



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITO GASTROPROTETOR E IMUNOMODULADOR DE *Mimosa tenuiflora*
(Willd.) Poir (Fabaceae)**

MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES

RECIFE, PE

2017

MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES

**EFEITO GASTROPROTETOR E IMUNOMODULADOR DE *Mimosa tenuiflora*
(Willd.) Poir (Fabaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Co-orientador: Prof. Dra. Simone do Nascimento Fraga

RECIFE, PE

2017

Catálogo na fonte

Aécio Oberdam

CRB4:1895

R696e Rodrigues, Maria de Fátima.

**Efeito gastroprotetor e imunomodulador de *Mimosa tenuiflora* (Willd.)
poir (Fabaceae) / Maria de Fátima Rodrigues. – Recife: o autor, 2018.**

105 f.; il; 30 cm.

Orientador: Rafael Matos Ximenes.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas.**

Inclui referências, figuras e tabelas.

1. Úlcera péptica. 2. Plantas medicinais. 3. Antimicrobianos. 4
Imunomodulação. I. Ximenes, Rafael Matos (orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 059)

MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES

EFEITO GASTROPROTETOR E IMUNOMODULADOR DE *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Fabaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 27/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Presidente - Avaliador interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dra. Simone do Nascimento Fraga (Avaliador externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar (Avaliador externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (Suplente interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dra. Alexandre Gomes da Silva (Suplente externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

***Dedico a minha querida Rebeca Luísa,
minha fonte de inspiração e amor
incondicional.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua presença constante em minha vida, amparo e consolo nos dias difíceis, e amor e doçura nos dias bons.

A minha filha Rebeca, o meu grande amor, por quem tenho lutado todos os dias em busca de tranquilidade e conforto.

Aos meus pais, Severino e Maria, por todo amor, suporte e compreensão diante situações tão difíceis.

A minha irmã, Gabriely, por todas as discussões construtivas.

Aos meus queridos avós, Raminha, Rita e Mariano, por todo aprendizado e amor proporcionado.

A minha segunda família: Tia Nete, Waltinho, Flavinho, e minha irmã do coração, Bela, por todo suporte e amor, vocês foram fundamentais.

Ao meu orientador, prof. Rafael Ximenes, pela paciência, confiança, compreensão e orientação durante esses dois anos, meu muito obrigado, por todo aprendizado.

A minha co-orientadora, prof. Simone Fraga, pela confiança, companheirismo e orientação, nada disso seria possível sem sua colaboração.

A prof. Cristiane Moutinho, por todo apoio na pesquisa e pelos grandes ensinamentos obtidos.

Aos meus amigos do Laboratório de Etnofarmacologia Aplicada – LEA, pelo companheirismo e pelas lutas travadas juntos, sem vocês eu não teria conseguido. Em especial ao Soldado (Wellinton) amigo que se tornou um irmão, à minha querida Camila, sem sua alegria tudo seria mais difícil, e a Raudiney por toda confiança e incentivo.

A minhas amigas, Silvia, Andréa, Joyce Mello, Iza, Rafa, John, Joyce Santos e Vera, pela compreensão diante muitas ausências.

A todos do laboratório BIOFORMATOX pela colaboração nos experimentos.

Ao CNPq, FACEPE e CAPES pelo auxílio e apoio concedido, de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

*'A sua estrada é somente sua.
Outros podem acompanhá-la,
Mas ninguém pode andar por você.'*

Rumi.

RESUMO

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir (Fabaceae) é uma planta nativa do Nordeste brasileiro, conhecida popularmente como Jurema Preta. Ela é amplamente utilizada na medicina popular no tratamento de queimaduras, gastrite, úlceras da pele e inflamações. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana, gastroprotetora e imunomodulatória do extrato aquoso de *M. tenuiflora* como indicativo da possível atividade gastroprotetora e cicatrizante da planta. A avaliação fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando sistemas e reveladores específicos e através da dosagem de compostos fenólicos e flavonoides. O potencial antioxidante *in vitro* do extrato foi analisado por redução de íons metálicos, no caso, a atividade antioxidante total (ATT), redução do íon férrico (FRAP), sequestro dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina) -6-sulfonato). A atividade gastroprotetora foi analisada em modelos ulcerogênicos induzidos por etanol, etanol/HCL, anti-inflamatórios não esteroidais e ácido acético. As respostas imunomodulatórias foram analisadas pelo ensaio de citotoxicidade, proliferação celular e dosagens de citocinas. A prospecção fitoquímica revelou a presença de flavonoides, taninos hidrolisáveis, proantocianidinas e leucoantocianidinas. O extrato apresentou atividade antioxidante e antimicrobiana, bem como atividade gastroprotetora nos modelos estudados. No modelo agudo de etanol, os resultados expressos em índices de lesões ulceradas nas doses testadas correspondeu a: EAMt 50 mg/kg, 63%; EAMt 100 mg/kg, 61% e EAMt 200 mg/kg, 27%. A dose de 200 mg/kg foi escolhida para seguir a avaliação da atividade gastroprotetora. No modelo agudo de Etanol/HCL, o índice de lesão ulcerada foi 51%. O EAMt também exibiu atividade cicatrizante no modelo ulcerogênico crônico, apresentando índice de lesão ulcerada de 10%. Nos ensaios imunológicos, os resultados mostraram que *M. tenuiflora* não induziu apoptose ou necrose celular e o EAMt foi capaz de estimular a resposta celular *in vitro* e *in vivo*, produzindo citocinas como IL-10, IL-6, INF- γ e TNF- α , caracterizando um perfil anti-inflamatório com caráter de resolução pró-cicatrizante. Em conclusão, o extrato aquoso das entrecasas de *M. tenuiflora* apresentou atividade antioxidante, antimicrobiana, gastroprotetora e cicatrizante, resultados que indicam a possível eficácia do uso popular desta espécie como gastroprotetor e cicatrizante.

Palavras-Chave: Úlcera péptica. Plantas Medicinais. Antimicrobianos. Imunomodulação.

