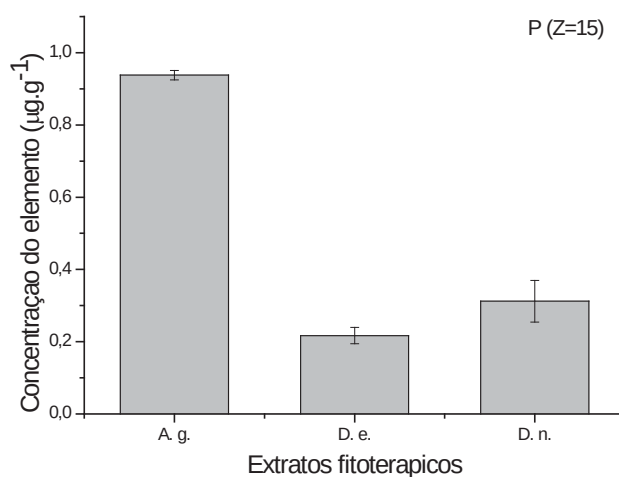


Figura 20: Concentração de P nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

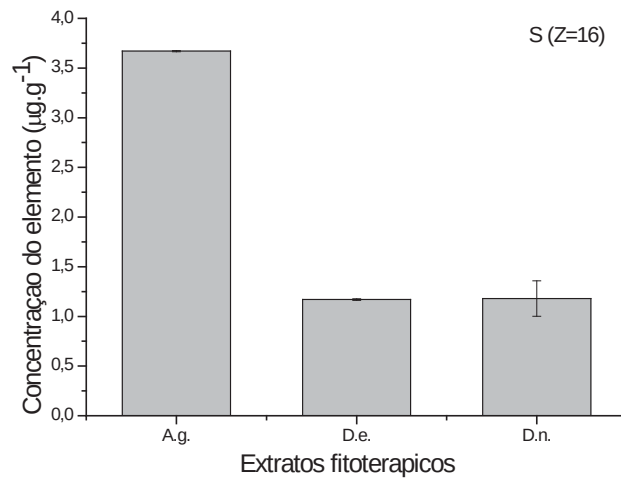


Figura 21: Concentração de S nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

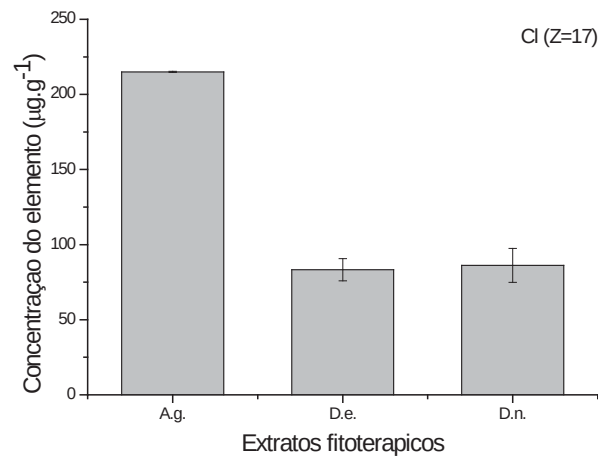


Figura 22: Concentração de Cl nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

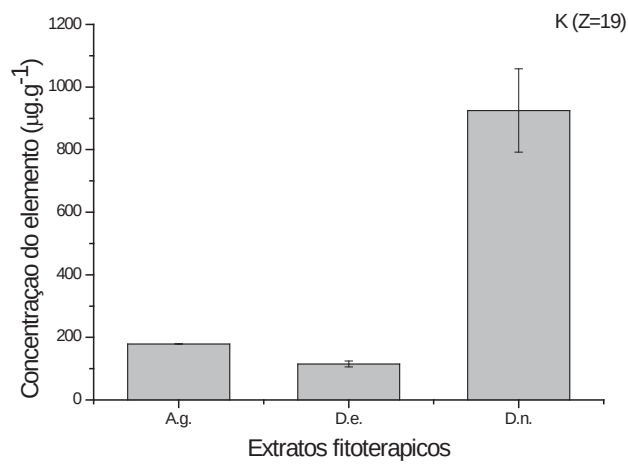


Figura 23: Concentração de K nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

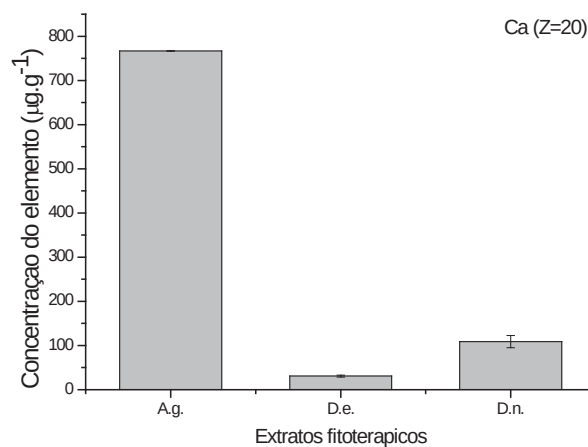


Figura 24: Concentração de Ca nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

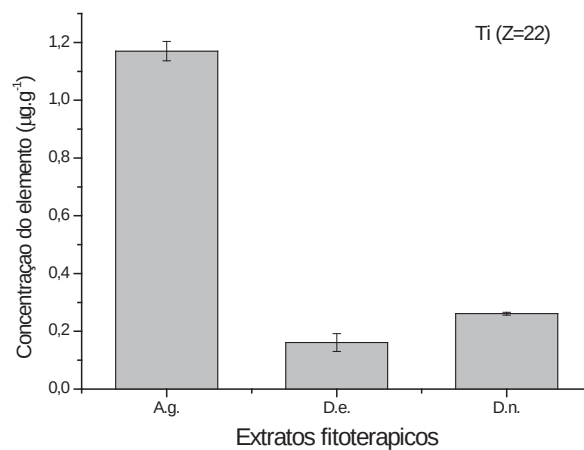


Figura 25: Concentração de Ti nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

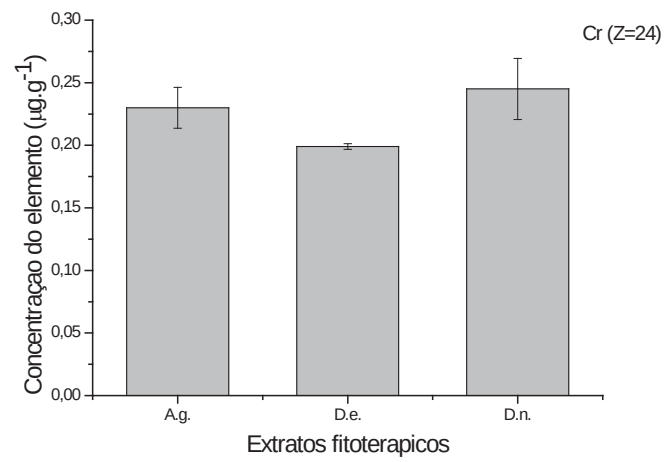


Figura 26: Concentração de Cr nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

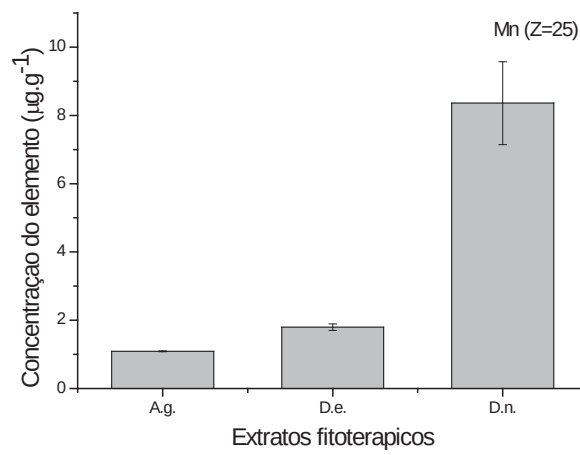


Figura 27: Concentração de Mn nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

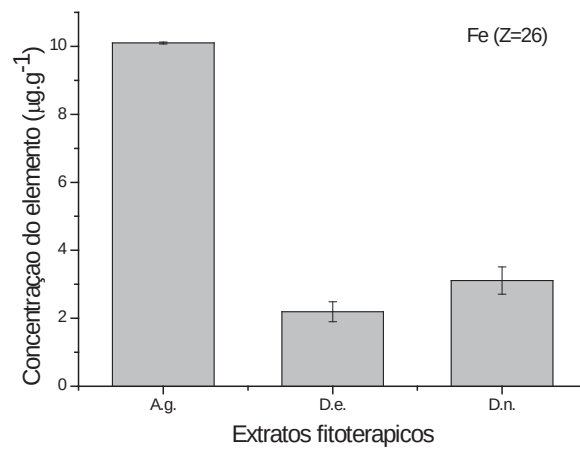


Figura 28: Concentração de Fe nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

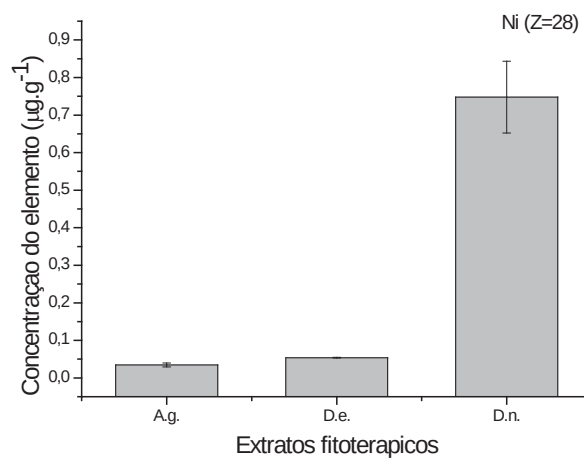


Figura 29: Concentração de Ni nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

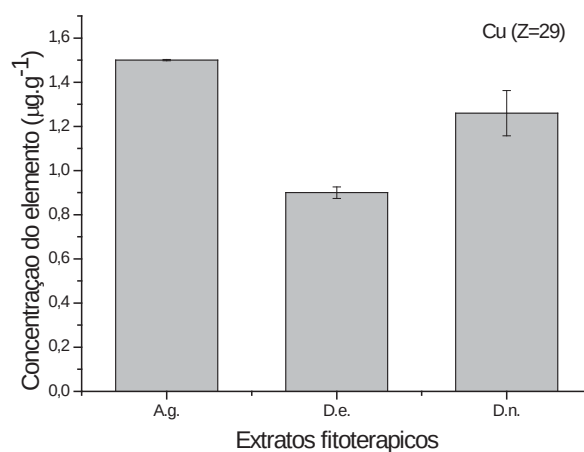


Figura 30: Concentração de Cu nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

