

Felipe Meira de Faria

**DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO
ENVOLVIDOS NAS ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E
ANTIOXIDANTE DE *Rhizophora mangle* L.**

Campinas

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Felipe Meira de Faria

DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO
ENVOLVIDOS NAS ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E
ANTIOXIDANTE DE *Rhizophora mangle* L.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas
para a obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Alba Regina Monteiro Souza Brito



UNICAMP
Campinas – São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Faria, Felipe Meira de

F225d Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante de *Rhizophora mangle L.* / Felipe Meira de Faria. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

Título em inglês : “Determination of the mechanisms of action in the antiulcerogenic and antioxidant activities of *Rhizophora mangle L.*”

Keywords: • Gastric ulcer
• Antioxidant
• Tannin

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Prof. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima

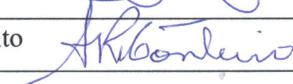
Prof. Dr. Marcos José Salvador

Data da defesa: 19-06-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

FELIPE MEIRA DE FARIA

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Alba Regina Monteiro de Souza Brito

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Clélia Akiko Hiruma Lima	
Professor (a) Doutor (a) Marcos Jose Salvador	
Professor (a) Doutor (a) Alba Regina Monteiro de Souza Brito	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/06/2009



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

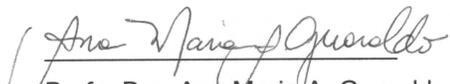
Certificamos que o Protocolo nº 1280-1, sobre "Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante de *Rhizophora mangle* L.", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito / Felipe Meira de Faria, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de maio de 2007.

CERTIFICATE

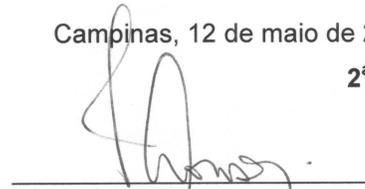
We certify that the protocol nº 1280-1, entitled "Determination of the mechanisms of action in the antiulcerogenic and antioxidant activities of *Rhizophora mangle* L.", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 28, 2007.

Campinas, 12 de maio de 2009.

2ª. VIA



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

DEDICATÓRIA

Este trabalho é, e só poderia ser, dedicado à Walber Toma.

AGRADECIMENTOS

Este item sempre é difícil de descrever por uma série de fatores, a possibilidade de esquecer um nome pode trazer prejuízos às relações pessoais para com o “esquecido”. Agradecer a tudo e todos também pode ser um grande equívoco e demonstrar que todos tiveram igual participação no desenrolar de um trabalho de dissertação, como este; portanto, embora possa parecer que há alguma falta de consideração por determinadas pessoas que foram ou são fundamentais na minha vida, os agradecimentos descritos a seguir são destinados somente aqueles que tiveram efetiva participação na elaboração deste trabalho ou que, de alguma forma colaboraram para que eu tivesse condições de realizá-lo.

Sendo assim, não seguirei qualquer ordem de importância aqui, e sim a ordem que me vem à cabeça neste momento, a grandeza de cada agradecimento será perceptível aos olhos dos atentos leitores desta página.

À minha mãe, Ana Luiza, que sempre me incentivou e tentou prover um bom terreno para que eu pudesse caminhar em busca dos meus objetivos, e assim foi quando me mudei de Santos para Campinas;

À Erika, ex-colega de laboratório, atual colega de vida a dois (e espero que futura também), pessoa muito especial em minha vida!;

Ao Walber Toma, que foi meu orientador durante a graduação e foi quem bateu na porta do Laboratório de Produtos Naturais da Unicamp porque acreditou que eu deveria seguir este caminho, e nesse período se tornou um verdadeiro amigo;

À Alba – sim, chamá-la-ei de Alba! – porque além de confiar nos argumentos do Walber e me aceitar como orientado, ser orientadora em todos os aspectos e áreas que tive a oportunidade de conversar com ela, tenho certeza que ganhei não só a única pessoa que poderia ser minha orientadora, como também uma baíta de uma amiga;

A todos os companheiros do Laboratório de Produtos Naturais, aos que se tornaram amigos e aqueles com os quais foram provocadas algumas desavenças, todos

foram fundamentais do início ao fim, seja ajudando (Erika, Aninha, Anderson, Victor, Ricardo, Eduardo-Cinza, Chris, Bitá, Patrícia, Cibele, Elis, Débora) ou atrapalhando (Eduardo-Cinza);

Assim como tem sido nas últimas defesas de dissertação/tese de nosso laboratório, três pessoas terão destaque especial nestes agradecimentos:

Aninha, uma verdadeira santa, uma pessoa honesta sem igual, profunda conhecedora da Biologia, sempre tirando dúvidas de todos, ajudando em experimentos, na redação de relatórios, de artigos, de resumos... amiga e querida de todos!;

Anderson, o cara do fator $h = 1$, é também o mais virtuoso que conheci aqui pros lados de Campinas, companheiro na alegria e na alegria (com ele não existe tristeza!), atual líder dentro de nosso laboratório, também auxilia a todos, é paciente, solicita ajuda a Aninha também, participa de todo e qualquer evento no laboratório, é difícil conduzir um experimento na sua ausência e ele certamente é um irmão que eu gostaria de ter!;

Ao Victor, que apesar de não ter convivido muito tempo comigo no laboratório, conviveu em nossa República, a “Leite com pêra”; foi e é, além de grande companheiro, um grande amigo, excelente pesquisador, um cara privilegiado de paz, inteligência, axé; parceiro de longas conversas e discussões; e mesmo após sua saída do laboratório, sempre que pôde, auxiliou nos experimentos e nas interpretações dos mesmos;

Ao Marcelo Silva, pelos esforços na preparação dos extratos e frações, pela colaboração na interpretação dos dados químicos, excelente profissional, amigo também!

Aos docentes que compuseram a banca do exame de qualificação, Prof^a. Dr^a. Sisi, Prof. Dr. Parada, e, Prof. Dr. Marcos Salvador, suas observações foram muito importantes;

O Prof. Marcos Salvador merece destaque também, desde o primeiro contato sempre foi muito solícito e me concedeu muito do seu tempo discutindo experimentos e resultados, me emprestou materiais e seu conhecimento, obrigado por tudo!;

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Pellizzon, por me receber em seu laboratório e pela orientação na preparação das lâminas histológicas e imunohistoquímicas, à Ariane (Sponja) pelo suporte dado nas análises dessas lâminas, e ao Hélio (Pon-Pon) que abriu as portas de sua casa e me recebeu em todas as oportunidades em que fui à Botucatu, desculpo-me por qualquer desconforto causado, muito obrigado pela hospitalidade e amizade!;

À Prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma Lima, que aceitou o convite para compor esta banca examinadora e com certeza suas sugestões serão fundamentais nesta avaliação. Sem dúvidas é um exemplo a ser seguido;

Ao Prof. Dr. Marcos Eberlin e à Patrícia Abdelnur pelas análises de massas, obrigado pela confiança e pelo auxílio neste período;

Aos nossos vendedores oficiais, Tadeu e Lazinho, pessoas totalmente diferentes um do outro, mas que se tornaram meus amigos também, gente finíssima, grandes companheiros, pessoas de bem, certamente a amizade e o companheirismo permanecerão!;

A alguns colegas do departamento de fisiologia e biofísica, responsáveis pela cooperação entre laboratórios...;

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, todos os momentos em que precisei de seu auxílio, ele estava lá, muito obrigado, outro exemplo de pesquisador, tenho profunda admiração por este profissional;

E por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que fomentou meus esforços para a realização desta dissertação de Mestrado, e também nossos projetos de pesquisa.

EPÍGRAFE

“Em minhas investigações sobre a ação das forças na matéria, surpreendi-me ao constatar linhas de fronteira que se dissipavam e pontos de contato que emergiam entre o vivo e o não vivo. Meu primeiro trabalho no domínio das luzes invisíveis levou-me à compreensão de que permanecíamos quase cegos em pleno oceano luminoso. Assim como, ao seguirmos a luz do visível para o invisível, o campo de investigação transcende nossa visão física, o problema do grande mistério da vida e da morte fica um pouco mais perto de uma solução quando, no domínio do vivo, passamos do falante para o não falante. Há alguma relação possível entre nossa própria vida e o mundo das plantas? A questão não é de especulação, mas sim de demonstração real por algum método que seja irrefutável. Para tanto, é fundamental nos livrarmos de todas as nossas idéias preconcebidas, a maioria das quais acaba por se revelar absolutamente sem base e contrária aos fatos. Convém que o apelo final seja feito diretamente à planta, e não se deve aceitar uma só evidência que não traga sua própria assinatura.”

Jagadis Chandra Bose

Retirado de “A vida secreta das plantas” Tompkins, P. & Bird, C. 1976

Sumário

DEDICATÓRIA	IX
AGRADECIMENTOS.....	XI
EPÍGRAFE	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXVII
LISTA DE FIGURAS.....	XXXV
LISTA DE TABELAS.....	XLIII
RESUMO	XLV
ABSTRACT	XLVII
1. Introdução	49
1.1. Considerações iniciais	49
1.2. Atividade antiulcerogênica e sua terapêutica.....	49
1.3. A proteção da mucosa gástrica	53
Prostaglandinas	53
Óxido nítrico (NO)	54
Muco e bicarbonato	55
Fluxo sanguíneo	55
Grupamentos sulfidrílicos (GSH)	56
Reconstituição e renovação do epitélio gástrico	56
Heat shock protein (HSP)	57
Proliferation cell natural antigen (PCNA).....	58
Fator de crescimento epidermal (EGF)	59
1.4. Os radicais livres e a defesa antioxidante	59
1.5. Plantas medicinais.....	61
1.6. Polifenóis, os taninos vegetais	64
1.7. <i>Rhizophora mangle</i> e sua importância como fonte de taninos	65

2. Objetivos	68
3. Material e métodos.....	69
3.1. Coleta da Espécie	69
3.2. Preparação do extrato e frações.....	69
3.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)	70
3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	70
3.5. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESIMS)	70
3.6. Animais.....	71
3.7. Drogas utilizadas	72
3.8. Delineamento experimental	72
3.8.1. Úlcera gástrica induzida por etanol	72
3.8.2. Úlcera induzida por isquemia-reperfusão.....	73
3.8.3. Ensaio de atividade antioxidante “in vivo”	73
3.8.3.1. Folin-Ciocalteu.....	73
3.8.3.2. Avaliação da redução do radical DPPH	73
3.8.4. Ensaio de atividade antioxidante “in vivo”	74
3.8.4.1. Níveis de grupamentos sulfidrílicos (GSH)	74
3.8.4.2. Atividade da glutatona redutase (GR).....	75
3.8.4.3. Atividade da glutatona peroxidase (GPx).....	75
3.8.4.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	75
3.8.4.5. Atividade da mieloperoxidase (MPO)	75
3.8.4.6. Determinação do índice de peroxidação lipídica (LPO)	76
3.8.5. Mecanismos de atividade antiulcerogênica.....	76
3.8.5.1. Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção.....	76
3.8.5.2. Envolvimento do NO na gastroproteção.....	77
3.8.5.3. Avaliação da secreção ácida pelo método de Shay.....	77

3.8.5.4. Produção de muco aderido à mucosa gástrica	77
3.8.5.5. Produção de PGE ₂ na mucosa gástrica.....	78
3.8.5.6. Avaliação da cicatrização de úlcera gástrica em modelo crônico	79
3.8.5.6.1. Toxicidade subcrônica.....	79
3.8.5.6.2. Expressão de COX-1, COX-2 e EGF	79
3.8.5.6.3. Análise histológica.....	80
3.8.5.6.4. Imunohistoquímica	81
3.9. Análise estatística.....	82
4. Resultados	83
4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	83
4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	84
4.3. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESIMS)	85
4.3.1. Moléculas propostas	90
4.4. Úlcera gástrica induzida por etanol	92
4.5. Úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão	94
4.6. Ensaio de atividade antioxidante “ <i>in vitro</i> ”	95
4.7. Ensaio de atividade antioxidante “ <i>in vivo</i> ”	96
4.8. Mecanismos de atividade antiulcerogênica.....	99
4.8.1. Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção	99
4.8.2. Envolvimento do NO na gastroproteção.....	100
4.8.3. Avaliação da secreção ácida pelo modelo de Shay	101
4.8.4. Produção do muco aderido à mucosa gástrica	102
4.8.5. Produção de PGE ₂ na mucosa gástrica.....	103
4.8.6. Avaliação da cicatrização de úlcera gástrica em modelo crônico	104
4.8.6.1. Toxicidade sub-crônica.....	105
4.8.6.2. Expressão de COX-1, COX-2 e EGF	107

4.8.6.3. Análise histológica.....	112
4.8.6.4. Imunohistoquímica	115
5. Discussão.....	119
6. Conclusões.....	135
7. Perspectivas	136
8. Referências bibliográficas	137

Lista de abreviaturas

- AA = ácido araquidônico
- ABC = composto 3'3-diaminobenzidina + peroxidase
- Abs. = absorbância
- AcF = fração acetato de etila
- Ach = neurotransmissor acetilcolina
- AGeq = ácido gálico equivalente
- ALFAC = álcool-formaldeído-ácido acético
- ALT = enzima alanina aminotransferase
- ALU = área de lesão ulcerogênica
- ANOVA = análise de variância de uma via
- AqF = fração aquosa
- AST = enzima aspartato aminotransferase
- BuF = fração butanólica
- Ca = catequina
- cAMP = adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- CAT = enzima catalase
- CCD = cromatografia em camada delgada
- CCK₂ = receptor de gastrina do tipo 2
- CE = extrato bruto
- cGMP = guanidina 3',5'-monofosfato cíclico
- COX-1 = enzima cicloxigenase tipo 1 (constitutiva)
- COX-2 = enzima cicloxigenase tipo 2 (induzível)
- DAB = 3'3-diaminobenzidina
- DAG = diacilglicerol
- DAINES = drogas antiinflamatórias não esteroidais

DNA = ácido desoxirribonucleico

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB = ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

EC₅₀ = concentração mínima para obter 50% do efeito

ECL = células enterocromafins “like”

EDTA = ácido etileno-diamino tetra acético

EGF = fator de crescimento epidermal

ELISA = ensaio imunoenzimático

EMBRAPORT = Empresa Brasileira de Terminais Portuários

eNOS = enzima óxido nítrico sintase endotelial

Ep = epicatequina

EP = receptor de prostaglandinas

EROs = espécies reativas de oxigênio

ESIMS = espectrometria de massas com ionização por eletrospray

fr-Aq = fração aquosa

fr-BuOH = fração butanólica

fr-EtOAc = fração acetato de etila

GA = ácido gálico

gl = glândula gástrica

GPx = enzima glutathiona peroxidase

GR = enzima glutathiona redutase

GSH = grupamentos sulfidrílicos

GSSH = grupamentos sulfidrílicos na forma oxidada

H⁺K⁺-ATPase = bomba protônica de hidrogênio e potássio

H₂ = receptor histamínico do tipo 2

HE = hematoxilina/eosina

HPLC-UV/DAD = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra violeta

HSP = chaperona

HSP-70 = chaperona-70

IBAMA = Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

IL-1 β = interleucina 1 β

iNOS = enzima óxido nítrico sintase induzível

IP₃ = inositol 1,4,5-trifosfato

L-NAME = N^o-nitro-L-arginina metil-éster

LPO = peroxidação lipídica

m = camada muscular

m/z = massa molecular

M₃ = receptor muscarínico do tipo 3

MALDI-MS = espectrometria de massas de ionização assistida por laser matrix

MDA = malonildialdeído

mm = camada muscular da mucosa

MPO = enzima mieloperoxidase

MW = micro-ondas

NADPH = β -nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NBT = azul de nitrotetrazólio

NEM = N-etil maleimida

nNOS = enzima óxido nítrico sintase neuronal

NO = óxido nítrico

NOS = enzima óxido nítrico sintase

NP/PEG = produtos naturais / polietilenoglicol

PAF = fator ativador de plaquetas

PAS = ácido periódico de Shiff

PCNA = antígeno natural de proliferação celular

PGE₂ = prostaglandina tipo E₂

PGH₂ = prostaglandina tipo H₂

PGHS = enzima prostaglandina H sintase

PGI₂ = prostaciclina

PGs = prostaglandinas

Ru = rutina

SDS-PAGE = gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio para eletroforese

sm = camada submucosa

SNC = sistema nervoso central

SNE = sistema nervoso entérico

SOD = enzima superóxido dismutase

TBARS = ácido tiobarbitúrico

TEPP = tetraepoxipropano

TNBS = ácido tri-nitro-benzeno-sulfônico

TNF- α = fator de necrose tumoral α

TRIS = hidroximetil aminometano

UV = ultra-violeta

γ -GCS = enzima γ -glutamilcisteína sintase

γ -GT = enzima γ -glutamiltransferase

Lista de figuras

- Figura 1.** Regulação fisiológica e farmacológica das secreções gástricas: a base para o tratamento da doença ulcerosa péptica. Adaptado de Hoogerwerf & Pasricha, (2005). 52
- Figura 2.** Foto de um conjunto de *Rhizophora mangle* compondo a franja do manguezal localizado no estuário de Santos/SP. 66
- Figura 3.** (A) Foto ilustrativa da droga vegetal (cascas) retirada de *Rhizophora mangle*; (B) droga vegetal pulverizada. 67
- Figura 4.** Fluxograma representativo dos métodos de extração (A), e, fracionamento (B) das cascas de *R. mangle*. 69
- Figura 5.** Cromatografia em camada delgada, (A) revelação com anisalaldeído/H₂SO₄; (B) revelação com NP/PEG; (C) revelação com FeCl₃ 1%. CE: extrato bruto; AcF: fração acetato de etila; AqF: fração aquosa; BuF: fração butanólica; GA: ácido gálico; Ru: rutina; Ca: catequina; Ep: epicatequina. 83
- Figura 6.** Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das injeções de (A) extrato acetona:água (7:3); (B) fração aquosa; (C) fração acetato de etila; (D) fração butanólica. 84
- Figura 7.** Espectro de massas modo negativo do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*. 85
- Figura 8.** Espectro de massas modo negativo da fração aquosa do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*. 86
- Figura 9.** Espectro de massas modo negativo da fração acetato de etila do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*. 87
- Figura 10.** Espectro de massas modo negativo da fração butanólica do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*. 88
- Figura 11.** Estruturas dos compostos polifenólicos propostos a partir do perfil (ESIMS) do extrato acetona:água (7:3) obtidos a partir das cascas de *R. mangle*. (1) catequina ou epicatequina, monômero de tanino condensado; (2) e (3) catequina (epi) heterosídeo; (4), (5), (6) e (7) derivados de elagitaninos, tanino hidrolisável; (8) e (9) derivados de galotaninos, tanino hidrolisável; (10) e (11) derivados de taninos complexos. 90
- Figura 12.** Proteção gástrica promovida pela fração aquosa (fr-Aq) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Dados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA, com teste *a posteriori* de Dunnett, ***P*<0.01, ****P*<0.001 comparados ao controle Salina. 92

- Figura 13.** Proteção gástrica promovida pela fração acetato de etila (fr-EtOAc) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste *a posteriori* de Dunnett, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina..... 92
- Figura 14.** Proteção gástrica promovida pela fração butanólica (fr-BuOH) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste *a posteriori* de Dunnett, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina. 93
- Figura 15.** Proteção gástrica promovida pela fração butanólica (0,5 mg.Kg⁻¹) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por isquemia/reperfusão em ratos. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste *a posteriori* de Dunnett, *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina. 94
- Figura 16.** Potencial redutor do extrato bruto (CE) e frações de *R. mangle* sobre o radical DPPH.. 95
- Figura 17.** Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-ethyl maleimide (NEM). Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 7), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tuckey, *** $P < 0.001$ comparados ao grupo Salina. 99
- Figura 18.** Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 7), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tuckey, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ comparados ao grupo Salina. 100
- Figura 19.** Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) sobre a produção de muco aderido pela mucosa gástrica de ratos submetidos à ligadura do piloro. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 7), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, ** $P < 0.01$ comparados ao grupo Salina..... 102
- Figura 20.** Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) na produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) na mucosa gástrica de ratos. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 6), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, ** $P < 0.01$, *** $P > 0.001$ comparados ao grupo Indometacina. 103
- Figura 21.** Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) durante a (A) evolução, (B) 4º, (C) 8º e (D) 14º dias sobre a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, ** $P < 0.01$ comparados ao grupo Salina..... 104
- Figura 22.** Avaliação da toxicidade da fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) no modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos. Efeito da fr-BuOH administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso

dos animais. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 12). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P>0.05$ comparados ao grupo Salina. 105

Figura 23. Avaliação da toxicidade da fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) no modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos. Efeito da fr-BuOH administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos dos animais. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 4). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $**P<0.01$ comparados ao grupo Salina. 106

Figura 24. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 4 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P>0.05$ comparados ao grupo Salina. 107

Figura 25. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 8 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P>0.05$ comparados ao grupo Salina. 108

Figura 26. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 14 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P>0.05$ comparados ao grupo Salina. 108

Figura 27. Efeito da administração oral de fr-BuOH por 4 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P>0.05$ comparados ao grupo Salina. 109

Figura 28. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 8 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P>0.05$.comparados ao grupo Salina. 110

Figura 29. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 14 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $*P<0.05$, $**P<0.01$ comparados ao grupo Salina. 110

Figura 30. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 14 dias sobre expressão de fator de crescimento epidermal (EGF) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $*P<0.05$, $**P<0.01$ comparados ao grupo Salina. 111

Figura 31. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹). Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise da organização morfológica da mucosa onde se observa os diferentes grupos experimentais. gl – glândulas; m – mucosa; mm – muscular da mucosa; SM – sub-mucosa..... 113

Figura 32. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹). Cortes histológicos corados com ácido periódico de Schiff (PAS), marcador de glicoproteínas, para visualização de muco gástrico produzido nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam compostos polissacarídicos. 114

Figura 33. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de Heat Shock Protein (HSP) 70 revelado com 3'3 diaminobenzidina (DAB), que promove a cor marrom como resposta positiva da reação. Foi verificada a participação da HSP-70 no processo de cicatrização nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização. 115

Figura 34. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) revelado com complexo ABC 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase, que promove a coloração marrom como resposta positiva da reação. Foi verificado o processo de divisão celular durante a cicatrização das lesões nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização. 116

Figura 35. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de cicloxigenase 2 (COX-2) revelado com ABC 3'3 diaminobenzindina (DAB), que promove a coloração marrom como resposta positiva da reação. Foi verificada a participação da enzima COX-2 no processo de cicatrização das lesões nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização..... 117

Lista de tabelas

Tabela 1. Anticorpos e diluições específicas para as reações de imunohistoquímica.....	81
Tabela 2. Descrição das moléculas propostas com sua massa real (m/z) e a massa encontrada no ESIMS ($m/z - H$).....	91
Tabela 3. Potencial redutor (DPPH) e conteúdo de polifenóis totais (Folin-Ciocalteu) do extrato e frações de <i>R. mangle</i>	95
Tabela 4. Níveis de GSH e atividade enzimática da SOD de ratos submetidos à úlcera induzida por etanol.	96
Tabela 5. Atividade enzimática da GPx e GR de ratos submetidos à úlcera induzida por etanol. ...	96
Tabela 6. Atividade enzimática da LPO e MPO de ratos submetidos à úlcera induzida por etanol. 97	
Tabela 7. Níveis de GSH e atividade enzimática da SOD de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.....	97
Tabela 8. Atividade enzimática da GPx e GR de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.....	98
Tabela 9. Atividade enzimática da LPO e MPO de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.....	98
Tabela 10. Efeito da administração oral de fr-BuOH ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$) em ratos submetidos à ligadura do piloro, avaliação do volume secretado e seu pH.	101

Resumo

A pesquisa farmacológica têm se voltado ao conhecimento da medicina popular, a fim de estabelecer as bases científicas dos seus efeitos farmacológicos. Atualmente taninos têm papel de destaque em função de sua capacidade antioxidante e em função dos avanços obtidos na análise e identificação desses compostos além de suas possibilidades terapêuticas. Entre as diversas fontes naturais desses compostos destacou-se, neste trabalho, uma planta bastante conhecida nos ambientes costeiros, a *Rhizophora mangle* L. (mangue-vermelho), pertencente à família RHIZOPHORACEAE. O gênero *Rhizophora* compreende cinco espécies das regiões equatorial, tropical e subtropical de ambos os hemisférios. É uma das mais importantes fontes de taninos (15 a 36% da massa da casca seca) para uso industrial. *R. mangle* é conhecida na medicina popular caribenha por suas propriedades antiinflamatória, antifúngica, bactericida, anti-úlceras, antihipertensiva e antioxidante. Este trabalho avaliou as atividades antiulcerogênica e antioxidante de *R. mangle*, assim como traçou o perfil químico das substâncias presentes em suas cascas. Para tanto foram realizados ensaios químicos e farmacológicos com o extrato bruto (acetona:água 7:3) e frações orgânicas (aquosa – fr-aq, acetato de etila – fr-EtOAc e butanólica – fr-BuOH) dele obtidas. A análise da atividade antiulcerogênica do extrato e frações, mostrou que fr-BuOH foi mais eficaz na dose de 0,5mg.Kg⁻¹. Essa fração também apresentou atividade antioxidante significativa. Nos ensaios químicos realizados, tanto para o extrato bruto quanto para as frações, verificou-se a existência de alta concentração de compostos polifenólicos. Os testes farmacológicos com a fr-BuOH buscaram determinar os mecanismos pelos quais são exercidas as atividades antiulcerogênica e antioxidante das substâncias nela presentes. Concluiu-se que fr-BuOH possui catequinas heterosídeos, galotaninos, elagitaninos e taninos complexos em sua composição, de acordo com métodos de análise empregados. Estas substâncias mostraram-se capazes de sequestrar radicais livres, atuar sobre compostos (GSH) e enzimas antioxidantes (GR, GPx e SOD) e pró-oxidantes (MPO e LPO) definindo sua atividade antioxidante. A atividade antiulcerogênica além de ser mediada pela própria ação antioxidante é dependente de GSH e NO, envolve a participação de PGE2, COX-2, EGF, PCNA, HSP-70, além do aumento da produção de muco aderido e propriedades anti-secretoras.

Abstract

The pharmacological research has been focusing on the folk medicine knowledge in order to establish the scientific basis of their pharmacological effects. Nowadays, tannins play a prominent role because of its high antioxidant capacity and, due to the progress made in the analysis and identification of these compounds and their therapeutic possibilities. Among the many natural sources of these compounds, highlighted in this work a well known plant in coastal environments, the *Rhizophora mangle* L., belonging to the family RHIZOPHORACEAE. The genus includes five species of Rhizophora in equatorial, tropical and subtropical regions in both hemispheres. It is one of the most important sources of tannin (15 to 36% of the dry bark weight) in industrial use. *Rhizophora mangle* is well known in the Caribbean folk medicine for its anti-inflammatory, antifungal, antibacterial, anti-ulcer, anti-hypertensive and antioxidant properties. This study aimed to evaluate the antioxidant and anti-ulcer activities of *R. mangle*, and to elucidate the chemical compounds present in its barks. For both evaluations chemical and pharmacological assays with the crude extract (acetone: water 7:3) and their organic fractions (aqueous - fr-aq, ethyl acetate - fr-EtOAc and butanolic - fr-BuOH) were performed. The analysis of anti-ulcer activity of the extract and fractions showed that fr-BuOH was more effective at a dose of 0,5 mg.Kg⁻¹. This fraction also showed significant antioxidant activity. It was found the presence of high concentrations of polyphenolic compounds in the chemical assay performed for both the crude extract and its fractions. The pharmacological experiments were carried out to determine the mechanisms by which the compounds present in fr-BuOH exert their anti-ulcer and antioxidant activities. It was concluded that the fr-BuOH has antioxidant activity linked to the concentration of polyphenolic compounds, which were able to scavenge free radicals, maintain the levels of GSH, reduce the MPO activity and LPO levels and maintain or increase the antioxidant enzymatic activities of GR, GPx and SOD. Moreover, the anti-ulcer activity of fr-BuOH is mediated by several mechanisms including: antioxidant action; involvement of GSH and NO; anti-secretory properties; increase of mucus and PGE₂ synthesis, and expression of COX-2, EGF, HSP-70 and PCNA on gastric mucosa. Chemical study revealed that the major compounds are heteroside catechins, gallotannins and “tannin complexes”.

1. Introdução

1.1. Considerações iniciais

Antes de dar início ao objeto desta pesquisa propriamente dito, serão descritas aqui algumas considerações julgadas importantes na execução deste trabalho bem como para uma melhor compreensão de alguns fatores que podem por ventura levantar questionamentos, os quais podem ser evitados por estas considerações iniciais.

A pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e necessita de acompanhamento de uma equipe multidisciplinar, uma vez que nela estão presentes conhecimentos de farmacologia, biologia molecular, química analítica, bioquímica, fitoquímica, etnobotânica, toxicologia, e, claro, o dever de traduzir tudo isso para uma aplicação prática daquilo que se pretende obter com um projeto dessa natureza. A pesquisa nesta área não deve ser utilizada apenas como divulgadora de dados, e sim, como fonte a partir da qual áreas de interesse extraíam conhecimentos e os apliquem de forma continuada.

1.2. Atividade antiulcerogênica e sua terapêutica

A humanidade tem convivido com úlceras pépticas desde tempos remotos. Talvez a primeira descrição dessa doença tenha sido inscrita nos pilares do templo de Esculápio em Epidaurus por volta do século IV a.C.: *“um homem com úlcera no estômago. Ele incubou e teve uma visão; o Deus pareceu ordenar a seus seguidores que o capturassem e o mantivessem prisioneiro, que ele poderia operar o seu estômago. Assim, o mesmo fugiu mas foi capturado a amarrado a uma aldraba. Em seguida Esculápio abriu-lhe o estômago, retirou a úlcera, costurou-o novamente e soltou suas amarras”*. Muitas pessoas ilustres sofreram de indigestão e úlceras, inclusive o imperador romano Marco Aurélio, cuja morte foi atribuída por alguns a uma úlcera perfurada e cujo médico era o próprio Galeano. A neutralização ácida foi reconhecida como um tratamento eficaz há mais de doze séculos por Paulus Aeginata, o qual prescreveu uma mistura de solos de Samos e Lemnos e

leite, não diferente dos esquemas terapêuticos com leite e antiácidos usados em meados do século XX.

O parágrafo acima retirado de Hoogerwerf & Pasricha em “Goodman & Gilman’s The Pharmacological basis of the therapeutic” (2005), citando Smith & Rivers (1953), mostra o longo histórico das úlceras pépticas e sua importância na história da humanidade. Os mesmos autores chamam a atenção para os enormes avanços no conhecimento da patogênese e no tratamento dos quadros clínicos de úlceras pépticas, desde então; entretanto a descoberta da *Helicobacter pylori* (Tytgat & Rauws, 1986) e dos inibidores prótonicos (Siepler *et al.*, 1986) são os últimos grandes acontecimentos da patologia e ambos ocorreram no século passado.

Do ponto de vista clínico, o controle da acidez nestes casos, bem como o tratamento anti *H. pylori* parece estar bem estabelecido; no entanto alguns avanços devem ainda ser feitos, tendo em vista que atrás de *H. pylori* os anti-inflamatórios não esteroidais – os DAINES – são os maiores responsáveis pelo surgimento de úlceras pépticas (Watanabe & Chiba, 2002).