ABSTRACT

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir (Fabaceae) is a plant native to the Brazilian Northeast, popularly known as Jurema Preta. She is widely used in folk medicine in the treatment of burns, gastritis, skin ulcers, and inflammation. The aim of this study was to evaluate the antioxidant, antimicrobial, gastroprotective, and immunomodulatory activity of the aqueous extract of *M. tenuiflora* as an indicative of the possible gastroprotective and healing activity of the plant. Phytochemical evaluation was performed by thin-layer chromatography (TLC) using specific systems and developers, and by the dosage of phenolic compounds and flavonoids. The *in vitro* antioxidant potential of the extract was analyzed by reduction of metal ions, in this case, total antioxidant activity (ATT), ferric ion reduction (FRAP) radical scavenging of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonate). The gastroprotective activity was analyzed in ulcerogenic models induced by ethanol, ethanol/HCL, NSAID and acetic acid. Immunomodulatory responses were analyzed by cytotoxicity, cell proliferation, and cytokine measurement. Phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, hydrolysable tannins, proanthocyanidins, and leucoanthocyanidins. The extract presented antioxidant and antimicrobial activities, as well as gastroprotective activity in the studied models. In the acute ethanol model, the results expressed as index of ulcer lesions at the doses tested corresponded to: EAMt 50 mg/kg, 63%; EAMt 100 mg/kg, 61 % and EAMt 200 mg/kg, 27%. The dose of 200 mg/kg was chosen to follow the gastroprotective models. In the acute Ethanol/HCL model, the index of ulcer lesions was 51%. EAMt also showed healing activity in the chronic ulcerogenic model, presenting an index of ulcer lesions of 10%. In immunological assays, the results showed that *M. tenuiflora* did not induce apoptosis or cell necrosis and EAMt was able to stimulate cellular response *in vitro* and *in vivo*, producing cytokines such as IL-10, IL-6, INF- γ and TNF- α , characterizing an anti-inflammatory profile with a pro-healing resolution character. In conclusion, the aqueous extracts of *M. tenuiflora* were characterized by antioxidant, antimicrobial, gastroprotective and healing activity, indicating the potential efficacy of the popular use of this species as a gastroprotector and wound healer.

Keywords: Peptic Ulcer. Plants Medicinal. Anti-Infective Agents. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismos regulatórios da secreção ácida na célula parietal	26
Figura 2 -	Espécime de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poer (Fabaceae)	37
Figura 3 -	Processo de extração das entrecascas de <i>M. tenuiflora</i>	42
Figura 4-	Teste de difusão em disco de papel	47
Figura 5-	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	48
Figura 6-	Desenho experimental das úlceras gástricas induzidas por etanol	50
Figura 7-	Desenho experimental das úlceras gástricas induzidas por etanol/ HCL	51
Figura 8-	Desenho experimental das úlceras gástricas induzidas por AINE	52
Figura 9-	Desenho experimental das úlceras gástricas induzidas por ácido acético 20%	53
Figura 10-	Desenho experimental da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção	54
Figura 11-	Efeito do extrato aquoso de <i>M. tenuiflora</i> (EAMt) e do Lanzoprazol sobre lesões gástricas induzidas por etanol 100% em camundongos	60
Figura 12-	Estômagos de camundongos pré-tratados v.o. com solução salina 0,9 % (A), Lanzoprazol 30 mg/kg (B), EAMt 50 mg/kg (C), EAMt 100 mg/kg (D), EAMt 200 mg/kg (E). (Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto)	69

- Figura 13-** Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e do Lanzoprazol sobre lesões gástricas induzidas por Etanol 100% em camundongos 70
- Figura 14-** Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e do Lanzoprazol sobre lesões gástricas induzidas por Etanol/HCL 0,3 M em camundongos 73
- Figura 15-** Efeito de extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e da Cimetidina sobre lesões gástricas induzidas por AINE em camundongos 74
- Figura 16-** Efeito de extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e da Ranitidina sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético 20% em camundongos 76
- Figura 17-** Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e da ranitidina sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético 80% em camundongos. Cortes na coloração de hematoxilina e eosina (HE) (A-C) 77
- Figura 18-** Efeito gastroprotetor de EAMt e da carbenoxolona após o tratamento com NEM, inibidor dos grupamentos sulfidrílicos, nas úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos 80
- Figura 19-** Estômagos de camundongos sem bloqueador, tratados com: (A) salina; B) carbenoxolona; (c) EaMt. Com bloqueador, tratados com: (D) salina; (E) carbenoxolona e (F)EAMt. Todos as úlceras foram induzidas por etanol absoluto 80
- Figura 20-** Teste de morte celular em células do baço de camundongo utilizando anexina V e iodeto de propídio 83

Figura 21-	Atividade proliferativa induzida pelo EAMt nos grupos experimentais	85
Figura 22-	A produção de IL-4, IL-6 e TNF- α induzidas, in vitro (Grupo I), in vitro e in vivo (Grupo II) pelo estímulo de EAMt	87
Figura 23-	A produção de IL-10 e INF- γ induzidas in vitro e in vivo (Grupo II) pelo estímulo de EAMt	87
Figura 24-	A produção de IL-6 e TNF- α induzidas in vivo (Grupo III) pelo estímulo de EAMt	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sistemas e reveladores utilizados na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada.	43
Tabela 2 -	Caracterização fitoquímica do extrato aquoso de <i>M. tenuiflora</i> .	59
Tabela 3 -	Atividades antioxidantes do extrato de <i>M. tenuiflora</i> .	62
Tabela 4-	Análise da atividade antimicrobiana do extrato de <i>M. tenuiflora</i> frente a bactérias Gram-positivas, Gram negativas, álcool-ácido resistentes e a leveduras, pelo método de difusão de disco.	65
Tabela 5-	Atividade antimicrobiana do extrato aquoso das entrecascas de <i>M. tenuiflora</i> frente à cepas de isolados clínicos multiresistentes de <i>S. aureaus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .	67
Tabela 6-	Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato aquoso das entrecascas de <i>M. tenuiflora</i> frente à cepas de isolados clínicos de <i>S. aureaus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA –	Ácido araquidônico
Abs –	Absorbância
ABTS –	(2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina) -6-sulfonato)
AC –	Adenilato ciclase
ACh –	Acetilcolina
AINES –	Antinflamatórios não-esteroides
ALU –	Área de lesão ulcerativa
AMPc –	Adenosina 3',5' monofosfato-cíclico
ANOVA –	Analysis of Variance (Análise de variância, inglês)
ATT –	Atividade antioxidante total
BabA –	Adesina de antígeno do grupo sanguíneo
bFGF –	Fator básico de crescimento de fibroblastos
BHT –	Hidroxitolueno butilado
CBA –	Cytometric Bead Array
CCD –	Comatografia em camada delgada
CCD –	Cromatografia em camada delgada
CCK 2 –	Colecistoquinina 2
CE50 –	Concentração eficiente de inibição 50%
CFSE –	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMB –	Concentração bactericida mínima
CMI –	Concentração inibitória mínima
COX –	Cicloxygenase
COX-1 –	Cicloxygenase-1
COX-2 –	Cicloxygenase-2
DPBS –	Solução salina tamponada com fosfato
DPPH –	2,2- difenil-1-picrilhidrazil
E.P.M. –	Erro padrão da média.
EAMt –	Extrato aquoso de mimosa tenuiflora
ECL –	Células enterocromafins
EGF –	Fator de crescimento epidérmico
EGF-R –	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EROs –	Espécies Reativas de Oxigênio
et al. –	e outros; e colaboradores (latim, abrev. de et alii)
FITC –	Isotiocianato de fluoresceína
FRAP –	Redução do íon férrico
g –	Grama(s)
h–	Hora(s)
<i>H. pylori</i> –	<i>Helicobacter pylori</i>
IL- 13 –	Interleucina 13
IL-1 –	Interleucina 1
IL-10 –	Interleucina 10
IL-1 β –	Interleucina 1beta
IL-2 –	Interleucina 2