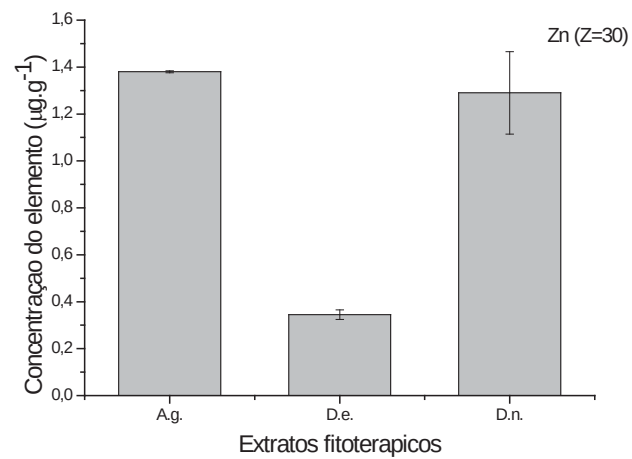


Figura 31: Concentração de Zn nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

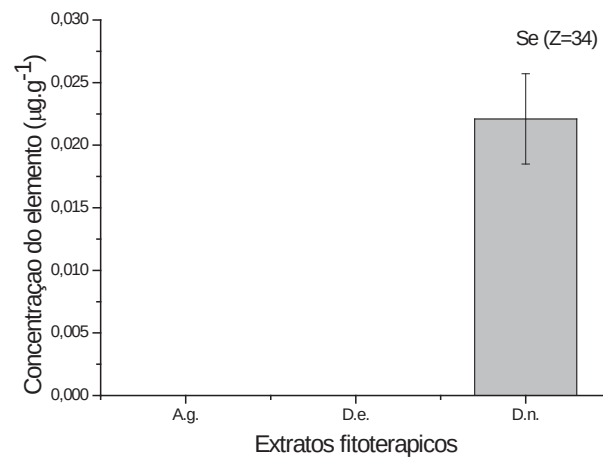


Figura 32: Concentração de Se nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

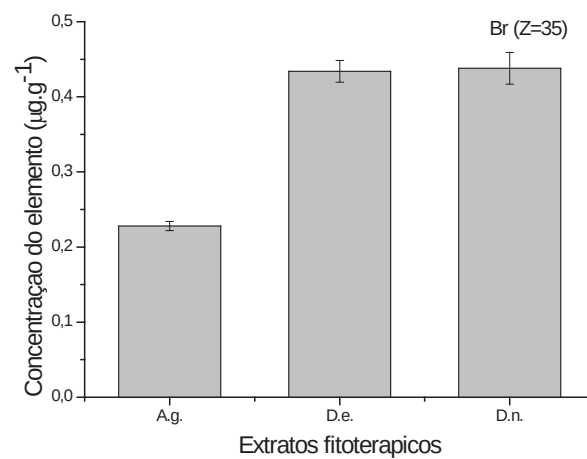


Figura 33: Concentração de Br nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

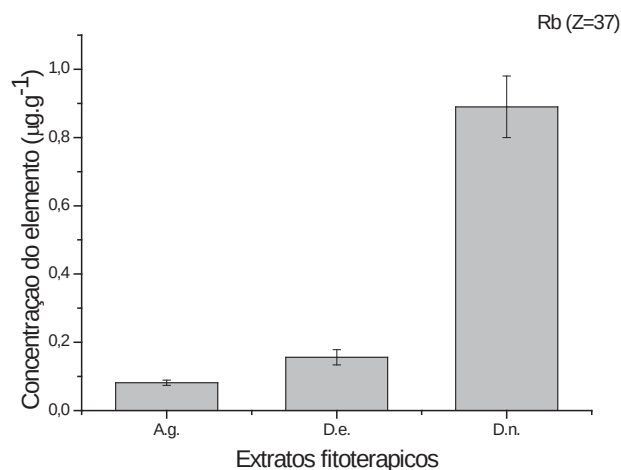


Figura 34: Concentração de Rb nas amostras de extratos fitoterápicos (média $\pm$ desvio padrão da média)

Ao analisar os valores médios das concentrações dos elementos constituintes das amostras, pode ser observado que os elementos P, S, Cl, Ca, Ti, Fe, Cu e Zn apresentam maiores concentrações nas amostras do extrato de *Alchornea glandulosa* (Figuras 20-22, 24, 25, 28, 30 e 31).

Os elementos K, Cr, Mn, Ni e Rb apresentaram maiores concentrações nas amostras do extrato de *Davilla nitida* (Figuras 23, 26, 27, 29 e 34).

O elemento Se só apresentou concentração acima do limite de detecção nas amostras do extrato de *Davilla nitida* (Figura 32).

Já o elemento Br apresentou concentrações semelhantes nas amostras dos extratos de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* (Figura 33).

Pode ser observado, também que o elemento que apresenta maior concentração nas amostras de *A. glandulosa* é o Ca. E nas amostras do gênero *Davilla*, o elemento que apresenta maior concentração é o K.

Com estes resultados, as concentrações dos elementos foram analisadas estatisticamente, com o teste de Tukey, para comprovar a significância, ou não, das diferenças entre seus valores médios nas amostras. A análise foi feita comparando as amostras par a par (Tabela 3).

Tabela 3: Análise estatística entre as médias das concentrações dos extratos fitoterápicos

	<i>A. glandulosa</i> x <i>D. elliptica</i>	<i>A. glandulosa</i> x <i>D. nitida</i>	<i>D. elliptica</i> x <i>D. nitida</i>
P	0,7210 (***)	0,6260 (***)	-0,0950 (ns)
S	2,500 (***)	2,490 (***)	-0,0100 (ns)
Cl	131,7 (***)	128,8 (***)	-2,900 (ns)
K	64,00 (ns)	-746,0 (***)	-810,0 (***)
Ca	236,1 (***)	158,0 (***)	-78,10 (***)
Ti	1,009 (***)	0,9090 (***)	-0,1000 (ns)
Cr	0,0310 (ns)	-0,0150 (ns)	-0,0460 (ns)
Mn	-0,7100 (ns)	-7,270 (***)	-6,560 (***)
Fe	7,910 (***)	6,990 (***)	-0,9200 (ns)
Ni	-0,0192 (ns)	-0,7133 (***)	-0,6941 (***)
Cu	0,6000 (ns)	0,2400 (ns)	-0,3600 (ns)
Zn	1,035 (ns)	0,0900 (ns)	-0,9450 (ns)
Se	0 ¹	-0,0221 (***)	-0,0221 (***)
Br	-0,2060 (***)	-0,2100 (***)	-0,0040 (ns)
Rb	-0,0744 (ns)	-0,8084 (***)	-0,7340 (***)

***: P<0,001

ns: não significativo (P>0,05)

1: o elemento Se não foi detectado nas amostras de *A. glandulosa* e *D. elliptica*

De acordo com a análise estatística dos extratos fitoterápicos (Tabela 3), pode ser observado que a maioria dos elementos apresenta diferenças significativas na comparação de um ou mais grupos, com exceção dos elementos Cr, Cu e Zn, que apresentaram concentrações compatíveis em todas as amostras.

Pode ser observado também que o elemento Ca apresentou diferenças significativas em todas as comparações, apresentando maior concentração no extrato de *A. glandulosa*, seguida dos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*.

5.4.2 Mucosas gástricas com úlceras induzidas por DAINE

Inicialmente foram analisadas as concentrações dos elementos nas amostras das mucosas gástricas pré-tratadas (grupo 1A: tratado com salina, grupo 2A: tratado com *A. glandulosa*, grupo 3A: tratado com *D. elliptica* e grupo 4A: tratado com *D. nitida*) e que tiveram úlcera induzida por Indometacina (DAINE), e comparadas com as amostras do grupo Sham (Figuras 35-49).

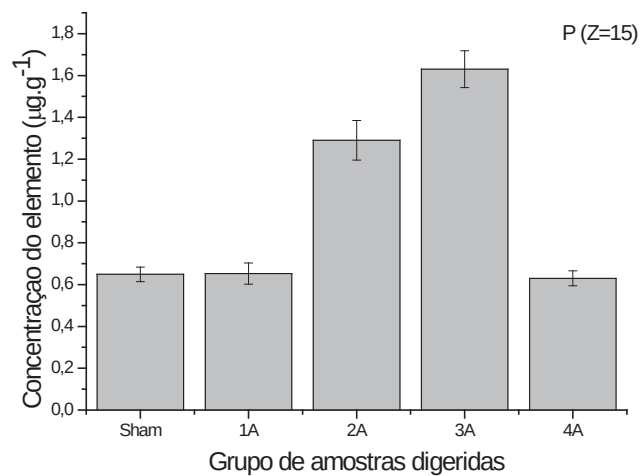


Figura 35: Concentração de P nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média ± desvio padrão da média)

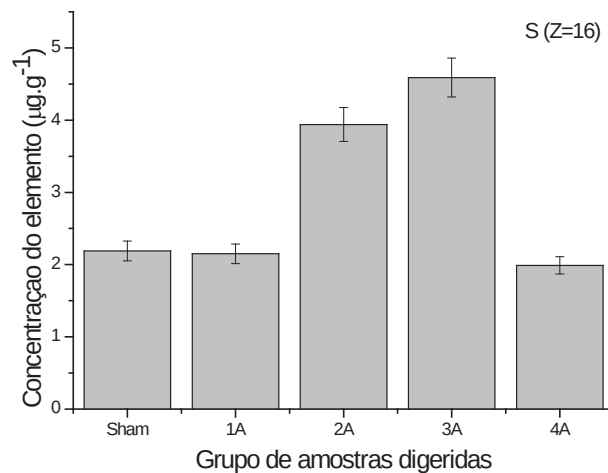


Figura 36: Concentração de S nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média ± desvio padrão da média)

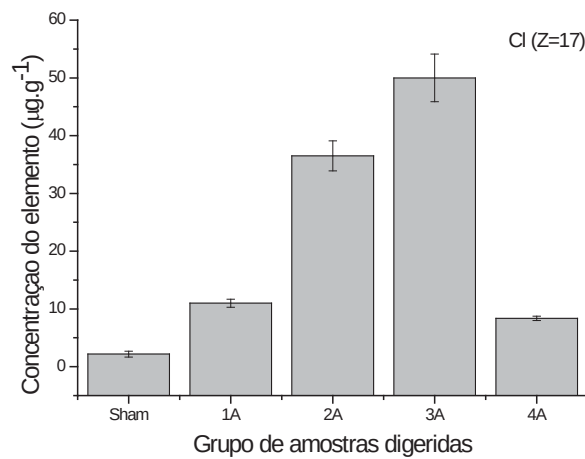


Figura 37: Concentração de Cl nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINÉ (média $\pm$ desvio padrão da média)

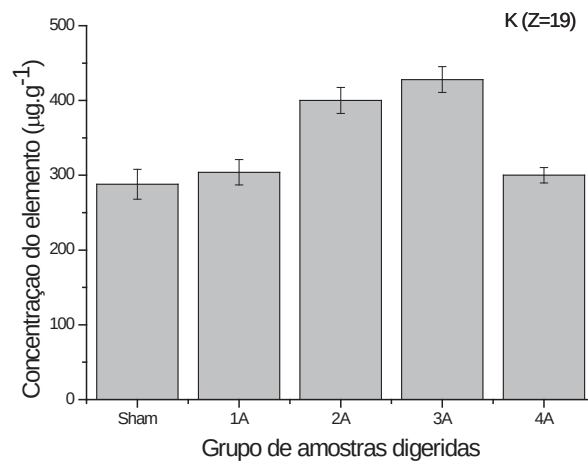


Figura 38: Concentração de K nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINÉ (média $\pm$ desvio padrão da média)