Embora a supressão da secreção ácida tenha sido um pilar para a promoção da cicatrização de úlceras gástricas por três décadas, há um grande interesse nos últimos anos nos mecanismos pelos quais a úlcera cicatriza-se, e a possibilidade de ambos, velocidade e qualidade na cicatrização serem modulados farmacologicamente (Wallace, 2005). Assim sendo, parece que o desbalanço entre os fatores agressivos e defensivos da mucosa estão sendo tratados de outra maneira em pesquisas recentes. Os fatores defensivos participariam do controle da acidez e o fortalecimento desses fatores vem fornecendo um novo horizonte de perspectivas para o tratamento da doença ulcerosa péptica (Dajani & Klamut, 2000; Wallace, 2005).

Entretanto, a secreção ácida é o grande evento na fisiologia gástrica (figura 1), e esta secreção é um processo contínuo e complexo controlado por múltiplos fatores tanto centrais (neurais), quanto periféricos (endócrino e parácrino). Cada fator se refere a um evento fisiológico final comum – a secreção de H^+ pelas células parietais, as quais estão localizadas no corpo e no fundo gástrico. Os fatores neurais (acetilcolina – Ach),

parácrinos (histamina) e endócrinos (gastrina) desempenham papéis importantes na regulação de secreção ácida. Seus respectivos receptores específicos (M_3 , H_2 e CCK_2) foram identificados anatômica e farmacologicamente na membrana basolateral da célula parietal. Existem duas vias principais de sinalização na célula parietal: a via dependente do cAMP e a via dependente do Ca^{2+} . Enquanto histamina utiliza a primeira via, a gastrina e a Ach exercem seus efeitos por meio da última. A via dependente de cAMP resulta na fosforilação das proteínas efetoras da célula parietal e a via dependente do Ca^{2+} leva a um aumento do Ca^{2+} citosólico. Ambas as vias ativam a H^+K^+ -ATPase (a bomba protônica), que consiste em uma grande subunidade α e uma subunidade β menor. Essa bomba produz o maior gradiente iônico conhecido nos vertebrados, com um pH intracelular de cerca de 7,3 e um pH intracanalicular de mais ou menos 0,8 (Hoogerwerf & Pasricha, 2005).

A liberação de Ach pelas fibras vagais pós-ganglionares pode estimular diretamente a secreção de ácido gástrico por meio de um receptor colinérgico muscarínico específico do subtipo M_3 . O sistema nervoso central (SNC) provavelmente modula a atividade do sistema nervoso entérico (SNE), sendo a Ach seu neurotransmissor regulador. O SNC é geralmente considerado o contribuinte para o início da secreção de ácido gástrico em resposta aos estímulos visual, olfatório, gustativo e antecipação do alimento (fase cefálica). A Ach também influencia indiretamente a célula parietal por meio da estimulação da liberação de histamina a partir das células enterocromafin “like” (ECL) no fundo gástrico e a estimulação da liberação de gastrina a partir das células G no antro gástrico (Hoogerwerf & Pasricha, 2005). A histamina é liberada das células ECL, ou de mastócitos, por meio de vias multifatoriais, e é um regulador fundamental da produção ácida por meio do subtipo H_2 do receptor. As células ECL são geralmente encontradas em estreita proximidade com as parietais. Seu envolvimento na secreção ácida foi comprovado pelo uso de antagonistas do receptor H_2 . A gastrina está presente principalmente nas células G do antro gástrico, assim como a histamina, a liberação da gastrina é regulada por meio de muitas vias envolvendo, entre outros, a ativação neural central, distensão local e componentes químicos do conteúdo gástrico. A gastrina estimula a secreção ácida predominantemente de uma maneira indireta por causar a liberação de histamina nas células ECL; também se observa

1.3. A proteção da mucosa gástrica

A mucosa gástrica mantém sua integridade estrutural e funcional apesar de estar constantemente exposta a fatores nocivos como HCl e pepsina, os quais são capazes de digerir tecido. Sob condições normais, a integridade da mucosa é mantida pelos mecanismos de defesa, os quais incluem fatores pré-epiteliais, uma barreira epitelial (superfície das células epiteliais justapostas secretando muco, gerando bicarbonato, peptídeos, prostaglandinas, e “heat shock proteins”), renovação contínua de células aperfeiçoadas por células progenitoras (regulados por fatores de crescimento e PGE₂), contínuo fluxo sanguíneo através de microvasos da mucosa, além de barreira endotelial, inervação sensorial, geração de PGs e óxido nítrico (NO) e mecanismos antioxidantes (Laine *et al.*, 2008).

Prostaglandinas

As prostaglandinas estão envolvidas numa série de processos fisiológicos no estômago, incluindo secreção ácida, produção de muco e fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (Robert & Ruwart, 1982). Foi estabelecido que a supressão da síntese de PGs no estômago, através da inibição das cicloxigenases (1 e 2), é o componente chave para o mecanismo da ulceração no trato gastrintestinal. DAINES induzem ulceração na mucosa gástrica por reduzirem a síntese de PGs via inibição da cicloxigenases. As conseqüências desta redução são constatadas pela diminuição de secreção de muco e bicarbonato e do fluxo sanguíneo local (Cryer, 2000), além disso, o contato direto das DAINES com a mucosa gástrica ataca os fosfolipídeos presentes tanto no muco quanto no epitélio gástrico, o que interfere severamente a hidrofobicidade da camada de muco, causando então uma retro-difusão de íons hidrogênio (Bjorkman, 1996, e Berstad *et al.*, 2002).

O efeito biológico das PGs, neste caso da PGE₂, é mediado via receptores específicos de membrana, denominados EP (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄), que são acoplados a proteínas-G de membrana, ligadas a diferentes vias de transdução de sinal intracelular (Sugimoto *et al.*, 2000; Dey *et al.*, 2006). Ligantes de PGE₂ a receptores EP₁ resultam na liberação intracelular de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG); ligantes de EP₂ e

EP₄ ativam o sistema adenilato ciclase-AMPC; por último, ligantes EP₃ inibem esse sistema (Pawlick, 2002; Dey *et al.*, 2006).

A PG exerce proteção por aumentar tanto a secreção de muco e bicarbonato quanto a resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas, além de manter o fluxo sanguíneo da mucosa (Hawkey & Rampton, 1985). Além disso, a demonstração de que PGE₂ inibe a secreção ácida também colabora para que este mediador seja considerado um fator importante na proteção da mucosa gástrica.

Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico tem importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica, como: regulador na secreção de muco (Brown *et al.*, 1993), vasodilatador, produzindo aumento do fluxo sanguíneo local (Wallace, 2000), inibidor da migração de neutrófilos (Banick *et al.*, 1997) e auxiliar no processo de cicatrização da úlcera gástrica (Jadeski & Lala, 1999). Nesta última, a ação do NO produz aumento da deposição de colágeno pelos fibroblastos além de estimular a angiogênese (Wallace, 2000). O NO exerce amplo espectro de atividades biológicas *in vivo* dependentes, em parte, da guanosina-3', 5'-monofosfato cíclica (cGMP) produzida após estimulação do guanilato ciclase solúvel (Moncada, *et al.*, 1991). Nas células musculares lisas essa estimulação resulta em relaxamento. O NO pode atuar também diretamente em canais de potássio dependentes de cálcio, levando a uma hiperpolarização dependente do endotélio, resultando em vasodilatação (Bolotina *et al.*, 1994).

As três enzimas produtoras de NO são as NO-sintases: nNOS (neuronal), eNOS (endotelial), e a induzida (ou inflamatória) iNOS, que têm sido caracterizadas no trato gastrintestinal. A iNOS produz grande quantidade de NO causando danos e, portanto, inibição específica dessa enzima é benéfica. As NOS constitutivas mantêm a barreira mucosa intacta (Kubes & McCafferty, 2000).

Estímulos apropriados, tais como respostas inflamatórias (por exemplo, a presença de úlcera gástrica), aumentam a atividade da iNOS (Kristjansson *et al.*, 2005). O bloqueio do NO aumenta o estresse oxidativo, ativando mastócitos, que são células encontradas em

grandes quantidades no trato gastrointestinal, e que liberam mediadores como histamina e fator ativador de plaquetas (PAF), causando aumento da permeabilidade epitelial (Kanwar *et al.*, 1994).

Muco e bicarbonato

A primeira linha de defesa contra o ácido é a barreira de muco (Phillipson *et al.*, 2002). O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco aderida à superfície mucosa. Esse muco, juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio, serve como barreira contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (Allen & Flemstrom, 2005). O muco se apresenta de forma viscosa, elástica e aderente na forma de um gel transparente composto por 95% de água e 5% de glicoproteína, que recobre a superfície da mucosa gastrointestinal (Repetto & Lleusly, 2002). O muco gástrico possui também atividade antioxidante devido às glicoproteínas, sendo os açúcares potentes seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mojzis *et al.*, 2000).

A secreção do muco gástrico é controlada por vários fatores em diferentes vias. PGs, NO e secretina, estimulam a secreção de muco (Tani *et al.*, 1997); nos receptores que medeiam a secreção de muco muitas substâncias fisiologicamente ativas, incluindo neurotransmissores, autacóides e hormônios servem de fatores secretagogos (Johnson & Alpers, 1994).

Fluxo sanguíneo

Um dos papéis do fluxo sanguíneo é suprir a mucosa com oxigênio, nutrientes e hormônios, além de participar na regulação da saída de ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato e remoção dos produtos do tecido, incluindo a retro-difusão de íons hidrogênio, assim, o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa. A redução deste está envolvida na formação das lesões na mucosa gástrica causadas por estresse, etanol e DAINES (Kawano & Tsuji, 2000).

A micro-circulação é modulada pelo sistema nervoso e mediadores como NO, bradicinina e PGs. Difusão de ácido ou toxinas na mucosa resulta em elevação crítica do

fluxo sanguíneo mediada por neurônio sensorial aferente, limitando danos a facilitando a reparação. O sangue dilui e/ou neutraliza o ácido/toxina e previne o acúmulo de altas concentrações na mucosa (Wallace & Ma, 2001).

Grupamentos sulfidrílicos (GSH)

O papel gastroprotetor dos grupamentos sulfidrílicos endógenos (compostos sulfidrílicos), presentes no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema xantina-oxidase, já foi demonstrado em diversos modelos de indução de úlcera (etanol, DAINES, e estresse), nos quais ocorre depleção destes compostos (Hernandez-Munoz *et al.*, 2000 e Bayir *et al.*, 2006). O pré-tratamento com bloqueadores de grupamentos sulfidrílicos como o *N-ethylmaleimide* (NEM) demonstrou potencializar significativamente a indução de úlceras gástricas (Hiraishi *et al.*, 1994), enquanto que aumentos significativos desses grupamentos promovem gastroproteção (Sener-Muratoglu *et al.*, 2001).

No processo inflamatório, EROs são geradas e iniciam uma reação em cadeia que culmina na peroxidação lipídica e morte celular (Tariq *et al.*, 2006). Os compostos sulfidrílicos ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou produzidos após exposição a agentes nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (Avilla *et al.*, 1996).

Estes agentes são também importantes na produção e manutenção do muco gástrico, uma vez que suas subunidades glicoprotéicas são unidas entre si por pontes dissulfeto que, uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel (Salim, 1992 e Avilla *et al.*, 1996).

Reconstituição e renovação do epitélio gástrico

O estômago possui várias formas de se proteger quando exposto continuamente a altas concentrações de ácido; uma das estruturas mais importantes é o epitélio gástrico. Ele é frequentemente renovado, sendo as células “velhas” deslocadas em direção ao lúmen. O epitélio gástrico humano renova-se completamente a cada 2-4 dias. A habilidade em permitir que as células velhas sejam repostas por células mais jovens, sem quebra significativa da barreira, é atribuída a um processo de extensão celular, ou seja, células vizinhas gradualmente “apertam” as células envelhecidas na base (Wallace & Granger, 1996).

O termo reconstituição refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa, que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida. As células gástricas estão ligadas à membrana basal da célula epitelial e este local é bastante sensível aos danos induzidos por ácido (Paimela *et al.*, 1995). A cicatrização da mucosa na úlcera gástrica requer reconstituição da estrutura glandular epitelial (re-epitelização), restauração da lâmina própria incluindo uma rede microvascular na mucosa, nervos e células de tecidos conjuntivos (Milani & Calabro, 2001). A cicatrização das úlceras é acompanhada de um aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera, de gastrina plasmática além de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . A hipergastrinemia que ocorre durante o período anterior à cicatrização da úlcera pode ser atribuída à supressão de acidez gástrica e expressão de fatores de crescimento (Brzozowski *et al.*, 2001).

A mucosa gástrica, situada na margem da úlcera, forma uma “zona de cicatrização”, glândulas dessa região começam a dilatar e as células de revestimento dessas glândulas sofrem diferenciação. A ativação de fator de crescimento epidermal (EGF) e proliferação celular é iniciada três dias após a implantação da úlcera e é essencial para a cicatrização. De modo geral, os fatores de crescimento promovem proliferação e migração de células epiteliais para a cratera da úlcera, levando à re-epitelização dessa cratera e maturação das glândulas. Na base da úlcera ocorre granulação de tecido com remodelação contínua. A angiogênese (formação de microvasos) facilita essa remodelação por liberar oxigênio e nutrientes. Células inflamatórias são substituídas por fibroblastos e microvasos na fase final da cicatrização (Chan & Sung, 2001). A angiogênese é importante então para o reparo, tanto de dano agudo quanto crônico, durante a cicatrização de úlceras gastroduodenais (Malara *et al.*, 2005).

Heat shock protein (HSP)

HSP-70 é um membro das famílias das HSPs encontrado em células (núcleo e citosol) de mamíferos com peso molecular de aproximadamente 70 kDa; sua produção é induzida em resposta ao estresse (Shichijo *et al.*, 2003). O aumento da expressão de HSP-70 é demonstrado em lesões patológicas como, por exemplo, arteriosclerose (Berberian *et*

al., 1990), estresse oxidativo (Hightower & White, 1982), doença neurodegenerativa (Hamos *et al.*, 1991), infecção viral e doença auto-imune (Young & Elliot, 1989). Foi proposto que HSP-70 contribui para proteção da mucosa gastrintestinal contra agentes nocivos (Tsukimi & Okabe, 2001). O aumento da expressão da HSP-70 está ainda envolvido com a aceleração da cicatrização de úlceras gástricas (Okabe & Amagase, 2005).

HSP também contribui para a citoproteção adaptativa na mucosa gastrintestinal, em especial a HSP-70, que atua com fatores integrais do mecanismo de defesa. A expressão de HSP-70, induzida por fármacos anti-úlceras, confere proteção contra a úlcera gástrica; entretanto, os mecanismos responsáveis por esta proteção não são conhecidos. Acredita-se que esta proteção ocorra através de um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (Shichijo *et al.*, 2003). O acúmulo de HSPs protege o organismo de uma série de condições patológicas, dentre elas a úlcera gástrica (Tytell & Hooper, 2001). A família de proteínas HSP-70 reduz desnaturação e agregação de proteínas intracelulares induzidas por diferentes formas de estresse. Sugere-se que elas exerçam seu efeito citoprotetor através de proteção da mitocôndria no programa de apoptose induzido pelo estresse (Rokutan, 2000).

Proliferation cell natural antigen (PCNA)

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é um polipeptídeo nuclear de 36 kDa que tem sido amplamente estudado em diversas patologias; está associado ao ciclo celular atuando como co-fator para a DNA polimerase delta (Bravo *et al.*, 1987; Prelich *et al.*, 1987 e Nanji & Tahan, 1996). O PCNA é essencial para a síntese de DNA e, conseqüentemente, é considerado agente intimamente associado à replicação celular. O ciclo celular é composto de duas etapas: fase mitótica (M) e interfase, que se divide nas fases G₀, G₁, S e G₂. A produção de PCNA no ciclo celular aumenta a partir da fase G₁, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G₂ e passando a exibir níveis extremamente baixos na fase M e em células quiescentes, que não podem ser identificados por métodos imunohistoquímicos (Huang *et al.*, 1994 e Martinez-Lara *et al.*, 1996).

O processo de cicatrização de úlcera é complexo onde ocorre reconstituição de estrutura epitelial e do tecido conjuntivo através da proliferação, migração e diferenciação celular (Beckert *et al.*, 2004). Após a implantação da úlcera gástrica a reconstituição da

superfície do epitélio gástrico é feita através da proliferação e diferenciação celular, estas induzidas por PCNA.

Fator de crescimento epidermal (EGF)

EGF aparece como marcador clínico de doenças neoplásicas e inflamatórias, e como fator de crescimento celular, que protege a mucosa do aparelho digestivo por estimulação da produção de muco e inibição da secreção ácida. Igualmente implicado no processo de cicatrização, o EGF aumenta o mesmo (Egée *et al.*, 2002); as células epiteliais da mucosa na margem da úlcera proliferam e migram para o tecido de granulação no sentido de re-epitelizar a úlcera. Fatores de crescimento, como EGF e citocinas produzidas localmente pelas células de regeneração, controlam a re-epitelização e reconstrução das estruturas glandulares. EGF, seu receptor e a COX-2 são fundamentais para proliferação celular epitelial, migração e re-epitelização na reconstrução das glândulas gástricas (Tarnawski *et al.*, 2001 e Tarnawski, 2005).

Assim, a cicatrização da úlcera é um complexo e bem regulado processo de preenchimento da mucosa lesada com proliferação, migração de células dos tecidos epitelial e conjuntivo. Este processo inclui re-estabelecimento da superfície contínua de camada epitelial, estruturas glandulares, microvasos e tecido conjuntivo no interior da cicatriz.

1.4. Os radicais livres e a defesa antioxidante

De acordo com Pincemail (1995) vários clichês como “oxigênio, amigo ou inimigo?”; “veneno necessário para vida”; “amigo perigoso” têm sido utilizados regularmente em artigos e encontros científicos para discutir os efeitos tóxicos do oxigênio em contradição de sua indispensável necessidade à vida. Isto se deve a sua habilidade de gerar espécies reativas como superóxidos, peróxidos de hidrogênio, óxidos de nitrogênio, entre outros. O “paradoxo do oxigênio” foi descrito pela primeira vez no século 19 por Louis Pasteur, quando demonstrou que organismos anaeróbicos morriam rapidamente após exposição ao ar contendo os 20% de oxigênio requerido para sobrevivência de organismos

aeróbicos. Gershan e colaboradores (1954) e Harman (1956) ressurgiram com este conceito e levantaram a hipótese de que a morte de animais expostos a irradiação por raios X na presença de altas concentrações de oxigênio e o processo de envelhecimento devem-se, em parte, ao metabolismo anormal do oxigênio, levando a reações tóxicas envolvendo radicais livres. Laborit e colaboradores (1960) chamaram a atenção para os possíveis efeitos tóxicos da alta pressão de oxigênio levando a formação de radicais livres nos mergulhos e sugeriram o uso de alguns antioxidantes na biologia.

A história dos radicais livres na biologia e medicina começou de fato quando em McCord e Fridovich (1969) descobriram a superóxido dismutase (SOD), uma enzima capaz de destruir o radical ânion superóxido pela redução univalente do oxigênio. A partir daí observou-se crescimento exponencial dos artigos científicos que mostravam a excessiva produção de “espécies reativas de oxigênio” (EROs) ou “radicais livres” implicada na patogênese de várias doenças em humanos. EROs podem ser formadas pela ativação de células inflamatórias, durante o metabolismo de xenobióticos, ou a partir da xantina oxidase durante lesões formadas por isquemia-reperfusão (Blake *et al.*, 1987; Cross *et al.*, 1987; Grisham & Granger, 1988; Braganza, 1989).

Radicais livres estão envolvidos na patofisiologia de várias doenças gastrintestinais (úlceras e inflamações) e hepáticas (Arthur *et al.*, 1988; Braganza, 1989; Rozga, 1989; Verspaget *et al.*, 1991; Babbs, 1992; Harris *et al.*, 1992; Stark & Szurszewski, 1992; Van der Vliet & Bast, 1992; Simmonds, 1995; Yoshida, 1995). O metabolismo de ácido araquidônico, macrófagos e neutrófilos geram EROs que podem contribuir para danos causados na mucosa gástrica (Rosen *et al.*, 1995). Os sequestradores de EROs são utilizados para proteger a mucosa gástrica do dano oxidativo e acelerar a cicatrização de úlceras. O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (Gutteridge, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2005).

De acordo com Augusto (2006) as defesas antioxidantes do organismo podem ser enzimáticas e não enzimáticas endógenas, e também podem vir da dieta. As enzimáticas são constituídas por superóxido dismutases; catalases; GSH peroxidases; GSH redutases; peroxirredoxinas; tioredoxinas; enzimas de reparo, que sintetizam GSH e que repõem NADPH; enquanto as não-enzimáticas são GSH, ácido úrico e albumina. Dentre aquelas provenientes da dieta são encontrados: ácido ascórbico; α -tocoferol (vitamina E); β -caroteno; polifenóis, flavonóides, etc. Em condições normais a concentração destas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelas enzimas superóxido dismutase, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (McCord & Fridovich, 1969; Halliwell & Gutteridge, 2005).

Antioxidantes endógenos e derivados da dieta são indispensáveis para a manutenção da saúde frente ao ataque de radicais livres; dentre os derivados da dieta encontra-se grande variedade de antioxidantes, muito dos quais representados pelos potentes polifenóis. Esses compostos podem exercer seus efeitos benéficos no trato gastrointestinal, uma vez que este é possivelmente o principal local de ações pro e antioxidantes. Todas as condições patológicas encontradas no trato gastrointestinal envolvem espécies reativas e danos oxidativos durante sua progressão e até mesmo antes de sua origem (Halliwell *et al.*, 2000; Halliwell & Gutteridge, 2005).

1.5. Plantas medicinais

Os componentes da biodiversidade podem fornecer ampla gama de produtos de importância econômica. Dentre eles destacam-se fitoterápicos e fitofármacos, originados dos recursos genéticos. Fitoterápicos são aqueles medicamentos preparados com plantas medicinais, já os fitofármacos são constituídos por substâncias extraídas destas. A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal é sua complexidade, estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais 55.000 espécies catalogadas, de um total de 350.000

e 550.000, considerando-se que mais da metade dessas espécies encontram-se nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da Terra. As oportunidades para prospecção de produtos com possível utilização econômica aumentam com a diversidade das espécies. As plantas são fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, é comum que pesquisadores da área de produtos naturais mostrem-se impressionados com o fato desses produtos possuírem enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Guerra & Nodari, 2004).

Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem produtos de origem natural dos sintéticos: diversidade molecular e ação biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Além disso, por serem produtos produzidos por organismos que possuem similaridade com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais àquelas encontradas em fármacos sintéticos (Reis *et al.*, 2004).

No Brasil estimou-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional, tenham sido originados de medicamentos derivados da plantas. Somente 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e apenas 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Garcia *et al.*, 1996). O crescimento do mercado interno de medicamentos fitoterápicos no Brasil é da ordem de 15% ao ano, enquanto aquele do mercado de medicamentos sintéticos é cerca de 5 vezes menor, ou seja, gira em torno de 3 a 4%. Contudo, de acordo com Di Stasi (1996), em nível nacional, apenas 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos sintéticos disponíveis, sendo que o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a principal ou a única fonte de recursos terapêuticos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais, sendo a maioria de países em desenvolvimento (McCheney, 1995; Schuster, 2001; Gurib-Fakim, 2006), dentre os fatores que definem o emprego

popular das plantas medicinais nos cuidados com a saúde, está o alto preço dos medicamentos industrializados (Rates, 2001).

Segundo Rates (2001), a possibilidade de encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável; entretanto, o estudo de novos compostos a partir de espécies vegetais é lento e bastante oneroso. Para que um novo fármaco seja lançado no mercado, são necessários em torno de 100 a 360 milhões de dólares e, no mínimo, 10 anos de trabalho. Estima-se que a probabilidade de sucesso para a obtenção de novos compostos seja de uma molécula a cada 10.000 moléculas estudadas. Esses dados referem-se a países desenvolvidos que selecionam plantas de maneira randômica aumentando custos e tempo gasto na obtenção de novos fármacos.

A área de pesquisa que utiliza plantas medicinais não se restringe apenas à procura de novas moléculas, pois essas plantas podem ser empregadas em diferentes formulações, como infusões, tinturas, extratos, frações, ou no desenvolvimento de fitoterápicos. Assim, realizar pesquisa com plantas medicinais envolve critérios adequados na seleção de espécies para obter sucesso na investigação farmacológica. A escolha com base no uso consagrado de uma planta na terapêutica (etnofarmacologia) seria óbvia devido às possibilidades aumentadas de descobrir novos compostos; porém, a seleção com base nos constituintes químicos encontrados num dado gênero ou família (quimiosistemática) torna-se também atrativa pela mesma razão. A fácil aceitação e preferência por fármacos sintéticos se devem, em parte, à acessibilidade, eficácia e segurança desses produtos. Atualmente, a crescente necessidade de estudos científicos para o registro dos fitomedicamentos, tem tornado as características diferenciais dos medicamentos sintéticos menos distantes (Holetz *et al.*, 2002). Assim, o interesse crescente em torno dos produtos naturais tem contribuído, mais do que nunca, para melhorar os cuidados com a saúde (Gurib-Fakim, 2006).

1.6. Polifenóis, os taninos vegetais

Historicamente, a importância dos taninos está ligada às suas propriedades de transformar a pele animal em couro, *tanar*. No entanto, atualmente a tanagem também pode ser industrialmente conseguida com compostos minerais. Durante o curtimento do couro ligações entre as fibras de colágeno na pele animal são formadas, desse modo, o couro adquire resistência ao calor, água e abrasivos; a capacidade dos taninos em combinar-se com macromoléculas explica a ação deles de precipitar celulose, pectinas e proteínas. Tais propriedades constituem a base da definição clássica dessa classe de compostos, ou seja, substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular de até 3000 Dalton, as quais apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Os taninos são particularmente importantes como componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos ou cascas em produtos alimentícios vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (Santos & Mello, 2004)

O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado; acredita-se que os mesmos estejam envolvidos na defesa química das plantas contra herbivoria e microrganismos patogênicos. Na defesa contra herbivoria a diminuição da palatabilidade devido ao sabor adstringente, dificuldades na digestão por complexação dos taninos com enzimas digestivas e/ou com proteínas da planta e, por último, formação de produtos tóxicos no trato digestório a partir da hidrólise dos taninos seriam os modos de ação propostos como estratégia evolutiva das espécies que tem taninos como metabólitos secundários (Santos & Mello, 2004).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são, ao menos em parte, devidas a três características gerais comuns, em maior ou menor grau a aqueles condensados e hidrolisáveis: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, dentre outros); 2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; 3) habilidade de complexar-se com macromoléculas tais como proteínas e

polissacarídeos. Foi sugerido que os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estejam intimamente ligados a essas três propriedades. Os taninos ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, que favorece abaixo desta, a ocorrência do processo de cicatrização (reestruturação do epitélio e formação vasos). Processo similar ocorre, provavelmente, em casos de úlcera gástrica, onde uma camada tanino-proteína seria responsável por proteger a lesão e garantir melhor cicatrização (Haslam, 1996).

Taninos com diferentes estruturas químicas ocorrem em todo o planeta nas plantas medicinais e alimentares; apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas, as quais são, muitas vezes, específicas para determinadas estruturas além de significativa para a saúde humana (Okuda, 2005). Os taninos são, portanto, merecedores de maior número de investigações, não só em fitoquímica, como também em farmacologia.

1.7. *Rhizophora mangle* e sua importância como fonte de taninos

Espécies do gênero *Rhizophora*, são conhecidas pelas propriedades medicinais de seus taninos, por exemplo, *R. apiculata* possui atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (Vijayavel *et al.*, 2006; Rahim *et al.*, 2008; Loo *et al.*, 2007; Loo *et al.*, 2008), e atividade antiviral (Premanathan *et al.*, 1999); *R. stylosa* possui também atividade antioxidante (Li *et al.*, 2007; Takara *et al.*, 2008).

R. mangle, é conhecida popularmente como “Mangue-Vermelho”, “Candapuva”, “Guaraparaíba”, “Mangue Garobeira”, “Mangue de Espeto”, “Mangue de Pendão”, “Mangue Preto”, “Mangue Sapateiro”, “Paxiubarana” e “Mangue Verdadeiro”, principalmente no nordeste do Brasil; é conhecida mundialmente como “Mangle Rojo”, “Mangle Colorado” e “Red Mangrove”. É encontrada em todo litoral do Brasil, Antilhas, México, África e Ilhas do Pacífico; possui importância econômica como fornecedora de taninos (que compreendem 15 a 36% da massa seca) extraídos das cascas sendo a planta

um dos mais importantes adstringentes de uso industrial (Pio-Corrêa, 1984; Chapman, 1976).

Segundo Pio-Corrêa (1984), a casca de *R. mangle* contendo tanino, é usada na forma de infuso contra diarreias, desinterias e hemorragias. Em vários países da América (Panamá, Costa Rica, Jamaica, Cuba) a espécie é empregada como lenha, além de ter sua decocção misturada com óleo de linhaça para encerar o assoalho das habitações, inclusive palácios e grandes hotéis.

Roig (1974) relata que *R. mangle* é conhecida há muito tempo na medicina popular de diferentes países caribenhos. Sua casca tem sido utilizada como adstringente, anti-séptico, hemostático, além de apresentar propriedades antifúngicas e antiulcerogênicas.

Alguns trabalhos recentes, especialmente de Cuba, relatando diversas propriedades medicinais de *R. mangle*, tais como antioxidante (Sánchez *et al.*, 2006 e Berenguer *et al.*, 2006), antibacteriana (Melchor *et al.*, 2001), antiulcerogênica (Perera *et al.*, 2001 e Berenguer *et al.*, 2006), cicatrizante (Fernandez *et al.*, 2001 e de Armas *et al.*, 2005), antiinflamatória (Marrero *et al.*, 2006) e anti-diabética (Alarcon-Aguilara *et al.*, 1998).



Figura 2. Foto de um conjunto de *Rhizophora mangle* compondo a franja do manguezal localizado no estuário de Santos/SP.

Neste trabalho, a idéia de trabalhar com uma planta oriunda do maguezal decorre também do fato de que o bioma é esquecido e abandonado, por ter características atrativas reduzidas (dificultando sua valorização por órgãos governamentais); os manguezais são de suma importância para o meio ambiente, e sua destruição avassaladora nos últimos tempos só agrava as condições de qualidade de nossas águas costeiras; tem papel fundamental no ciclo do carbono, no fornecimento de matéria orgânica dissolvida (Maie *et al.*, 2008), e na proteção e reciclagem das águas costeira, e marítima (razão do nome “berçário dos mares”).

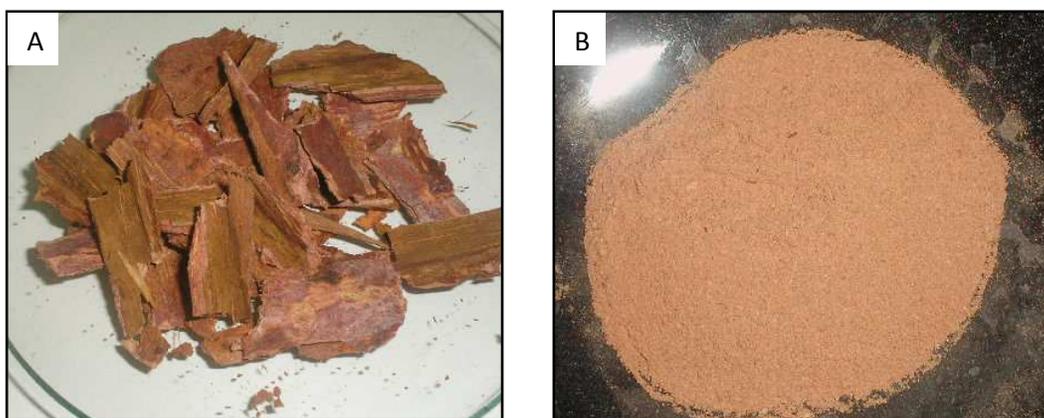


Figura 3. (A) Foto ilustrativa da droga vegetal (cascas) retirada de *Rhizophora mangle*; (B) droga vegetal pulverizada.