IL-4 –	Interleucina 4
IL-5 –	Interleucina 5
IL-6 –	Interleucina 6
IL-8 –	Interleucina 8
ILU–	Índice de lesão ulcerativa
INF- γ –	Interferon gama
iNOS –	Óxido nítrico-sintase induzível
Kg–	Quilograma(s)
LTC4 –	Leucotrienos C4
mg–	Miligrama(s)
mgEAG–	Miligrama de equivalente de ácido gálico
mgEQ–	Miligrama de equivalente de quercetina
NEM –	N-etilmaleimida
NK –	Células natural killer
Nm –	Nanômetro
NO –	Óxido nítrico
NOS –	Óxido nítrico sintase
OipA –	Adesina de proteína inflamatória externa
PBS –	Tampão fosfato salino
PGI ₂ –	Prostaglandinas PGI ₂
PHA –	Fitohemaglutinina
PI –	Propídio
PKA –	Proteína quinase A
PLA ₂ –	Fosfolipase A ₂
PNPIC –	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SRL –	Sequestro de radicais livre.
SUS –	Sistema Único de Saúde SUS
TEAC –	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TGF β –	Fator de transformação do crescimento beta
TGF β ₁ –	Fator de transformação do crescimento beta 1
TGI –	Trato gastrointestinal
TNF α –	Fator de necrose tumoral-alfa
TPTZ–	2,4,6-tripiryridyl-s-triazine
TXA ₂ –	Tromboxano A ₂
VEGF –	Fator de crescimento endotelial vascular
VIP –	Peptídeo intestinal de vasoativo VIP
α –	Alfa
β –	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1	Anatomia Funcional do Estômago	22
3.2	Mecanismos Regulatórios da Secreção Ácida	24
3.3	Fatores Protetores da Mucosa Gástrica	26
3.4	Úlcera Péptica	29
3.5	Terapêutica da Úlcera Gástrica	31
3.6	Plantas Medicinais	33
3.6.1	Família Fabaceae	34
3.6.2	Gênero <i>Mimosa</i>	35
3.6.3	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir	36
3.7	Citocinas e Óxido Nítrico no Processo de Cicatrização da Úlcera Gástrica	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Coleta do Material Botânico	41
4.2	Extração do Material vegetal	41
4.3	Caracterização Fitoquímica	42
4.4	Dosagens de Fenóis Totais	43
4.5	Dosagens de Flavonóides	44
4.6	Atividades Antioxidantes <i>in vitro</i>	44
4.6.1	Sequestro de Radicais Livres pelo DPPH•	44
4.6.2	Inibição pelo Radical Livre ABTS (2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)	45
4.6.3	Atividade Antioxidante Total (ATT)	45
4.6.4	Redução do Íon Férrico – FRAP	46
4.7	Atividade Antimicrobiana	46
4.7.1	Teste de Difusão em Disco	47

4.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI) e da Concentração Bactericida Mínima (CMB)	48
4.8 Animais	49
4.9 Avaliação Da Atividade Gastroprotetora	49
4.9.1 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol	49
4.9.2 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol/HCL	50
4.9.3 Úlcera Gástrica Induzida por Anti-inflamatório não-esteróide	51
4.9.4 Úlcera Gástrica Crônica Induzida por Ácido Acético	52
4.10 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidrílicos na Gastroproteção	53
4.11 Atividades Imunomodulatórias	54
4.11.1 Isolamento dos Esplenócitos	54
4.11.2 Avaliação da Citotoxicidade através dos Ensaio de Viabilidade Celular	55
4.11.3 Dosagens de Citocinas em Esplenócitos de Camundongos	56
4.11.4 Ensaio de Proliferação com Carboxifluoresceína Succinimidil Éster (CFSE)	56
4.12 Análise Estatística	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Caracterização Química	59
5.1.1 Prospecção Fitoquímica	59
5.1.2 Teor de Fenóis Totais	61
5.1.3 Teor de Flavonóides	61
5.2 Atividades Antioxidantes <i>in vitro</i>	62
5.3 Atividade Antimicrobiana	64
5.4 Atividades Gastroprotetoras	68
5.4.1 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Absoluto	68
5.4.2 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol/ HCL	72
5.4.3 Úlcera Gástrica Induzida por Anti-inflamatório Não-esteróide	73
5.4.4 Úlcera Gástrica Crônica Induzida por Ácido Acético	75
5.5 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidrílicos na Gastroproteção	79
5.6 Atividades Imunomodulatórias	82
5.6.1 Avaliação da Citotoxicidade através do Ensaio de Viabilidade Celular	82

5.6.2	Ensaio de Proliferação Celular com CFSE	84
5.6.3	Dosagens de Citocinas em Esplenócitos de Camundongos	85
6	CONCLUSÃO	90
7	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática milenar embasada no conhecimento empírico de suas propriedades, constituindo um conjunto de saberes e práticas reconhecidos como parte da medicina tradicional pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002.). As plantas medicinais são consideradas fontes promissoras de produtos naturais por apresentarem importantes substâncias bioativas com potencial terapêutico (CORADIM; SIMINSKI; REIS, 2011).

O Brasil, devido a seu vasto território e sua rica biodiversidade apresenta um amplo potencial medicinal a ser explorado. Em destaque, a região Nordeste possui uma forte cultura popular de utilização da plantas medicinais. Entretanto, apesar do vasto conhecimento sobre essas espécies, apenas um pequeno percentual tem sido estudadas (RODRIGUES; DI SIMONI, 2010).

A família *Fabaceae*, representa a terceira maior família dentre as Angiospermas, compreendendo 727 gêneros e cerca de 20.000 espécies, com distribuição cosmopolita (LEWIS et al., 2005). O gênero *Mimosa* L. constitui o segundo maior grupo dessa família, sendo encontrado em florestas, campos, savanas, caatingas e regiões desérticas e amplamente distribuídos na América do Sul (Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina) e no Centro – Sul do México (LAVIN, 1992).

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir, conhecida popularmente como Jurema Preta, é uma espécie nativa do Nordeste Brasileiro, tem como domínios fitogeográficos a Caatinga e o Cerrado, ocorrendo também no México e na Venezuela. Essa espécie é amplamente utilizada na medicina popular, no tratamento de queimaduras, acnes e lesões da pele, além de possuir uma grande capacidade de produção de estacas e lenha, fornecendo materiais para construções (CRUZ et al., 2016; MAIA, 2004).