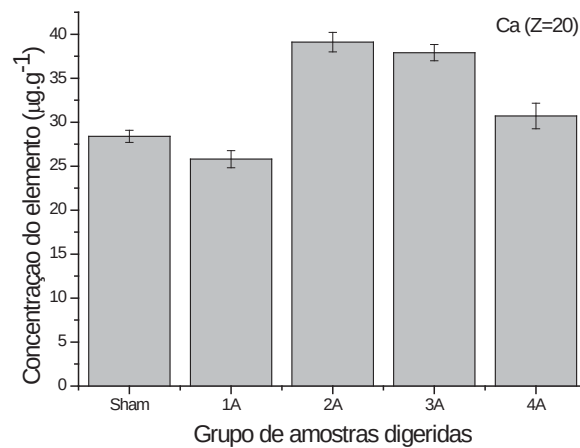


Figura 39: Concentração de Ca nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINÉ (média $\pm$ desvio padrão da média)

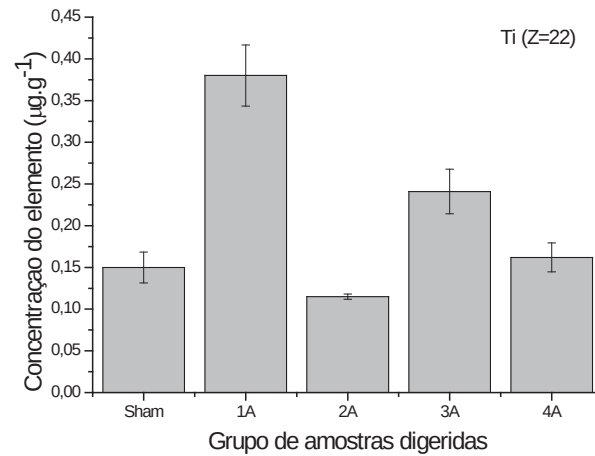


Figura 40: Concentração de Ti nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média)

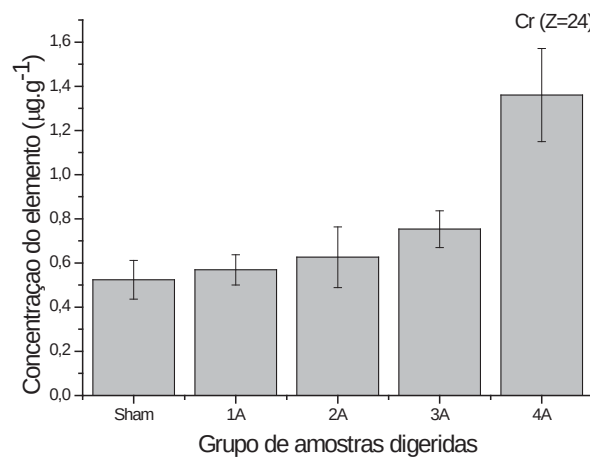


Figura 41: Concentração de Cr nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média)

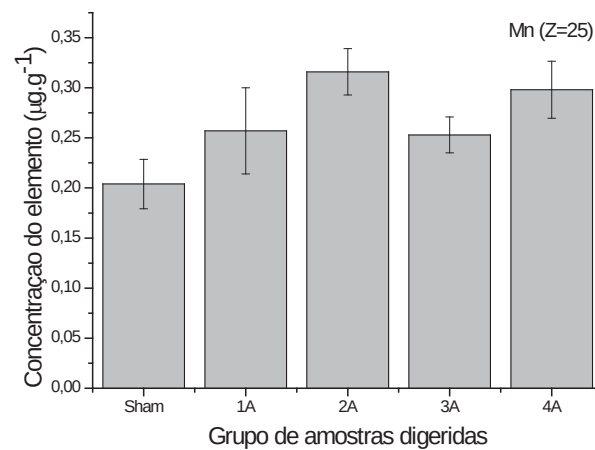


Figura 42: Concentração de Mn nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média)

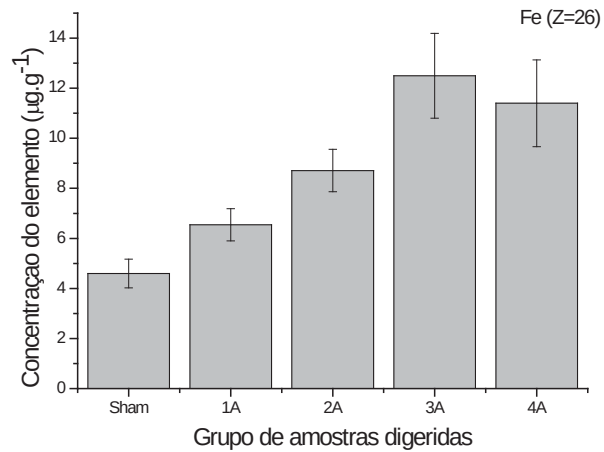


Figura 43: Concentração de Fe nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média)

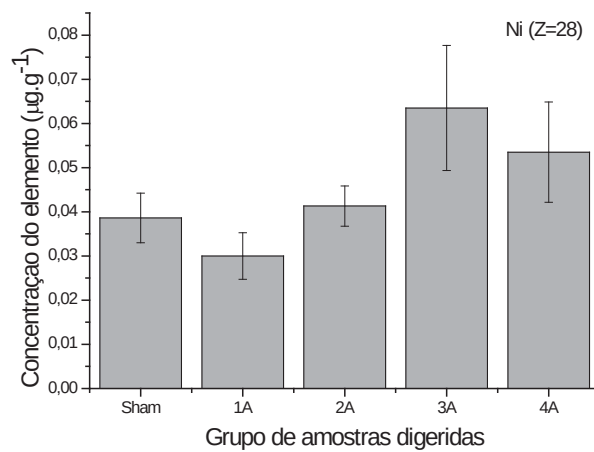


Figura 44: Concentração de Ni nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média)

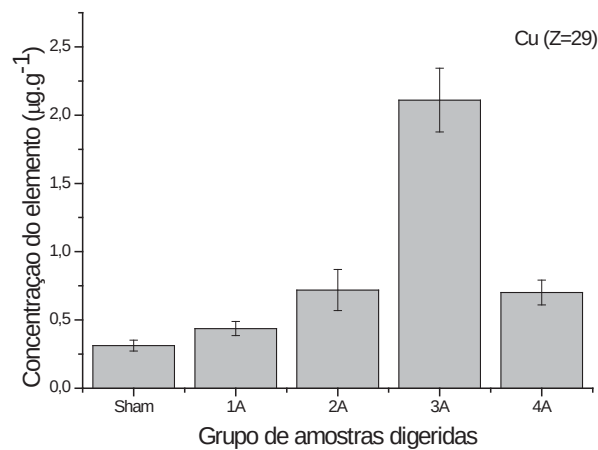


Figura 45: Concentração de Cu nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média)

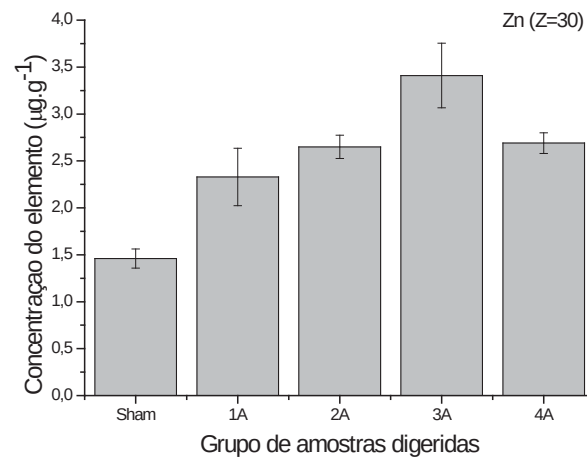


Figura 46: Concentração de Zn nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINÉ (média $\pm$ desvio padrão da média)

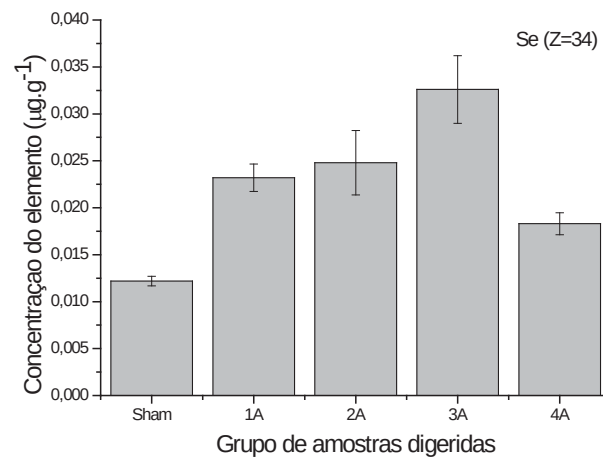


Figura 47: Concentração de Se nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINÉ (média $\pm$ desvio padrão da média)

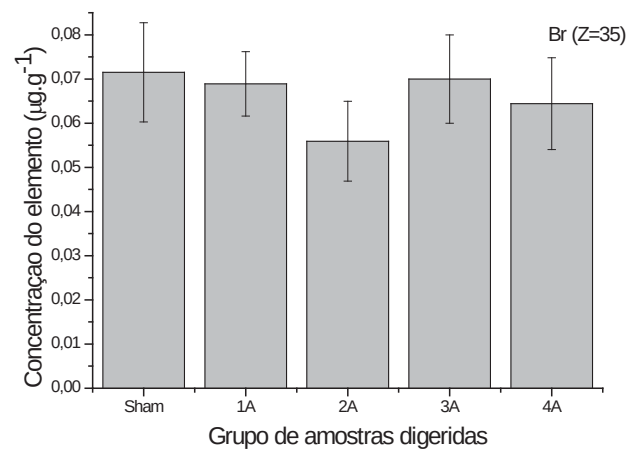


Figura 48: Concentração de Br nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINÉ (média $\pm$ desvio padrão da média)

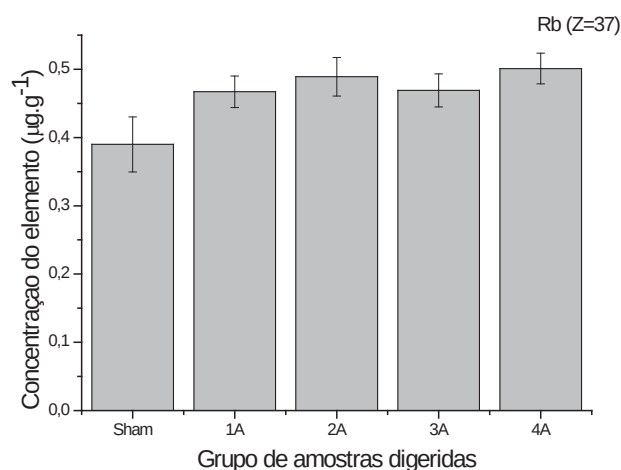


Figura 49: Concentração de Rb nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por DAINE (média $\pm$ desvio padrão da média)

Como pode ser observado, todos os elementos das amostras pré-tratadas, que tiveram úlcera induzida por Indometacina, apresentaram concentrações maiores que as amostras do grupo Sham, com exceção do elemento Br (Figura 48).