Portanto a seleção da espécie *Rhizophora mangle* ou mangue-vermelho, como é conhecida popularmente, se deu também pela possibilidade de agregar valor a um bem natural que vem sendo destruído pelo homem na construção de *resorts*, ampliação de portos e instalação de pólos petrolíferos. Maior relevância nesta seleção é o fato de que a espécie é amplamente utilizada na medicina popular de países caribenhos (Roig 1974); e no Brasil, suas cascas são utilizadas apenas como fonte de taninos para tingir/impermeabilizar painéis de barro e barcos, pelas populações ribeirinhas de áreas costeiras, especialmente no norte do país.

2. Objetivos

São objetivos deste trabalho:

⇒ traçar o perfil químico do extrato e das frações orgânicas das cascas de *R. mangle*;

⇒ investigar os principais constituintes químicos do extrato e das frações orgânicas das cascas de *R. mangle*;

⇒ estudar a potencial atividade antiulcerogênica das frações orgânicas obtidas do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *R. mangle*, e;

⇒ determinar os mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante da fração com melhor atividade anti-úlceras.

3. Material e métodos

3.1. Coleta da Espécie

A coleta do material biológico foi realizada na área continental do sistema estuarino de Santos/SP, aproveitando-se de uma supressão de vegetação autorizada pelo IBAMA (autorização número: 116/2006) e realizada pela EMBRAPORT sob os cuidados do taxonomista vegetal Msc. Paulo de Salles Penteado Sampaio, responsável também pela identificação da espécie.

3.2. Preparação do extrato e frações

As cascas de *R. mangle* foram secas em estufa à 40°C durante sete dias e moídas em moinho de facas. A extração foi realizada utilizando acetona:água (7:3) pelo método de maceração, que durou setes dias e obteve o rendimento de 31,4%. O extrato acetona:água de *R. mangle* foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, obtendo assim frações semi-purificadas. Esta metodologia proporciona um adequado *clean up* dos extratos polares (Calixto & Yunes, 2001). Aproximadamente 20 g do extrato foi dissolvido em 150 mL de água em um funil de separação; 50 mL de acetato de etila foi adicionado ao funil de separação e particionado por 3 vezes. Em seguida, a fase aquosa foi particionada também com 50 mL de *n*-butanol (por 3 vezes), conforme pode ser observado na figura 4.

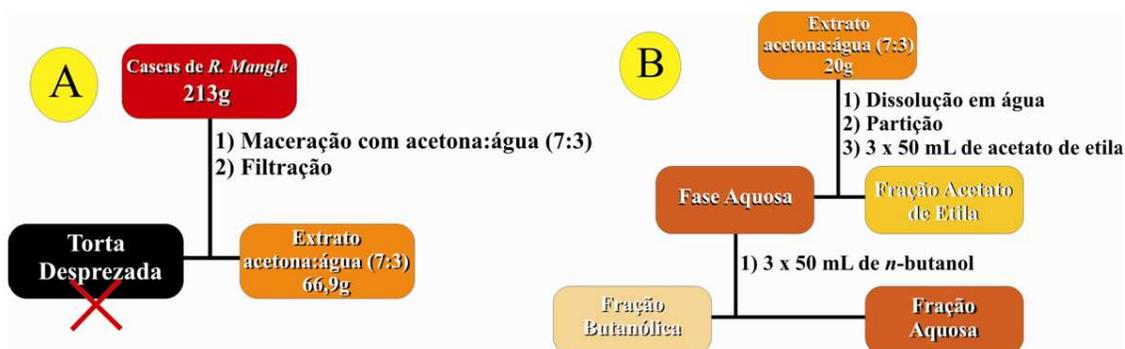


Figura 4. Fluxograma representativo dos métodos de extração (A), e, fracionamento (B) das cascas de *R. mangle*.

3.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na análise por CCD comparativa, foram utilizadas placas prontas de sílica gel 60 (Merck) de diversos tamanhos. As frações obtidas nas partições foram analisadas por CCD, usando como fase móvel CHCl_3 :MeOH:PrOH:H₂O (5:6:1:4 v/v/v/v, fase orgânica) e como padrões: rutina, ácido gálico, catequina, epicatequina, lupeol, reserpina, friedelina. Utilizou-se como revelador: luz UV (254 e 366 nm), anisaldeído/ H₂SO₄, NP/PEG e FeCl₃ 1% em metanol (Wagner *et al.*, 1984).

3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O perfil cromatográfico do extrato e frações de *R. mangle* foi obtido usando sistema HPLC-UV/DAD (Shimadzu) e coluna ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm, i.d. 5 µm). A fase móvel foi formada por acetonitrila (bomba A) e H₂O com 1% de ácido acético pH 2,88 (bomba B), em gradiente [0 a 15min – 15% A; 15 a 22 min – 15 a 20% A; 22 a 25 min – 20% A; 25 a 30 min – 20 a 40% A; 30 a 35 min – 40% A; 35 – 50 min – 40 a 100% A; 50 a 55 min - 100 a 15% A; 55 a 60 min – 15% A]. O volume de amostra injetado foi 20 µl, com concentração igual a 1 mg/ml e o efluente foi monitorado em 280 nm.

3.5. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESIMS)

Os extratos foram diluídos em uma solução contendo 50% (v/v) de metanol grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, E.U.A.), 50% (v/v) água deionizada e 0,5% de hidróxido de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As impressões digitais (*fingerprint*) ou perfil de ESIMS dos extratos no modo negativo foram adquiridas e acumuladas ao longo de 60s, e os espectros foram escaneados na faixa entre m/z 100 e 1000, utilizando um Micromass-Waters Q-TOF mass spectrometer (Waters, Manchester, England). As tensões de capilares e cone foram fixadas para -3000 V e -40 V, respectivamente, com uma temperatura de 100°C. O ESI-MS foi feito por injeção direta, com fluxo típico de vazão de 10 µl.min⁻¹ utilizando uma micro-seringa acoplada a uma bomba (Harvard Apparatus, MA,

E.U.A.). Os constituintes foram identificados por comparação dos pesos moleculares com dados da literatura.

3.6. Animais

Todos os animais são provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. Foram utilizados ratos machos Wistar (150 a 250 g) para os experimentos de lesões gástricas e determinação dos mecanismos de ação antiulcerogênica e antioxidante.

Os animais foram aclimatados às condições do laboratório por pelo menos sete (7) dias antes da manipulação experimental, com temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclos claro-escuro de 12 horas controlados, alimentados com ração nuvital (Nuvilab) e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos ao acaso nos diferentes grupos experimentais e submetidos a jejum (com água *ad libitum*) de pelo menos 12 horas, dependendo do tipo de experimento. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA/IB/UNICAMP.

É importante lembrar que a possibilidade oferecida pelo modelo animal só intensifica a qualidade da pesquisa e aumenta sua aplicabilidade a partir destes dados. No entanto é importante ressaltar que experimentos *in vivo* sofrem interferência de todo e qualquer tipo de novidade ou irritação ao animal experimental, toda manipulação, sons, cheiros, tudo isso interfere em pesquisas onde o substrato é um modelo animal. Além de todo estresse natural aos quais os animais são submetidos, existe toda a questão que envolve determinado protocolo experimental, em particular neste trabalho, o jejum é fundamental para que as investigações possam ser realizadas, todavia, esse fato pode aumentar o estresse dos animais e desperta em alguns deles atitudes que podem influenciar nos resultados obtidos. Na realidade, a maior influência pode ser percebida na redução da linearidade dos resultados de modelos agudos, por exemplo, e isso não ocorre com experimentos *in vitro* onde todas as condições e variáveis são determinadas e controladas pelo pesquisador.

3.7. Drogas utilizadas

As drogas utilizadas para determinação da atividade antiulcerogênica e antioxidante e seus mecanismos de ação foram: Lansoprazol (MEDLEY, Campinas, Brasil), Indometacina, N^o-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME), N-ethyl-maleimide (NEM), Quercetina, Ácido Gálico (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), ácido acético P.A. e cloreto de sódio P.A. (CHEMCO, Campinas, Brasil). Todas as drogas foram preparadas imediatamente à sua utilização.

3.8. Delineamento experimental

Nos testes de atividade antiulcerogênica, as drogas foram sempre administradas por via oral, em dose-volume de 10 mL.Kg⁻¹. Foi utilizado um grupo controle (negativo) que recebeu um volume equivalente de uma solução salina a 0,9%, veículo no qual foram dissolvidas as frações e/ou a droga-padrão.

Ratos foram mantidos em gaiola especial sem maravalha e submetidos a jejum de no mínimo 12 h, dependendo do protocolo experimental. Em todos os modelos de indução de lesões, os estômagos foram abertos na região da maior curvatura, prensados em placas de vidro (exceto modelo de úlcera crônica) e fotografados. A área de lesão foi calculada com auxílio do programa AVSoft BioView 4.

3.8.1. Úlcera gástrica induzida por etanol

Após 24 horas de jejum, grupos de ratos foram tratados por via oral com as frações orgânicas em doses variáveis (0,5; 1,5; 3,0; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 mg.Kg⁻¹), com Lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹), e solução salina (10 mL.Kg⁻¹), exceto grupo Sham (animais manipulados) uma hora antes da indução da lesão gástrica. A lesão gástrica foi induzida pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto. Os animais foram sacrificados 1 hora após a administração do agente lesivo, e os estômagos retirados para contagem das lesões ulcerativas (Morimoto *et al.*, 1991).

3.8.2. Úlcera induzida por isquemia-reperfusão

Os ratos foram mantidos em jejum por 24 horas com livre acesso à água. Os tratamentos com a fração butanólica - fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹), Lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹) e Salina (10 mL.Kg⁻¹) foram realizados por via oral exceto grupo Sham (animais manipulados), 30 min antes de anestésiar os animais. Sob anestesia, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para colocação de um “clamp” na artéria celíaca. Decorrida meia hora de isquemia o “clamp” foi retirado e, então, os ratos foram submetidos à uma hora de reperfusão e, em seguida, sacrificados (Ueda, *et al.*, 1989).

3.8.3. Ensaio de atividade antioxidante “in vivo”

3.8.3.1. Folin-Ciocalteu

O extrato e as frações foram analisados quanto ao seu conteúdo de fenólicos totais solúveis utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Piccinelli *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). Para tanto, extrato e frações foram solubilizados em etanol, sendo preparadas diluições com concentrações entre 20 e 200 ppm. Para a substância de referência (ácido gálico) foi elaborada curva analítica nas concentrações de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 ppm. A absorbância das amostras e amostra-padrão foi medida em leitor de elisa ($\lambda=730$ nm) e os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalentes (AGeq) por grama de extrato ou fração em base seca (mg de AGeq/g). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo, ácido gálico (200 ppm). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8.3.2. Avaliação da redução do radical DPPH

O radical DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade das amostras-teste e amostra-padrão de reduzir o radical DPPH. Para tanto, o extrato e as frações (2,6 mg) foram dissolvidos em etanol (1 mL), obtendo-se uma solução estoque. Várias diluições foram preparadas em etanol a fim de se obter concentrações finais

no ensaio de 3,125 a 200 ppm (extrato e frações). Para cada amostra (10 µL) foram adicionados 100 µL de etanol, 100 µL de tampão fosfato (100mM) e 50 µL de solução de DPPH (250 µM). Decorridos 30min a absorbância foi medida em leitor de elisa ($\lambda=517$ nm) e a porcentagem de redução do radical foi calculada pela equação: %redução = $100 - [(Abs. Amostra - Abs. controle negativo)/Abs. controle DPPH - Abs. controle negativo] \times 100$ (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005; Cuendet *et al.*, 1997). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo o flavonóide quercetina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8.4. Ensaio de atividade antioxidante “in vivo”

Para a determinação dos mecanismos antioxidantes, os estômagos obtidos tiveram suas porções glandulares raspadas exaustivamente com lâminas de vidro e homogeneizada em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) e congeladas a -70°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

As atividades enzimáticas, ou níveis de compostos antioxidantes, foram determinados espectrofotometricamente em leitores de ELISA. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina do soro bovino para estabelecimento da curva padrão.

3.8.4.1. Níveis de grupamentos sulfidrílicos (GSH)

As amostras foram centrifugadas (12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH = 7,4). Em seguida, foi feita a leitura da absorbância de 100 µL da amostra, acrescidos de 100 µL de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura adicionou-se 20 µL de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01 mM) e então foi feita uma nova leitura (A2), a 412 nm, após 15 min de reação, para determinação de grupamentos sulfidrílicos não protéicos (GSH). A concentração de grupamentos sulfidrílicos (tiol) é dada por $(A1-A2) \times 1,57$ (Faure & Lafond, 1995).

3.8.4.2. Atividade da glutathiona redutase (GR)

Para determinação da atividade da GR, a reação enzimática foi preparada com 100 µL da amostra (após centrifugação e diluição do sobrenadante em tampão fosfato pH = 7,4, na relação 1:10) e 150 µL do cocktail formado por EDTA (0,20 mM), glutathiona oxidada (1 mM) e NADPH (0,1 mM). A absorbância foi lida a 365 nm, entre 1 e 10 min (Carlberg & Mannervik, 1985).

3.8.4.3. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, a 4°C, por 15 min e o sobrenadante diluído em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) na proporção 1:10. A uma alíquota de 100 µL do raspado, foram adicionados 150 µL de solução de glutathiona reduzida (10 mM), NADPH (4 mM) e glutathiona redutase (1U) e 20 µL de H₂O₂ (25 mM), de acordo com método de Yoshikawa *et al.*, (1993). A absorbância foi determinada a 365 nm, entre 1 e 10 min.

3.8.4.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Neste ensaio foi empregado o método descrito por Winterbourn *et al.* (1975), onde as amostras foram centrifugadas e diluídas em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4), na proporção 1:20. A 100 µL do homogenato foram adicionados 150 µL da solução de hipoxantina (0,1 mM), xantina oxidase (0,07 U) e nitrobluetetrazolium (NBT - 0,6 mM). As absorbâncias foram lidas a 560 nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.8.4.5. Atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO na mucosa gástrica foi mensurada de acordo com o método proposto por Krawisz *et al.*, (1984), como pequena modificações em Farias-Silva *et al.*, (2007). Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas (6,7 µL) adicionadas a tampão fosfato

0.05M, pH 6.8 contendo 0,0005% de peróxido de hidrogênio e 1.25 mg/mL de dihidroclorato de *o*-dianisidina, em seguida foi realizada leitura a 460 nm por 10 minutos em intervalos de 1 minuto.

3.8.4.6. Determinação do índice de peroxidação lipídica (LPO)

O homogenato da porção glandular do estômago foi diluído em KCl 0,15 M (relação 1:10). Em seguida, a 0,5 mL deste homogenato foram adicionados 0,2 mL de dodecil sulfato (8,1%); 1,5 mL de ácido acético (20%, solução ajustada com NaOH a pH 3.5); 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) e 0,3 mL de água destilada. Todas as amostras foram deixadas em banho-maria, com termostato ajustado para 95°C, por 1 hora. Após este período, as amostras foram resfriadas e acrescidas de 1 mL de água destilada e 5 mL da mistura n-butanol + piridina (15:1, v/v), agitadas por 1 min em vórtex e centrifugadas a 1400 G, por 10 minutos. A absorbância da capa orgânica foi determinada, a 532 nm. Como padrão foi utilizado tetraetoxipropano (TEPP), diluído em etanol. Os resultados foram expressos como picomoles de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de proteínas (pmol TBARS/ mg de proteínas) (Ohkawa *et al.*, 1979).

3.8.5. Mecanismos de atividade antiulcerogênica

3.8.5.1. Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção

Ratos Wistar machos em jejum de 24h foram divididos em grupos de acordo com os tratamentos (Salina + Salina, Salina + NEM, Lansoprazol + Salina, Lansoprazol + NEM, fr-BuOH + Salina e fr-BuOH + NEM). Os controles receberam injeção intraperitoneal de solução salina e os outros animais de NEM (10 mg.Kg⁻¹), um bloqueador do grupamento sulfidrílicos. Após 30 minutos os grupos receberam por via oral os tratamentos Salina (10 mL.Kg⁻¹), Lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹) e fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹). Depois de uma hora (1h), os animais receberam por via oral 1mL de etanol. Uma hora (1h) após o tratamento com etanol os animais foram sacrificados e os estômagos removidos para contagem das lesões (Matsuda, 1999).

3.8.5.2. Envolvimento do NO na gastroproteção

Ratos Wistar machos em jejum de 24h foram divididos em grupos de acordo com os tratamentos (Salina + Salina, Salina + L-NAME, Lansoprazol + Salina, Lansoprazol + L-NAME, fr-BuOH + Salina e fr-BuOH + L-NAME). Os controles receberam injeção intraperitoneal de solução salina e os outros animais de L-NAME (70 mg.Kg⁻¹), um bloqueador do grupamento sulfidrílicos. Após 30 minutos os grupos receberam por via oral os tratamentos Salina (10 mL.Kg⁻¹), Lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹) e fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹). Depois de uma hora, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol. Uma hora após o tratamento com etanol os animais foram sacrificados e os estômagos removidos para contagem das lesões (Matsuda, 1999).

3.8.5.3. Avaliação da secreção ácida pelo método de Shay

Após 24 horas de jejum, os animais sob anestesia (ketamina 30 mg.Kg⁻¹ e xilazina 0,3 mg.Kg⁻¹), sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a localização e amarradura do piloro. Os tratamentos Salina (10 mL.Kg⁻¹), Lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹) e fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) foram administrados por via intraduodenal logo após a ligadura do piloro, e, em seguida, as incisões suturadas. Quatro horas após a o procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados, as incisões reabertas, e os estômagos retirados. O conteúdo estomacal foi coletado para determinação do volume e pH da secreção gástrica (Shay *et al.*, 1945).

3.8.5.4. Produção de muco aderido à mucosa gástrica

O muco da parede gástrica foi determinado em ratos submetidos à ligadura do piloro. Os diferentes grupos experimentais de ratos receberam os tratamentos Salina (10 mL.Kg⁻¹), Lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹) e fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por via oral, uma hora depois, estes animais anestesiados foram submetidos à ligadura do piloro conforme o método descrito anteriormente.

Após o sacrifício dos animais, os estômagos foram removidos e abertos no sentido da grande curvatura, os segmentos glandulares do estômago foram removidos e pesados. Cada segmento foi transferido imediatamente para um tubo contendo 10 mL de Alcian blue 0,1% (em solução de sucrose 0.16 M tamponada com acetato de sódio 0.05 M, pH 5). Após imersão por 2 h nesta solução, o excesso de tinta dos estômagos foi removido através de duas lavagens sucessivas com 10 mL de solução de sacarose 0.25 M, primeiro por 15 min e, em seguida, por 45 min. O Alcian Blue complexado com o muco da parede gástrica foi extraído com 10 mL $MgCl_2$ de 0.5 M com agitação intermitente por 1 min, em intervalos de 30 min, durante 2 h. Uma alíquota de 4 mL do extrato de Alcian Blue foi vigorosamente agitado com um volume igual de éter dietílico; a emulsão resultante foi centrifugada a 3600 rpm por 20 min e a absorvância da camada aquosa determinada a 580 nm. A quantidade de Alcian blue extraída por grama de tecido glandular foi então calculada, e, expressa como concentração do corante em μg por mL de solução por grama de porção glandular (Corne *et al.*, 1974).

3.8.5.5. Produção de PGE_2 na mucosa gástrica

Os diferentes grupos experimentais foram tratados v.o. com Salina ($10 mL.Kg^{-1}$) e fr-BuOH ($0,5 mg.Kg^{-1}$), exceto sham (animais manipulados). Trinta minutos após o tratamento, foi administrado aos animais $30 mg.Kg^{-1}$ de indometacina s.c., e 30 minutos depois os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e, estes, abertos no sentido da maior curvatura. A mucosa foi raspada com o auxílio de duas lâminas de vidro, pesada e, então ressuspensa em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM; pH 7,4). O tecido foi homogeneizado com auxílio de um Polytron® e, então incubado a $37^\circ C$ por 20 min. A PGE_2 no tampão foi determinada por um kit de radioimunoensaio (R&D System KGE004) e todos os dados sobre a capacidade de síntese de PGE_2 foram expressos em PG/mg de peso de tecido glandular (Curtis, *et al.*, 1995).

3.8.5.6. Avaliação da cicatrização de úlcera gástrica em modelo crônico

Ratos foram anestesiados com ketamina (30 mg.Kg⁻¹) e xilazina (0,3 mg.Kg⁻¹) para exposição do estômago através de uma incisão de aproximadamente 1 cm realizada abaixo da apófise xifóide. Em seguida foi depositado, com o auxílio de uma micro-pipeta, em uma área demarcada com um tubo plástico, 50 µL de ácido acético 40 % na camada serosa da junção do fundo com o antro do estômago. No dia seguinte um animal de cada grupo experimental foi sacrificado para determinar a área inicial da lesão. Dois dias após a indução, foram iniciados os tratamentos (Salina, Lansoprazol e fr-BuOH), por via oral, os quais persistiram durante 14 dias consecutivos (Okabe & Amagase, 2005).

Após 4, 8 e 14 dias os animais foram sacrificados e seus estômagos removidos, abertos no sentido da maior curvatura e os estômagos retirados para determinação da área de lesão, e, ensaios de imunohistoquímica e “western blot”.

3.8.5.6.1. Toxicidade subcrônica

O experimento de toxicidade sub-crônica é uma estimativa das propriedades tóxicas *in vivo* da substância teste em sua dose terapêutica (Lima *et al.*, 2006). O peso dos animais do modelo descrito anteriormente foi registrado durante os 14 dias, no 15º dia os animais foram sacrificados e os órgãos (coração, fígado, rins, pulmões, testículos) removidos para pesagem. Os dados foram expressos pelo arcoseno do peso do órgão/peso do animal.

3.8.5.6.2. Expressão de COX-1, COX-2 e EGF

O raspado estomacal foi centrifugado a 12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Valores determinados de proteína (50 µg) foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidos à eletroforese, com solução tampão (Trisma base 25 mM, glicina 1,92 mM, SDS 1%). O SDS-PAGE foi submetido a 40V, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento das proteínas (*stacking*), e, 120V até o final do gel de resolução (*resolving*). Em seguida, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram

transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em equipamento de eletrotransferência, com as membranas embebidas em solução tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), mantidas em voltagem constante de 90V por 2 horas. As membranas de nitrocelulose, contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (NaCl 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 a 0,05%, leite em pó desnatado a 5%) por uma hora, a fim de diminuir a ligação inespecífica de proteínas. Em seguida, as membranas serão submetidas a lavagens com tampão básico (NaCl 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 a 0.05%), em intervalos de 10 minutos. A membrana foi incubada a 4°C, durante uma noite, usando anticorpo específico para COX-1 e COX-2 (Cayman), e EGF (Santa Cruz). Na manhã seguinte, a membrana de nitrocelulose foi lavada em tampão básico por 40 minutos e, em seguida, incubada à temperatura ambiente, por 1h, com anticorpo secundário Thermo Scientific Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 31460 para COX-1 e COX-2 e Zymed San Francisco, CA, USA ZyMax Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) HRP conjugate 81-1620 para EGF. Para detectar as bandas imuno-reativas, os “blots” foram expostos à solução de quimioluminescência (ECL-plus-LumiGlo chemiluninescence substrate, Kirkegard and Perry Gaithersburg, MD. USA) por 1 minuto, seguido de exposição a um filme para detecção de quimioluminescência (Hyperfilm™ECL™ – AmerSham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra). As densidades das bandas das amostras sobre filme foram capturadas para quantificação densitométrica ótica, usando o Software AVSoft Bioview 4.

3.8.5.6.3. Análise histológica

Os cortes e lâminas histológicas foram preparados nos Laboratórios de Histologia do Departamento de Morfologia, IBB UNESP/Campus de Botucatu sob orientação da Prof^a Dr^a Claudia Helena Pellizzon. Após a fixação do material em ALFAC (formalina, álcool 80%, ácido acético) por 24 horas, as peças foram desidratadas e incluídas em paraplast. Posteriormente, os blocos de paraplast foram cortados (7 µm de espessura) em micrótomo, de maneira seriada. As amostras foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) (Behmer *et al.*, 1976) para observação geral da estrutura e celularidade, e ácido

periódico de Schiff (PAS) (Vacca, 1985) para análise de substâncias mucopolissacarícas em microscopia de luz.

3.8.5.6.4. Imunohistoquímica

Para análise imunohistoquímica foi utilizada uma lâmina representativa de cada tratamento dos animais submetidos à úlcera induzida por ácido acético, que foi desparafinizada, re-hidratada, e, destinada a imunohistoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com solução de leite desnatado, posteriormente à recuperação antigênica conforme a tabela abaixo, e as amostras foram incubadas com anticorpos específicos em solução de bloqueio “overnight”. Posteriormente, amostras foram lavadas em tampão fosfato (0.01 mol/L, pH 7.4) e incubadas em anticorpo secundário (Kit ABC Vector) e revelado com Avidina-Biotina associado com 3-3’diaminobenzina tetrahydrochloride (DAB, Sigma), e analisadas posteriormente no microscópio Leica DM acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard, Reino Unido. Esse trabalho foi realizado nos Laboratórios de Histologia do Departamento de Morfologia, IBB, UNESP/Campus de Botucatu, sob orientação da Prof^a Claudia Helena Pellizzon.

Tabela 1. Anticorpos e diluições específicas para as reações de imunohistoquímica.

Anticorpo	Empresa	Titulação	Recuperação antigênica	Referência
PCNA	Novo Castra	1:100	Citrato+MW	Kitajima <i>et al.</i> , 1993
HSP-70	Santa Cruz	1:100	Não necessita	Guo <i>et al.</i> , 2002
COX-2	Cayman	1:300	Citrato+MW	To <i>et al.</i> , 2001

Citrato+MW = Tampão citrato 0,01M com irradiação em microondas, segundo indicação do fabricante.

3.9. Análise estatística

Todos os resultados farmacológicos foram expressos em média \pm desvio padrão, ou erro padrão, e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e teste *a posteriori* de Dunnett e/ou Tuckey com um nível de significância de $*P<0.05$, $**P<0.01$ e $***P<0.001$.

4. Resultados

4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD mostrou por meio das três revelações utilizadas informações importantes acerca dos compostos presentes nas amostras testadas através das colorações adquiridas pelos compostos após reação com os respectivos reveladores, além da visualização da eficiência no processo de fracionamento. Abaixo é possível verificar na figura 5 (A) que a revelação da placa cromatográfica com anisaldeído/ H_2SO_4 permitiu observar a presença de catequina nas amostras de extrato e frações. A revelação com NP/PEG (natural products/polyethylene glycol), representada pela figura 5 (B), aponta também para esta última observação. Já a figura 5 (C), onde se observa a placa cromatográfica revelada com $FeCl_3$ 1%, chama a atenção para a possível presença de taninos complexos, observação feita pela tonalidade acinzentada, provavelmente resultado da mistura de tanino complexo (esverdeada) com tanino hidrolisável (azulada).

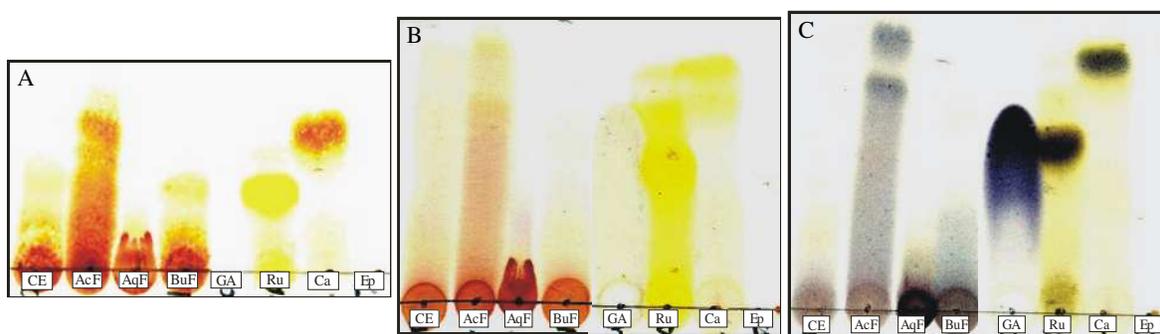


Figura 5. Cromatografia em camada delgada, (A) revelação com anisaldeído/ H_2SO_4 ; (B) revelação com NP/PEG; (C) revelação com $FeCl_3$ 1%. CE: extrato bruto; AcF: fração acetato de etila; AqF: fração aquosa; BuF: fração butanólica; GA: ácido gálico; Ru: rutina; Ca: catequina; Ep: epicatequina.

4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

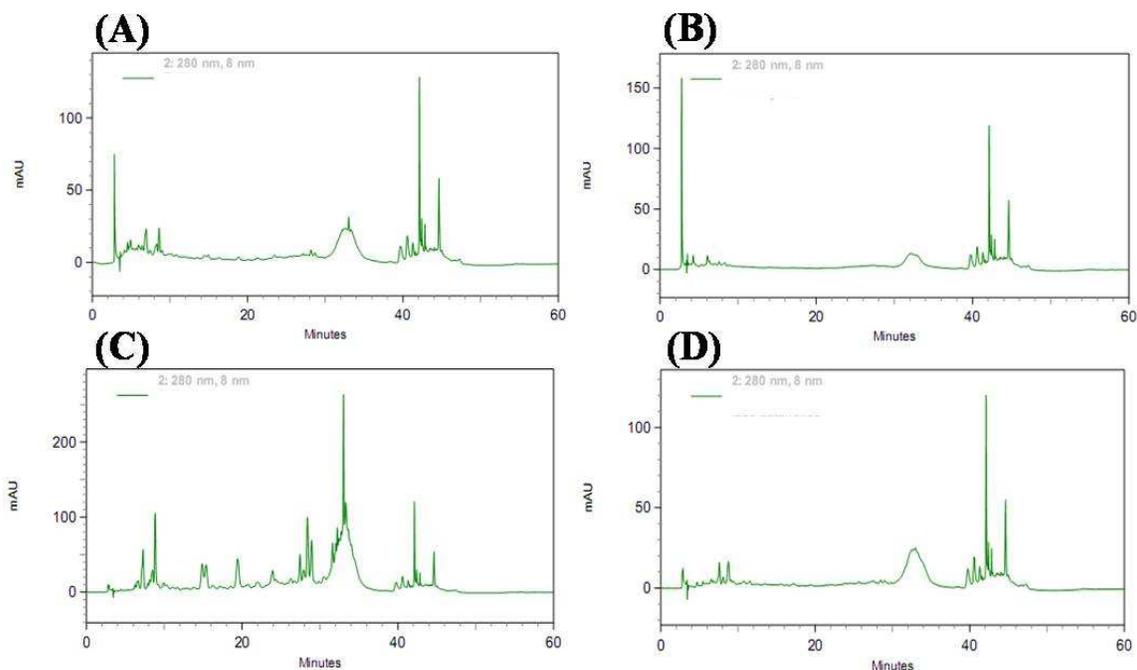


Figura 6. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das injeções de (A) extrato acetona:água (7:3); (B) fração aquosa; (C) fração acetato de etila; (D) fração butanólica.