Dos estudos realizados com esta espécie, algumas atividades biológicas têm sido relatadas, atribuindo assim à *M. tenuiflora* a atividade cicatrizante (RIVERA-ARCE, 2007), antimicrobiana (VALENCIA-GOMEZ, 2016), anti-inflamatória (NASCIMENTO et al.; CRUZ et al., 2016), neutralizante e anti-inflamatória em modelo de envenenamento por *Tityus serrulatus* (BITENCOURT et al., 2014).

A úlcera gástrica indica uma área de lesão na mucosa do estômago ou duodeno causada pelo desequilíbrio entre fatores protetores e agressores da mucosa. Estas lesões são resultantes da hipersecreção gástrica associada ao desequilíbrio fisiológico entre hormônios gástricos, do uso exacerbado de anti-inflamatórios não-esteroides, uso abusivo de álcool, estresse e infecções bacterianas. Esse processo patológico apresenta taxas de incidência na população mundial de 0,1 – 0,3 % e de prevalência de 5 – 10 % ao ano. (SCHUBERT, 2014).

Os tratamentos clínicos para a úlcera gástrica são baseados em fármacos inibidores da bomba de prótons, antagonistas dos receptores H₂, antiácidos e anticolinérgicos. Apesar de sua eficácia comprovada, os fármacos utilizados nesses tratamentos apresentam altas taxas de recidiva de úlcera, bem como efeitos colaterais indesejáveis. Novas buscas para o tratamento dessa patologia tem sido amplamente estudadas, e neste contexto, as plantas medicinais constituem uma alternativa eficaz, uma vez que são portadoras de substâncias com propriedades terapêuticas (ALBUQUERQUE et al., 2014; KANGWAN et al., 2014).

Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, gastroprotetora e imunomodulatória do extrato de *M. Tenuiflora*, a fim de demonstrar os possíveis benefícios proporcionados por esta espécie no tratamento de úlceras gástricas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito gastroprotetor e perfil imunomodulador de *Mimosa tenuiflora*.

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar e extrair as entrecascas de *M. tenuiflora*;
- Realizar a prospecção fitoquímica e determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides dos extrato aquoso de *M. tenuiflora*;
- Determinar a atividade antioxidante do extrato por diferentes métodos químicos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato contra microrganismos padrões e isolados clínicos;
- Investigar a atividade gastroprotetora e cicatrizante do extrato em camundongos por meio de diferentes modelos ulcerogênicos em camundongos;
- Investigar o efeito imunomodulador do extrato aquoso de *M. tenuiflora*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Anatomia Funcional do Estômago

O sistema digestório dispõe de estruturas especializadas para desempenhar diversas funções, tais como ingestão, secreção, mistura e propulsão, digestão, absorção de alimentos e eliminação de resíduos. Ele é constituído pelo trato gastrointestinal (TGI) e órgãos acessórios da digestão (glândulas salivares, pâncreas, fígado e vesícula biliar). O TGI compreende: cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso (TORTORA; DERRICKSON, 2014).

O estômago corresponde a uma porção dilatada do TGI, com posição anatômica disposta inferiormente ao diafragma, situado no epigástrio e no hipocôndrio esquerdo. Ele é responsável pelo armazenamento, mistura do alimento com as secreções gástricas (enzimas e hormônios) e esvaziamento gradativo no intestino delgado. Em termos anatômicos, é dividido em quatro regiões: a cárdia, região que envolve a abertura superior do estômago; o fundo, situado superior e à esquerda da cárdia; o corpo, correspondente à parte central e o piloro, região que conecta o estômago ao duodeno (SOYBEL, 2005; TORTORA; DERRICKSON, 2014).

A anatomia fisiológica da parede do TGI é composta por quatro camadas: serosa, camada mais externa constituída por células mesoteliais escamosas; muscular lisa, com uma camada muscular longitudinal externa e uma circular interna; submucosa, constituída por tecido conjuntivo frouxo com fibrilas de colágeno e elastina e mucosa, camada mais interna composta por epitélio, lâmina própria e lâmina muscular da mucosa (BERNE & LEVY, 2009; SOYBEL, 2005).

As funções secretoras do TGI são desempenhadas por glândulas secretoras, que desempenham funções primárias, como secreção de enzimas digestivas e secreção de muco para lubrificação e proteção de todo o TGI. Diferentes tipos de glândulas sintetizam diversos tipos de secreções ao longo do TGI, como por exemplo as glândulas mucosas de célula única (células caliciformes), localizadas na superfície do epitélio, são responsáveis pela secreção de muco para lubrificar e proteger as superfícies do TGI; as glândulas tubulares profundas, responsáveis pela secreção de

ácido e pepsinogênio no estômago; e as glândulas complexas – o fígado, o pâncreas e as glândulas salivares - que produzem secreções para emulsificação dos alimentos e para digestão (ISACKSON & ASHLEY, 2011).

As secreções glandulares do trato alimentar são reguladas por diferentes tipos de estímulos a estimulação epitelial pelo contato direto do alimento com a mucosa, ativando assim o sistema nervoso entérico; a estimulação autônoma da secreção ou a estimulação pelos hormônios gastrointestinais, regulando o volume e as características químicas das secreções (SCHUBERT & PEURA, 2008).

A mucosa gástrica possui, além de células secretoras de muco, dois tipos importantes de glândulas do tipo tubulares, as glândulas oxínticas (parietais) e as glândulas pilóricas. Localizadas na região do antro e do fundo do estômago, as glândulas oxínticas são formadoras de ácido e responsáveis por secretarem ácido clorídrico (HCl), pepsinogênio, fator intrínseco e muco. As glândulas pilóricas, localizadas na região do antro no estômago, secretam o hormônio gastrina e principalmente muco para proteção da mucosa pilórica frente ao ácido gástrico (DEFONESKA & KAUNITZ, 2010).

As glândulas oxínticas são compostas por três tipos de células, as células mucosas do cólon, que secretam muco; as células principais, que secretam pepsinogênio e as células parietais, que secretam HCl e o fator intrínseco. As glândulas pilóricas são constituídas basicamente por células mucosas, poucas células pépticas e pouquíssimas células parietais. As células mucosas secretam pequenas quantidades de pepsinogênio, e grandes quantidades de muco, auxiliando na lubrificação e proteção da parede gástrica pelas enzimas digestivas. Além dessas secreções, glândulas pilóricas liberam também o hormônio gastrina, que atua no controle da secreção gástrica (SCHUBERT; PEURA, 2008).

As células parietais das glândulas oxínticas, quando estimuladas, liberam uma solução ácida composta por 160 mmol/L de HCl a um pH extremamente ácido de 0,8. A secreção de HCl auxilia a digestão das proteínas e a absorção de ferro, cálcio e vitamina B-12, como também previne o crescimento excessivo de bactérias e a infecção entérica. A regulação do ácido é mediada por vias neuronais, hormonais e parácrinas, a fim de que o equilíbrio entre fatores protetores e agressores da mucosa

seja alcançado. A ativação dessas vias pode ocorrer através de estímulos cerebrais ou estímulos do estômago (SCHUBERT, 2014; SCHUBERT & PEURA, 2008).