Os elementos P, S, Cl, K, Fe, Ni, Cu, Zn e Se apareceram em maior concentração nas amostras do grupo 3A, que foram pré-tratados com extrato fitoterápico de *Davilla elliptica* (Figuras 35-38 e 43-47).

Os elementos Ca e Mn apresentaram maior concentração nas amostras do grupo 2A, que foram pré-tratados com extrato fitoterápico de *Alchornea glandulosa* (Figuras 39 e 42).

Já os elementos Ti e Cr apareceram em maior concentração, respectivamente, nas amostras do grupo 1A, pré-tratado com salina (Figura 40), e nas amostras do grupo 4A, pré-tratado com extrato de *Davilla nitida* (Figura 41).

Nestes resultados, foi empregado o teste de Tukey para calcular a compatibilidade estatística entre as médias dos diferentes valores de concentração obtidos para cada elemento, comparando as amostras duas a duas (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Análise estatística entre as médias das concentrações das mucosas gástricas do grupo Sham e das pré-tratadas que tiveram úlceras induzidas por DAINÉ

Elemento	Sham x 1A	Sham x 2A	Sham x 3A	Sham x 4A
P	-0,0040 (ns)	-0,6410 (***)	-0,9810 (***)	0,0190 (ns)
S	0,0400 (ns)	-1,750 (***)	-2,400 (***)	0,200 (ns)
Cl	-2,970 (ns)	-28,47 (**)	-41,97 (***)	-0,350 (ns)
K	-16,00 (ns)	-112,0 (ns)	-140,0 (ns)	-12,00 (ns)
Ca	2,600 (ns)	-10,70 (ns)	-9,500 (ns)	-2,300 (ns)
Ti	-0,2300 (***)	0,0350 (ns)	-0,0910 (ns)	-0,0120 (ns)
Cr	-0,0450 (ns)	-0,1020 (ns)	-0,2290 (ns)	-0,8360 (***)
Mn	-0,0530 (ns)	-0,1120 (ns)	-0,0490 (ns)	-0,0940 (ns)
Fe	-1,940 (ns)	-4,110 (ns)	-7,900 (***)	-6,800 (**)
Ni	0,0086 (ns)	-0,0027 (ns)	-0,0249 (ns)	-0,0149 (ns)
Cu	-0,1250 (ns)	-0,4070 (ns)	-1,798 (***)	-0,3890 (ns)
Zn	-0,8700 (ns)	-1,190 (*)	-1,950 (***)	-1,230 (*)
Se	-0,0110 (*)	-0,0126 (**)	-0,0204 (***)	-0,0061 (ns)
Br	0,0026 (ns)	0,0156 (ns)	0,0015 (ns)	0,0071 (ns)
Rb	-0,0770 (ns)	-0,0990 (ns)	-0,0790 (ns)	0,1110 (ns)

***: P<0,001

** : P<0,01

*: P<0,05

ns: não significativo (P>0,05)

As respostas farmacológicas obtidas em modelos experimentais de úlceras pépticas, induzidas por DAINÉ (Cimetidina ou Piroxicam) e tratadas com as mesmas espécies de plantas medicinais analisadas neste estudo, são de 34 % para *A. glandulosa*, 75 % para *D. elliptica* e 58 % para *D. nitida* (Kushima, 2006; Calvo, Lima, *et al.*, 2007).

Ao analisar as diferenças de concentrações elementares, pode ser observado que as mucosas gástricas tratadas com *D. elliptica* apresentaram concentrações significativamente mais altas de P e Cu em relação à *A. glandulosa*;

de P, S, Cl, Cr, Cu e Se em relação à *D. nitida* (Tabela 5); além das diferentes concentrações de P, S, Cl, Fe, Cu, Zn e Se em relação ao grupo Sham (Tabela 4).

Estas diferenças indicam que a formação de compostos responsáveis pela atividade gastroprotetora mais efetiva da *D. elliptica* pode estar relacionada com a presença em maior concentração destes constituintes em seu extrato.

Tabela 5: Análise estatística entre as médias das concentrações das mucosas gástricas pré-tratadas que tiveram úlceras induzidas por DAINÉ

	1A x 2A	1A x 3A	1A x 4A	2A x 3A	2A x 4A	3A x 4A
P	-0,6370 (***)	-0,9770 (***)	0,0230 (ns)	-0,3400 (*)	0,6600 (***)	1,000 (***)
S	-1,790 (***)	-2,440 (***)	0,1600 (ns)	-0,6500 (ns)	1,950 (***)	2,600 (***)
Cl	-25,50 (*)	-39,00 (***)	2,620 (ns)	-13,50 (ns)	28,12 (**)	41,62 (***)
K	-96,00 (ns)	-124,0 (ns)	4,000 (ns)	-28,00 (ns)	100,0 (ns)	128,0 (ns)
Ca	-13,30 (ns)	-12,10 (ns)	-4,900 (ns)	1,200 (ns)	8,400 (ns)	7,200 (ns)
Ti	0,2650 (***)	0,1390 (ns)	0,2180 (***)	-0,1260 (ns)	-0,0470 (ns)	0,0790 (ns)
Cr	-0,0570 (ns)	-0,1840 (ns)	-0,7910 (***)	-0,1270 (ns)	-0,7340 (***)	-0,6070 (**)
Mn	-0,0590 (ns)	0,0040 (ns)	-0,0410 (ns)	0,0630 (ns)	0,0180 (ns)	-0,0450 (ns)
Fe	-2,170 (ns)	-5,960 (*)	-4,860 (ns)	-3,790 (ns)	-2,690 (ns)	1,100 (ns)
Ni	-0,0113 (ns)	-0,0335 (ns)	-0,0235 (ns)	-0,0222 (ns)	-0,0122 (ns)	0,0100 (ns)
Cu	-0,2820 (ns)	1,673 (***)	-0,2640 (ns)	-1,391 (***)	0,0180 (ns)	1,409 (***)
Zn	-0,3200 (ns)	-1,080 (ns)	-0,3600 (ns)	-0,7600 (ns)	-0,0400 (ns)	0,7200 (ns)
Se	-0,0016 (ns)	-0,0094 (ns)	0,0049 (ns)	-0,0078 (ns)	0,0065 (ns)	0,0143 (***)
Br	0,0130 (ns)	-0,0011 (ns)	0,0045 (ns)	-0,0141 (ns)	-0,0085 (ns)	0,0056 (ns)
Rb	-0,0220 (ns)	-0,0020 (ns)	-0,0340 (ns)	0,0200 (ns)	-0,0120 (ns)	-0,0320 (ns)

***: P<0,001

** : P<0,01

*: P<0,05

ns: não significativo (P>0,05)

Adicionalmente, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre os diferentes elementos para cada tipo de amostra (Tabelas 6-10).

Tabela 6: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas sem tratamento e sem indução de úlcera (grupo Sham)

[illegible]

Tabela 7: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com salina e que tiveram úlcera induzida por DAINÉ

[illegible]

Tabela 8: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *A. glandulosa* e que tiveram úlcera induzida por DAINÉ

[illegible]

Tabela 9: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *D. elliptica* e que tiveram úlcera induzida por DAINÉ

[illegible]

Tabela 10: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *D. nitida* e que tiveram úlcera induzida por DAINE

[illegible]

Analisando os resultados da análise das mucosas gástricas que tiveram úlceras induzidas por DAINE, as concentrações dos elementos P, S e Cl, considerados elementos essenciais, têm comportamentos semelhantes.

As amostras tratadas com salina e com *D. nitida* são estatisticamente equivalentes com as amostras do grupo Sham (Tabela 4). A maior concentração destes elementos acontece nas amostras tratadas com *D. elliptica*, seguida pelas amostras tratadas com *A. glandulosa* (Tabela 5). E os coeficientes de correlação de Pearson entre estes elementos são superiores a 95 % em todas as amostras.

Para o elemento P, outras correlações importantes são: K (96 %) e Ca (91 %) nas amostras tratadas com solução salina; K (92 %) nas amostras tratadas com *A. glandulosa* (Tabela 8) e Mn (89 %), Fe (78 %) e Se (72 %) nas amostras contendo *D. elliptica* (Tabela 9).

Para o elemento S, há correlações de 94 % com os elementos K e Ca nas amostras tratadas com salina (Tabela 7), e correlações com K (90 %) e Ca (79 %) nas amostras tratadas com *A. glandulosa* (Tabela 8). Para as amostras tratadas com *D. elliptica*, as demais correlações relevantes deste elemento foram obtidas para K (96 %), Cr (77 %), Mn (93 %), Fe (86 %) e Se (71 %) (Tabela 9). Já para as amostras tratadas com *D. nitida* e com úlcera induzida por DAINE, não foram obtidas novas correlações relevantes para este elemento (Tabela 10).

O elemento Cl apresentou correlações de 92 % com os elementos K e Ca, nas amostras tratadas com salina (Tabela 7). Para as amostras tratadas com *A. glandulosa*, foram obtidas correlações com os elementos K (90 %), Zn (76 %) e Se (72 %) e uma anti-correlação com Mn (71 %) (Tabela 8). Para as amostras com *D. elliptica*, foram obtidas correlações relevantes com os elementos K (91 %), Cr (71 %), Mn (88 %) e Fe (86 %) (Tabela 9). E, novamente nas amostras contendo *D. nitida*, não foram obtidas novas correlações relevantes para estes elementos (Tabela 10).

Os elementos K e Ca não apresentaram variação significativa em suas concentrações nas quatro amostras (Tabelas 4 e 5). As correlações destes elementos com P, S, Cl, para as amostras do grupo SHAM e as amostras tratadas

com salina e que tiveram úlcera induzida por Indometacina estão acima de 77 % (Tabelas 6 e 7).

Já ao analisar as combinações dos tratamentos com os extratos fitoterápicos que tiveram úlcera induzida por Indometacina, no caso do elemento Ca, somente a correlação com o elemento S supera o 70 %, no caso de aplicação de *A. glandulosa* (Tabela 8), e com o elemento Zn também é superior a 70 % nos casos de aplicação de *D. elliptica* e *D. nitida* (Tabelas 9 e 10).

O elemento Mn não apresentou diferenças significativas entre as concentrações dos cinco tipos de amostras (Tabelas 4 e 5). Este elemento, além das correlações que já foram discutidas nos casos anteriores, apresentou correlação de 85 % com o elemento Fe, nas amostras que foram tratadas com o extrato fitoterápico de *D. elliptica* (Tabela 9). Além disso, o Mn também apresentou uma anti-correlação com o Mn (77 %), nas amostras tratadas com *A. glandulosa* (Tabela 8).