As análises por HPLC-DAD foram realizadas para verificação do processo de fracionamento e da separação observada na CCD, assim o método não foi empregado visando identificação de substâncias, uma vez que não foram injetados padrões para esta finalidade. O perfil cromatográfico obtido para cada amostra indica que as frações possuem características químicas próprias, evidenciando a qualidade e sucesso dos procedimentos extrativos.

4.3. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESIMS)

TOF MSES-
57

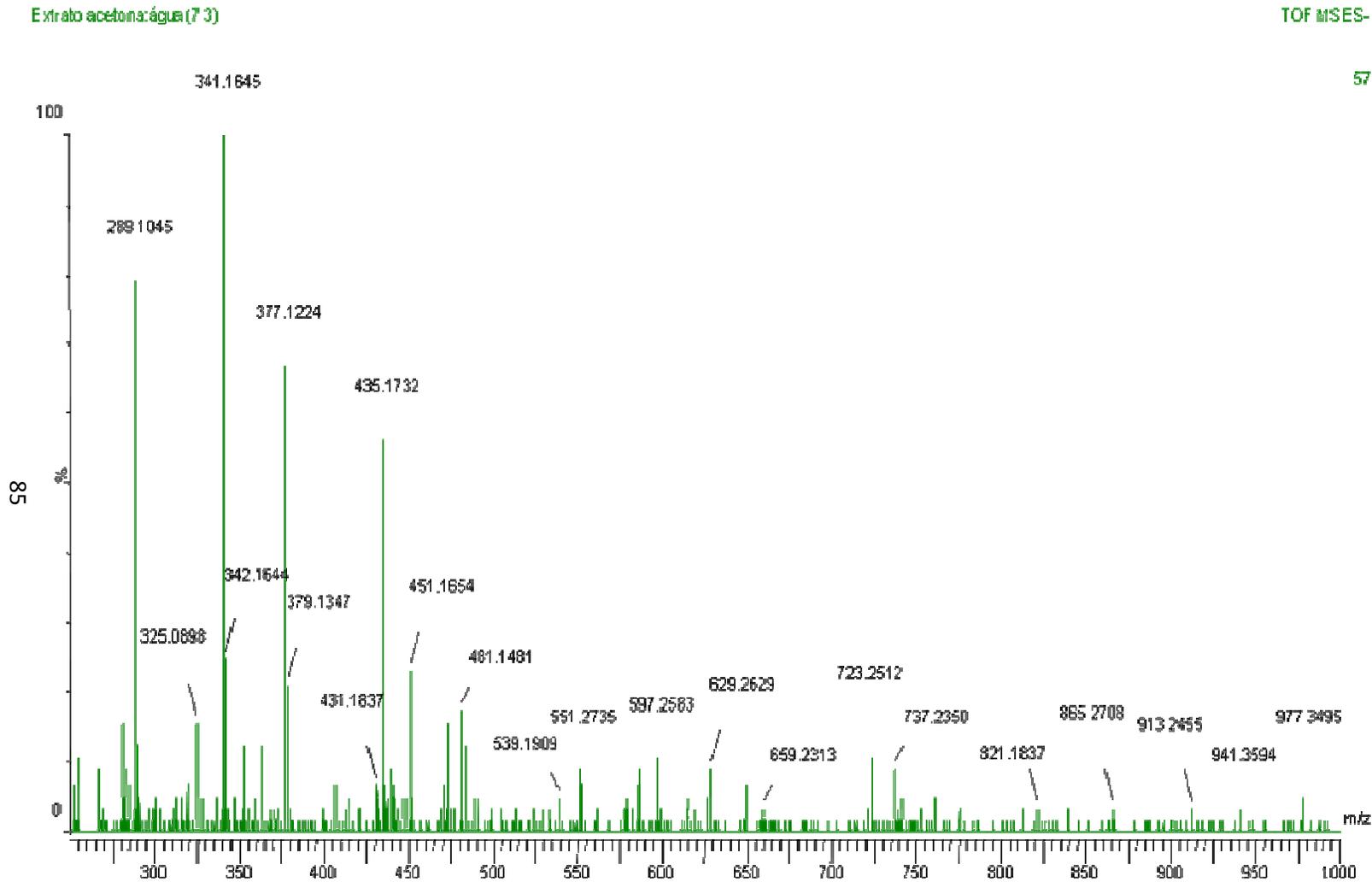


Figura 7. Espectro de massas modo negativo do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*.

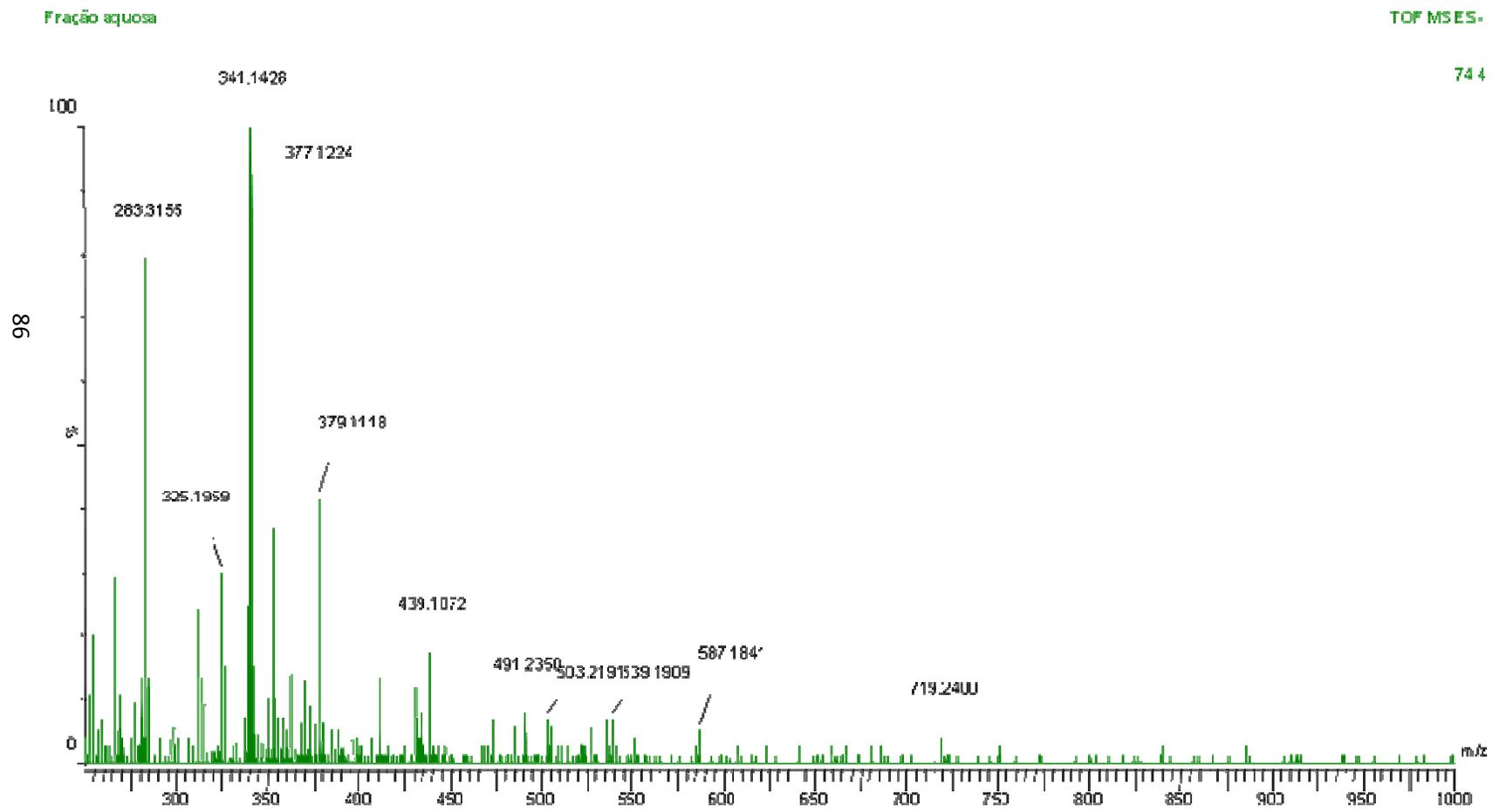


Figura 8. Espectro de massas modo negativo da fração aquosa do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*.

87

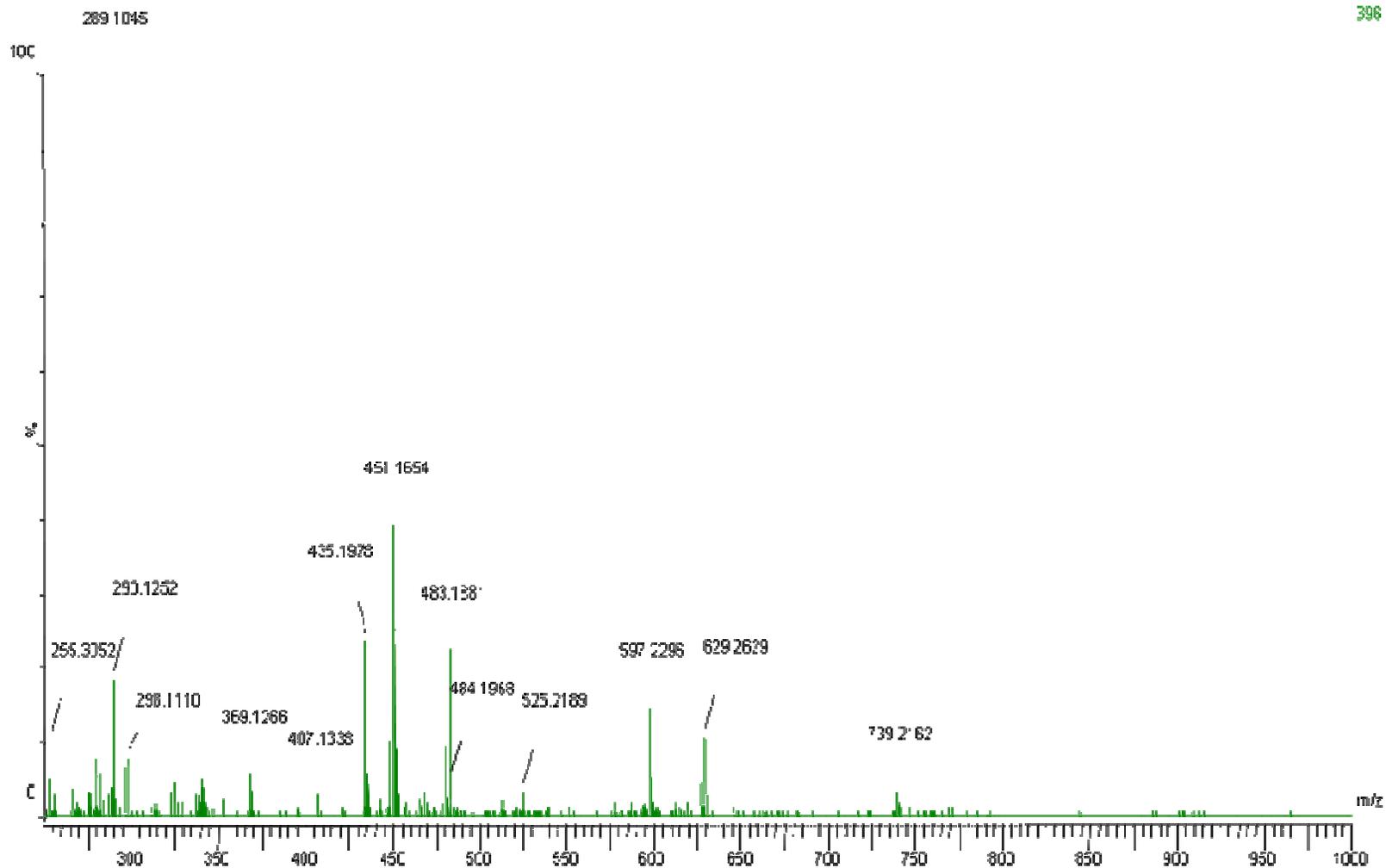


Figura 9. Espectro de massas modo negativo da fração acetato de etila do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*.

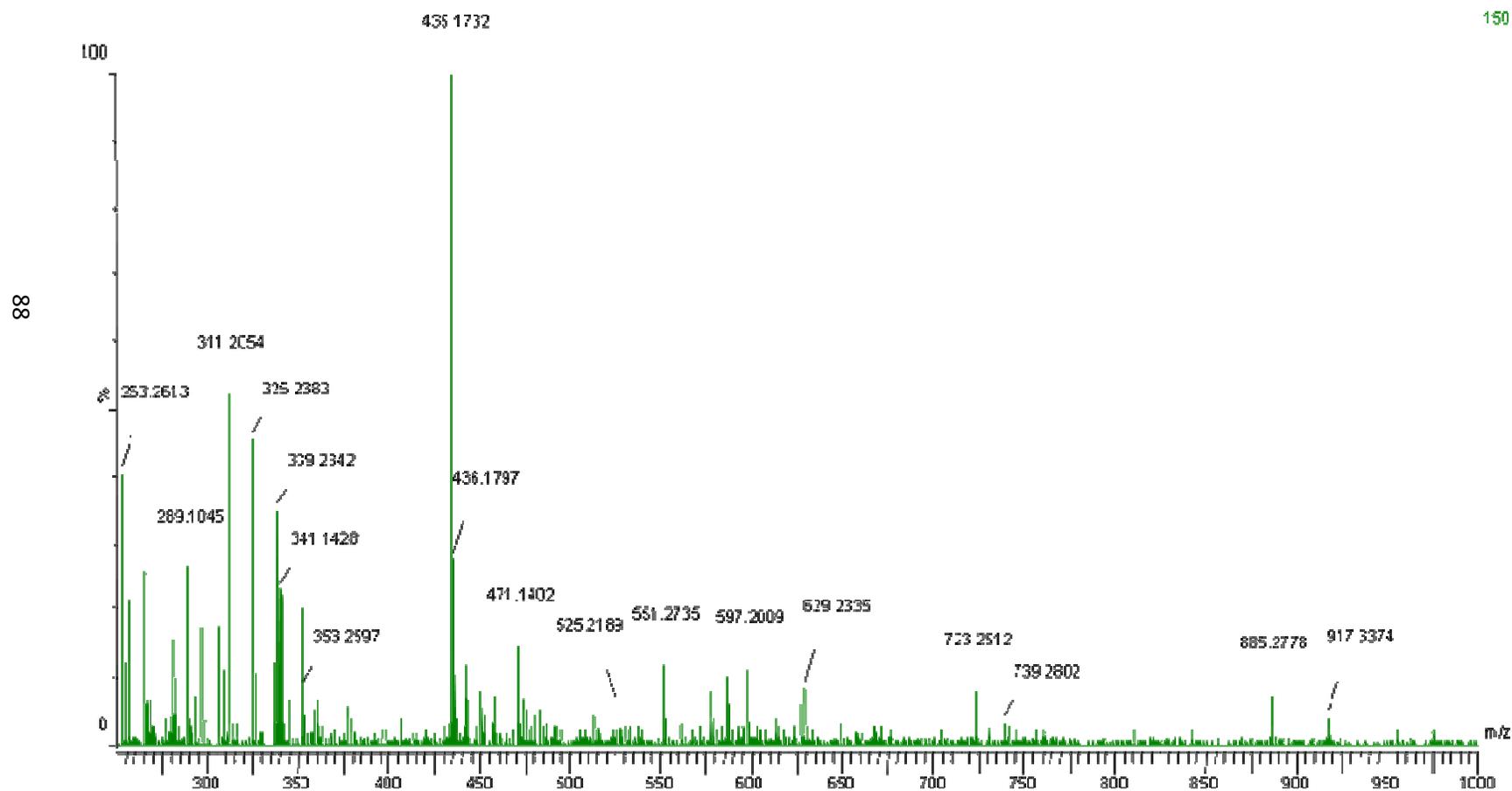


Figura 10. Espectro de massas modo negativo da fração butanólica do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*.

Assim como na análise química inicial realizada através da análise da CCD e HPLC, os espectros de massas obtidos pela ionização dos compostos por electrospray (figuras 8, 9, 10 e 11) permitiram corroborar a eficiência do processo de fracionamento do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *R. mangle*; estes métodos de análise, um comum e qualitativo (CCD) e os outros modernos e com maior resolução analítica (HPLC e ESIMS) permitiram levantar conjunto de dados que forneceu resultados necessários para à proposição de alternativas estruturais dentro da classe em estudo com maior eficiência. A análise dos espectros se deu por comparação do peso molecular e busca bibliográfica em bases de dados como *SciFinder*, *PubMed*, e *ISI of Knowledge*, e a composição das moléculas propostas (mostradas em seguida) foi realizada utilizando-se para tal o *software* ACD/LabsChemSketch 12.0 *free version*.

4.3.1. Moléculas propostas

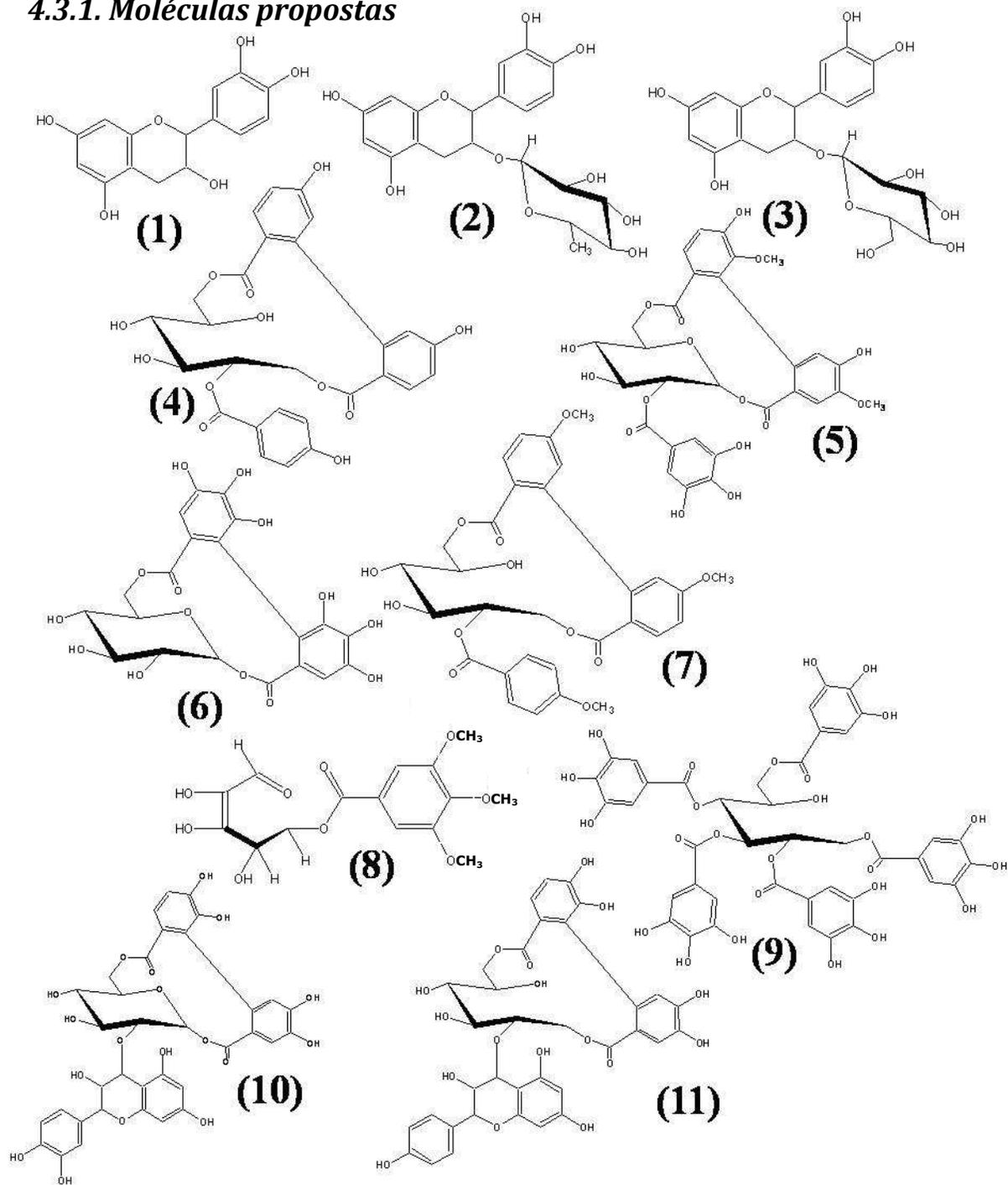


Figura 11. Estruturas dos compostos polifenólicos propostos a partir do perfil (ESIMS) do extrato acetona:água (7:3) obtidos a partir das cascas de *R. mangle*. (1) catequina ou epicatequina, monômero de tanino condensado; (2) e (3) catequina (epi) heterosídeo; (4), (5), (6) e (7) derivados de elagitaninos, tanino hidrolisável; (8) e (9) derivados de galotaninos, tanino hidrolisável; (10) e (11) derivados de taninos complexos.

Tabela 2. Descrição das moléculas propostas com sua massa real (m/z) e a massa encontrada no ESIMS ($m/z - H$)

Composto	Classificação	m/z real	$m/z - H$
(1) $C_{15}H_{14}O_6$	catequina ou epicatequina	290	289
(8) $C_{15}H_{18}O_9$	derivado de galotanino	342	341
(2) $C_{21}H_{24}O_{10}$	catequina (epi) heterosídeo	436	435
(3) $C_{21}H_{24}O_{11}$	catequina (epi) heterosídeo	452	451
(4) $C_{20}H_{18}O_{14}$	derivado de elagitanino	482	481
(5) $C_{27}H_{24}O_{12}$	derivado de elagitanino	540	539
(6) $C_{30}H_{30}O_{13}$	derivado de elagitanino	598	597
(7) $C_{29}H_{26}O_{16}$	derivado de elagitanino	630	629
(11) $C_{35}H_{32}O_{17}$	derivado de tanino complexo	724	723
(10) $C_{35}H_{30}O_{18}$	derivado de tanino complexo	738	737
(9) $C_{41}H_{34}O_{26}$	derivado de galotanino	942	941

As moléculas propostas com base na análise de sua massa molecular (m/z) constituem a classe em estudo, sendo encontrados representantes das três classes de taninos hoje conhecidas, condensados, hidrolisáveis e complexos. Além da presença de catequina ou epicatequina.

4.4. Úlcera gástrica induzida por etanol

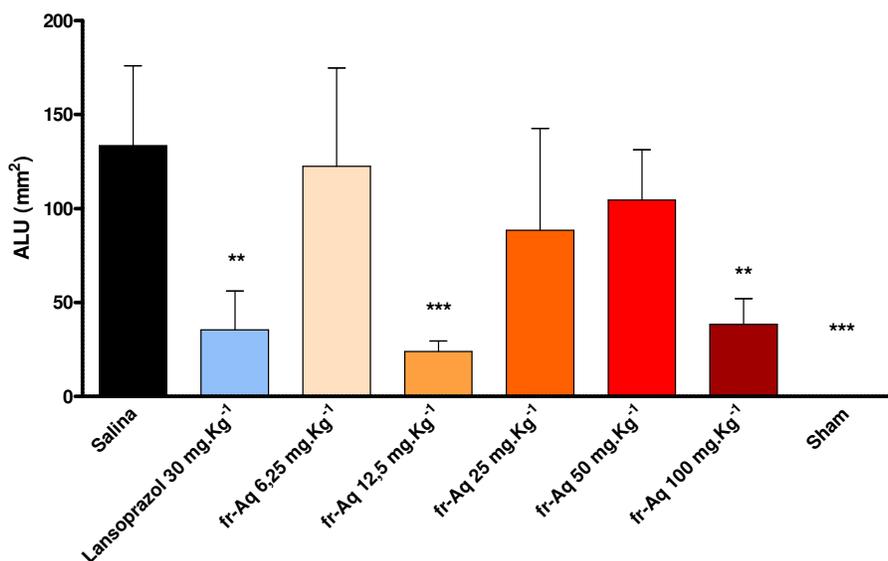


Figura 12. Proteção gástrica promovida pela fração aquosa (fr-Aq) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste *a posteriori* de Dunnett, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina.

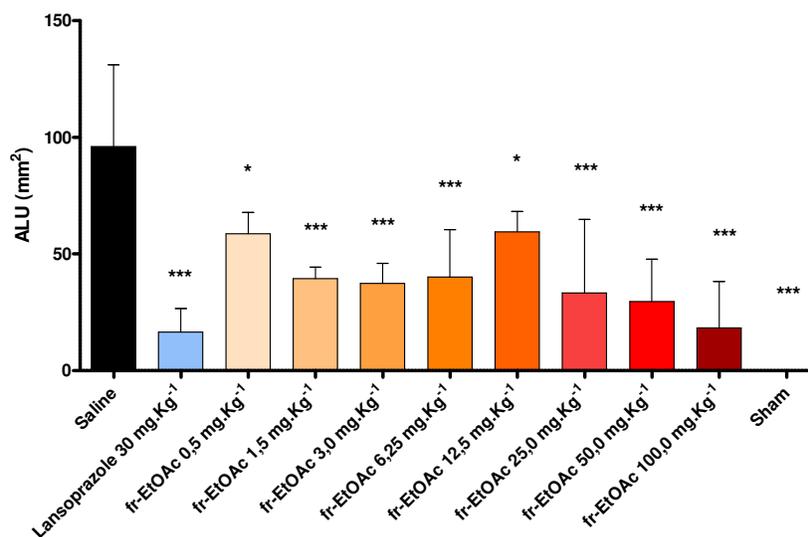


Figura 13. Proteção gástrica promovida pela fração acetato de etila (fr-EtOAc) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste *a posteriori* de Dunnett, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina.

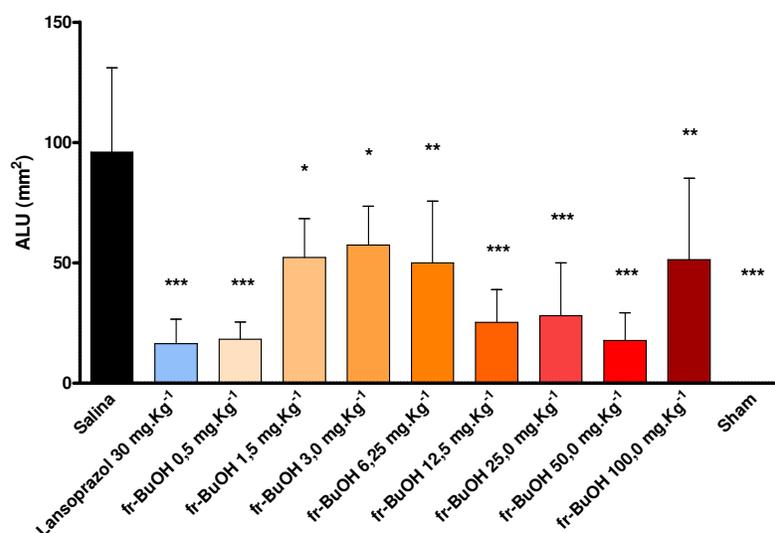


Figura 14. Proteção gástrica promovida pela fração butanólica (fr-BuOH) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste *a posteriori* de Dunnett, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina.

As figuras 12, 13 e 14 ilustram os resultados obtidos para os experimentos iniciais, cujos objetivos foram demonstrar a atividade antiulcerogênica das frações orgânicas, encontrar a melhor dose eficaz em prevenir a geração de lesões gástricas pela administração do etanol e avaliar a atividade de enzimas antioxidantes a partir dos tecidos coletados. Foi encontrado que a fr-Aq possui atividade antiulcerogênica nas doses de 12,5 e 100,0 mg.Kg⁻¹, já a fr-EtOAc demonstrou esta atividade em todas as doses testadas (de 0,5 a 100,0 mg.Kg⁻¹), sendo 1,5 mg.Kg⁻¹ a melhor delas, uma vez que entre os dados mais significativos não houve diferença; assim como na anterior, a fr-BuOH se mostrou eficaz em todas as doses testadas, e 0,5 mg.Kg⁻¹ mostrou-se mais interessante por ser a menor dose e ter a mesma significância dentre as mais significativas. A partir desses resultados os testes *in vivo* foram conduzidos no sentido de avaliar os mecanismos de ação envolvidos nas atividades anti-úlcera e antioxidante da fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹).

4.5. Úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão

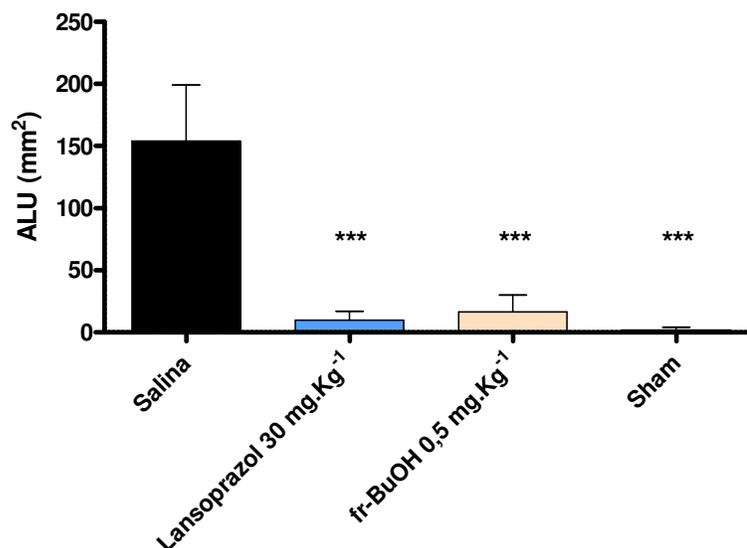


Figura 15. Proteção gástrica promovida pela fração butanólica (0,5 mg.Kg⁻¹) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por isquemia/reperfusão em ratos. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste *a posteriori* de Dunnett, *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina.

De acordo com os resultados apresentados acima, o pré-tratamento com lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹) e fr-BuOH (0,5 mg.kg⁻¹) foi capaz de reduzir o surgimento de lesões induzidas por isquemia-reperfusão. O raspado da mucosa gástrica foi coletado para a avaliação da atividade de enzimas antioxidantes.

4.6. Ensaio de atividade antioxidante “*in vitro*”

A atividade antioxidante de *R. mangle* foi inicialmente avaliada *in vitro* quanto ao conteúdo de polifenóis totais e capacidade de reduzir o radical DPPH. Verificou-se que o conteúdo de polifenóis totais encontra-se numa concentração de 20 a 27% no extrato e frações orgânicas. A capacidade de reduzir o DPPH foi encontrada para todas amostras e, entre estas, o extrato (CE) apresentou EC_{50} inferior ao obtido pelo controle positivo quercetina.

Tabela 3. Potencial redutor (DPPH) e conteúdo de polifenóis totais (Folin-Ciocalteu) do extrato e frações de *R. mangle*.

Tratamentos	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) DPPH	mg de AGeq/g Folin-Ciocalteu
Quercetina	$2,924 \pm 1,666$	-
Extrato bruto (CE)	$1,65 \pm 0,1697$	262,6
fr-Aq	$4,465 \pm 0,5756$	257,2
fr-EtOAc	$25,46 \pm 4,591$	207,3
fr-BuOH	$8,065 \pm 2,369$	226,7

EC_{50} : concentração mínima suficiente para produzir 50% do efeito representada pela média \pm desvio padrão; AGeq: ácido gálico equivalente.