As células mucosas e pépticas das glândulas gástricas secretam e ativam o pepsinogênio. Logo quando secretado, o pepsinogênio não possui ação digestiva. Porém, em contato com o HCl, ele é clivado em pepsina ativada, que atua como enzima proteolítica em baixo pH. Tanto o HCl, quanto a pepsina são altamente necessários para digestão das proteínas no estômago. O fator intrínseco, secretado juntamente com o HCL pelas células parietais, é essencial para absorção da vitamina B-12 no íleo (SCHUBERT, 2014).

3.2 Mecanismos Regulatórios da Secreção Ácida

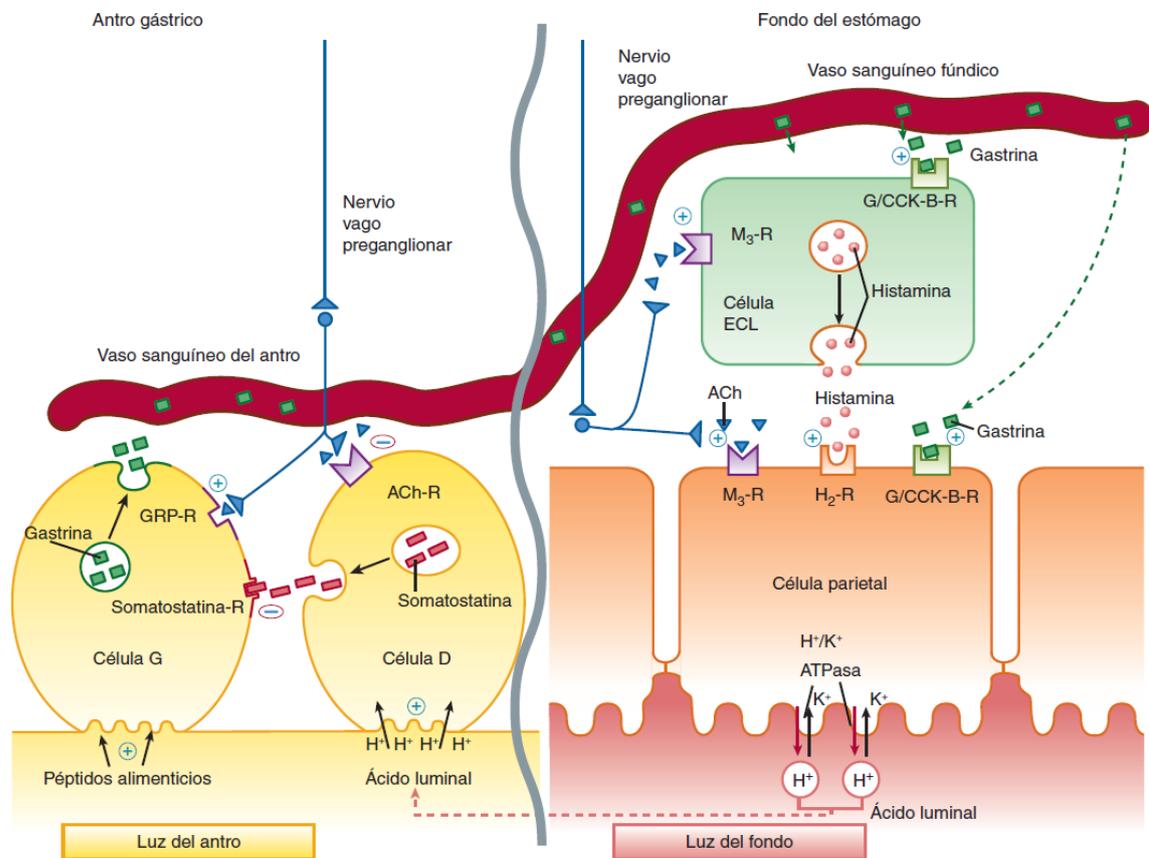
A secreção ácida tem como principais mediadores regulatórios, a histamina (via parácrina), liberada pelas células semelhantes às enterocromafins (células ECL) e localizadas na submucosa; a gastrina (via hormonal), liberada pelas células G e localizadas nas glândulas pilóricas no estômago distal; e a acetilcolina (ACh) (via neurócrina), liberada a partir de neurônios entéricos pós- ganglionares, como mostrado na figura 1 (BIGHETTI; ANTONIO; CARVALHO, 2002).

A histamina é uma amina básica formada por descarboxilação da L-histidina pela histidina descarboxilase. Em nível celular, é encontrada em mastócitos e basófilos, sendo liberada pelas células ECL das glândulas oxínticas e por mastócitos da lâmina própria. Atuando através de mecanismos parácrinos, quando liberada, difunde-se pelos espaços intercelulares até alcançarem as células parietais. Esse mediador atua em receptores acoplados à proteína G, receptores do tipo H₁, H₂, H₃ e H₄. Quando acoplado aos receptores do tipo H₂, a adenilato ciclase (AC) é estimulada, aumentando a concentração intracelular de adenosina 3',5' monofosfato-cíclico (AMPC). O AMPC ativa a proteína-quinase dependente de AMPC (PKA), que por sua vez, fosforila e ativa a H⁺/K⁺-ATPase. Essa fosforilação permite a saída de H⁺ para o lume gástrico (BIGHETTI; ANTONIO; CARVALHO, 2002; SCHUBERT, 2014; RANG & DALE, 2011).

A gastrina, um hormônio secretado pelas células da gastrina (células G) na região do antro do estômago, constitui o principal estimulante da secreção ácida durante a ingestão das refeições. Pode ser secretada em duas formas peptídicas uma forma grande contendo 34 aminoácidos, nomeada G-34, e uma forma menor, contendo 17 aminoácidos, G-17. Sendo esta última a que ocorre com maior frequência. A medida que as proteínas oriundas dos alimentos atingem a região do antro do estômago, ocorre a estimulação das células G à liberar gastrina no sangue, para que esta seja transportada para as células ECL do estômago, consistindo a principal via de liberação deste hormônio. A gastrina tem alta afinidade pelos receptores de colecistocinina 2 (CCK 2) acoplados à ativação da fosfolipase C e à liberação de Ca^{2+} intracelular, presentes nas células ECL. Após esta ativação, o resultado é a síntese e secreção da histamina, que irá agir diretamente nas glândulas das células oxínticas, estimulando a secreção do HCl. Uma via secundária para liberação do ácido pela gastrina ocorre através da ativação direta da gastrina sobre as células parietais. Sendo necessário, nesse caso, que as concentrações de AMPc estejam acima do limiar (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014; SCHUBERT & PEURA, 2008).