O elemento Fe apresentou concentrações estatisticamente diferentes nos casos de aplicação dos fitoterápicos do gênero *Davilla*, apresentando, em ambos os casos, valores superiores ao valor obtido nas amostras do grupo Sham (Tabela 4). Além das correlações já discutidas com os elementos anteriores, este elemento possui correlação de 80 % com os elementos Ni e Cu nas amostras do grupo Sham (Tabela 6).

Nas amostras tratadas com salina, o Fe não apresentou nenhuma correlação importante. Este comportamento se repete no caso tratamento com *A. glandulosa* (Tabela 8). No caso de amostras com *D. elliptica*, além das já discutidas, existe uma correlação de 70 % deste elemento com o Se (Tabela 9) e, na aplicação de *D. nitida*, foi obtida uma correlação de 95 % com Ni e uma anti-correlação de 75 % com Br (Tabela 10).

O elemento Ni não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os cinco tipos de amostra (Tabelas 4 e 5). Além das correlações já apresentadas para os elementos anteriores, o único caso no qual o valor ultrapassa os 70 % ocorre com o elemento Zn, nas amostras tratadas com a *D. nitida* (Tabela 9).

O elemento Cu teve comportamento estatisticamente compatível em todas as amostras, exceto nas amostras tratadas com *D. elliptica* (Tabelas 4 e 5). No caso das amostras do grupo Sham, nenhuma correlação importante, além da já apresentada, foi obtida (Tabela 6). Já para as amostras tratadas com salina, foram obtidas anti-correlações acima de 80 % com os elementos Se (89 %) e Br (82 %) (Tabela 7).

Nas amostras tratadas com extratos fitoterápicos, para o Cu, somente no caso de aplicação de *D. nitida*, foi obtida uma correlação acima de 70 % com o elemento Zn (Tabela 10).

Para as concentrações obtidas para o elemento K, os valores das correlações com os elementos P, S, Cl estão acima de 90 % para todos os tipos de amostras (Tabela 6-9), com exceção da amostra tratada com *D. nitida*, na qual não apresenta correlação do K com estes elementos (Tabela 10). Nesta amostra, este elemento somente apresenta correlações importantes com os elementos Fe, Ni e Zn.

O elemento Ti somente apareceu em concentração superior, à obtida nas amostras do grupo Sham, nas amostras que foram tratadas com solução salina antes da indução de úlcera por Indometacina (Tabela 7). Este resultado não era esperado, porque o elemento Ti não é essencial e não faz parte nem da composição da DAINE, nem da solução salina. Neste caso, pode ter ocorrido algum tipo de contaminação das amostras. Apesar disto, as demais amostras apresentaram concentrações estatisticamente compatíveis. Para o Ti, nenhuma correlação com os outros elementos ultrapassou os 70 % em nenhuma das amostras.

A concentração do elemento Cr somente aumentou no caso do tratamento com *D. nitida* (Figura 41). Nas restantes configurações, os valores obtidos para as concentrações são estatisticamente compatíveis. Para as amostras do grupo Sham, este elemento possui correlação acima de 70 % com os elementos Fe, Ni e Cu (Tabela 6). No caso do tratamento com salina, a única correlação importante deste elemento é obtida com o Fe e tem valor de 87 % (Tabela 7). Para as amostras tratadas com *D. elliptica*, além das já discutidas, apresenta a correlação com o Ti (75 %), e com os elementos K, Mn e Fe com correlações de 90 %, 89 % e

78 %, respectivamente (Tabela 9). Já no caso do tratamento com *D. nitida*, o Cr apresenta a correlação com Ca (77 %), Fe (95 %) e Ni (94 %) e a anti-correlação de 74 % que ocorre com o elemento Br (Tabela 10).

Um resultado interessante surge ao analisar as correlações entre as concentrações do Cr com os outros elementos no caso do tratamento com o extrato fitoterápico de *A. glandulosa*. Neste caso, o elemento apresenta correlações acima de 70 % com os elementos Mn e Ni e anti-correlações, também acima de 70 %, com os elementos Zn e Se (Tabela 8).

Para o elemento Zn, as concentrações obtidas nas amostras tratadas com extratos fitoterápicos foram superiores àquelas obtidas para as amostras do grupo Sham e do tratado com salina, com estes dois grupos não apresentando diferença estatisticamente significativa entre si (Tabelas 4 e 5). E além das correlações já discutidas com os elementos anteriores, somente no caso das amostras do grupo Sham, houve uma correlação de 82 % da concentração do Zn com o elemento Br (Tabela 6).

No caso do elemento Se, o único grupo de amostras que não possui diferença significativa com o grupo Sham, é o que foi tratado com *D. nitida* (Tabela 4). E somente uma nova correlação acima de 80 % aparece, no caso das amostras com solução salina, com o elemento Br (Tabela 7).

O elemento Br não apresentou diferença estatisticamente significativa entre suas concentrações em todos os tipos de amostra (Tabelas 4 e 5), mas apresentou algumas correlações, já discutidas, com outros elementos.

Todas as correlações superiores a 70 % estão apresentadas, de forma resumida, na Tabela 11.

Tabela 11: Correlações de Pearson entre os elementos constituintes das amostras que tiveram úlcera induzida por DAINE

1A	2A	3A	4A
P, S, Cl, K, Ca	P, S, Cl, K, Ca, Zn, Se	P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn, Se	P, S, Cl, Ca, Fe, Ni, Cr, Zn
Cr, Fe	Cr, Mn, Ni		Br, Fe, Cr (-)
Se, Br	Cl, Mn (-)		
Cu, Se, Br (-)	Cr, Zn, Se (-)		
Mn, Se (-)			

(-) Anti-correlação

5.4.3 Mucosas gástricas com úlceras induzidas por álcool

Primeiramente foram analisadas as concentrações dos elementos nas amostras das mucosas gástricas pré-tratadas (grupo 1A: tratado com salina, grupo 2A: tratado com *A. glandulosa*, grupo 3A: tratado com *D. elliptica* e grupo 4A: tratado com *D. nitida*) e que tiveram úlcera induzida por etanol (álcool), e comparadas com as amostras do grupo Sham (Figuras 50-63).

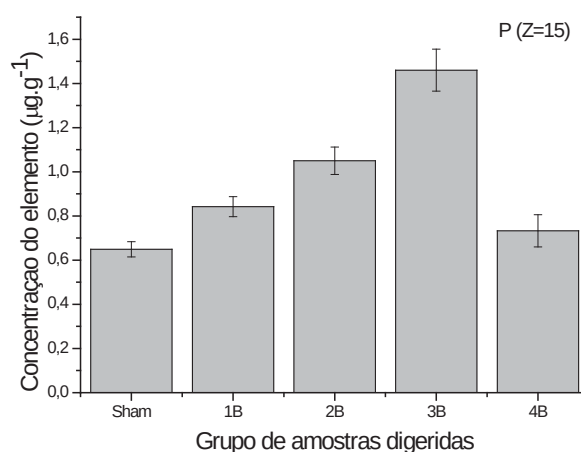


Figura 50: Concentração de P nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

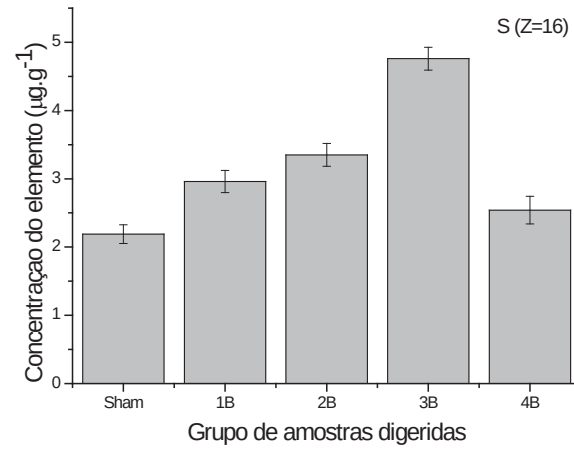


Figura 51: Concentração de S nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

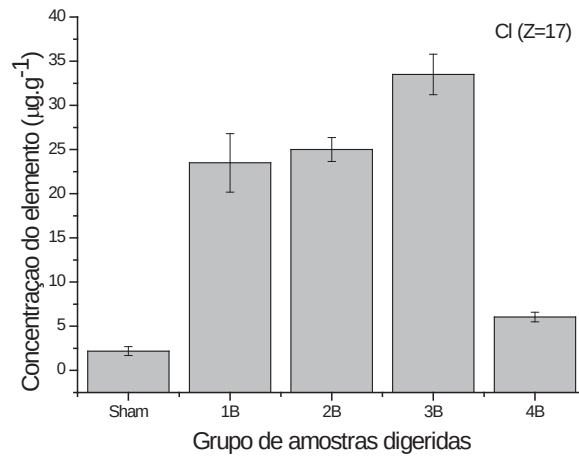


Figura 52: Concentração de Cl nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

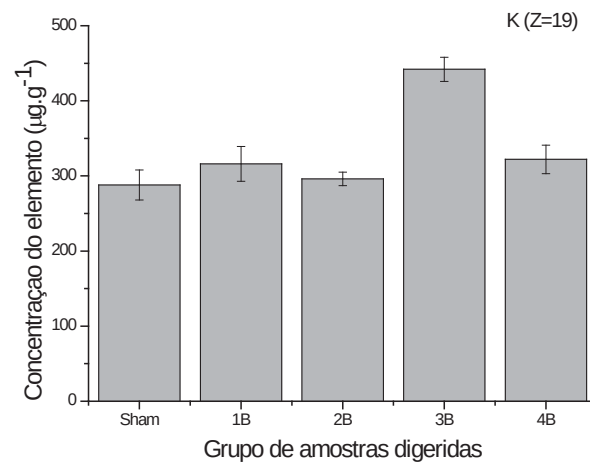


Figura 53: Concentração de K nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

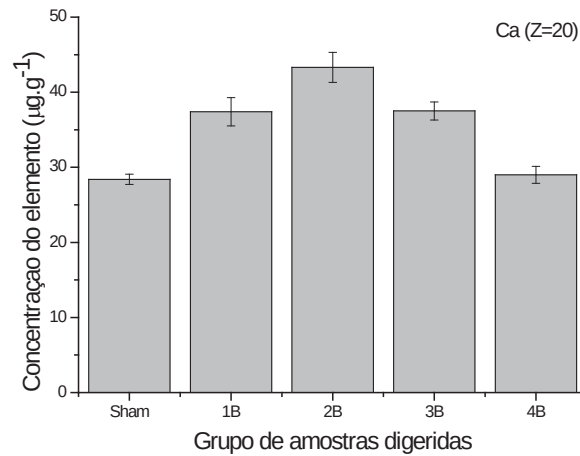


Figura 54: Concentração de Ca nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