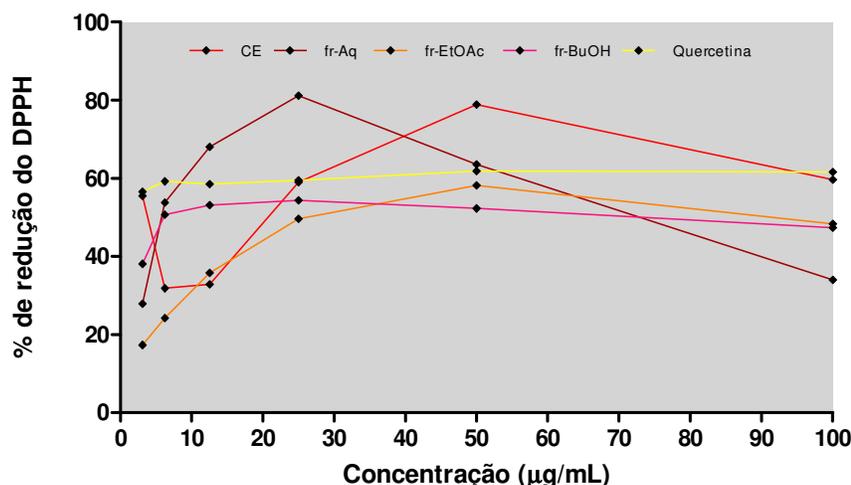


Figura 16. Potencial redutor do extrato bruto (CE) e frações de *R. mangle* sobre o radical DPPH.

4.7. Ensaios de atividade antioxidante “*in vivo*”

Dados referentes ao modelo de úlcera induzida por etanol

Os ensaios de atividade antioxidante avaliaram os níveis de grupamentos sulfidrílicos (GSH) e peroxidação lipídica (LPO), bem como as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), e mieloperoxidase (MPO) na úlcera induzida por etanol. Observou-se pela análise dos dados que a fr-BuOH elevou o nível de GSH e foi capaz de manter a atividade da SOD, como demonstrado na tabela 4; a tabela 5 mostra que as atividades das enzimas GPx e GR foram mantidas próximas dos valores homeostáticos; já a tabela 6 exibe os valores obtidos para LPO que se mantiveram reduzidos, assim como a atividade da MPO.

Tabela 4. Níveis de GSH e atividade enzimática da SOD de ratos submetidos à úlcera induzida por etanol.

Tratamentos	Dose (mg.Kg ⁻¹)	GSH (nmol/mg de proteína)	SOD (U/mg de proteína)
Salina	10 (mL.Kg ⁻¹)	5,883 ± 0,3796	2,243 ± 1,315
Sham	-	14,58 ± 1,091*	28,82 ± 2,888***
Lansoprazol	30	10,53 ± 0,8678	4,296 ± 3,006
fr-BuOH	0,5	21,44 ± 0,9567***	21,87 ± 3,314***

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina.

Tabela 5. Atividade enzimática da GPx e GR de ratos submetidos à úlcera induzida por etanol.

Tratamentos	Dose (mg.Kg ⁻¹)	GPx (nmol/min/mg de proteína)	GR (nmol/min/mg de proteína)
Salina	10 (mL.Kg ⁻¹)	50,01 ± 4,248	11,00 ± 1,220
Sham	-	103,8 ± 5,556***	20,56 ± 2,995***
Lansoprazol	30	61,17 ± 4,976	11,26 ± 1,067
fr-BuOH	0,5	96,66 ± 3,550***	16,94 ± 1,305*

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ comparados ao controle Salina.

Tabela 6. Atividade enzimática da LPO e MPO de ratos submetidos à úlcera induzida por etanol.

Tratamentos	Dose (mg.Kg ⁻¹)	LPO (pmol TBARS /mg de proteína)	MPO (U/mg de proteína)
Salina	10 (mL.Kg ⁻¹)	0,2988 ± 0,0007947	2,51 ± 1,013
Sham	-	0,2293 ± 0,002809*	1,57 ± 1,733**
Lansoprazol	30	0,2470 ± 0,030741	1,74 ± 0,2333*
fr-BuOH	0,5	0,2146 ± 0,01171**	1,75 ± 0,1363*

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. **P*<0.05, ***P*<0.01 comparados ao controle Salina.

Dados referentes ao modelo de úlcera induzida por isquemia-reperfusão.

O modelo de isquemia-reperfusão foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante promovida pela fr-BuOH sem a participação de um agente químico na indução das lesões. Assim como realizado no modelo de etanol, os mecanismos de ação antioxidantes foram avaliados quanto aos níveis de compostos e atividade de enzimas antioxidantes.

Na tabela 7 estão expressos os níveis de GSH e atividade da SOD; neste modelo, foi determinado que a administração de fr-BuOH manteve elevado o nível de GSH, e aumentou a atividade da SOD, a qual foi também elevada por lansoprazol. A tabela 8 mostra que fr-BuOH promoveu aumento da atividade das enzimas GPx e GR; enquanto a tabela 9 exhibe os valores de LPO e de atividade de MPO reduzidos pela fr-BuOH.

Tabela 7. Níveis de GSH e atividade enzimática da SOD de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.

Tratamentos	Dose (mg.Kg ⁻¹)	GSH (nmol/mg de proteína)	SOD (U/mg de proteína)
Salina	10 (mL.Kg ⁻¹)	13,39 ± 1,923	10,61 ± 0,3043
Sham	-	23,26 ± 0,8022**	13,42 ± 1,987
Lansoprazol	30	18,91 ± 2,036	25,14 ± 2,363***
fr-BuOH	0,5	20,93 ± 1,535*	18,48 ± 1,882*

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 comparados ao controle Salina.

Tabela 8. Atividade enzimática da GPx e GR de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.

Tratamentos	Dose (mg.Kg ⁻¹)	GPx (nmol/min/mg de proteína)	GR(nmol/min/mg de proteína)
Salina	10 (mL.Kg ⁻¹)	13,58 ± 1,011	18,00 ± 1,015
Sham	-	15,60 ± 1,612	18,44 ± 0,8882
Lansoprazol	30	13,47 ± 0,9679	18,94 ± 0,7057
fr-BuOH	0,5	21,96 ± 1,917**	26,86 ± 2,341**

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. ***P*<0.01 comparados ao controle Salina.

Tabela 9. Atividade enzimática da LPO e MPO de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.

Tratamentos	Dose (mg.Kg ⁻¹)	LPO (pmol TBARS/mg de proteína)	MPO (U/mg de proteína)
Salina	10 (mL.Kg ⁻¹)	0,2437 ± 0,01117	2,433 ± 0,1273
Sham	-	0,1770 ± 0,01172*	1,250 ± 0,1689***
Lansoprazol	30	0,2230 ± 0,01767	2,215 ± 0,07914
fr-BuOH	0,5	0,1758 ± 0,01416*	1,869 ± 0,1280*

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. **P*<0.05, ****P*<0.001 comparados ao controle Salina.

O conjunto de dados obtidos para atividade antioxidante *ex vivo* sugere que fr-BuOH possui ação antioxidante e entre os mecanismos desta pode-se destacar a manutenção e aumento dos níveis de GSH, da atividade da SOD, GPx e GR; a redução da LPO e da atividade da MPO. Assim a atividade anti-úlcera de fr-BuOH pode ser atribuída em parte a essa ação antioxidante.

4.8. Mecanismos de atividade antiulcerogênica

4.8.1. Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção

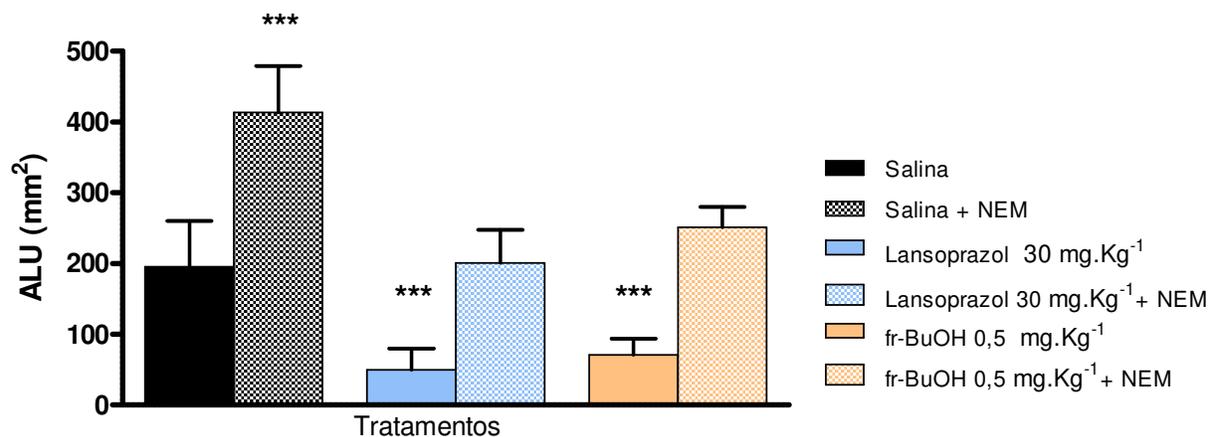


Figura 17. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-ethyl maleimide (NEM). Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 7), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tuckey, *** $P < 0.001$ comparados ao grupo Salina.

Observa-se pela figura 17 que fr-BuOH não é capaz de atenuar a lesão induzida por etanol em ratos pré-tratados com NEM (um bloqueador de GSH), sugerindo que sua atividade antiulcerogênica é dependente de grupamentos sulfidrílicos.

4.8.2. Envolvimento do NO na gastroproteção

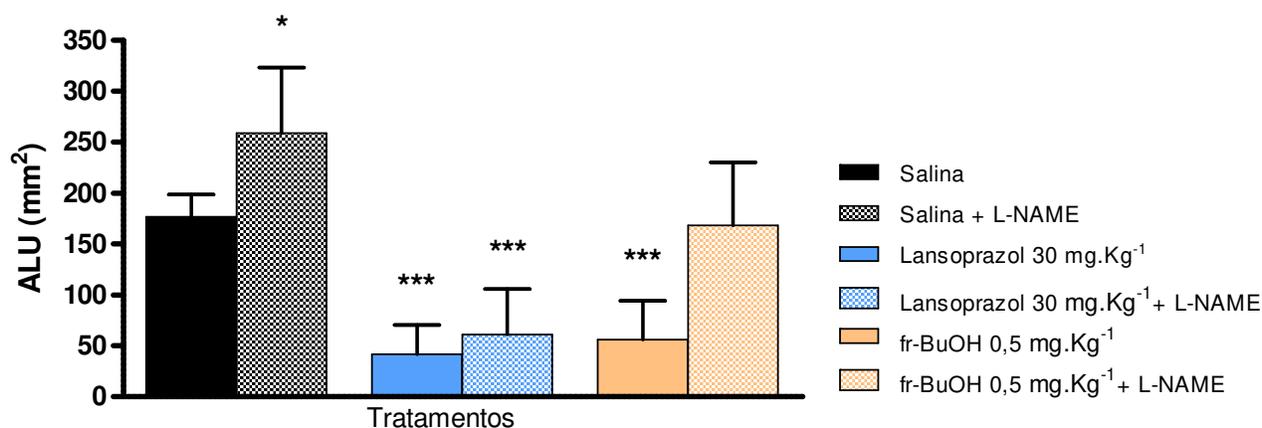


Figura 18. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 7), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tuckey, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ comparados ao grupo Salina.

O pré-tratamento de ratos com L-NAME mostrou, conforme a figura 18 ilustra, que a atividade antiulcerogênica de fr-BuOH é perdida quando a síntese de NO é bloqueada, indicando que o NO participa da gastroproteção promovida pela fr-BuOH.

4.8.3. Avaliação da secreção ácida pelo modelo de Shay

Tabela 10. Efeito da administração intraduodenal de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) em ratos submetidos à ligadura do piloro, avaliação do volume secretado e seu pH.

Tratamentos	Dose (mg.Kg ⁻¹)	Volume secreção gástrica (mL/4h)	pH (unidades)
Salina 0.9%	10 mL.Kg ⁻¹	1,784 ± 0,1566	2,38 ± 0,1310
Lansoprazol	30	1,518 ± 0,3358	3,046 ± 0,5326*
fr-BuOH	0.5	1,418 ± 3,090*	3,090 ± 0,2128*

Dados expressos em média ± desvio padrão ($n = 7$), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, * $P < 0.05$ comparado ao grupo Salina.

A tabela 10 traz os dados obtidos no modelo de ligadura do piloro, foi verificada uma ação anti-secretória de fr-BuOH onde o pH foi aumentado significativamente ao passo que houve redução no volume de secreção gástrica.

4.8.4. Produção do muco aderido à mucosa gástrica

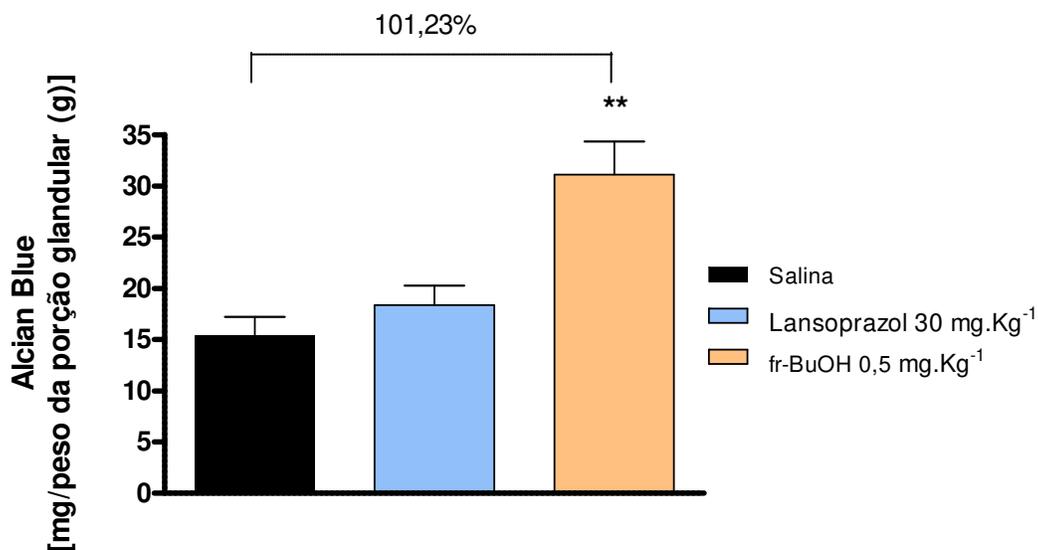


Figura 19. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) sobre a produção de muco aderido pela mucosa gástrica de ratos submetidos à ligadura do piloro. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 7), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, ** $P < 0.01$ comparados ao grupo Salina.

Neste modelo foi avaliada a produção de muco aderido na mucosa gástrica em ratos submetidos à ligadura do piloro, na figura 19 observa-se que a fr-BuOH foi capaz de aumentá-la em mais de 100%.

4.8.5. Produção de PGE₂ na mucosa gástrica

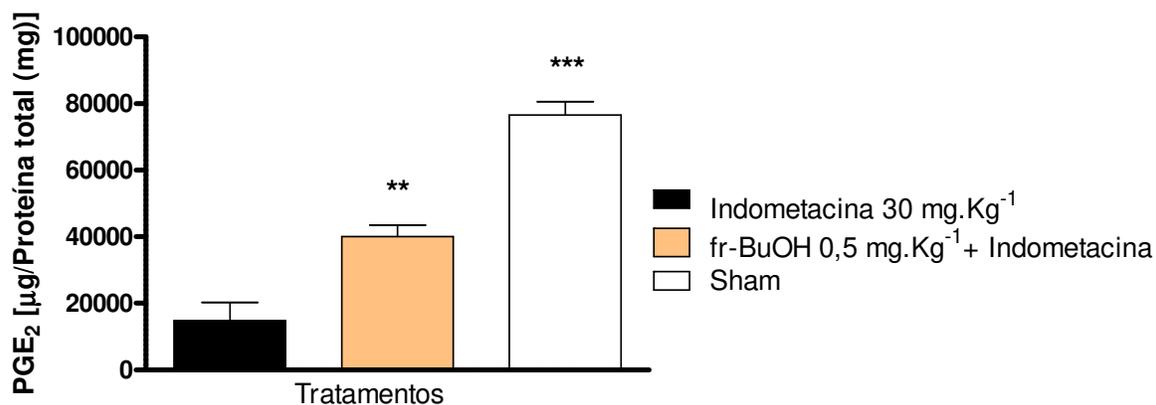


Figura 20. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) na produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) na mucosa gástrica de ratos. Dados expressos em média ± erro padrão (n = 6), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, ***P*<0.01, ****P*>0.001 comparados ao grupo Indometacina.

A figura 20 apresenta os resultados obtidos para a produção de prostaglandina na mucosa gástrica; o pré-tratamento com a fr-BuOH foi capaz de estimular a síntese de PGE₂ na presença da indometacina, um inibidor de cicloxigenases.

4.8.6. Avaliação da cicatrização de úlcera gástrica em modelo crônico

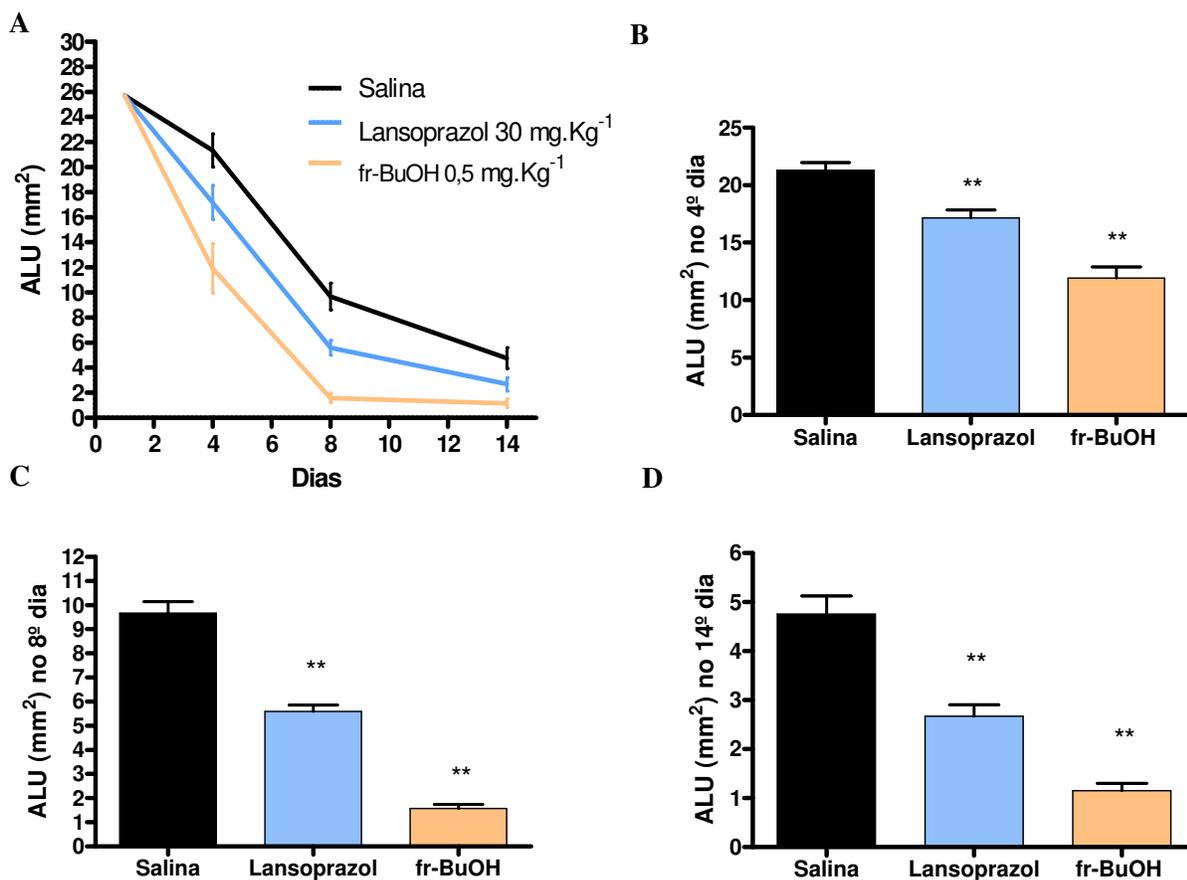


Figura 21. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) durante a (A) evolução, (B) 4º, (C) 8º e (D) 14º dias sobre a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, **P<0.01 comparados ao grupo Salina.

A figura 21 mostra que a fr-BuOH acelera o processo de cicatrização da úlcera gástrica em modelo crônico. Nota-se que desde o início dos tratamentos verificou-se que a cicatrização promovida pela fr-BuOH ocorreu mais rapidamente.

4.8.6.1. Toxicidade sub-crônica

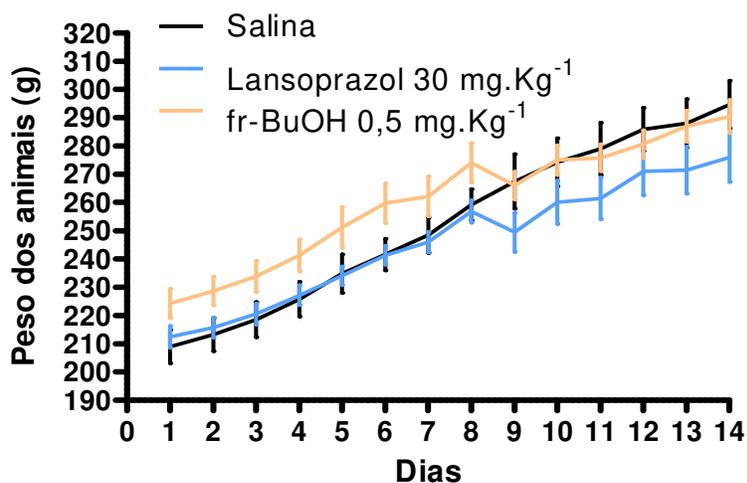


Figura 22. Avaliação da toxicidade da fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) no modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos. Efeito da fr-BuOH administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 12). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P > 0.05$ comparados ao grupo Salina.

A monitoração do peso dos animais durante o tratamento crônico por 14 dias consecutivos é verificada na figura 22; nota-se que os grupos que receberam lansoprazol e fr-BuOH apresentaram menor ganho de peso a partir do 8º dia de tratamento, entretanto essa diferença não foi significativa.

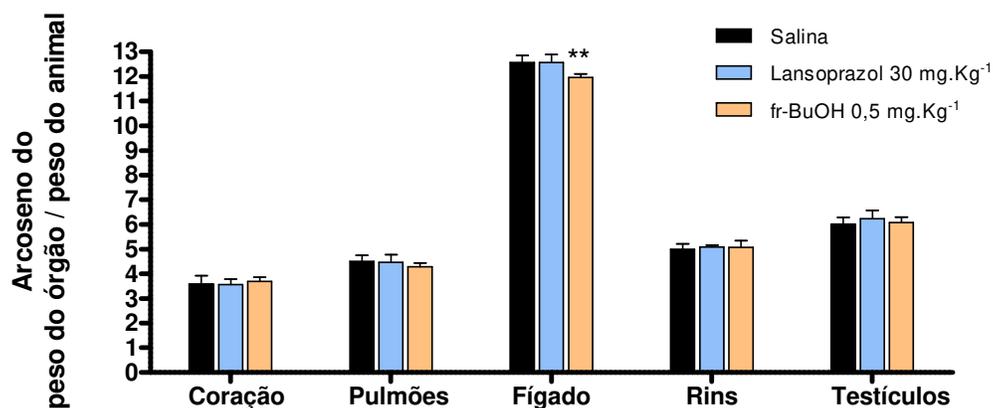


Figura 23. Avaliação da toxicidade da fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) no modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos. Efeito da fr-BuOH administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos dos animais. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 4). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, ** $P < 0.01$ comparados ao grupo Salina.

Dando continuidade à avaliação da toxicidade de fr-BuOH após 14 dias consecutivos de tratamento, foi analisada a relação entre peso dos órgãos sobre o peso dos animais, como mostra a figura 23. Foi encontrada diferença significativa nesta relação para o fígado de animais tratados com fr-BuOH; esta avaliação sugere possível hepatotoxicidade deste tratamento, entretanto aumento de massa hepática está mais associado á toxicidade do que a perda.

4.8.6.2. Expressão de COX-1, COX-2 e EGF

Nas próximas figuras (24 a 30) estão representados os gráficos correspondentes às intensidades densitométricas obtidas nas revelações das membranas utilizadas para analisar a expressão de COX-1, COX-2 e EGF, utilizando como controle interno a proteína β -actina. A densitometria foi calculada para cada membrana, e, para as análises foram divididos os valores densitométricos das proteínas de interesse pela densitometria de β -actina encontrada na mesma membrana.

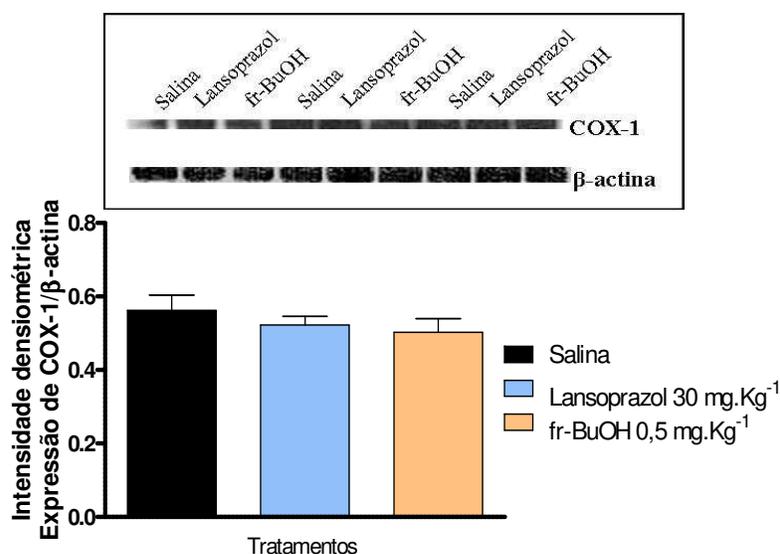


Figura 24. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 4 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P > 0.05$ comparados ao grupo Salina.

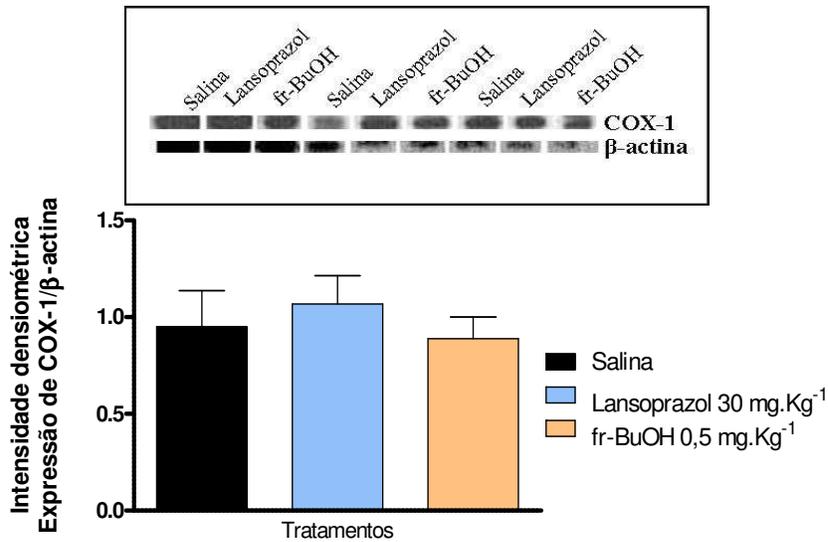


Figura 25. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 8 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média ± erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P > 0.05$ comparados ao grupo Salina.

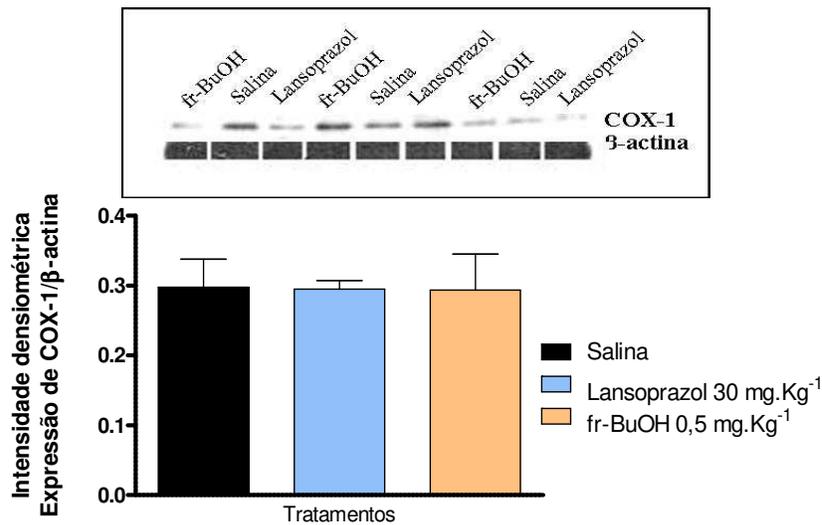


Figura 26. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 14 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média ± erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P > 0.05$ comparados ao grupo Salina.

As figuras 23, 24 e 25 demonstram a expressão da COX-1 após 4, 8 e 14 dias de tratamento respectivamente. Nenhuma diferença foi verificada, como esperado.

Em seguida, nas figuras 27 e 28, verificou-se a expressão da COX-2, após 4 e 8 dias de tratamento respectivamente, nenhuma diferença foi encontrada na expressão da mesma nos referidos dias. Entretanto na figura 29, onde a expressão de COX-2 foi verificada após 14 dias de tratamento foi encontrado aumento significativo, para a mesma, nos grupos tratados com lansoprazol e fr-BuOH.

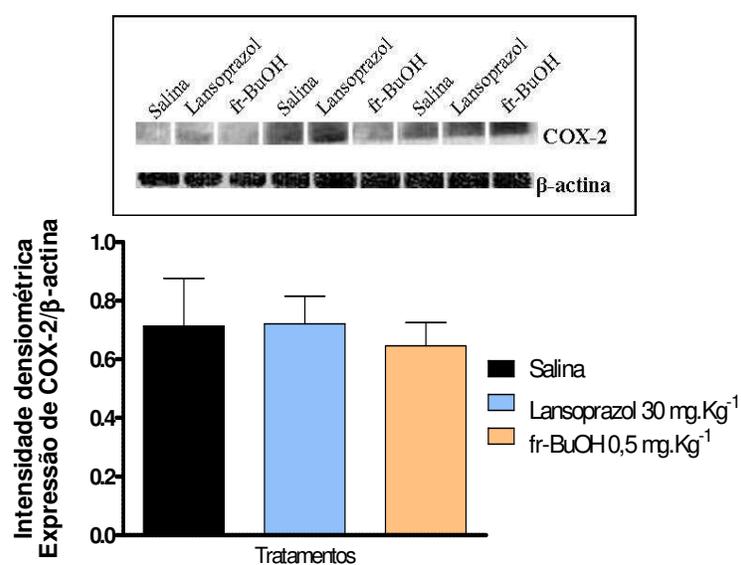


Figura 27. Efeito da administração oral de fr-BuOH por 4 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P > 0.05$ comparados ao grupo Salina.