A acetilcolina (ACh) é liberada a partir de neurônios colinérgicos pós-ganglionares. Por estimulação parassimpática, estimula a secreção de HCl pelas células parietais, secreção de muco pelas células da mucosa e de pepsinogênio pelas células pépticas. A ACh estimula diretamente a célula parietal, ligando-se aos receptores muscarínicos M_3 , os quais ativam a fosfolipase C, com subsequente produção de trifosfato de inositol (IP_3) e liberação de Ca^{2+} intracelular, este por sua vez, estimula as proteinoquinases, que promovem a secreção de HCl a partir de uma H^+/K^+ -ATPase na superfície celular. Através da ligação da ACh aos receptores nas células ECL, é possível a estimulação e liberação da histamina, resultando na secreção de ácido pela H^+/K^+ -ATPase. Indiretamente, a ACh estimula a secreção de HCl através da ativação de receptores M_2 e M_4 em células D acopladas a inibição da secreção de somatostatina (RANG & DALE, 2011; SCHUBERT, 2014; HALL, 2011).

Figura 1- Mecanismos regulatórios da secreção ácida na célula parietal.



Fonte: KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014.

3.3 Fatores Protetores da Mucosa Gástrica

A mucosa gástrica precisa manter sua integridade estrutural através de mecanismos de defesa, para isso, o estômago desenvolveu diversos mecanismos de proteção. Esses mecanismos citoprotetores conferem resistência às células gástricas e limitam o acesso dos agentes agressores às mesmas. Entre os principais agentes citoprotetores destacam-se, a secreção de muco, de bicabornato, de ácido, as prostaglandinas e o óxido nítrico (BIGHETTI; ANTONIO; CARVALHO, 2002).

Na superfície epitelial da mucosa gástrica existe uma camada protetora de muco, composta por água, eletrólitos, glicoproteínas, peptídeos e lipídeos. Essa

camada de muco tem a capacidade de permitir o fácil deslizamento do alimento pelo TGI e de evitar danos escoriativos ou químicos ao epitélio, mais também atua como barreira de difusão do ácido, pepsina, vários medicamentos e algumas macromoléculas. O muco é levemente diferente nas várias regiões do TGI, porém as características de lubrificação e proteção são mantidas nas diferentes regiões. Ele tem como principais características a capacidade de aderência ao alimento ou a outras partículas, formando um filme sobre as superfícies; a consistência para revestir a parede do TGI, evitando o contato direto de partículas com a mucosa; a baixa resistência ao deslizamento de partículas pelo epitélio; a alta resistência à digestão pelas enzimas gastrointestinais; suas glicoproteínas são capazes de tamponar pequenas quantidades de ácidos ou bases e muitas vezes, o muco contém quantidades moderadas de íons bicarbonato para neutralização dos ácidos. Formando assim, um importante agente citoprotetor da mucosa (AASE, 1989; ALLEN; FLEMSTROM, 2005).

O íon bicarbonato (HCO_3^-) é secretado a partir do epitélio na superfície da mucosa gástrica. Com função de neutralizar os íons H^+ que se difundem na superfície da mucosa, evitando danos ao epitélio, o HCO_3^- tem sua secreção estimulada quando a concentração de ácido na mucosa é superior em relação ao lume gástrico. Na mucosa duodenal, a secreção de bicarbonato é realizada pelas células de Brunner, sendo o peptídeo intestinal de vasoativo (VIP) um importante estimulante de secreção de bicarbonato no duodeno. A mucosa gástrica se torna vulnerável ao ácido, caso a disponibilidade de HCO_3^- esteja diminuída (WALLACE; GRANGER, 1996; FONESKA & KAUNITZ, 2010).

A microcirculação da mucosa gástrica é essencial para entrega de oxigênio e nutrientes e para remoção de substâncias tóxicas. O fluxo sanguíneo da mucosa tem um aumento acentuado e rápido, quando a mucosa gástrica é exposta a algum agente irritante, ou quando ocorre difusão ácida. Os micro vasos são revestidos por células endoteliais, as quais fornecem potentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas (PGI_2), dois principais mediadores locais com função protetora em diversas condições fisiopatológicas, responsáveis por manter a viabilidade das células endoteliais e evitar a adesão de plaquetas e leucócitos, evitando o comprometimento da microcirculação (LAINE; TAKEUCHI & TARNAWSKI, 2008).

As prostaglandinas (PGs) são derivados de ácidos graxos, produzidas pela maioria das células do TGI. Exercem efeitos citoprotetores das mais diversas funções gástricas, tais como o aumento da secreção de bicarbonato, aumento da liberação de mucina protetora, redução da produção de ácido gástrico e prevenção da vasoconstrição que ocorre após o estímulo agressivo. As PGs são sintetizadas nas células a partir da ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) e da liberação de ácido araquidônico (AA), o qual será convertido em PGs pelas enzimas ciclo-oxigenases. Formando assim as PGs de série 2: PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF_{2a} e tromboxano A₂ (TXA₂). PGE₂ inibe a ação linfocitária e de outras células que participam de respostas alérgicas e inflamatórias, além de promover a vasodilatação; (Prostaciclina) PGI₂ é predominante no endotélio vascular, atuando como vasodilatador e inibidor da adesividade plaquetária, sendo importante mecanismo de defesa da mucosa gástrica. As funções desempenhadas pelas PGs são impedidas quando a atividade da COX-1, sua precursora, é inibida. Os AINES constituem uma das principais causas de inibição da COX-1, sendo responsáveis pelo dano microvascular na mucosa gástrica, resultando no surgimento de úlceras. Já o TXA₂ atua como vasoconstrictor e agregador plaquetário, participando na regulação do fluxo sanguíneo local. A ativação de PLA₂ para liberação de AA a partir de fosfolipídios de membrana, depende de estímulos fisiológicos e patológicos (DEY; LEJEUNE & CHADEE, 2006; FONESKA & KAUNITZ, 2010).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por uma reação enzimática entre o O₂ e a L-arginina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), dentro da célula epitelial, em resposta à ativação de receptores colinérgicos. Ele desempenha um papel fundamental na modulação de vários componentes de defesa na mucosa gástrica, tais como a secreção de muco, o aumento do fluxo sanguíneo e na resistência da mucosa à elementos agressores. O NO possui a capacidade de contrariar os efeitos nocivos da inibição da síntese de PGs, pois atuam como excelentes inibidores na ativação/adesão de neutrófilos no endotélio vascular gástrico e aumento do fluxo sanguíneo mucoso. O aumento do fluxo sanguíneo, promovido pelo NO, viabiliza a vasodilatação na mucosa gástrica, acelerando a retirada de íons H⁺ nocivos, como também, aumenta o aporte de nutrientes para a mucosa (WALLACE & MILLER, 2000; BIGHETTI; ANTONIO; CARVALHO, 2002).