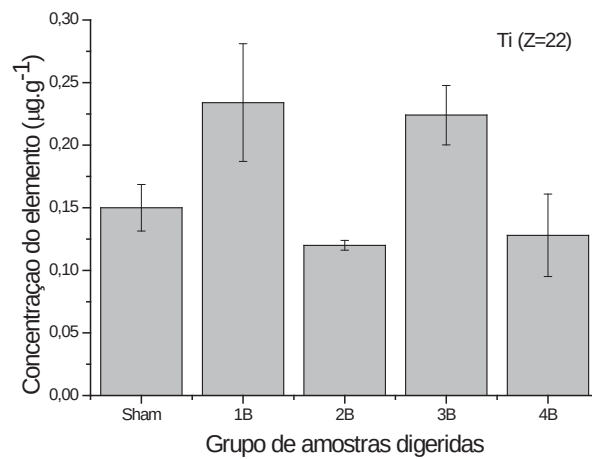


Figura 55: Concentração de Ti nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

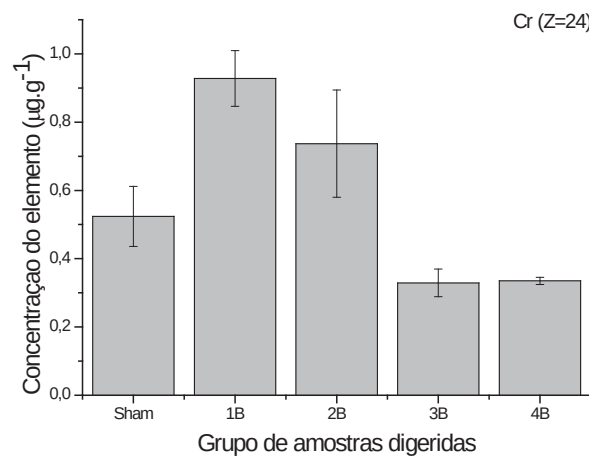


Figura 56: Concentração de Cr nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

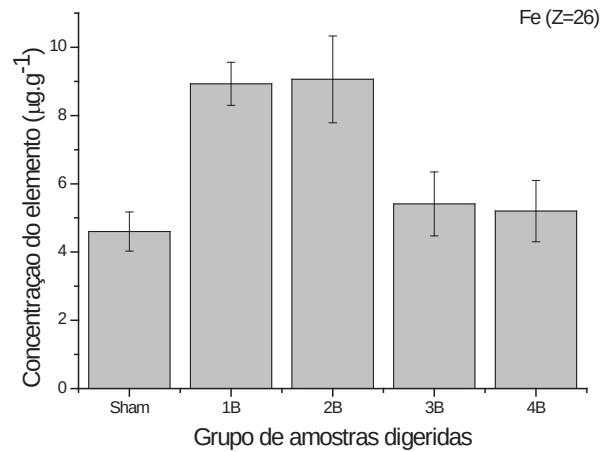


Figura 57: Concentração de Fe nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média ± desvio padrão da média)

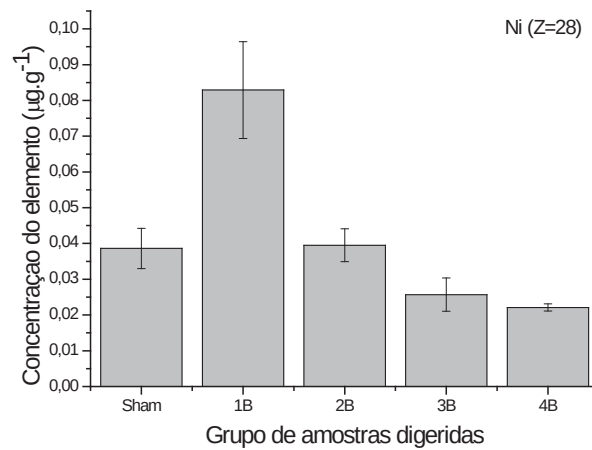


Figura 58: Concentração de Ni nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média ± desvio padrão da média)

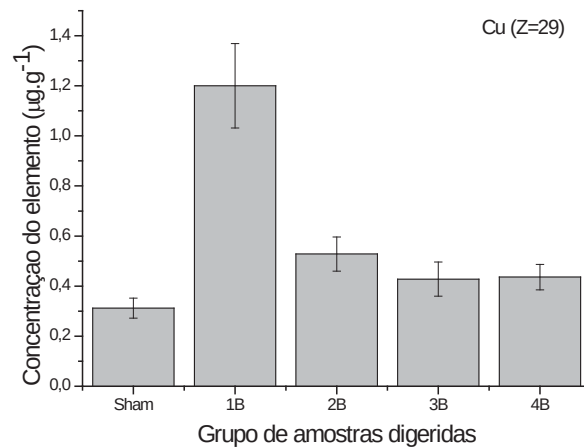


Figura 59: Concentração de Cu nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média ± desvio padrão da média)

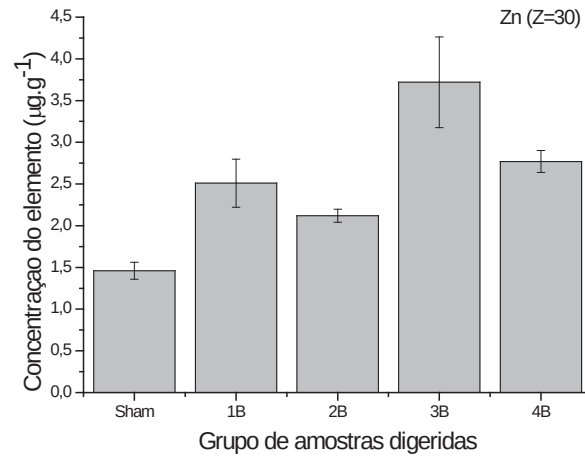


Figura 60: Concentração de Zn nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

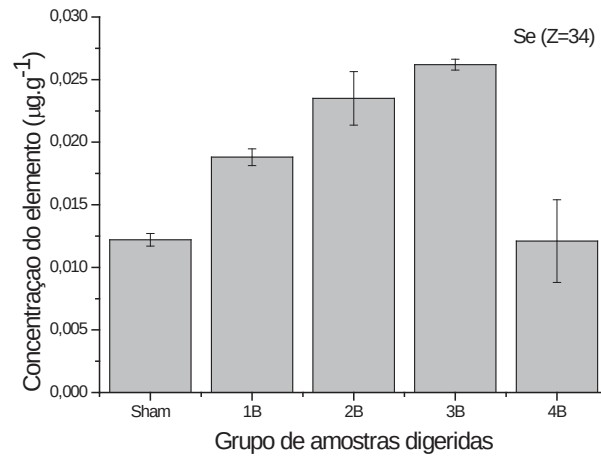


Figura 61: Concentração de Se nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

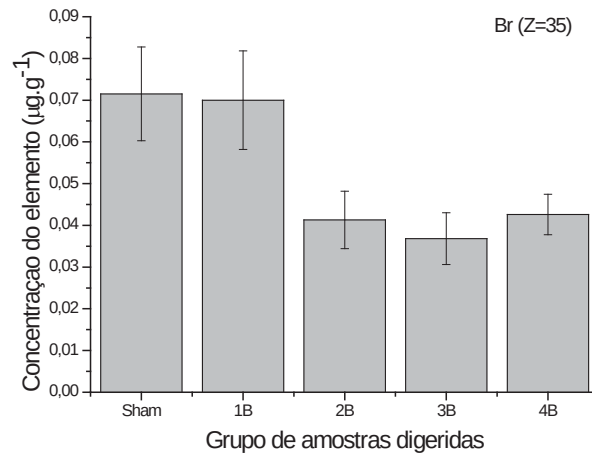


Figura 62: Concentração de Br nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

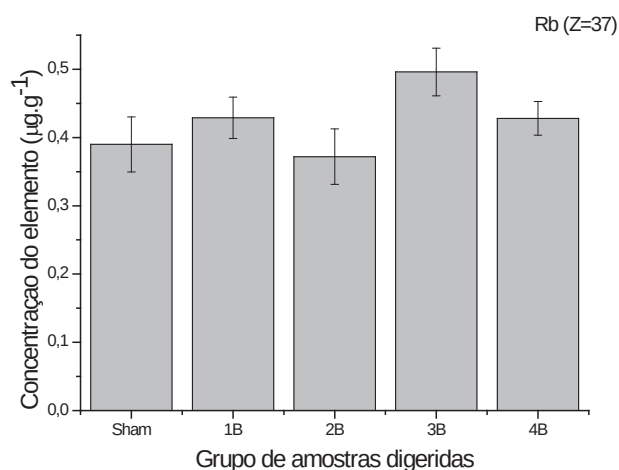


Figura 63: Concentração de Rb nas amostras de mucosas gástricas que tiveram úlcera induzida por álcool (média $\pm$ desvio padrão da média)

Como pode ser observado, todos os elementos das amostras pré-tratadas, que tiveram úlcera induzida por etanol, apresentaram concentrações maiores que as amostras do grupo Sham, também com exceção dos elementos Ti, Cr, Ni, Se e Br (Figura 62).

Os elementos P, S, Cl, K, Zn, Se e Rb apareceram em maior concentração nas amostras do grupo 3B, que foram pré-tratados com extrato fitoterápico de *Davilla elliptica* (Figuras 50-53, 60 e 61).

O elemento Ca apresentou maior concentração nas amostras do grupo 2B, que foram pré-tratados com extrato fitoterápico de *Alchornea glandulosa* (Figura 54).

Já os elementos Ti, Cr, Ni e Cu apareceram em maior concentração nas amostras do grupo 1B, pré-tratado com salina (Figuras 55, 56, 58 e 59).

E o elemento Fe apresentou concentrações semelhantes nas amostras do grupo 1B e 2B (Figura 57).

Tabela 12: Análise estatística entre as médias das concentrações das mucosas gástricas do grupo Sham e das pré-tratadas que tiveram úlceras induzidas por álcool

Elemento	Sham x 1B	Sham x 2B	Sham x 3B	Sham x 4B
P	-0,1930 (ns)	-0,4010 (**)	-0,8110 (***)	-0,0840 (ns)
S	-0,7700 (ns)	-1,160 (***)	-2,570 (***)	-0,3500 (ns)
Cl	-15,47 (ns)	-16,97 (ns)	-25,47 (*)	1,990 (ns)
K	-28,00 (ns)	-8,000 (ns)	-154,0 (ns)	-34,00 (ns)
Ca	-9,000 (ns)	-15,00 (ns)	-9,100 (ns)	-0,600 (ns)
Ti	-0,0840 (ns)	0,0300 (ns)	-0,0740 (ns)	-0,0220 (ns)
Cr	-0,4040 (ns)	-0,2130 (ns)	0,1950 (ns)	0,1890 (ns)
Mn	-0,2850 (ns)	-0,0040 (ns)	-0,0020 (ns)	-0,0240 (ns)
Fe	-4,330 (ns)	-4,460 (ns)	-0,8100 (ns)	-0,600 (ns)
Ni	-0,04430 (ns)	0,0347 (ns)	0,0129 (ns)	0,0165 (ns)
Cu	-0,880 (*)	-0,2160 (ns)	-0,1160 (ns)	-0,1240 (ns)
Zn	-1,050 (ns)	-0,6600 (ns)	-2,260 (***)	-1,310 (**)
Se	-0,0066 (ns)	-0,0113 (*)	-0,0140 (**)	0,0001 (ns)
Br	0,0015 (ns)	0,0302 (ns)	0,0347 (ns)	0,0289 (ns)
Rb	-0,0390 (ns)	0,0180 (ns)	-0,1060 (ns)	-0,0380 (ns)
***: P<0,001 **: P<0,01 *: P<0,05 ns: não significativo (P>0,05)				

Nestes resultados, foi empregado o teste de Tukey para calcular a compatibilidade estatística entre as médias dos diferentes valores de concentração obtidos para cada elemento, comparando as amostras duas a duas (Tabelas 12 e 13).