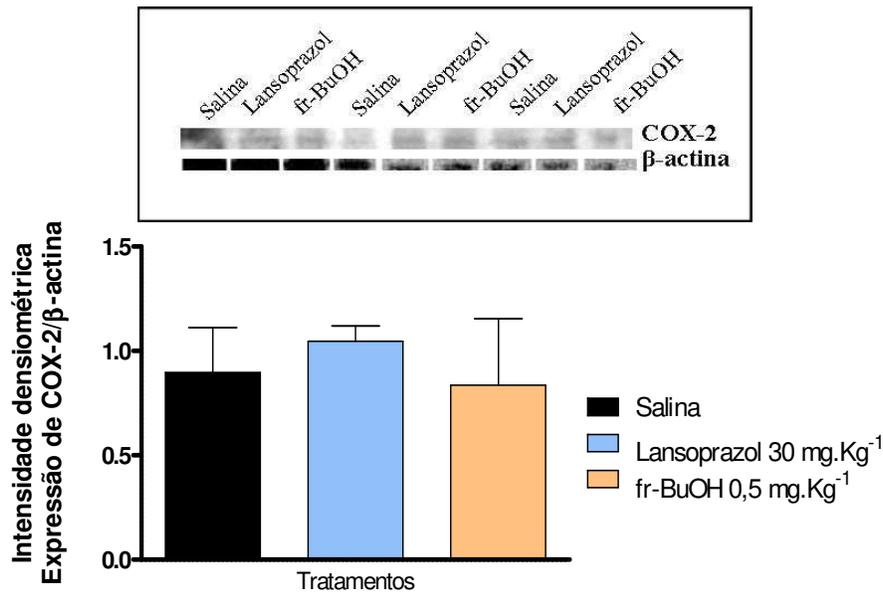


Figura 28. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 8 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, P > 0.05.comparados ao grupo Salina.

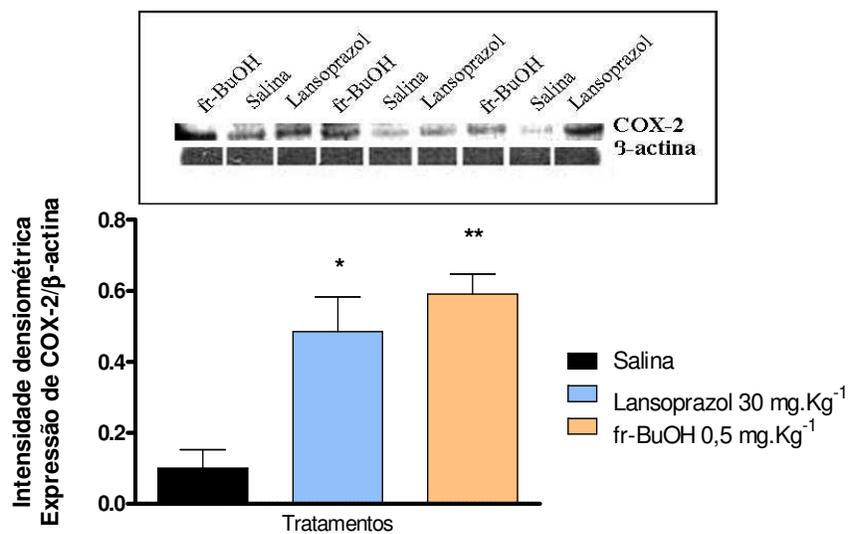


Figura 29. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 14 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, *P < 0.05, **P < 0.01 comparados ao grupo Salina.

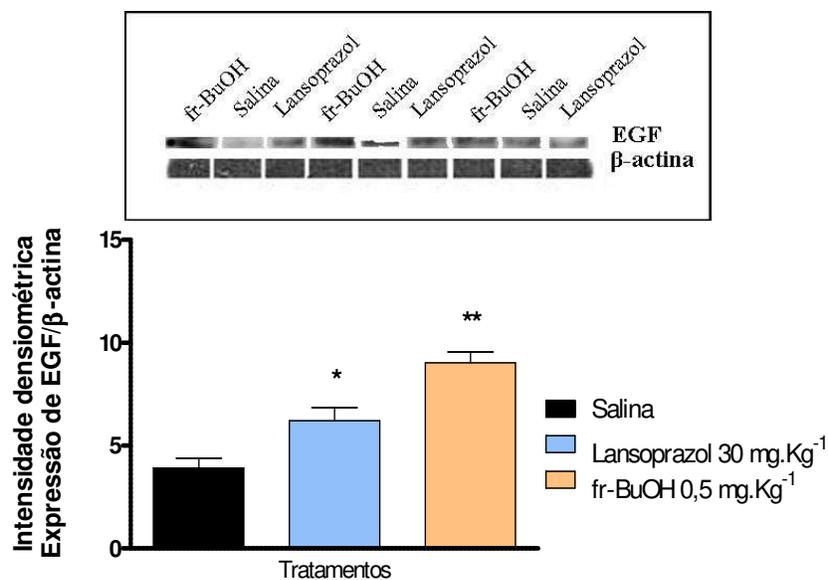


Figura 30. Efeito da administração oral de fr-BuOH (0,5 mg.Kg⁻¹) por 14 dias sobre expressão de fator de crescimento epidermal (EGF) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média \pm erro padrão (n = 4), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ comparados ao grupo Salina.

Foi verificado aumento na expressão do fator de crescimento epidermal após 14 dias de tratamento com lansoprazol e fr-BuOH, como nota-se na figura 30. O aumento na expressão do EGF é fundamental para a cicatrização mais rápida da úlcera neste modelo.

4.8.6.3. Análise histológica

As figuras a seguir são demonstrativas dos resultados obtidos nos estudos histológicos (figuras 31 e 32) e imunohistoquímicos (figuras 33, 34 e 35) dos estômagos dos animais submetidos ao modelo de úlcera crônica e tratados por 14 dias consecutivos. As legendas das figuras indicam detalhadamente o tratamento, a coloração ou imunolocalização e o objeto de estudo em particular. Os resultados histológicos serão descritos em seguida, já os imunohistoquímicos serão descritos após a última figura.

A figura 31 mostra o melhor arranjo estrutural na borda (especialmente das glândulas) da lesão nos tratamentos com lansoprazol (30 mg.Kg^{-1}) e fr-BuOH ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$), o mesmo observa-se na figura 32, netretanto é destacado na mesma a presença de muco nas glândulas gástricas.

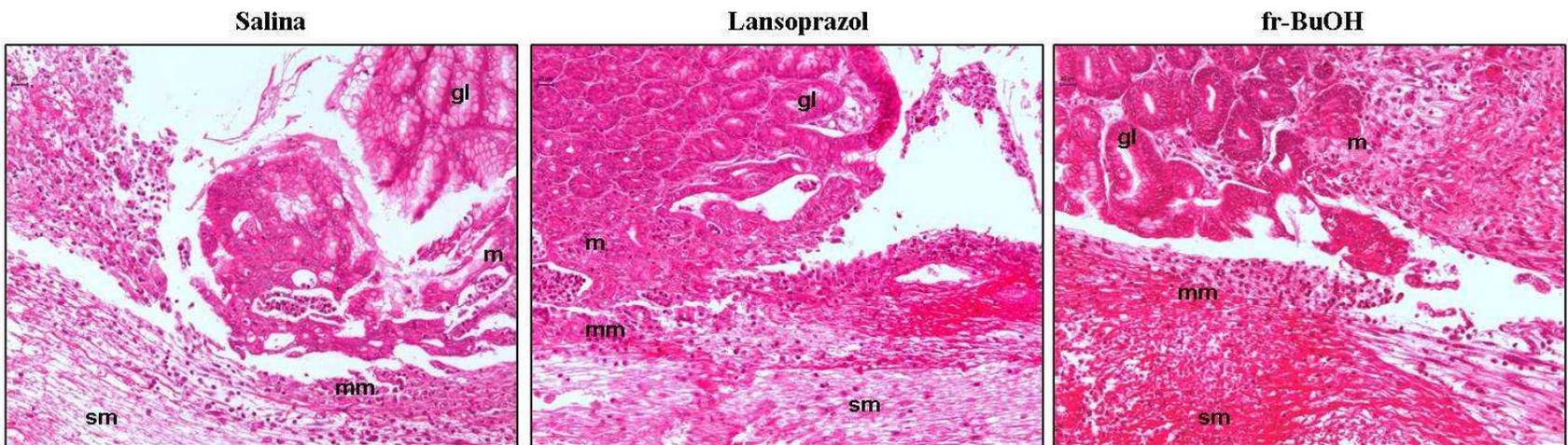


Figura 31. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise da organização morfológica da mucosa onde se observa os diferentes grupos experimentais. gl – glândulas; m – mucosa; mm – muscular da mucosa; SM – sub-mucosa.

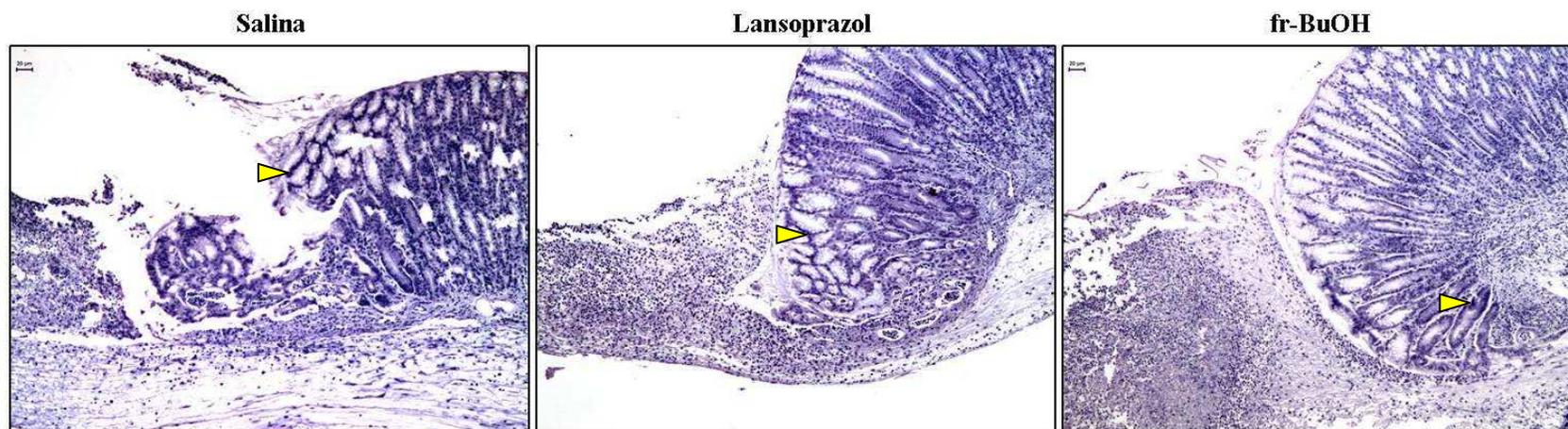


Figura 32. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Cortes histológicos corados com ácido periódico de Schiff (PAS), marcador de glicoproteínas, para visualização de muco gástrico produzido nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam compostos polissacarídicos.

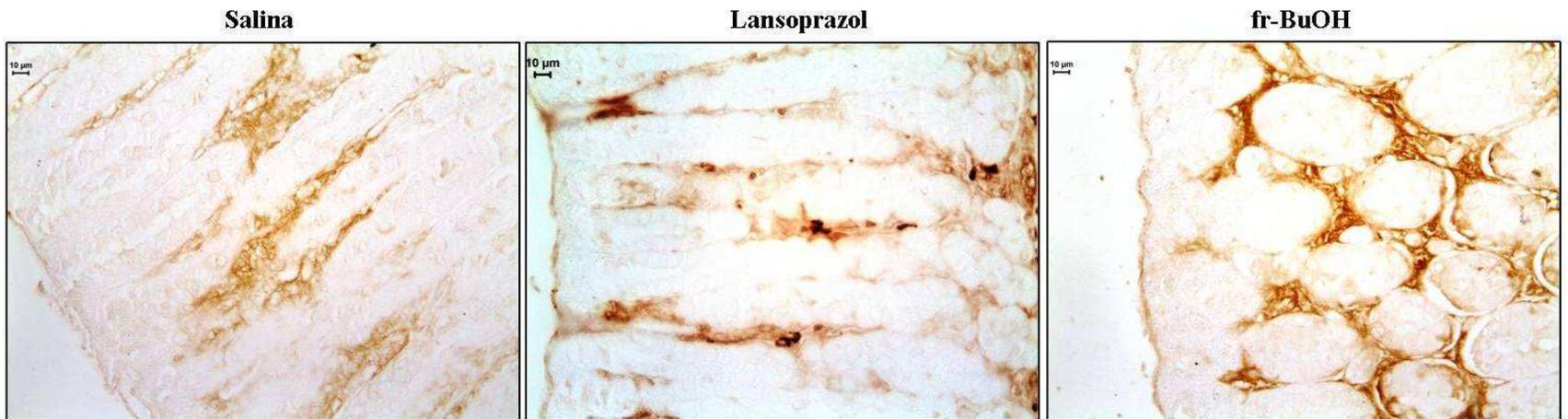
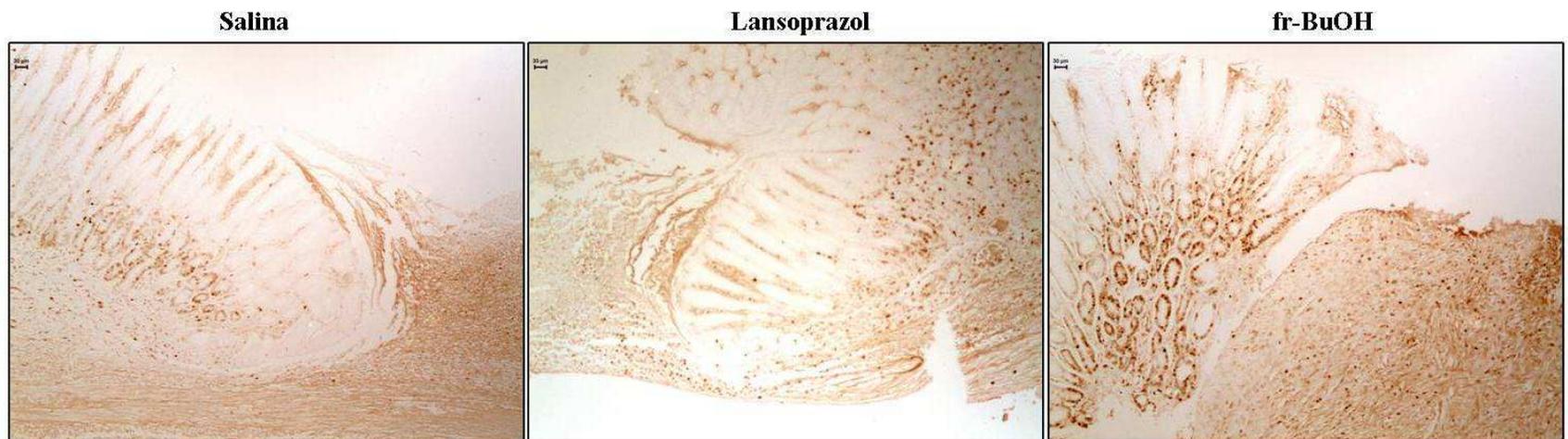


Figura 33. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de Heat Shock Protein (HSP) 70 revelado com 3'3 diaminobenzidina (DAB), que promove a cor marrom como resposta positiva da reação. Foi verificada a participação da HSP-70 no processo de cicatrização nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização.



116

Figura 34. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) revelado com complexo ABC 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase, que promove a coloração marrom como resposta positiva da reação. Foi verificado o processo de divisão celular durante a cicatrização das lesões nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização.

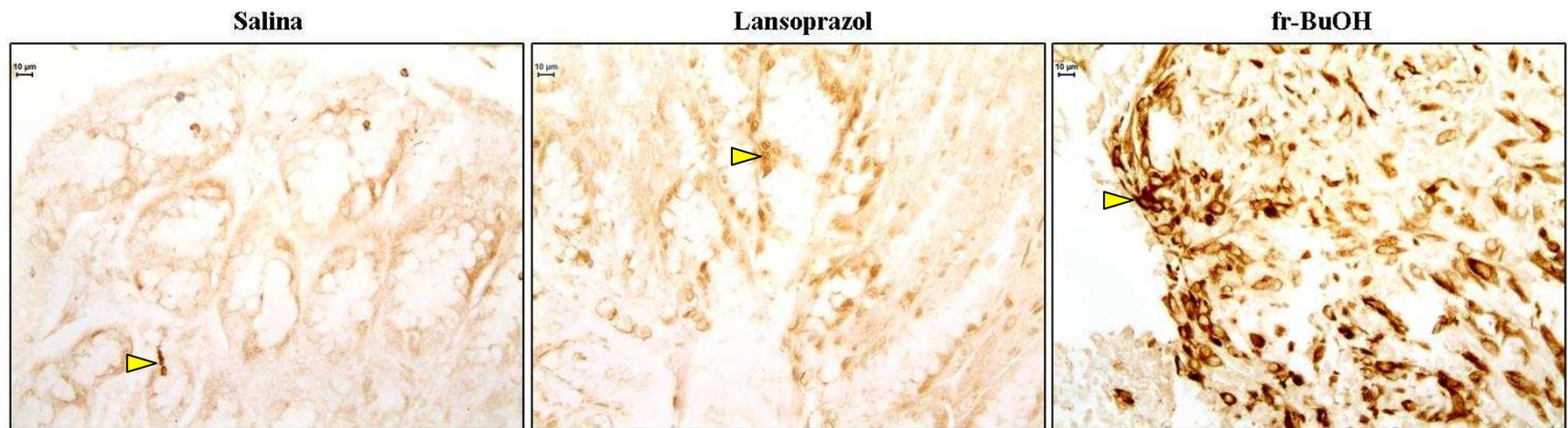


Figura 35. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH ($0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de cicloxigenase 2 (COX-2) revelado com ABC 3'3 diaminobenzindina (DAB), que promove a coloração marrom como resposta positiva da reação. Foi verificada a participação da enzima COX-2 no processo de cicatrização das lesões nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização.

As figuras 33, 34 e 35 mostram a imunolocalização de HSP-70, PCNA e COX-2 respectivamente, verificou-se maior presença destes no grupo lansoprazol e fr-BuOH, sendo mais evidentes neste último; assim, foi observado participação do HSP-70, PCNA e COX-2 no processo de cicatrização, especialmente nos grupos onde este processo foi mais eficiente e rápido.

5. Discussão

A pesquisa farmacológica têm se voltado ao conhecimento da medicina popular, a fim de estabelecer as bases científicas de seus efeitos farmacológicos. Neste contexto, atenção especial vem sendo dada por vários grupos do Oriente, Europa e América às plantas medicinais ricas em polifenóis (Haslam, 1996).

O parágrafo acima de ‘Sir’ Edwin Haslam, apesar de ter já 12 anos, traduz aquilo que vem sendo publicado atualmente com produtos naturais, tanto que o mesmo autor relata em outro *review* (Haslam, 2007) os progressos obtidos no conhecimento desses compostos e as contribuições que taninos vegetais forneceram desde o início dos estudos. Taninos têm papel de destaque especialmente como antioxidante; a análise e identificação desses compostos, que até bem pouco tempo atrás raramente era levada a cabo, contribuiu para os avanços obtidos nos últimos dois anos.

Artigos relevantes a respeito da constituição química de *Rhizophora spp.*, em especial *R. mangle* e *R. apiculata* foram recentemente publicados; Oo e colaboradores (2007) indicaram que taninos podem ser encontrados em espécies de *Rhizophora* nos manguezais, ademais apresentaram um protocolo MALDI-MS que consiste numa análise sequencial a partir do espectro de massas. No caso de *R. apiculata* os taninos são do grupo das procianidinas (taninos > proantocianidinas > procianidinas > catequinas). Rahim e colaboradores (2008) reforçaram ambas, presença de taninos e atividade antioxidante de *R. apiculata* e concluíram que “taninos de mangue” podem tornar-se fonte de novas drogas desde que estudos minuciosos sejam conduzidos.

Os compostos presentes nas cascas de *R. mangle* foram caracterizados química e farmacologicamente neste trabalho; encontrar propriedades farmacológicas desses taninos bem como estabelecer algum tipo de relação entre resposta biológica e características químicas dessas substâncias foi o objetivo maior. Os indicativos sobre composição química das frações orgânicas obtidas a partir do extrato bruto das cascas de *R. mangle* forneceram dados suficientes para embasar as discussões sobre taninos envolvidos nas atividades estudadas. CCD das frações revelou presença de catequina; a revelação com FeCl₃ 1%

mostrou que taninos condensados, hidrolisáveis e complexos estão presentes em *R. mangle* (figura 5).

Os perfis cromatográficos (figura 6) e de massas – *fingerprints* – (figuras 8 a 11) obtidos para extrato e frações orgânicas forneceram alguns indicativos importantes; um deles foi quanto a qualidade do processo de fracionamento. Com isso também foi possível verificar o grau de purificação realizada desde extrato bruto até obtenção das frações. Vale salientar que a garantia da boa execução do fracionamento já havia sido verificada quando da análise em CCD, a qual foi ratificada no HPLC e ESIMS. O conjunto de resultados forneceu dados necessários para que propuséssemos algumas alternativas estruturais dentro da classe em estudo. Ficou claro tratar-se das três classes de taninos hoje conhecidas, condensados, hidrolisáveis e complexos; foi possível observar que alguns monômeros de taninos condensados e hidrolisáveis heterosídeos, bem como o monômero isolado, neste caso a catequina ou epicatequina estão presentes na fração estudada. As moléculas propostas (figura 11 e tabela 2) foram desenhadas a partir do software ACD/LabsChemSketch *free version* e a viabilidade das mesmas conferida através do software/base bibliográfica SciFinder. Além disso, possibilidades químicas e ocorrência desses compostos foi sustentada por minuciosa pesquisa bibliográfica (Haslam, 1970; Haslam, 1974; Haslam, 1996; Pinto, 1999; Santos & Mello, 2004; Okuda, 2005).

Tendo sido obtido o perfil do extrato e frações, dois experimentos de atividade antioxidante *in vitro*, DPPH e Folin-Ciocalteu, foram realizados. Na tabela 3 foram mostrados os resultados para estes dois modelos e a concentração de polifenóis, tanto no extrato quanto nas frações é considerada elevada; os dados obtidos estão de acordo com aqueles encontrados por Chapman (1976) nas cascas de *R. mangle*. Os valores de EC₅₀ para a atividade antioxidante (DPPH), tanto do extrato bruto, quanto das frações são baixos, inclusive, o extrato bruto apresentou valor inferior ao do controle quercetina (figura 16 ilustra a curva de redução do DPPH para as diferentes concentrações de extrato e frações). Estes resultados mostraram que extrato e frações foram eficientes em sequestrar radicais livres *in vitro* e apresentam concentração de polifenóis entre 20 e 27%; tais dados são importantes no sentido de que representam uma alternativa para estabelecer caminhos a

serem seguidos dentro do estudo com atividade antioxidante. Mais adiante será possível constatar que esse potencial antioxidante também é revelado em modelo animal.

Ao se decidir pelo estudo da atividade anti-úlceras para *R. mangle*, não foi difícil estabelecer que a atividade antioxidante deveria ser investigada conjuntamente, já que a literatura relacionada ao gênero *Rhizophora*, na maioria das vezes, apontava para seqüestro de radicais livres e mecanismos antioxidantes; claro é que em se tratando de compostos polifenólicos esta propriedade torna-se ainda mais evidente.

Classicamente, na pesquisa de compostos antiulcerogênicos o modelo de úlceras experimentais induzidas por etanol em ratos representa a primeira etapa desta linha de pesquisa, pois fornece informações básicas sobre esta atividade, além de ser útil para determinar as doses dos tratamentos. Neste modelo foi verificada a atividade antiulcerogênica das frações aquosa (fr-Aq), acetato de etila (fr-EtOAc) e butanólica (fr-BuOH) em doses variáveis de 0,5 a 100,0 mg.Kg⁻¹ para as duas últimas (figuras 13 e 14) e 6,5 a 100,0 mg.Kg⁻¹ para a primeira (figura 12).

Os efeitos do etanol na mucosa gástrica podem ser classificados em: 1) dano cáustico com altas concentrações de etanol (acima de 20%), que possibilitam que as lesões penetrem profundamente no plexo vascular ocasionando estase, ruptura da parede dos vasos sanguíneos, favorecendo hemorragia e necrose da mucosa; 2) dano por retrodifusão de íons H⁺ com baixas concentrações de etanol (8 a 20%), que podem levar à esfoliação das células epiteliais e, na presença do suco gástrico, ao rompimento da barreira protetora da mucosa gástrica; 3) aumento da resistência da mucosa, um efeito paradoxal, com concentrações que variam de 5 a 20%, que podem desencadear citoproteção adaptativa. Irritantes moderados, parcimoniosamente utilizados, estimulam a síntese de prostaglandina que, por sua vez, favorecem processos regenerativos da mucosa (Sikiric *et al*, 1999).

Além disso, lesões gástricas por etanol podem estar associadas à geração de EROs; essas lesões produzem desbalanço entre processos celulares oxidante e antioxidante (Repetto & Llesuy, 2002). A administração do etanol pode resultar ainda em alterações na permeabilidade da membrana com redução na resistência da mucosa e distúrbios na secreção de H⁺ (Vasquez-Ramirez *et al.*, 2006). As úlceras aparecem devido à ação

necrotizante do etanol na mucosa gástrica, com menor participação da secreção ácida (Lewis & Hanson, 1991). Desse modo, os resultados obtidos no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos forneceram as primeiras evidências da atividade antioxidante *in vivo* para os compostos presentes nas cascas de *R. mangle*.

Após terem sido definidas frações mais ativas, as menores doses eficazes de cada uma delas foram selecionadas a partir das curvas dose-resposta obtidas para fr-Aq, fr-EtOAc e fr-BuOH ainda no modelo de úlcera induzida por etanol. Os resultados mostraram que, embora o traçado da curva de fr-EtOAc seja mais compatível com aquele de uma curva dose-resposta, fr-BuOH mostrou-se bem mais efetiva do ponto de vista da significância estatística, além de terem sido usadas doses extremamente baixas. Como não houve diferença estatística significativa entre as doses efetivas, escolheu-se então a menor dose empregada. Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que taninos, especialmente os condensados, possuem atividade farmacológica em doses bastante baixas (Iwasaki *et al.*, 2004).

No modelo de lesões gástricas induzidas por isquemia-reperusão, as lesões ocorrem sem utilização de agentes químicos (Cabeza *et al.*, 2001). A isquemia enfraquece a barreira da mucosa gástrica aumentando a difusão de ácido, o que causa danos à mucosa (Kawai *et al.*, 1994) Durante a isquemia ocorre redução do fluxo sanguíneo no órgão levando a uma seqüência de reações químicas que resultam em disfunção, necrose celular e aparecimento de metabólitos tóxicos contribuindo para a morte celular (De Groot, 2005). Com a reperusão, EROs são geradas, especialmente no sistema xantina-oxidase e na ativação de neutrófilos, causando peroxidação lipídica no tecido; com isso, a combinação de EROs com secreção ácida promove danos na mucosa gástrica (Wada *et al.*, 1996). Lesões gástricas ocorridas na fase de reperusão são consideradas mais severas do que aquelas que ocorrem durante a isquemia, já que há participação de EROs (incluindo biomoléculas como O_2^{\bullet} , OH^{\bullet} e H_2O_2 que atacam lipídeos de membrana, ácidos nucléicos, enzimas e receptores), ocasionando alterações na estrutura, na atividade celular e no transporte de proteínas além de modificações, por exemplo, no influxo de cálcio nas células (Schoenberg & Berger, 1993; Cerqueira *et al.*, 2005).

Nesse modelo, os resultados obtidos demonstraram que fr-BuOH também foi eficaz em reduzir significativamente a formação de lesões (figura 15). A hipótese formulada para tanto, foi que essa proteção poderia ser atribuída aos taninos de *R. mangle*, confirmando agora, *in vivo*, a atividade antioxidante. Esta classe de compostos é conhecida por sua capacidade antioxidante, especialmente para os taninos do chá-verde (Ariga, 2004).

EROs são continuamente produzidas durante os eventos fisiológicos normais, sendo removidas pelo mecanismo de defesa antioxidante. Em condições patológicas, EROs resultam em peroxidação lipídica e dano oxidativo. O desequilíbrio entre EROs e defesa antioxidante leva à modificação oxidativa na membrana celular, ou nas moléculas intracelulares (El-Habit *et al.*, 2000). A primeira enzima antioxidante da mucosa gástrica é a SOD, que cataliza a dismutação de O_2^* em H_2O_2 que é menos nocivo. O segundo passo do metabolismo do H_2O_2 depende da atividade da GPx. A redução do H_2O_2 em água pela GPx é acompanhada pela conversão da glutathiona na forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG), que depois é convertida em GSH pela GR (Kwiecién *et al.*, 2002).

Membranas celulares são alvos constantes de EROs por serem ricas em complexos enzimáticos pertencentes às cadeias redutoras de O_2 . Nelas, a grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados (AGP) favorece a formação de sítios geradores de EROs, fazendo com que ocorra lipoperoxidação, devido ao fácil acesso das EROs às insaturações dos ácidos graxos (Buege & Aust, 1978; McCord, 2000; Andreoli, 2000). Este processo degenerativo, envolvendo formação, propagação de radicais lipídicos peroxil e alcóxil (ROO^* , RO^*), captação de O_2 e rearranjo de duplas ligações dos AGP altera a integridade e fluidez das membranas (Buege e Aust, 1989). A integridade da mucosa gástrica depende de fatores como manutenção da microcirculação, secreção de muco e atividade de enzimas antioxidantes, como SOD e GPx; tais fatores também implicam na gastroproteção contra agentes irritantes exógenos e endógenos na mucosa gástrica (Kwiecién *et al.*, 2004). Assim, substâncias capazes de garantir a integridade da mucosa são potencialmente úteis no tratamento e/ou prevenção de lesões gástricas

Glutathiona existe em duas formas nas células, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo a proporção de GSH para GSSG determinada pelo estado redox da célula. A síntese

de glutathiona é determinada enzimaticamente pela γ -glutamylcisteina sintase (γ -GCS) e glutathiona sintase, com formação limitada pela atividade dessas enzimas. Uma tarefa importante da glutathiona celular é o sequestro de radicais livres e peróxidos produzidos durante o processo de respiração celular que podem levar a oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Mecanismo compensatório desses danos oxidativos envolve a transativação dos genes responsáveis pelas enzimas que participam da síntese e metabolismo da glutathiona (Thomas *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2002). Moskaug e colaboradores (2005) mostraram que a administração de polifenóis como a quercetina induz a expressão de γ -GCS e conseqüentemente aumento intracelular de glutathiona. Desta forma foi possível observar que os compostos presentes na fr-BuOH induzem a síntese de GSH, exercendo tanto a manutenção (demonstrada com isquemia-reperfusão, tabela 7), quanto aumento (verificado com etanol, tabela 4) dos níveis de GSH por esse mecanismo.

GPx é uma enzima que desempenha papel fundamental na eliminação do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos nas células da mucosa gástrica (Halliwell *et al.*, 1992). A atividade antioxidante da GPx é conjugada com a oxidação de glutathiona reduzida (GSH) que, posteriormente, pode ser reduzida pela GR utilizando NADPH como agente redutor. Os resultados obtidos tanto no modelo de etanol (tabelas 4 e 5), quanto de isquemia-reperfusão (tabelas 7 e 8) sustentam que o aumento/manutenção de GSH pode ter gerado condições para que SOD, GPx e GR apresentassem suas atividades regulares nas condições experimentais de cada modelo. Assim, os compostos presentes na fr-BuOH demonstraram que sua ação antioxidante poderia ser obtida através da modulação da glutathiona e da conseqüente atividade das enzimas SOD, GPx e GR, promovendo proteção à mucosa gástrica.