3.4 Úlcera Péptica

Úlcera péptica é o termo utilizado para indicar uma área de lesão da mucosa do estômago ou duodeno proximal causada pelo desequilíbrio entre fatores protetores da mucosa (bicarbonato, mucina, PGs, NO e outros peptídeos e fatores de crescimento) e fatores agressores da mucosa (ácido e pepsina). Estas lesões são resultantes da hipersecreção gástrica associada ao desequilíbrio fisiológico entre hormônios gástricos, como a gastrina e a somatostatina. Tais lesões podem ocasionar perda do tecido mucoso local, dando origem a áreas mais profundas na mucosa, denominadas feridas (LANAS & CHAN, 2017).

Diversos fatores estão relacionados ao surgimento da úlcera péptica, desde alterações fisiológicas à infecção por microorganismos. A hipersensibilidade colinérgica e a prevalência parassimpática estão relacionadas à estimulação do ácido clorídrico e da pepsina, que atuam como cofatores no desenvolvimento da úlcera péptica por conta de suas propriedades digestivas na barreira gastroduodenal. Dentre as causas mais comuns se destaca a infecção por *Helicobacter pylori* e o uso indiscriminado de AINEs, além de outros fatores como o tabagismo, estresse fisiológico, corticosteroides, idade, uso demasiado de álcool, anticoagulantes, quimioterápicos e hábitos alimentares (YUAN; PADOL & HUNT, 2006).

A taxa de incidência da úlcera péptica na população mundial é de 0,1 – 0,3 % por ano, e a de prevalência de 5 – 10 % ao ano. Essas taxas tem diminuído em todo mundo, principalmente em países de alto desenvolvimento, e acredita-se que a redução desses números seja resultado da introdução de novas terapias para o tratamento dessa patologia. A redução das complicações da úlcera péptica pode estar relacionada ao uso mais racional dos AINES e ao uso generalizado de medicamentos anti-secretores em todo o mundo. Essas taxas, de incidência e prevalência, exigem a busca por novos tratamentos que atinjam o alívio dos sintomas com o mínimo de efeitos colaterais possíveis (LANAS; CHAN, 2017).

H. pylori, bactéria gram-negativa, atua infectando a mucosa do estômago provocando patologias de gravidade variável, tais como gastrite, úlceras pépticas e

câncer de estômago. Este tipo de infecção é um dos mais comuns em todo o mundo, e nos países desenvolvidos, a prevalência de *H. pylori* diminuiu devido à melhoria da higiene e redução da transmissão na primeira infância. A infecção por *H. pylori* danifica o sistema de defesa da mucosa, causando redução na espessura da camada de muco, diminuindo o fluxo sanguíneo e interagindo com o epitélio gástrico em todas as fases da infecção. As cepas de *H. pylori* produzem e liberam enzimas digestivas que tornam líquida a barreira mucosa, o que permite que as secreções gástricas realizem a degradação das células epiteliais. Em contra partida, a produção de ureia pelo organismo propicia um ambiente alcalino no estômago, tornando-o propício para a permanência da bactéria sob a barreira mucosa. A expressão de adesinas pelo organismo também facilita a ligação das bactérias ao epitélio gástrico, tais como a adesina de antígeno do grupo sanguíneo (BabA) e a adesina de proteína inflamatória externa (OipA) (YUAN; PADOL & HUNT, 2006; LANAS; CHAN, 2017; BARBOSA; SCHINONNI, 2011).

Os AINES, são ácidos orgânicos fracos com propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas combinadas. O mecanismo de ação destes fármacos ocorre por via sistêmica; consistindo principalmente na supressão da síntese de PGs pela mucosa através da inibição específica da ciclo-oxigenase-1 (COX-1), sobretudo PGE₂ e PGI₂. A síntese de PGs ocorre por meio da COX -1, expressa constitutivamente no TGI, a fim de manter a integridade da mucosa através da geração contínua das PGs; e da COX- 2, que pode ser induzida após certos estímulos fisiopatológicos. Os AINES suprimem a expressão de COX-1 e COX-2, reduzindo assim a expressão de PGs na mucosa, causando diminuição na secreção de muco e bicarbonato, inibição da proliferação celular, diminuição do fluxo sanguíneo mucoso e acumulação de leucócitos, fatores que contribuem para a danificação da mucosa (GOODMAN & GILMAN, 2012; LANAS; CHAN, 2017). Em conjunto, a inibição da formação de PGs resulta em um aumento rápido e significativo de neutrófilos aderentes ao endotélio vascular. Essa adesão causa estase microvascular e lesiona a mucosa através de isquemia e liberação de radicais livres. Além da inibição das PGs, os AINES alteram a hidrofobicidade da membrana da mucosa gástrica ao interagir quimicamente com os fosfolípidios. Através da formação de poros interferem na fluidez e espessura da membrana, permitindo que ocorra a retrodifusão de íons H⁺

sobre as células mucosas, causando morte celular e desenvolvimento de úlceras gástricas (HALTER; TARNAWSKI, 2001).

3.5 Terapêutica da Úlcera Gástrica

A abordagem terapêutica consiste no desenvolvimento de agentes capazes de reduzir a acidez gástrica. Os agentes disponíveis agrupam-se em fármacos antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas dos receptores H₂ para histamina e os inibidores da bomba de prótons (JAIN et al., 2007).

Os antagonistas dos receptores H₂ bloqueiam de modo reversível e competitivo a ligação da histamina aos seus respectivos receptores na membrana basolateral da célula parietal, obtendo assim a supressão da secreção gástrica de ácido. Existem quatro principais antagonistas: cimetidina, ranitidina, nizatidina e famotidina, que inibem parcialmente a secreção de ácido estimulada pela gastrina, apresentam eficácia máxima no período noturno, quando a secreção intragástrica ácida basal é mais acentuada. Esses fármacos são rapidamente absorvidos pelo intestino delgado e são eliminados tanto por excreção renal quanto pelo metabolismo hepático (FOX, MUNIRAJ, 2016; HUANG, HUNT, 2001).

Os inibidores da bomba de prótons são considerados os agentes terapêuticos mais eficazes no tratamento de úlceras pépticas. Tem como principal mecanismo a inibição irreversível da etapa final da secreção ácida através da bomba H⁺/K⁺-ATPase. Os principais representantes dessa classe de fármacos são o omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, e esomeprazol, que possuem eficácia terapêutica superior aos antagonistas dos receptores H₂ e aos antiácidos, mostrando uma taxa de cicatrização de úlcera péptica significativamente mais rápida em relação aos outros agentes terapêuticos. Essa acentuada atividade cicatrizante dos inibidores da bomba de prótons é atribuída à diminuição da produção de pepsina e redução do volume de secreção, aumentando assim o pH intragástrico. O tratamento da infecção por *H. pylori* geralmente inclui uma associação entre um inibidor da bomba de prótons com antibióticos (FOX; MUNIRAJ, 2016; HUANG; HUNT, 2001; O'NEIL; LEONARD, 2011).