As respostas farmacológicas obtidas em modelos experimentais de úlceras pépticas, induzidas por álcool e tratadas com as mesmas espécies de plantas medicinais analisadas neste estudo, são de 57 % para *A. glandulosa*, 96 % para *D. elliptica* e 89 % para *D. nitida* (Kushima, 2006; Calvo, Lima, *et al.*, 2007).

Tabela 13: Análise estatística entre as médias das concentrações das mucosas gástricas pré-tratadas que tiveram úlceras induzidas por álcool

	1B x 2B	1B x 3B	1B x 4B	2B x 3B	2B x 4B	3B x 4B
P	-0,2080 (ns)	-0,6180 (***)	0,1090 (ns)	-0,4100 (***)	0,3170 (*)	0,7270 (***)
S	-0,3900 (ns)	-1,800 (***)	0,4200 (ns)	-1,410 (***)	0,8100 (ns)	2,220 (***)
Cl	-1,500 (ns)	-10,00 (ns)	17,46 (ns)	-8,500 (ns)	18,96 (ns)	27,46 (*)
K	20,00 (ns)	-126,0 (ns)	-6,000 (ns)	-146,0 (ns)	-26,00 (ns)	120,0 (ns)
Ca	-6,000 (ns)	-0,1000 (ns)	8,400 (ns)	5,900 (ns)	14,40 (ns)	8,500 (ns)
Ti	0,1140 (ns)	0,0100 (ns)	0,1060 (ns)	-0,1040 (ns)	0,0080 (ns)	0,0960 (ns)
Cr	0,1910 (ns)	0,5990 (**)	0,5930 (**)	0,4080 (ns)	0,4020 (ns)	-0,0060 (ns)
Mn	0,2810 (ns)	0,2830 (ns)	0,3090 (ns)	0,0020 (ns)	0,0280 (ns)	0,0260 (ns)
Fe	-0,1300 (ns)	3,520 (ns)	3,730 (ns)	3,650 (ns)	3,860 (ns)	0,2100 (ns)
Ni	0,0790 (ns)	0,0572 (ns)	0,0608 (ns)	-0,0218 (ns)	-0,0182 (ns)	0,0036 (ns)
Cu	0,6720 (ns)	0,7720 (ns)	0,7640 (ns)	0,100 (ns)	0,0920 (ns)	-0,0080 (ns)
Zn	0,3900 (ns)	-1,210 (*)	-0,2600 (ns)	-1,600 (***)	-0,6500 (ns)	0,9500 (ns)
Se	-0,0047 (ns)	-0,0074 (ns)	0,0067 (ns)	-0,0027 (ns)	0,0114 (*)	0,0141 (**)
Br	0,0287 (ns)	0,0332 (ns)	0,0274 (ns)	0,0045 (ns)	-0,0013 (ns)	-0,0058 (ns)
Rb	0,0570 (ns)	-0,0670 (ns)	0,0010 (ns)	-0,1240 (ns)	-0,0560 (ns)	0,0680 (ns)

***: P<0,001

** : P<0,01

*: P<0,05

ns: não significativo (P>0,05)

Ao analisar as diferenças de concentrações elementares, pode ser observado que as mucosas gástricas tratadas com *D. elliptica* apresentaram concentrações significativamente mais altas de P, S e Zn em relação à *A. glandulosa*; de P, S, Cl e Se em relação à *D. nitida* (Tabela 13); além das diferentes concentrações de P, S, Cl, Zn e Se em relação ao grupo Sham (Tabela 12).

Estas diferenças indicam que a formação de compostos responsáveis pela atividade gastroprotetora mais efetiva da *D. elliptica* pode estar relacionada com a presença em maior concentração destes constituintes em seu extrato.

Adicionalmente, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre os diferentes elementos para cada tipo de amostra, com os resultados apresentados nas Tabelas 14-17.

Analisando os resultados da análise das mucosas gástricas que tiveram úlceras induzidas por álcool, os elementos P e Cl têm comportamento semelhante. Nas amostras tratadas com salina e nas amostras tratadas com *D. nitida*, estes elementos têm concentração estatisticamente compatíveis com as concentrações do grupo Sham (Tabela 12). A maior concentração de ambos os elementos também acontece nas amostras com *D. elliptica* (Tabela 16).

A correlação entre P e Cl está acima de 90 % nas amostras de solução salina (sendo a única correlação importante do elemento P nesta amostra), *A. glandulosa* e *D. nitida* (Tabelas 14, 15 e 17). No caso da *D. elliptica* a correlação é de 87 % (Tabela 16). Outras correlações importantes do elemento P nas amostras tratadas com extratos fitoterápicos são com os elementos: K (88 %) nas amostras com *A. glandulosa* (Tabela 15); com os elementos K (8 %), Ca (94 %) e Mn (80 %) nas amostras com *D. elliptica* (Tabela 16) e com os elementos K (94 %) e Ni (70 %) nas amostras com *D. nitida* (Tabela 17).

Para as concentrações obtidas para o elemento K, os valores das correlações calculadas com os elementos P, S, Cl estão acima de 70 % para todos os tipos de amostras, com exceção das amostras tratadas com solução salina, na qual não existe forte correlação do K com estes elementos (Tabela 14), e das amostras com *A. glandulosa* que não apresenta forte correlação com o Cl. Nas amostras contendo salina, o K também não apresenta correlações importantes com nenhum outro elemento.

Tabela 14: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com salina e que tiveram úlcera induzida por álcool

[illegible]

Tabela 15: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *A. glandulosa* e que tiveram úlcera induzida por álcool

[illegible]

Tabela 16: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *D. elliptica* e que tiveram úlcera induzida por álcool

[illegible]

Tabela 17: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de mucosas gástricas tratadas com *D. nitida* e que tiveram úlcera induzida por álcool

[illegible]

Nas amostras contendo *A. glandulosa*, é importante a anti-correlação do K com o elemento Br (82 %) (Tabela 15). Para as amostras com *D. elliptica*, das correlações calculadas para o K, as mais relevantes foram com Ca (95 %), Mn (81 %) e Zn (81 %) (Tabela 16). Já no caso da *D. nitida*, foi obtida uma correlação significativa do K com Ca (81 %) e uma anti-correlação com o elemento Ni (72 %) (Tabela 16).

Ao analisar as combinações do tratamento com extratos fitoterápicos em úlceras induzidas por etanol, no caso do elemento Ca, no tratamento com *A. glandulosa*, só as correlações com os elementos Cl (73 %), Cr (95 %), Fe (91 %) e Ni (91 %) superam os 70 % (Tabela 15). Nos tratamentos com os extratos do gênero *Davilla*, o elemento Ca possui correlação relevante, além dos já apresentados, com os elementos S (76 %), Cl (96 %), Mn (77 %) e Zn (76 %) para a *D. elliptica* (Tabela 16) e P (94 %), S (95 %) e Cl (71 %) para a *D. nitida* (Tabela 17).

As concentrações dos elementos Ti, Cr, Mn, Fe e Ni foram estatisticamente equivalentes nas cinco amostras (Tabelas 12 e 13).

Nas correlações calculadas para Ti, em relação aos outros elementos, não foi obtido nenhum valor acima de 70 % (Tabelas 14-17).

Para o elemento Cr, além das já apresentadas, foram determinadas correlações acima de 70 % nas amostras de *A. glandulosa*, para os elementos Fe (96 %) e Ni (83 %) (Tabela 15) e nas amostras de *D. nitida* para o elemento Zn (79 %) (Tabela 17). No caso das amostras com solução salina, foi obtida uma correlação de 81 % com o elemento Fe (Tabela 14).

O elemento Mn somente apresentou correlação de 88 % com o elemento Cu nas amostras contendo solução salina (Tabela 14), correlação de 71 % e 72 % com o elemento Br, respectivamente nas amostras tratadas com *A. glandulosa* (Tabela 15) e *D. nitida* (Tabela 17) e 77 % com o elemento Zn nas amostras tratadas com *D. elliptica* (Tabela 16).

Além das correlações já discutidas, para o elemento Fe somente foi obtido um valor relevante de 77 % com o elemento Ni, nas amostras tratadas com *A.*

glandulosa (Tabela 15). Para este último elemento, não foi obtida nenhuma nova correlação além das já descritas, em nenhum dos cinco tipos de amostra.

Para o elemento Cu, as concentrações obtidas nas mucosas tratadas com os extratos fitoterápicos não apresentaram diferenças significativas em relação às amostras do grupo Sham (Tabela 12). Para este elemento não foi obtida nenhuma nova correlação importante além da já relatada.

No caso da concentração do elemento Zn, nas amostras tratadas com salina e *A. glandulosa*, os resultados são estatisticamente compatíveis (Tabela 13). Os valores de concentração obtidos para as amostras tratadas com os fitoterápicos do gênero *Davilla* possuem concentrações maiores em relação ao grupo Sham (Tabela 12). Porém, nenhuma outra correlação acima de 70 % foi obtida para este elemento, com exceção das já relatadas.

Já para o elemento Se, as concentrações determinadas nas amostras com solução salina e com *D. nitida* não apresentaram diferenças significativas com as achadas nas amostras do grupo Sham (Tabela 12). Neste caso, a única correlação acima de 70 % ocorre nas amostras contendo *D. nitida* com o elemento Br (90 %) (Tabela 17).

Finalmente, as concentrações obtidas para o elemento Br nos cinco tipos de amostra são estatisticamente compatíveis. E nenhuma nova correlação relevante, além das já relatadas, foi obtida para este elemento.

Todas as correlações superiores a 70 % estão apresentadas, de forma resumida, na Tabela 18.

Tabela 18: Correlações de Pearson entre os elementos constituintes das amostras que tiveram úlcera induzida por álcool

1B	2B	3B	4B
P, Cl	P, S, Cl, K, Ca, Cr, Fe, Ni	P, S, Cl, K, Ca, Mn, Zn	P, S, Cl, K, Ca, Ni
Mn, Cu	Mn, Br (-)		Mn, Br, Se
	Br, K (-)		K, Ni (-)

(-) Anti-correlação

6 – Conclusões

Este trabalho apresentou resultados da composição multielementar de extratos fitoterápicos de *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, plantas popularmente utilizadas no tratamento de úlceras pépticas, obtidos a partir da técnica de TXRF, utilizando luz síncrotron.

Com esta mesma técnica, foi obtida também a composição multielementar de mucosas gástricas pré-tratadas com os extratos fitoterápicos analisados e que tiveram úlceras induzidas a partir de dois fatores etiológicos da doença no homem: álcool e droga anti-inflamatória não esteroidal (DAINE).