EROs podem atacar componentes celulares e extracelulares. Sabe-se que os ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares da bicamada lipídica são os principais alvos das EROs (Gutteridge, 1995). Uma vez que o processo de LPO é iniciado, normalmente pelo OH, ele continua numa reação em cadeia gerando hidroperóxidos lipídicos e aldeídos. O acúmulo de hidroperóxidos na membrana celular tem um profundo efeito na sua fluidez e na atividade das enzimas transmembranas, transportadores, receptores e outras proteínas de membrana (Jourdain *et al.*, 1993). Como conseqüência, a LPO pode causar mudanças na

seletividade e permeabilidade da membrana, levando a alterações no volume e metabolismo celular (Chen *et al.*, 1996). Além disso, hidroperóxidos e aldeídos são tóxicos para células e suas organelas (Aw, 1998), possuem propriedades quimiotáticas de neutrófilos e podem regular a produção de citocinas (Jayatilleke & Shaw, 1998). O processo de LPO acelera quando o sistema de detoxificação celular falha na remoção dos precursores de OH, em particular os hidroperóxidos. LPO pode ser interrompida por antioxidantes lipossolúveis, como o α -tocoferol (vitamina E) e mais recentemente, o NO também mostrou-se capaz de interromper esse processo (Hogg & Kalyanaraman, 1999). Os níveis de LPO obtidos nos modelos estudados sugerem que a fr-BuOH (tabelas 6 e 9) foi capaz de reduzir este índice provavelmente pela eliminação destes compostos pela GPx.

A MPO é descrita como marcadora da infiltração/agregação de neutrófilos e está frequentemente aumentada em lesões ulcerogênicas (Guha *et al.*, 2009); essa enzima, presente nos neutrófilos, exerce importante atividade antibacteriana (Segal, 2005). Neutrófilos representam a primeira linha de defesa da resposta imune inata ao fagocitar, matar e digerir bactérias e fungos; a enzima NADPH oxidase é componente essencial dos neutrófilos, sendo responsável pela geração de radicais livres e outras formas de EROs como o ânion superóxido (Segal, 2005; Klebanoff, 2005). Neutrófilos também são os principais mediadores de aumento da permeabilidade microvascular induzida por reperfusão (La Casa *et al.*, 2000); alguns autores relataram que a exposição da mucosa gástrica ao etanol, bem como à isquemia seguida de reperfusão, provocam aumento significativo na atividade MPO (La Casa *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 1998; Ueda *et al.*, 1989). Desta forma, a atividade da MPO foi estudada nos modelos de úlcera induzida por etanol e isquemia-reperfusão como componente oxidante/antioxidante da mucosa gástrica. Os dados obtidos para atividade desta enzima (tabelas 6 e 9) indicaram possível mecanismo antioxidante promovido pelos compostos da fr-BuOH, uma vez que foi verificada redução na atividade da MPO, corroborando assim para a ação antioxidante constatada anteriormente; adicionalmente, os dados forneceram evidências de um possível mecanismo antiinflamatório.

O sucesso dos tratamentos farmacológicos em prevenir ou curar lesões gástricas não depende somente do bloqueio da secreção de ácido ou da atividade antioxidante, mas

também do aumento de fatores protetores da mucosa gástrica (Dajani & Klamu, 2000; Wallace, 2005; Laine, *et al.*, 2008). A capacidade que certos fatores endógenos apresentam de proteger a mucosa gástrica contra danos através de mecanismos não relacionados à inibição da secreção de ácido foi primeiramente designada como “citoproteção”; no entanto, essa propriedade também é mencionada como “gastroproteção” ou “defesa da mucosa” (Szabo & Goldeberg, 1990; Martin & Wallace, 2006).

Após determinar se a gastroproteção de fr-BuOH é exercida por mecanismos antioxidantes, buscamos verificar se a depleção de GSH influenciaria a gastroproteção promovida por fr-BuOH. Para tanto, foi utilizado um agente bloqueador de GSH, o composto *N-ethylmaleimide* (NEM). Os dados obtidos demonstraram que depleção de GSH pelo NEM reduziu de forma significativa a proteção promovida pela fr-BuOH (figura 17). Assim, os efeitos de fr-BuOH sobre a mucosa gástrica não somente estariam ligados à manutenção dos níveis de GSH, como também seriam dependentes destes compostos; este dado reforça a idéia de que o mecanismo fundamental, envolvido na gastroproteção promovida pelos compostos da fr-BuOH, está intimamente ligado a produção de GSH, seja estimulando sua síntese, seja favorecendo as condições para tal, pois fr-BuOH promoveu modulação de compostos sulfidrílicos (GSH) e enzimas antioxidantes (SOD, GPx e GR).

O passo seguinte foi verificar um possível envolvimento do óxido nítrico (NO) na gastroproteção de fr-BuOH. Para tanto foi utilizado N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor da NOS, análogo da L-arginina. L-NAME é hidrolizado em L-nitroarginina que inativa a NOS (Pfeiffer *et al.*, 1996), fazendo com que as úlceras induzidas por etanol sejam agravadas (Kawano & Tsuji, 2000). Assim como no modelo utilizando NEM, foi também observada redução significativa no efeito protetor de fr-BuOH sobre a mucosa gástrica após bloqueio da NOS (figura 18). Estes dados demonstraram que a gastroproteção de fr-BuOH também é dependente de NO. É possível que um dos efeitos gastroprotetores dos compostos presentes na fr-BuOH esteja ligado ao aumento da liberação de NO, uma vez que já foi descrito *up-regulation* por compostos fenólicos como o resveratrol (Wallerath *et al.*, 2002). Neste contexto, NO pode promover produção de metabólitos da COX como a prostaglandina (Toriyabe *et al.*, 2004).

Assim como suposto anteriormente, o envolvimento do NO na gastroproteção de fr-BuOH também poderia estar ligado a mecanismos antioxidantes; alguns autores demonstraram que a redução de ânions superóxido favorece a estabilização do NO (Pechanova & Simko, 2007). Desta forma, os resultados obtidos até aqui fornecem muitos indícios de que este seja um mecanismo provável para a participação do NO, uma vez que fr-BuOH promove seqüestro de radicais livres, assim como desempenha papel modulador sobre enzimas como SOD. Além disso, alguns trabalhos revelaram que compostos fenólicos são inibidores da enzima conversora de angiotensina e assim, esses compostos poderiam beneficiar a função endotelial (Ottaviani *et al.*, 2006; Actis-Goretta *et al.*, 2006). Vale ressaltar que a angiotensina II é potente estimuladora da NADPH oxidase (Pechanova & Simko, 2007), o que seria traduzido em danos oxidativos da infiltração de neutrófilos.

A participação de EROs não é menos importante, entretanto, que a secreção ácida nos dois modelos de indução de úlcera experimental em questão; o envolvimento de compostos e enzimas capazes de proteger ou reduzir danos causados por EROs é essencial na manutenção da integridade da mucosa gástrica. Neste sentido, foram verificados na mucosa gástrica níveis de GSH, LPO e atividade das enzimas SOD, GPx e GR. Os dados mostraram que a fr-BuOH foi capaz de manter e elevar os níveis de GSH, atividade da SOD, GPx e GR e reduzir os níveis de LPO e atividade da MPO. Observação interessante é a de que o lansoprazol, no modelo de isquemia-reperfusão, foi capaz de elevar a atividade da SOD, sugerindo que essa substância provavelmente exerça gastroproteção por vias também independentes da inibição da secreção ácida, observação esta já indicada por outros autores (Blandizzi *et al.*, 1999; Natale *et al.*, 2004; Blandizzi *et al.*, 2005).

Ainda que alguns mediadores químicos participem da produção coordenada e efetiva da resposta da mucosa à danos, há influência dominante de PGE₂ e NO nesse processo, já que ambos são moduladores essenciais à defesa da mucosa. Essas substâncias influenciam cada um dos componentes gastroprotetores da mucosa estimulando a secreção de muco e bicarbonato, além de elevar o fluxo sanguíneo promovendo tamponamento da acidez e remoção de toxinas que a atravessam, além de inibir a secreção ácida, proporcionando recuperação das lesões (Wallace & Miller, 2000).

As atividades anti-secretória (H^+) e mucossecretora promovidas pela administração de fr-BuOH foram avaliadas utilizando-se os modelos de ligadura do piloro com administração intraduodenal e oral, respectivamente; os dados estão apresentados na tabela 10 e figura 19.

No modelo de ligadura do piloro a utilização de via intraduodenal é importante para investigar a atividade do composto quando administrado por via sistêmica, evitando contato direto das substâncias testes com a mucosa gástrica dos animais. A fr-BuOH produziu alterações tanto no pH quanto no volume gástrico, ou seja, enquanto o pH aumentou, o volume secretado foi significativamente reduzido. Essas alterações sugeriram que fr-BuOH também atua sobre a secreção ácida gástrica, inibindo-a; este seria mais um de seus mecanismos de ação. De acordo com Muramaki e colaboradores (1992), taninos apresentam atividade antiulcerogênica, ao menos em parte, devido à atividade anti-secretória, a qual ocorreria pela inibição da H^+K^+ -ATPase, possivelmente associada a propriedade dos taninos de precipitar proteínas.

Após verificar a inibição da secreção ácida redução, um potente agente agressor da mucosa gástrica, a produção de muco aderido pela mucosa gástrica foi investigada. O muco contribui para a defesa da mucosa por criar barreira física contra bactérias, ácido, toxinas, além de agir como lubrificante, o que reduz efeitos abrasivos sobre ela (Wallace *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2005; Wallace, 2007). O muco gástrico também é importante seqüestrador de radicais livres, em função da composição glicoprotéica (Mojzis *et al.*, 2000). Os resultados obtidos neste modelo demonstraram que fr-BuOH é estimuladora da produção de muco gástrico, já que foi observado aumento superior a 100% na produção de muco aderido. Ito e colaboradores (2008) estudaram o envolvimento de taninos do chá verde na modulação do muco gastrintestinal em modelo crônico e verificaram aumento do conteúdo de mucina no muco ilíaco, entretanto não foram encontradas mudanças significativas no muco gástrico. Já Hamaishi e colaboradores (2006) demonstraram que estes mesmos compostos previnem a redução de açucars do muco gástrico em modelo de úlceras induzidas por etanol, sugerindo fortalecimento da barreira mucosa e aumento do potencial antioxidante do muco.

Considerando-se este último resultado e aquele que demonstrou envolvimento do NO na gastroproteção, a produção de PGE₂ na mucosa gástrica foi, em seguida, avaliada. Um aumento na produção deste prostanóide foi observado no grupo tratado com fr-BuOH (figura 20). A PGE₂ é fator importante na proteção da mucosa gástrica; tanto ela, quanto NO, atuam na homeostasia vascular e estão intimamente ligados à produção de muco gástrico (Laine *et al.*, 2008). Berenguer e colaboradores (2006) comprovaram atividade protetora de *R. mangle* em úlceras causadas por DAINES; um dos mecanismos implicados nessa proteção seria justamente aumento de PGE₂.

Os resultados até aqui obtidos sugeriram que os mecanismos de ação da fr-BuOH estariam ligados às propriedades atribuídas aos taninos, como inibição da secreção ácida pela possível inibição da bomba protônica e, fundamentalmente, ação antioxidante encontrada *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, aumentos na produção de PGE₂ poderiam estar relacionados à ação antioxidante de fr-BuOH. Ogino e colaboradores (1997) demonstraram que o aumento na atividade da SOD gera substrato para as COXs podendo levar a estimulação da produção de PGE₂; em concordância, Iwasaki e colaboradores (2004) demonstraram que a administração oral de proantocianidinas produz tanto elevação da atividade da SOD quanto dos níveis de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos. De acordo com Myers & Hernandez (1992) a SOD é também capaz de promover restabelecimento dos níveis de eicosanóides de maneira indireta, ou seja, após administração de SOD os níveis de 6-keto-PGF_{1α} são restabelecidos.

Compostos fenólicos têm efeito duplo sobre a síntese de prostaglandinas; em baixas concentrações estimulam-na, enquanto altas concentrações a inibem; na estimulação estes compostos atuam como substratos redutores dos intermediários oxidados da prostaglandina H sintase (PGHS) acelerando o ciclo da peroxidase e protegendo a PGHS da inativação catalizada por si mesma ao remover o radical livre da PGG e reduzi-la a PGH₂ (Alanko *et al.*, 1999). A PGHS catalisa a conversão do ácido araquidônico (AA) a PGH₂, um precursor universal de prostaglandinas e tromboxanos. Síntese de PGH₂, mediada pela PGHS, ocorre em duas etapas: 1) conversão do AA em peróxido orgânico (PGG₂) através da COX; 2) redução de PGG₂ a PGH₂ através da peroxidase. Além disso, na sequência da ação de enzimas específicas (convertases), PGH₂ pode ser convertida em compostos

fisiologicamente ativos, como PGE₂, D₂, F_{2α}, tromboxano A₂ e prostaciclina (PGI₂) (Bergstrom *et al.*, 1964; Hamberg & Samuelsson, 1973; Tsaplina *et al.*, 2006).

Uma vez que distintos mecanismos de ação foram elucidados em modelos agudos de lesões gástricas, restava avaliar a eficácia da fr-BuOH em modelo crônico; a fração foi então avaliada em modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos e também a toxicidade já que ocorre tratamento dos animais por 14 dias consecutivos. De acordo com Ito e colaboradores (2008) a administração crônica de taninos pode reduzir a absorção de alguns nutrientes e minerais, bem como o peso dos animais. Não foi constatada alteração significativa no peso corporal dos animais tratados por 14 dias com fr-BuOH (figura 22); entretanto, a massa hepática desses animais mostrou-se reduzida, sugerindo possível hepatotoxicidade (figura 23), apesar de não terem sido observadas alterações macroscópicas no fígado desses animais. Todavia, o fato de que compostos catequínicos são metabolizados no fígado (Moridani *et al.*, 2001), com participação do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 e CYP3A4) gerando metabólitos conjugados a GSH, não pode ser ignorado; Mazzanti e colaboradores (2009) relataram que polifenóis do chá verde ou seus metabólitos podem ser hepatotóxicos devido a estresse oxidativo no fígado. Dados adicionais de hepatotoxicidade poderiam ser obtidos através da determinação dos níveis séricos de enzimas hepáticas como a ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e γ -GT (γ -glutamilttransferase); no entanto, esta avaliação não foi realizada.

No que diz respeito à cicatrização da úlcera (figura 21), os grupos experimentais tiveram três momentos de eutanásia para que fossem obtidas informações importantes sobre a evolução do processo de cicatrização em cada um dos grupos experimentais. Foi possível observar, em todos os momentos de eutanásia, melhora significativa na cicatrização da lesão com tratamento de fr-BuOH, sugerindo que os compostos de *R. mangle* apresentam ação cicatrizante nessas condições. A análise histológica da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera crônica mostrou melhor recuperação da lesão nos grupos lansoprazol e fr-BuOH, após 14 dias de tratamento (figura 31). Ainda nesse modelo as expressões de COX-1, COX-2 e EGF foram avaliadas (figuras 24 a 30). Verificou-se que a expressão de COX-1 não foi alterada em nenhum dos grupos experimentais enquanto que a

expressão de COX-2 só foi mantida nos níveis normais até o 4º e 8º dias de tratamento; entretanto, notou-se aumento na expressão desta enzima depois de 14 dias de tratamento com fr-BuOH e lansoprazol. O mesmo padrão de resultados foi observado para a expressão do EGF (figura 30).

Para Wallace (2005), a contribuição de COX-2 para a defesa da mucosa gástrica e o processo de cicatrização está cada vez mais clara, o que pode levar ao desenvolvimento de novas terapias. A expressão de COX-2 controla mecanismos de proteção da mucosa como re-epitelização, angiogênese e citoproteção adaptativa; além disso, fármacos como lansoprazol produzem *up-regulation* de EGF e COX-2 em tratamentos crônicos; drogas com esta propriedade apresentam sucesso maior na cicatrização de úlceras gástricas (Poonam *et al.*, 2005; Schmassman *et al.*, 2005). Tsuji e colaboradores (2002) destacam que EGF também é responsável pelo *up-regulation* de COX-2 e subsequente produção de PG's em diversas células; PG's são conhecidas como importantes fatores de proteção e recuperação da mucosa gástrica, em parte devido à via de proliferação celular epitelial.

Schmassman e colaboradores (2005) demonstraram que a cicatrização da úlcera é interrompida quando inibidores de COX-2 são administrados; além disso, os autores demonstraram que o processo de cicatrização não é alterado quando apenas COX-1 é suprimida. Contudo, outro fator importante apontado por esses autores é que a úlcera não se desenvolve espontaneamente em animais COX-1 ou COX-2 suprimidos; para isso ocorrer é necessário que ambas isoformas sejam suprimidas. Tsuji e colaboradores (2002) também apontaram COX como fator fundamental para a cicatrização de úlceras gástricas; os autores propuseram que *up-regulation* de COX-2 produz aumento dos níveis séricos de gastrina e seria isso que tornaria a proteção da mucosa mais eficiente, já que este evento desencadeia elevação de outros fatores, como EGF. Os dados encontrados após 14 dias de tratamento com fr-BuOH são condizentes com a literatura; a cicatrização mais rápida do grupo tratado com fr-BuOH é compatível com o aumento nas expressões de COX-2 e EGF.

Sabe-se que PGs exercem papel fundamental na renovação do epitélio gástrico, função endotelial e manutenção de fatores defensivos da mucosa gástrica, assim os dados descritos sobre os modelos agudos tornam-se ainda mais importantes mediante a avaliação

da cicatrização de úlceras no modelo crônico. A possibilidade dos mecanismos antioxidantes produzidos pelos compostos presentes em fr-BuOH serem responsáveis por uma série de respostas envolvidas na atividade anti-úlceras, em especial a indução da síntese de PGE₂, faz com que o mecanismo reparador da mucosa gástrica seja atribuído a este prostanóide. É provável que o cerne da atividade antiulcerogênica de *R. mangle* seja sua evidente ação antioxidante, cujos mecanismos podem ser responsáveis pelo desencadeamento da produção de PGE₂ e participação do NO como fatores fundamentais para a cicatrização de lesão ulcerativa, mediada por COX-2 e EGF.

A cicatrização da mucosa gástrica foi investigada microscopicamente por imunohistoquímica; a presença da proteína HSP-70 nos grupos tratados com lansoprazol e fr-BuOH foi encontrada com maior intensidade (figura 33). Tsukimi e colaboradores (2001) sugeriram que aumento na expressão de HSP-70 está relacionado à aceleração da cicatrização da úlcera gástrica. HSP-70 é um importante membro da família das *heat shock proteins*, também conhecidas como proteínas do estresse, que estão envolvidas em diferentes processos celulares essenciais como síntese e transporte de proteínas. Estes eventos estão relacionados com a proteção das células contra efeitos tóxicos das proteínas agregadas produzidas a partir de agentes estressantes (Konturek *et al.*, 2008).

Observou-se que o tratamento dos animais com fr-BuOH aumentou a expressão de PCNA, sugerindo maior divisão e renovação celular (figura 34). PCNA está associado ao ciclo celular atuando como co-fator para a DNA polimerase delta (Bravo *et al.*, 1987; Prelich *et al.*, 1987 e Nanji & Tahan, 1996), assim, PCNA é essencial para síntese de DNA e, conseqüentemente, intimamente associado à replicação celular, que por sua vez, desempenha papel preponderante na cicatrização de feridas (Tarnawski, 2005). A imunolocalização de COX-2 (figura 35) corrobora análise de expressão da mesma que mostrou-se maior na mucosa gástrica de ratos tratados com fr-BuOH

Apesar do caráter qualitativo da participação destas proteínas na recuperação da mucosa gástrica, os dados obtidos reforçam a idéia de que mecanismos antiulcerogênicos (inibição da secreção ácida e aumento dos fatores protetores) exercem influência benéfica

sobre a rede de processos moleculares promovendo a proliferação celular durante a cicatrização da úlcera gástrica.

Inicialmente, o uso da uma droga padrão (lansoprazol) nos modelos experimentais *in vivo* foi determinado com base em informações prévias acerca dos mecanismos envolvidos na atividade anti-úlcerosa de taninos; como descrito anteriormente, alguns autores sugerem que esta se deva em função da ação anti-secretória desses compostos e especialmente da capacidade antioxidante destes. Assim sendo, buscou-se estabelecer a relevância dos tratamentos disponíveis na terapêutica da úlcera gástrica atualmente e foi verificado que os inibidores protônicos continuam sendo os fármacos de primeira escolha. Fármacos da classe dos inibidores protônicos são potentes agentes anti-úlcerosa que possuem tanto atividade anti-secretória quanto citoprotetora (Ruwart *et al.*, 1984; Okabe *et al.*, 1986; Holm *et al.*, 1988; Bergmann *et al.*, 1992; Kawano *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1995; Murakami *et al.*, 1992; Blandizzi *et al.*, 1999). Dentre mecanismos gastroprotetores desses fármacos usados cronicamente encontram-se aumento da expressão de COX-2, gastrina, EGF e dos níveis de PGE₂. Já foi sugerido que lansoprazol também age reduzindo suscetibilidade da mucosa a danos causados por estresse oxidativo; essa ação ocorreria pela manutenção dos níveis de GSH e redução dos níveis de MDA (malondialdehyde) e 8-iso-PGF_{2α}, indicando redução da peroxidação lipídica (Natale *et al.*, 2004), os autores descartam, entretanto, o envolvimento do NO na gastroproteção.

Com base nestas informações as investigações *in vivo* buscaram estabelecer alguma relação na resposta biológica dos taninos de *R. mangle* com lansoprazol. Uma primeira observação importante, em modelos agudos, foi verificada quanto a dose terapêutica; todas as frações obtidas do extrato bruto das cascas de *R. mangle* mostraram atividade antiulcerogênica em doses inferiores àquela do lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹), sendo que a dose escolhida para o estudo desta atividade é sessenta vezes menor que esta última (0,5 mg.Kg⁻¹). Pode-se verificar que algumas das premissas elencadas na literatura também foram constatadas pelos dados obtidos neste trabalho. Outro aspecto observado está relacionado à atividade antioxidante que os compostos presentes em *R. mangle* apresentaram, modulando compostos e enzimas antioxidantes bem como reduzindo agentes oxidantes; lansoprazol, por sua vez, também demonstrou esta habilidade, mas o fez de forma mais discreta sobre

SOD e MPO. O pré-tratamento com NEM mostrou que tanto lansoprazol quanto *R. mangle* possuem atividade gastroprotetora dependente de GSH; já o pré-tratamento com L-NAME revelou que apenas *R. mangle* tem atividade dependente de NO. No modelo de ligadura do piloro foi verificado que *R. mangle* e lansoprazol foram capazes de aumentar pH do conteúdo gástrico; no entanto, apenas fr-BuOH reduziu significativamente a secreção ácida. Ademais, somente *R. mangle* provocou aumento de muco aderido, além de aumentar a síntese de PGE₂.

Quando a mesma comparação foi feita em modelo de úlcera crônica constatou-se semelhança ambos estes tratamentos na evolução da cicatrização da lesão. O mesmo ocorreu em relação à avaliação de proteínas importantes no processo de cura, tanto os compostos de *R. mangle*, quanto lansoprazol foram eficientes na recuperação da mucosa gástrica macro e microscopicamente; ambos induziram *upregulation* de COX-2, EGF, HSP-70 e PCNA. Todavia, constatou-se que tratamento crônico com os compostos presentes na fr-BuOH de *R. mangle* produziram redução do peso do fígado dos animais, sugerindo possível hepatotoxicidade, o que não ocorreu com lansoprazol.

Assim, os compostos fenólicos presentes em *R. mangle* exercem atividade anti-úlceras semelhante e/ou mais eficaz que lansoprazol, tanto em modelos agudos quanto crônicos apresentando mecanismos de ação semelhantes aos da droga padrão, lansoprazol. Já a atividade antioxidante é bem maior em *R. mangle* do que aquela observada para lansoprazol.

Apontar compostos majoritários como responsáveis por estas atividades não é oportuno diante da diversidade estereoquímica das moléculas envolvidas. Assim, são apontados compostos presentes na fr-BuOH de *R. mangle* como agentes que possuem atividade farmacológica importante tanto para o tratamento de úlceras gástricas, quanto para doenças relacionadas aos processos oxidativos.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos nos modelos experimentais utilizados e levando em conta aquilo que foi discutido até o presente pode-se concluir que:

- ❖ As três frações, fr-Aq, fr-EtOAc, e fr-BuOH possuem taninos como principais constituintes, de acordo com as análises em CCD; os cromatogramas e *fingerprints* do extrato e das frações revelaram que: 1) os procedimentos de extração e fracionamento foram executados com sucesso; 2) composto majoritário da fração aquosa bem como do extrato pode ser um derivado de tanino hidrolisável; 3) composto majoritário da fração acetato de etila é catequina ou epicatequina e 4) composto majoritário da fração butanólica pode ser catequina ou epicatequina heterosídeo.
- ❖ Extrato e frações orgânicas possuem potencial atividade antioxidante demonstrada pela capacidade de reduzir o radical DPPH em modelo *in vitro*; Folin-Ciocalteu revelou que tanto o extrato, quanto frações orgânicas possuem níveis elevados de polifenólicos;
- ❖ fr-BuOH tem atividade antioxidante, cujos mecanismos se dão pela manutenção/modulação dos níveis de GSH, da supressão de MPO e LPO, do aumento da atividade das enzimas GPx, GR e SOD.
- ❖ A fr-BuOH promove gastroproteção dependente de NO e GSH, do aumento de muco aderido e da indução da produção de PGE₂; a cicatrização da úlcera revelou que a administração de fr-BuOH por 14 dias envolve a participação de HSP-70 e PCNA, e aumenta a expressão de COX-2 e EGF.
- ❖ Atividade de fr-BuOH ocorre na dose de 0,5 mg.Kg⁻¹, sessenta vezes menor que aquela do lansoprazol, droga padrão na terapêutica da úlcera péptica.

7. Perspectivas

Este estudo proporcionou o levantamento de muitos dados acerca do que já foi estudado sobre as atividades farmacológicas de *R. mangle*, os resultados corroboram muitos dos trabalhos anteriores.

Os compostos presentes em *R. mangle* são importantes sob vários pontos de vista, tanto a química quanto a farmacologia desses compostos são objetos de novas investigações, a fr-EtOAc será avaliada quanto a sua capacidade de proteger e curar colite experimental, a fr-BuOH foi avaliada neste método e apresentou recuperação significativa. As fr-EtOAc e fr-Aq terão seus mecanismos anti-úlceras continuados em outros trabalhos. A possível hepatotoxicidade será também investigada para se ter maior conhecimento quanto aos benefícios terapêuticos versus efeitos colaterais, estabelecendo níveis seguros desses compostos, uma vez que a eficácia já foi estabelecida. Ainda há necessidade, entretanto, de maior investigação química para garantir ou não a presença das moléculas propostas; análise de ESIMS/MS se faz necessária para identificar os fragmentos obtidos de cada molécula podendo, desta forma, caracterizá-las quimicamente. Além do mais, o conhecimento exato das moléculas presentes nas cascas de *R. mangle* pode colaborar para padronização de métodos de isolamento desses compostos, e sendo este método eficaz, poder-se-á avaliar o potencial farmacológico de cada uma dessas moléculas isoladamente.

Sendo assim, a continuidade do estudo desses compostos pode ser promissora, pois possuem atividades biológicas importantes necessitando de doses muito baixas para tal. Seguindo essa linha, serão estudados os parâmetros de farmacocinética destes compostos, assim, poderemos ter maior conhecimento suas propriedades biológicas e fornecer mais informações a cerca dos taninos e suas aplicações farmacológicas.

8. Referências bibliográficas

1. ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J.I.; FRAGA, C.G. Inhibition of angiotensin converting enzyme by flavanol-rich foods. *J. Agric. Food Chem.*, 54(1): 229-234, 2006.
2. ALANKO, J.; RIUTTA, A.; HOLM, P.; MUCHA, I.; VAPAATALO, H.; METSA-KETELA, T. Modulation of arachidonic metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2): 193-201, 1999.
3. ALARCON-AGUILARA, F. J.; ROMAN-RAMOS, R.; PEREZ-GUTIERREZ, S.; AGUILAR-CONTRERAS, A.; CONTRERAS-WEBER, C.C.; FLORES-SAENZ, J. L. Study of anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2): 101-110, 1998.
4. ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(1): C1-C19, 2005.
5. ANDREOLI, T. E. Physiology in medicine: Free radical and oxidative stress. *The Amer J Med*, 108: 650-651, 2000.
6. ARIGA, T. The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors*, 21(1-4): 197-201, 2004.
7. ARTHUR, M.J.P. Reactive oxygen intermediates and liver injury. *J. Hepatol.*, 6: 125-131, 1989.
8. AUGUSTO, O. Radicais livres bons, maus e naturais. São Paulo/SP, 1ª edição, Editora Oficina de Textos, 115 p., 2006.
9. AVILLA, J. R.; DE LA LASTRA, C. A.; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.*, 45(2): 83-88, 1996.
10. AW, T.Y. Determinants of intestinal detoxication of lipid hydroperoxides. *Free Radical Research*, 28(6): 637-646, 1998.

11. BABBS, C.F. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Rad. Biol. Med.*, 13: 169-181, 1992.
12. BANICK, P. D.; CHEN, Q.; XU, Y. A.; THOM, S. R. Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *J. Cell Physiol*, 172(1): 12-24, 1997.
13. BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 13(8): 584-590, 2006.
14. BECKERT, S.; CLASS, N.; FARRAHI, F.; COERPER, S. Growth hormone enhances gastric ulcer healing in rats. *Med. Sci. Monit.*, 10(8): BR255-BR258, 2004.
15. BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo/SP: EDART, Editora da Universidade de São Paulo, 1976.
16. BERBERIAN, P. A.; MYERS, W.; TYTELL, M.; CHALLA, V.; BOND, M. G. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am. J. Pathol.*, 136(1): 71-80, 1990.
17. BERENQUER, B.; SÁNCHEZ, L. M.; QUÍLEZ, A.; LÓPEZ-BARREIRO, M.; DE HARO, O. GÁLVEZ, J. MARTIN, M. J. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 194-200, 2006.
18. BERGMANN, J.F.; CHASSANY, O.; SIMONEAU, G.; LEMAIRE, M. SEGRESTAA, J.M.; CAULIN, C. Protection against aspirin-induced gastric-lesions by lansoprazole – simultaneous evaluation of functional and morphologic responses. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 52(4): 413-416, 1992.
19. BERGSTROM, S., DANIELSSON, H., SAMUELSSON, B. Enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins + related factors 32. *Biochim. Biophys. Acta*, 90(1): 207-210, 1964.
20. BERSTAD, A. E.; BERSTAD, K.; BERSTAD, A. PH-activated phospholipase A2: an important mucosal barrier breaker in peptic ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 37(6): 738-742, 2002.
21. BJORKMAN, D. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. *Am. J. Med.*, 101(1A): 25S-32S, 1996.