A técnica de TXRF foi eficiente na determinação das concentrações dos elementos P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br e Rb.

Nos resultados obtidos, foi empregado o teste estatístico de Tukey, com significância estabelecida de 5 %. O teste foi realizado comparando amostras duas a duas, apresentando a significância, ou não, entre as diferenças dos valores médios das concentrações dos elementos constituintes das amostras.

Nas amostras de extratos fitoterápicos, apesar de muitos elementos terem apresentado diferenças em suas concentrações, nem todas foram estatisticamente significativas ($P > 0,05$), como é o caso dos elementos Cr, Cu e Zn, que apresentaram os mesmos valores de concentração nas três amostras. Ao contrário disto, o elemento Ca apresentou diferenças significativas em todas as comparações.

Os elementos que apresentaram maior concentração nas amostras de extratos fitoterápicos foram o Ca, no extrato de *A. glandulosa*, e o K, nas amostras do gênero *Davilla*.

Ao analisar as mucosas gástricas que tiveram úlceras induzidas por DAINÉ, as que foram pré-tratadas com o extrato de *D. elliptica* apresentaram concentrações mais altas dos elementos P e Cu em relação à *A. glandulosa*; de P, S, Cl, Cu e Se em relação à *D. nitida* e de P, S, Cl, Fe, Cu, Zn e Se em relação ao grupo Sham. Uma análise semelhante para as amostras que tiveram úlcera induzida por álcool estabelece concentrações significativamente mais altas de P, S e Zn em

relação à *A. glandulosa*; de P, S, Cl e Se em relação à *D. nitida* de P, S, Cl, Zn e Se em relação ao grupo Sham.

Essas diferenças nas concentrações indicam que a atividade gastroprotetora mais efetiva da *D. elliptica* possa ter relação com a maior concentração destes elementos em sua composição.

A partir dos dados obtidos, foi calculada, também, a correlação de Pearson para medir o grau de correlação entre os elementos das amostras.

Nesta análise, pode ser observado que os elementos P, S e Cl apresentam fortes correlações (superiores a 70 %) com vários elementos em todas as amostras.

Nas amostras que tiveram úlceras induzidas por DAINÉ, esses elementos apresentam forte correlação com o Zn, que é um importante elemento no tratamento e prevenção de úlceras. Já nas amostras que tiveram úlceras induzidas por álcool, esses elementos apresentam forte correlação com o Ca, que é também é um importante elemento na regeneração da mucosa danificada.

Com estes resultados, pode-se sugerir que estes elementos são bioindicadores da efetiva atividade gastroprotetora dos extratos fitoterápicos.

7 – Perspectivas Futuras

Com o propósito de dar seguimento a este estudo, algumas perspectivas são apresentadas:

- Analisar as mucosas gástricas por microfluorêscência de raios-X, para mapeamento da distribuição multielementar na região da lesão para as diferentes configurações do modo de indução de úlcera e aplicação de extratos fitoterápicos.
- Analisar as amostras de extratos fitoterápicos em digestão ácida.
- Estudar o efeito de outros tipos de DAINES, como o Piroxicam e a Cimetidina.
- Estudar o possível efeito da relação isotópica de carbono (dependendo da origem do álcool) na composição multielementar das úlceras induzidas.

8 – Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, E. **Utilização das técnicas de fluorescência de raios-X por dispersão de energia e reflexão total na pesquisa agropecuária**. 2001. 62p. Dissertação (Mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- ASCHENBRENNER, D. S.; VENABLE, S. J. **Drug Therapy in Nursing**. 3a. Edição. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health e Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
- BANDYOPADHYAY, B.; BANERJEE, P.; BHATTACHARYA, B. et al. Serum zinc level: a possible index in the pathogenesis of peptic ulcer syndrome. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 36, n. 5, p. 965-972, 1995.
- BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.
- 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. 451-459, 2007.
- CARVALHO, M. L.; MAGALHÃES, T.; BECKER, M. et al. Trace elements in human cancerous and healthy tissues: a comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. **Spectrochimica Acta**, v. 62, p. 1004-1011, 2007.
- CESAREO, R. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. In: CESAREO, R. **Nuclear analytical techniques in medicine**. Amsterdam: Elsevier, v. 8, 1988.
- CUNHA E SILVA, R. M.; NASCIMENTO-FILHO, V. F.; VALENCIA, E. P. E. et al. Determination of Fe, Cu and Zn in Brazilian sugar-cane spirit from Piracicaba city region, SP, using total reflection X-ray fluorescence technique. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 252, n. 3, p. 541-544, 2002.
- DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.
- GO, M. F. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 15, 1997.
- 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. 527-531, 1990.
- GRACIOSO, J. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. Antiulcerogenic effect of a hydroalcoholic extract and its organic fractions of *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. **Phytomedicine**, v. 7, p. 283-289, 2000.

GUARALDO, L.; CHAGAS, D. A.; KORN, A. C. et al. Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 61, 2000.

GUARALDO, L.; SERTIE, J. A. A.; BACCHI, E. M. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 191, 2001.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BIGHETTI, E. J. B. et al. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. **Phytomedicine**, v. 9, p. 523-529, 2002.

IAEA. International Atomic Energy Agency. **Quantitative X-ray analysis system (QXAS) software package**, 2006. Disponível em: <<http://www.iaea.org>>.

IVYENGAR, G. V.; KOLLMER, W. E.; BROWEN, H. J. M. **The elemental composition of human tissues and body fluids**. Weinheim: Verlag Chemie, 1970.

JENKINS, R. **Quantitative X-ray spectrometry**. New York: Marcel Dekker, 1981.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 3a. Edição. ed. Florida: CRC, 2000.

KLOCKENKÄMPER, R.; VON BOHLEN, A. Elemental analysis of environmental samples by total reflection X-ray fluorescence: a review. **X-ray Spectrometry**, v. 25, p. 156-162, 1996.

KOO, M. W. L. The effects of milk and calcium on ethanol-induced gastric mucosal damage. **Pharmacological Research**, v. 29, n. 3, p. 217-224, 1994.

KOO, M. W.; CHO, C. H.; OGLE, C. W. Verapamil worsens ethanol-induced gastric ulcers in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 3, p. 355-358, 1986.

KORNDÖRFER, A. P. **A importância do silício nas relações entre herbívoros e *Davilla nitida* (Dilleniaceae) St. Hil no cerrado**. 2006. 31p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

KUSHIMA, H. **Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davilla elliptica* St. Hil. E *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (Dilleniaceae)**. 2006. 107p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Botucatu, 2006.

LAMBERT, J. R. Pharmacology of Bismuth-Containing Compounds. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 8, p. S691-S695, 1991.

LAZAR, V. A.; BEEZON, K. C. The determination of copper and molybdenum in plants by X-ray spectrography. **Journal the AOAC**, v. 41, p. 416, 1958.

LEE, S. P. The mode of action of colloidal bismuth subcitrate. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 185, p. 1-6, 1991.

LEWIS, D. A.; HANSON, P. J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 201-231, 1991.

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>. Acesso em: 28 agosto 2009.

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

MARKERT, B. **Instrumental element and multi-element analysis of plant samples**: methods and application. New York: John Wiley & Sons, 1996.

MATHEUCCI, L. G. **Farmacognóstico e Farmacológico de Davilla Rugosa Poiret**. 1996. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de São Paulo, 1996.

MOBAROK ALI, A. M.; AL-RASHED, R. S.; AL-SWAYEH, O. A. et al. Selenium protects against ischemia-reperfusion induced gastric lesions in rats. **The Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 3, p. 125-129, 1997.

MORAES, L. M. B. **Utilização de duas variantes da fluorescência de raios-X (EDXRF e TXRF) na determinação de chumbo em águas e sedimentos**. 2004. 118p. Dissertação (Mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MUSTAFA, I. M.; HAPIPAH, M. A.; ABDULLA, M. A. et al. Synthesis, structural characterization, and anti-ulcerogenic activity of Schiff base ligands derived from tryptamine and 5-chloro, 5-nitro, 3,5-ditertiarybutyl salicylaldehyde and their nickel(II), copper(II), and zinc(II) complexes. **Polyhedron**, v. 28, p. 3993-3998, 2009.

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>. Acesso em: 31 ago. 2007.

OBIAJUNWA, E. I.; ABADEJO, A. C.; OMOBUWAJO, O. R. Essential and trace element contents of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 252, p. 473-476, 2002.

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.

PARMAR, N. S.; TARIQ, M.; AGEEL, A. M. Gastric anti-ulcer and cytoprotective effect of selenium in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 122-130, 1988.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research - every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medica**, v. 69, p. 491-495, 2003.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: Embrapa, 1994.

PRANGE, A.; BÖDDEKER, H.; KRAMER, K. Determination of trace elements in river-water using total-reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta**, v. 48B, p. 207-215, 1993.

QUERALT, I.; OVEJERO, M.; CARVALHO, M. L. et al. Quantative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP tchiniques. **X-Ray Spectrometry**, v. 34, p. 213-217, 2005.

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.

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, 2007.

SILEN, W.; ITO, S. Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface. **Annual Review of Physiology**, v. 47, p. 217-219, 1985.

SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B. et al. **Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília: WWF, 2001.

STRELI, C.; WOBRAUSCHEK, P.; MEIRER, F. et al. Synchrotron radiation induced TXRF. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, p. 792-798, 2008.

STURNIOLO, G. C.; MESTRINER, C.; D'INCÀ, R. Trace element and mineral nutrition in gastrointestinal disease. In: BOGDEN, J.; KLEVAY, L. M. **Clinical nutrition of the essential trace elements and minerals: the guide for health professionals**. 1a. ed. Totowa: Humana Press, 2000. Cap. 17, p. 289-308.

TOLGYESSY, T.; HAVRANEK, E.; DEJMKOVA, E. **Radionulide X-ray fluorescence**. Amsterdam: Elsevier, 1990.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; HIRUMA-LIMA, C. A. et al. Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of Quassia amara bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 19-23, 2003.

TUORKEY, M. J. F.-A.; ABDUL-AZIZ, K. K. A pioneer study on the anti-ulcer activities of copper nicotinate complex [CuCl (HNA)₂] in experimental gastric ulcer induced by aspirin-pylorus ligation model (Shay model). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 194-201, 2009.

WATANABE, T.; ARAKAWA, T.; FUKUDA, T. et al. Zinc deficiency delays gastric ulcer healing in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 40, n. 6, p. 1340-1344, 1995.

WHO. World Health Organization. **National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines**, 2005. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s7916e/s7916e.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2009.

YAMASHITA, C. I. **Estudo sobre os constituintes inorgânicos presentes em diferentes espécies da planta medicinal do gênero Casearia coletadas em regiões distintas da Mata Atlântica, SP**. 2006. 130p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

YAZDANPANA, K.; MOGHIMI, N.; YOUSEFINEJAD, V. et al. Effect of zinc sulphate on peptic ulcer disease. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 25, n. 3, p. 404-407, 2009.