22. BLAKE, D.R.; ALLEN, R.E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems – a review oriented to inflammatory processes. *BR. Med. Bull.*, 43: 371-385, 1987.
23. BLANDIZZI, C.; NATALE, G.; GHERARDI, G.; LAZZERI, G.; MARVEGGIO, C.; COLUCCI R.; CARIGNANI, D.; DEL TACCA, M. Acid-independent gastroprotective effects of lansoprazole in experimental mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 44(10): 2039-2050, 1999.
24. BLANDIZZI, C.; FORNAI, M.; COLUCCI, R.; NATALE, G.; LUBRANO, V.; VASSALE, C.; ANTONIOLI, L.; LAZZERI, G.; DEL TACCA, M. Lansoprazole prevents experimental gastric injury induced by no-steroidal anti-inflammatory drugs through a reduction of mucosal oxidative damage. *World Journal of Gastroenterology*, 11(26): 4052-4060, 2005.
25. BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368(6474) 850-853, 1994.
26. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
27. BRAGANZA, J.M. Towards antioxidant therapy for gastrointestinal disease. *Curr. Med. Lit. Gastroenterol.*, 8: 99-106, 1989.
28. BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P. A.; DONALD-BRAVO, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326(6112): 515-517, 1987.
29. BROWN, J. F.; KEATES, A. C.; HANSON, P. J.; WHITTLE, B. J. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol*, 265(3 Pt 1): G418-G422, 1993.
30. BRZozowski, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; DROZDOWICZ, D. et al. Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. *Microsc. Res. Tech.*, 53(5): 343-353, 2001.
31. BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52: 302-310. 1978.
32. CABEZA, J.; MOTILVA, V.; MARTIN, M. J., DE LA LASTRA, C. A. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sciences*, 68(12) 1405-1415, 2001.

33. CALIXTO, J.B.; YUNES, R. A. (org.). Plantas medicinais sob a ótica da medicina moderna. Chapecó: Editora Universitária Argos, 2001.
34. CARLBERG, I. & MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods in Enzimology*, 113: 484-499, 1985.
35. CERQUEIRA, N. F., HUSSNI, C. A. YOSHIDA, W. B. Pathophysiology of mesenteric ischemia-reperfusion: a review. *Acta Cirurgica Brasileira*, 20: 336-343, 2005.
36. CHAN, F. K.; SUNG, J. J. Role of acid suppressants in prophylaxis of NSAID damage. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 15(3): 433-445, 2001.
37. CHAPMAN, V. J. Mangrove vegetation. J. Cramer, Alemanha, 447p., 1976.
38. CHEN, Y.; ZHOU, M.; LIU, S.X.; LE, Y. PSK protects macrophages from lipoperoxide accumulation and foam cell formation caused by oxidatively modified low-density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 124(2): 171-181, 1996.
39. CORNE, S. J.; MORRISSEY, S. M.; WOODS, R. J. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J. Physiol.*, 242(2): 116P-117P, 1974.
40. CROSS, C.E.; HALLIWELL, B.; BORISH, E.T.; PRYOR, W.A.; AMES, B.N.; SAUL, R.L.; MCCORD, J.M.; HARMAN, D. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, 107: 526-545, 1987.
41. CRYER, B. NSAID gastrointestinal toxicity. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 16(6): 495-502, 2000.
42. CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; DYATMIKO, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80(4): 1144-1152, 1997.
43. CURTIS, G. H.; MACNAUGHTON, W. K.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73(1): 130-134, 1995.
44. DAJANI, E. Z., KLAMUT, M. J. Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update. *Expert Opin. Invest. Drugs*, 9: 1537-1544, 2000.
45. DE ARMAS, E.; SARRACENT, Y.; MARRERO, E.; FERNÁNDEZ, O.; BRANFORD-WHITE, C. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract (RMABE) in the treatment of aphthous ulcers: a pilot study. *Current Medical Research and Opinion*, 21(11): 1711-1715, 2005.

46. DE GROOT, H. Injury to visceral organs by ischemia and reperfusion. Processes in pathogenetic networks. *Zentralblatt Fur Chirurgie*, 130(3): 202-212, 2005.
47. DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology*, 149: 611-623, 2006
48. DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciencia – um guia de estudo interdisciplinar. 1ª edição, São Paulo/SP: Fundação Editora UNESP, 1996.
49. EGÉA, J. C.; HIRTZ, C.; VALCARCEL, J.; DEVILLE DE PÉRIÈRE, D. Epidermal growth factor : a probable oral and digestive health protector. *Pathol. Biol. (Paris)*. 50(10): 608-612, 2002.
50. EL-HABIT, O. H., SAADA, H. N., AZAB, K. S., ABDEL-RAHMAN, M., EL-MALAH, D. F. The modifying effect of β -carotene on gamma radiation-induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in male rats. *Mutat Res*, 466: 179-86, 2000.
51. FARIAS-SILVA, E.; COLA, M.; CALVO, T. R.; BARBASTEFANO, V; FERREIRA, A. L.; MICHELATTO, D. D.; ALVES DE ALMEIDA, A. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antioxidant activity of Indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. *Planta Medica*, 73: 1241-1246, 2007.
52. FAURE, P. & LAFOND, J.L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: *Analysis of free radicals in biological systems*. FAVIER A. E. et al. Eds. Verla Bostonp, p. 237-248, 1995.
53. FERNÁNDEZ, O.; CAPDEVILA, J. Z.; DALLA, G.; MELCHOR, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*, 73: 564-568, 2002.
54. FUKUDA, T.; ARAKAWA, T.; SHIMIZU, Y.; OHTANI, K.; HIGUISHI, K.; KOBAYASHI, K. Effects of lansoprazole on ethanol-induced injury and PG synthetic activity in rat. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 20(2): S5-S7, 1995.
55. GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASINI, T. *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello, 1996, 17p.
56. GERSHMAN, R.; GILBERT, D.L.; NYE, S.W.; DWYER, P.; FENN, W.O. Oxygen poisonig and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119: 623-626, 1954.

57. GRISHAM, M.B. & GRANGER, D.N. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig. Dis. Sci.*, 33: 6S-15S.
58. GUERRA, M.P. & NODARI, P.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões et al., orgs. 5ª ed. Rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora de UFRGS/editor da UFSC, p 13-28, 2004*
59. GUHA, P.; DEY, A.; SARKAR, B.; DHYANI, M.V.; CHATTOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.K. Improved antiulcer and anticancer properties of trans-resveratrol analog in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, (328(3): 829-838, 2009.
60. GUO, J. S.; CHO, C. H.; WANG, J. Y.; KOO, M. W. Expression and immunolocalization of heat shock proteins in the healing of gastric ulcers in rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 37(1): 17-22, 2002.
61. GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.*, 27 (1): 1-93, 2006.
62. GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic.Res.Commun.*, 19(3): 141-158, 1993.
63. GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 41(12): 1819-1828, 1995.
64. HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. 4th edition, Oxford University Press Inc, New York, 851p, 2005.
65. HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M.; The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radical Research*, (33(6): 819-830, 2000.
66. HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11): 2206-2213, 2006.
67. HAMBERG, M., AND SAMUELSSON, B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *PNAS*, 70(3) 889-903, 1973.
68. HAMOS, J. E.; OBLAS, B.; PULASKI-SALO, D.; WELCH, W. J.; BOLE, D. G.; DRACHMAN, D. A. Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology*, 41(3): 345-350, 1991.
69. HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Geront.* 11: 298-300, 1956.

70. HARRIS, M.L.; SCHILLER, H.J.; REILLY, P.M.; DONOWITZ, M.; GRISHAM, M.B.; BULKLEY, G.B. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon? *Pharmac. Ther.*, 53: 375-408, 1992.
71. HASLAM, E. Chemistry of vegetable tannins. London: Academic, 179 p., 1970.
72. HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59: 205-215, 1996.
73. HASLAM, E. The shikimate pathway. New York: J. Wiley, 316 p., 1974.
74. HASLAM, E. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68: 2713-2721, 2007.
75. HAWKEY, C. J.; RAMPTON, D. S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology*, 89(5): 1162-1188, 1985.
76. HERNANDEZ-MUNOZ, R.; MONTIEL-RUIZ, C.;VAZQUEZ-MARTINEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Lab. Invest.*, 80(8): 1161-1169, 2000.
77. HIRAISHI, H.; TERANO, A.; OTA, S.; MUTOH, H.; SUGIMOTO, T.; HARADA, T.; RAZANDI, M.; IVEY, K. J. Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. *Gastroenterology*, 106(5): 1199-1207, 1994.
78. HOGG, N. & KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1411(2-3): 378-384, 1999.
79. HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7): 1027-1031, 2002.
80. HOLM, L. Gastric mucosal blood flow and mucosal protection. *J. Clin. Gastroenterol.*, 10(1): S114-119, 1988.
81. HOOGERWERF, W. A. & PASRICHA, P. J. Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease. *In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. Goodman's & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 11TH edition, McGraw-Hill, International edition, p.1005-1020, 2005.*

82. HUANG KP, HUANG FL. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem. Pharmacol.*, 64:1049-1056, 2002.
83. HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind the antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841-1856, 2005.
84. HUANG, W. Y.; COLTRERA, M.; SCHUBERT, M.; MORTON, T.; TRUELOVE, E. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.*, 78(6): 748-754, 1994.
85. ITO, H.; IGUCHI, A.; HATANO, T. Identification of urinary and intestinal bacterial metabolites of ellagitannin geraniin in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 56(2): 393-400, 2008.
86. IWASAKI, Y. ; MATSUI,T.; ARAKAWA, Y. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in wistar rats. *Journal of Gastroenterology*, 39(9): 831-837, 2004.
87. JADESKI, L. C.; LALA, P. K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am. J. Pathol.*, 155(4): 1381-1390, 1999.
88. JAYATILLEKE, A. & SHAW, S. Stimulation of monocyte interleukin-8 by lipid peroxidation products: a mechanism for alcohol-induced liver injury. *Alcohol*, 16(2): 119-123, 1998.
89. JOHNSON, L. R. & ALPERS, D. H. Physiology of the gastrointestinal tract. L. R. Johnson. 3rd ed. New York: Raven Press, 1283 p., 1994.
90. JOURD'HEUIL, D.; VAANANEN, P.; MEDDINGS, J.B. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am. J. Physiol.*, 264(6): G1009-G1015, 1993.
91. KANWAR, S.; WALLACE, J. L.; BEFUS, D.;KUBES, P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am. J. Physiol.*, 266(2 Pt 1): G222-G229, 1994.
92. KAWAI, T.; JOH, T.; IWATA, F.; ITHO, M. Gastric epithelial damage induced by local ischemia-reperfusion with or without exogenous acid. *Am J Physiol*, 266: 263-270, 1994.
93. KAWANO, S.; MURAKAMI, M.; SAITA, H.; TSUJI, S. Effect of lansoprazole in mono-, dual-, or triple therapy on *Helicobacter pylori* eradication. *Journal of Gastroenterology*, 31(9): 41-43, 1996.

94. KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15: D1-D6, 2000.
95. KITAJIMA, T.; OKUHIRA, M.; TANI, K.; NAKANO, T.; HIRAMATSU, A.; MIZUNO, T.; INOUE, K. Cell proliferation kinetics in acetic acid-induced gastric ulcer evaluated by immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen. *J. Clin. Gastroenterol.*, 17(1): S116-S120, 1993.
96. KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend or foe. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(5): 598-635, 2005.
97. KONTUREK, P. C.; BURNAT, G.; BRZOZOWSKI, T.; ZOPF, Y.; KONTUREK, S. J. Tryptophan free diet delays healing of chronic gastric ulcers in rat. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(2): 53-65, 2008.
98. KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology*, 87: 1344-50, 1984.
99. KRISTJANSSON, G.; HOGMAN, M.; VENGE, P.; HALLGREN, R. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in coeliac patients challenged with gluten and corn. *Gut*, 54(6): 769-774, 2005.
100. KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am. J. Med.*, 109(2): 150-158, 2000.
101. KWIECIÉN, S., BRZOZOWISK, T., KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa damage. *Physiol. Pharmacol.*, 53: 39-50, 2002.
102. KWIECIÉN, S.; BRZOZOWISK, T.; KONTUREK, P. C.; PAWLIK, M. W.; KWIECIÉN, N.; KONTUREK, S. J. Gastroprotection by pentoxifilline against stress-induced gastric damage. Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55: 337-355, 2004.
103. LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, C.A.; MOTILVA, V.; CALERO, M.J.M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1-2): 45-53, 2000.
104. LABORIT, H.; BARON, C.; BERTHOU, J.; DROUET, J.; GERARD, J.; JOUANY, J.M.; NARVAES, C. NIAUSSAT, P.; WEBER, B. Introduction à l'étude des antioxydants et des structures à électrons célibataires en biologie. 2ème partie: étude expérimentales et réanimation métabolique. *Agressologie*, 1: 133-155, 1960.

105. LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWASKI, A. Reviews in basic and clinical gastroenterology. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, 135: 135-141, 2008.
106. LEWIS, D.A. & HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. *Progress Medicinal Chemistry*, 28: 201-231, 1991.
107. LI, D.L.; LI, X.M.; PENG, Z.Y.; WANG, B.G. Flavanol derivatives from *Rhizophora stylosa* and their DPPH radical scavenging activity. *Molecules*, 12(5): 1163-1169, 2007.
108. LIMA, Z.P.; SEVERI, J.A.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.; SOLIS, P.N.; CÁCERES, A.; GIRÓN, L.M. VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1): 29-37, 2006.
109. LOO, A.Y.; JAIN, K.; DARAH, I. Antioxidant activity of compounds from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*, 107(3): 1151-1160, 2008.
110. LOO, A.Y.; JAIN, K.; DARAH, I. Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*, 104(1): 300-307, 2007.
111. MAIE, N.; PISANI, O.; JAFFE, R. Mangrove tannins in aquatic ecosystems: their fate and possible influence on dissolved carbon and nitrogen cycling. *Limnology and Oceanography*, 53(1): 160-171, 2008.
112. MALARA, B.; JOSKO, J.; TYRPIEN, M.; MALARA, P.; STEPLEWSKA, K. Dynamics of changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and angiogenesis in stress-induced gastric ulceration in rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, 56(2): 259-271, 2005.
113. MARRERO, E.; J. SANCHEZ, J.; DE ARMAS, E.; ESCOBAR, A.; MELCHOR, G.; ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.M.; MEGIAS, J.; ALCARAZ, M.J. COX-2 and sPLA(2) inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia*, 77(4): 313-315, 2006.
114. MARTIN, G. R., WALLACE, J. L. Gastrintestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Exp Biol Med*, 231(2): 130-7, 2006.
115. MARTINEZ-LARA, I.; GONZALEZ-MOLES, M. A.; RUIZ-AVILA, I.; BRAVO, M.; RAMOS, M. C.; FERNANDEZ-MARTINEZ, J. A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. *Acta Stomatol. Belg.*, 93(1): 29-32, 1996.

116. MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci.*, 65(2): L27-L32, 1999.
117. MAZZANTI, G.; MENNITI-IPPOLITO, F.; MORO, P.A.; CASSETI, F.; RASCHETTI, R.; SANTUCCIO, C.; MASTRANGELO, S. Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(4): 331-341, 2009.
118. MCCHENEY, J. Natural products: Developing economical and reliable supplies of plant source material. *In: Symposium on Medicinal Plants and Natural Products*, Washington, D.C.1995.
119. MCCORD, J. M., The evolution of free radicals and oxidative stress. *The Amer J Med*, 108: 652-659, 2000.
120. MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244(22): 6049-6055, 1969.
121. MELCHOR, G.; ARMENTEROS, M.; FERNÁNDEZ, O.; LINARES, E.; FRAGAS, I. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*, 72: 689-691, 2001.
122. MILANI, S.; CALABRO, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc. Res. Tech.*, 53(5): 360-371, 2001.
123. MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol. Res.*, 49(4): 441-446, 2000.
124. MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43(2): 109-142, 1991.
125. MORIDANI, M. Y.; SCOBIE, H.; SALEHI, P.; O'BRIEN, P. J. Catechin metabolism: glutathione formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase and cytochrome P450. *Chem. Res. Toxicol*, 14: 841-848, 2001.
126. MORIMOTO, Y., SHIMOHARA, K., OSHIMA, S., & SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jpn. J. Pharmacol.*, 57(4): 495-505, 1991.

127. MOSKAUG, J.O.; CARLSEN, H.; MYHRSTAD, M.C.W.; BLOMHOFF, R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 277S-283S, 2005.
128. MURAKAMI, S.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S. Inhibitory effect of tannic acid on gastric H⁺K⁺-ATPase. *Journal of Natural Products*, 55(4): 513-516, 1992.
129. MYERS, S.I. & HERNANDEZ, R. Role of oxygen-derived free radicals on rat splanchnic eicosanoid production during acute hemorrhage. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 44(1): 25-36, 1992.
130. NAM, S.Y.; KIM, N.; LEE, C.S.; CHOI, K.D.; LEE, H.S.; JUNG, H.C.; SONG, I.S. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(11): 2110-2120, 2005.
131. NANJI, A.A.; TAHAN, S.R. Association between endothelial cell proliferation and pathologic changes in experimental alcoholic liver disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140(1): 101-107, 1996.
132. NATALE, G.; LAZZERI, G.; LUBRANO, V.; COLUCCI, R.; VASSALLE, C.; FORNARI, M.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(1): 62-72, 2004.
133. OGINO, K.; HATANAKA, K.; KAWAMURA, M.; KATORI, M.; HARADA, Y. Evaluation of pharmacological profile of meloxicam as an anti-inflammatory agent, with particular reference to its relative selectivity for cyclooxygenase-2 over cyclooxygenase-1. *Pharmacology*, 55(1): 44-53, 1997.
134. OHKAWA, H., OHISHI, N., & YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95(2): 351-358, 1979.
135. OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models--the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8): 1321-1341, 2005.
136. OKABE, S.; MIYAKE, H.; AWANE, Y. Cytoprotective effects of NC-1300 and omeprazole on HCl-ethanol-induced gastric lesions in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 42(118): 75-76, 1986.
137. OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66(17): 2012-2031, 2005.

138. OO, C. W., PIZZI, A., PASCH, H., KASSIM, M.J. Study on the structure of mangrove polyflavonoid tannins with MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008; 109: 963-967.
139. OTTAVIANI, J.I.; ACTIS-GORETTA, L.; VILLORDO, J.J.; FRAGA, C.G. Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie*, 88(3-4): 359-365, 2006.
140. PAIMELA, H.; GODDARD, P. J.;SILEN, W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Dig. Dis. Sci.*, 40(11): 2495-2496, 1995.
141. PAWLIK, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. W.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T.; CZESNIKIEWICZ, M. et al. Impact of Helicobacter pylori and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on gastric ulcerogenesis in experimental animals and in humans. *Eur. J. Pharmacol.*, 449(1-2): 1-15, 2002.
142. PECHANOVA, O. & SIMKO, F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiological Research*, 56: S7-S16, 2007.
143. PERERA, L.M.S.; RUEDAS, D.; GOMEZ, B.C. Gastric antiulcer effect of Rhizophora mangle L. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1): 1-3, 2001.
144. PFEIFFER, S.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F.;MAYER, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, 118(6): 1433-1440, 1996.
145. PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNAS, J.;HOLM, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282(2): G211-G219, 2002.
146. PICCINELLI, A.L., DE SIMONE, F., PASSI, S. Et al. Phenolic constituents and antioxidant activity of Wendita caiysina leaves (Burrito), a folk Paraguayan tea. *Journal of Agricultural and Foods Chemistry*, 52(19): 5863-5868, 2004.
147. PINCEMAIL, J. Free radical and antioxidants in human diseases. *In: Analysis of free radicals in biological systems. Favier et al.*, (Eds). Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, 1995; 83-98.
148. PINTO, B. M. 1999. V. 3. Carbohydrates and their derivatives including tannins. Cellulose, and related lignins. *In: BARTON, D.; NAKANISHI, K.; METH-COHN, O. Comprehensive natural products chemistry. BPC Wheatons Ltd.*, Glasgow, UK, 827p.

149. PIO-CORRÊA, M. Dicionário da plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Volume 5, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984, 687p.
150. POONAM, D.; VINAY, C.S.; GAUTAN, P. Cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in experimental chronic gastric ulcer healing. *European Journal of Pharmacology*, 519: 277-284, 2005.
151. PRELICH, G.; TAN, C.K.; KOSTURA, M.; MATHEWS, M.B.; SO, A.G.; DOWNEY, K.M.; STILLMAN, B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*, 326(6112): 517-520, 1987.
152. PREMANATHAN, M.; ARAKAKI, R.; IZUMI, H.; KATHIRESAN, K.; NAKANO, M.; YAMAMOTO, N.; NAKASHIMA, H. Antiviral properties of a mangrove plant, *Rhizophora apiculata* Blume, against human immunodeficiency virus. *Antiviral Research*, 44(2): 113-122, 1999.
153. PRIOR, R. L., WU, X. L., SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-4302, 2005.
154. RAHIM, A.A.; ROCCA, E.; STEINMETZ, J.; KASSIM, M.J. IBRAHIM, M.S.; OSMAN, H. Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. *Food Chemistry*, 107: 200-207, 2008.
155. RATES, S.M. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5): 603-613, 2001.
156. REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões *et al.*, orgs. 5ª ed. Rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora de UFRGS/editor da UFSC, 45-89p., 2004.
157. REPETTO, M.G. & LLESUY, S.F.. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(5): 523-534, 2002.
158. ROBERT, A.; RUWART, M. Effect of prostaglandins on the digestive system. In: J. B. Lee. Prostaglandins. New York: Elsevier New York, 1982. p. 113-176.
159. ROIG, J.T. Plantas medicinales, aromaticas e venenosas de Cuba. Editorial *Científica Técnica*, La Havana-Cuba, 1974, 164p.
160. ROKUTAN, K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15: D12-D19, 2000.

161. ROSEN, G.M.; POU, S.; RAMOS, C.L.; COHEN, M.S.; BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.*, 9(2): 200-209, 1995.
162. ROZGA, J. The role of reactive oxygen metabolites in the pathogenesis of ulcerative colitis: a speculative synthesis. *Materia. Med. Pol.*, 21: 263-268, 1989.
163. RUWART, M.J.; NEZAMIS, J.E.; RUSH, B.D.; LANCASTER, C. DAVIS, J.P.; NICHOLS, N.M. OCHOA, R. Timoprazole is a unique cytoprotection agent in the rat. *Digestion*, 30(1): 33-40, 1984.
164. SALIM, A. S. Sulphydryl-containing agents: a new approach to the problem of refractory peptic ulceration. *Pharmacology*, 45(6): 301-306, 1992.
165. SANCHEZ, J. ; MELCHOR, G. ; MARTINEZ, G. ; ESCOBAR, A. ; FAURE, R. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*, 77(2): 141-143, 2006.
166. SANTOS, S. C. & MELLO, J. C. P. Taninos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões *et al.*, orgs. 5^a ed. Rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora de UFRGS/editor da UFSC, 615-656p, 2004.
167. SCHMASSMAN, A.; ZOIDL, G.; PESKAR, B.M.; WASER, B.; SCHMASSMAN-SUHIJAR, D.; GEBBERS, J.O.; REUBI, J.C. Role of the different isoformas of cyclooxygenase and nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in cyclooxygenase-1 and -2 knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 290(4): G747-G756, 2005.
168. SCHOENBERG, M.H., BERGER, H.G. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit. Care Med.*, 1993; 21: 1376-1386.
169. SCHUSTER, B.G. A new integrated program for natural product development and the value of an ethnomedical approach. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7(1): S61-S72, 2001.
170. SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, 23: 197-223, 2005.
171. SENER-MURATOGLU, G.; PASKALOGLU, K.; ARBAK, S.; HURDAG, C.; YANOGLU-DULGER, G. Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 46(2): 318-330, 2001.
172. SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLER, H. A Simple Method for the Uniform Production of Gastric Ulceration in the Rat. *Gastroenterology*, 5(1): 43-61, 1945.

173. SHICHIGO, K.; IHARA, M.; MATSUU, M.; ITO, M.; OKUMURA, Y.; SEKINE, I. Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcerresistant rats. *Dig. Dis. Sci.*, 48(2): 340-348, 2003.
174. SIEPLER, J.K.; MAHAKIAN, K.; TRUDEAU, W.T. Current concepts in clinical therapeutics: peptic ulcer disease. *Clin. Pharm.*, 5(2): 128-142, 1986.
175. SIKIRIC, P.; SEIWERTH, S.; GRABAREVIC, Z.; RUCMAN, R.; PETEK, M.; JAGIC, V.; TURKOVIC, B.; ROTVIC, I.; MISE, S.; ZORICIC, I.; KONJEVODA, P.; PEROVIC, D.; JURINA, L.; SEPAROVIC, J.; HANZEVACKI, M.; ARTUKOVIC, B.; BRATULIC, M.; TISLJAR, M.; GJURASIN, M.; MIKLIC, P.; STANCIC-ROKOTOV, D.; SLOBODNAJAK, Z.; JELOVAC, N.; MAROVIC, A. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N^G-nitro-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *E. J. of Pharmacology*, 332: 23-33, 1997.
176. SIMMONDS, N. J. Free radicals in gastrointestinal and hepatic disease. *In: Immunopharmacology of free radical species*. Blake & Winyard (Eds). Academic Press/Harcourt Brace and Company, London, 1995, 143-182.
177. SMITH, L. A. & RIVERS, A. B. History. *In, peptic ulcer: pain patterns diagnosis and medical treatment*. Appleton-Century-Crofts, New York, 1953, p. 1-10.
178. STARK, M.E. & SZURSZEWSKI, J.H. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology*, 103: 1928-1949, 1992.
179. SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Prog. Lipid. Res.*, 39(4): 289-314, 2000.
180. SZABO, S.; GOLDBERG, I. Experimental pathogenesis: drugs and chemical in the gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.*, 174: 1-8, 1990.
181. TAKARA, K. ; KUNIYOSHI, A. ; WADA, K. ; KINJYO, K. ; IWASAKI, H. Antioxidative flavan-3-ol glycosides from stems of *Rhizophora stylosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(8) : 2191-2194, 2008.
182. TANI, S.; OKUDA, M.; MORISHIGE, R.; TANAKA, T. Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 20(5): 482-485, 1997.
183. TARIQ, M.; ELFAKI, I.; KHAN, H.A.; ARSHADUDDIN, M.; SOBKI, S.; AL MOUTAERY, M. Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 12(36): 5798-5804, 2006.

184. TARNAWSKI, A. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig. Dis. Sci.*, 50(1): S24-S33, 2005.
185. TARNAWSKI, A.; SZABO, I. L.; HUSAIN, S. S.; SOREGHAN, B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factor and signal transduction pathways. *J. Physiol. Paris.*, 95(1-6): p. 337-344, 2001.
186. THOMAS JA, POLAND B, HONZATKO R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 319: 1-9, 1995.
187. TO, K.F.; CHAN, F.K.L. CHENG, A.S.L.; LEE, T.L.; SUNG, J.J.Y. Up-regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in human gastric ulcer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15(1): 24-34, 2001.
188. TORIYABE, M.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenase to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology*, 101(4): 983-990, 2004.
189. TSAPLINA, L.A.; KARATASSO, Y.O.; FILIMONOV, I.S.; VRZHESHCH, P.V. Kinetic mechanism of the bifunctional enzyme prostaglandin-H-synthase. Effect of electron donors on the cyclooxygenase reaction. *Biochemistry-Moscow*, 71(11): 1247-1255, 2006.
190. TSUJI, S.; SUN, W.; TSUJI, M.; KAWAI, N.; KIMURA, A.; KAKIUCHI, Y.; YASUMARU, S.; KOMORI, M.; MURATA, H.; SASAKI, Y.; KAWANO, S.; HORI, M. Lansoprazole Induces Mucosal Protection through Gastrin Receptor-Dependent Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 in Rats. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 303(3): p. 1301-1308, 2002.
191. TSUKIMI, Y. & OKABE, S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24(1): 1-9, 2001.
192. TSUKIMI, Y.; NAKAI, H.; ITOH, S.; AMAGASE, K.; OKABE, S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J.Physiol Pharmacol.*, 52(3): 391-406, 2001.
193. TYTELL, M.; HOOPER, P. L. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert. Opin. Ther. Targets.*, 5(2): 267-287, 2001.
194. TYTGAT, G.N.; RAUWS, E.A. Significance of *Campylobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1(1): 527S-539S, 1986.

195. UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; OYAMADA, H.; TANIGAWA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl*, 162: p. 55-58, 1989.
196. VACCA, L.L. Laboratory manual of histochemistry. New York: Raven Press, 1985.
197. VAN DER VLIET, A. & BAST, A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Rad. Bio. Med.*, 12: 499-513, 1992.
198. VASQUEZ-RAMIREZ, R., OLGUIN-MARTINEZ, M., KUBLI-GARFIAS, C., HERNANDEZ-MUNOZ, R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *World J. Gastroenterol.*, 12(27): 4318-24, 2006.
199. VERSPAGET, H.W.; MULDER, T.P.J.; VAN DER SLUYS VEER, A.; PENA, A.S.; LAMERS, C.H.B.W. Reactive oxygen metabolites and colitis; a disturbed balance between damage and protection. A selective review. *Scand. J. Gastroenterol.*, 26(188): 44-51, 1991.
200. VIJAYAVEL, K.; ANBUSELVAM, C.; BALASUBRAMANIAN, M.P. Free radical scavenging activity of the marine mangrove *Rhizophora apiculata* bark extract with reference to, naphthalene induced mitochondrial dysfunction. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1-2): 170-175, 2006.
201. WADA, K.; KAMISAKI, Y.; KITANO, M.; KISHIMOTO, Y.; NAKAMOTO, K.; ITOH, T. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. *Life Sci.*, 59: 295-301, 1996.
202. WAGNER, H.M., BLADT, S., ZGAINSKI, E. M. Plant Drug Analysis. Springer, Berlin, 1986.
203. WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J.*, 10(7): 731-740, 1996.
204. WALLACE, J. L.; MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp. Biol. Med.*, 226(11): 1003-1015, 2001.
205. WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*, v. 119, n. 2, p. 512-520, 2000.
206. WALLACE, J.L. Building a better aspirin: gaseous solutions to a century-old problem. *British Journal of Pharmacology*, 152(4): 421-428, 2007.

207. WALLACE, J.L. How do NSAIDs cause ulcer disease? *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology*, 14(1): 147-159, 2000.
208. WALLACE, J.L. Recent advances in gastric ulcers therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(6): 573-577, 2005.
209. WALLACE, J.L.; MCKNIGHT, W.; REUTER, B.K.; VERGNOLLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, 119(3): 706-714, 2000.
210. WALLERATH, T.; DECKERT, G.; TERNES, T.; ANDERSON, H.; LI, H.; WITTE, K.; FORSTERMANN, U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106(13): 1652-1658, 2002.
211. WATANABE, T.; CHIBA, T. Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly. *Nippon Rinsho*, 60(8): 1515-1520, 2002.
212. WINTERBOURN, C. C.; HAWKINS, R. E.; BRIAN, M.; CARRELL, R. W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.*, 85(2): 337-341, 1975.
213. WU, M.J., YEN, J.H., WANG, L.S. et al. Antioxidant activity of porcelainberry (*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) (Trautv). *American Journal of Chinese Medicine*, 32(5): 683-693, 2004
214. YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T.; NAKAMURA, Y.; ARAI, M.; MATSUYAMA, K.; IINUMA, S.; YAGI, N.; NAITO, Y.; MIYASAKA, M.; KONDO, M. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.*, 40(11): 2300-2304, 1995.
215. YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; KISHI, A.; TOMII, T.; KANEKO, T.; IINUMA, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; TAKAHASHI, S.; KONDO, M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut*, 34(6): 732-737, 1993.
216. YOUNG, R. A.; ELLIOTT, T. J. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell*, 59(1): 5-8, 1989.