Os antiácidos são bases fracas que interagem com o ácido clorídrico, neutralizando o ácido gástrico, e fornecendo o alívio imediato a curto prazo dos sintomas. No entanto, esse alívio é temporário, tornando os antiácidos uma terapia definitiva não recomendada. Hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, carbonato de sódio e carbonato de cálcio são os representantes dessa classe (FOX; MUNIRAJ, 2016; O'NEIL; LEONARD, 2011).

Os anticolinérgicos, através da inibição da ação da acetilcolina, bloqueiam os receptores dos gânglios intramurais da parede do estômago, promovendo o alívio da dor e a motilidade duodenal, através do bloqueio dos receptores dos gânglios intramurais da parede gástrica. Eles compoem uma das classes de agentes terapêuticos menos utilizados, pois as doses necessárias para produzir os efeitos esperados são geralmente associadas à efeitos colaterais bem pronunciados (HUANG, HUNT, 2001).

Misoprostol é um agente gastroprotetor utilizado simultaneamente durante o uso crônico de AINES, sendo um análogo de prostaglandina aprovado para prevenção da úlcera induzida por AINE. Possui uma maior eficácia quando comparado aos antagonistas dos receptores H₂ na prevenção da úlcera gástrica (FOX, MUNIRAJ, 2016; YUAN & HUNT, 2006).

Além da terapêutica convencional através da utilização de medicamentos alopáticos, destaca-se também o uso de fitoterápicos no tratamento dessa patologia. Na relação dos fitoterápicos, ofertados pelo SUS e disponíveis no mercado, existem dois que são utilizados na terapêutica da úlcera gástrica, como *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) (Celastraceae) e *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). Estudos com *M. ilicifolia*, a espinheira-santa, mostra sua eficiente atividade gastroprotetora, animutagênica (TABACH et al., 2017), anti-inflamatória (JORGE et al., 2004), e antioxidante (NEGRI et al., 2009). *C. scolymus*, a alcachofra, além de possuir atividade gastroprotetora, apresenta um bom potencial antioxidante (KOLLIA et al., 2016), anti-inflamatório (SALEM et al., 2017) e hepatoprotetor (COLAK et al., 2016), ambas são indicadas para o tratamento de gastrite e úlcera duodenal (BRASIL, 2012).

3.6 Plantas Medicinais

Utilizadas na busca pelo alívio de sintomas ou cura de doenças, as plantas medicinais constitui uma das formas primordiais de utilização dos recursos naturais. A utilização desses recursos para fins medicinais é resultante do acúmulo de conhecimentos empíricos de diversas civilizações orientais e ocidentais. Apesar dos avanços tecnológicos na medicina moderna, as plantas medicinais desempenham um papel fundamental na saúde mundial (VEIGA JÚNIOR; MELLO, 2008). As plantas utilizadas como medicinais são aquelas que possuem ação farmacológica e princípios ativos conhecidos, constituindo uma fonte de matéria-prima para a indústria farmacêutica (OMS, 2003; ABUJAIR et al., 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) de 65 a 80% da população mundial, possuem alta confiabilidade nos produtos à base de plantas medicinais para o tratamento de suas doenças, utilizando desses recursos com base na medicina tradicional (RAHMAN & SINGHAL, 2002).

O Brasil é considerado um dos países com maiores perspectivas para a exploração econômica da biodiversidade do planeta. Apresentando o maior número de espécies animais e vegetais do mundo, sendo estimado que aporta de 15% a 20% da biodiversidade mundial. Tem sido relatado que 20% da população brasileira consomem 63% dos medicamentos alopáticos, os demais encontram-se nos recursos naturais, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação. Diante de toda diversidade que o país aporta, medidas tomadas pelo Ministério da Saúde visam assegurar e incentivar a utilização desses recursos naturais, através do Sistema Único de Saúde (SUS), é disponibilizado plantas medicinais e fitoterápicos como opções terapêuticas (ATANASOV, et al., 2015; BRASIL, 2010; FOGLIO et al., 2006).

Através da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), as plantas medicinais e os fitoterápicos foram institucionalizados no Sistema Único de Saúde (SUS), tratando-se de uma terapêutica determinada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas. Essa prática vem incentivar o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (BRASIL, 2012).

O interesse pela identificação de substâncias procedentes de produtos naturais com potencial antiulcerogênico ou gastroprotetor tem aumentado significativamente, devido à perspectiva da eficácia destas substâncias apresentarem semelhança à eficácia dos medicamentos já utilizados, como também por apresentar êxito na prevenção de reincidência da mesma (KANGWAN et al., 2014).

Nas últimas décadas tem-se observado um crescente interesse na utilização das plantas medicinais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Diversos medicamentos foram desenvolvidos embasados nas propriedades de plantas medicinais, como atividades antiulcerogênicas e gastroprotetoras, atribuídas principalmente à presença de metabólitos secundários, como os terpenos, alcaloides e compostos polifenólicos, como por exemplo, *Melastoma malabathricum* (SUHAIMY et al., 2017), *Virola oleífera* (PEREIRA, et al., 2016), *Terminalia coriacea* (Roxb.) Wight & Arn (KHAN; NAZAN; JAIS, 2017), *Croton rhamnifolioides* (VIDAL, et al., 2017), *Caryocar coriaceum* (LACERDA NETO, et al., 2016). Dentre as inúmeras espécies vegetais distribuídas na flora brasileira, cerca de 28.000 já foram estudadas em busca de compostos bioativos para avaliação de suas propriedades medicinais. Estas espécies distribuem-se em grandes famílias de interesse medicinal (HEINZMANN; BARROS, 2010)

3.6.1 Família Fabaceae

Fabaceae (Leguminosae) é considerada a terceira maior família dentre as Angiospermas, compreende 946 gêneros e com mais de 24.000 espécies aceitas, com distribuição cosmopolita (The Plant List, 2013). No Brasil, é considerada a maior família, com 222 gêneros e mais de 2.800 espécies aceitas, sendo representada em todos os biomas brasileiros (Flora do Brasil, 2020, em construção). No bioma da caatinga ocorrem 619 espécies, constituindo um terço da riqueza do bioma (QUEIROZ, 2009; ANDRADE; MIOTTO; SANTOS, 2009; Flora do Brasil, 2020, em construção). Predominam na maioria dos tipos de vegetação distribuídos por regiões temperadas e tropicais. Esta família inclui grande número de espécies obtidas para

consumo humano e animal, como também óleos, fibras, combustíveis, fertilizantes, madeira, medicamentos, produtos químicos e de horticultura (LEWIS et al., 2005).

Pertencente à ordem Rosales, a família Fabaceae é dividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae. No geral, são plantas de hábito bastante variável, do tipo ervas, arbustos, trepadeiras até grandes árvores. Mimosoideae é a menor dentre as três, compreendendo 77 gêneros e 3.000 espécies, na sua maioria se apresentam nas formas de árvores e arbustos tropicais e subtropicais. Na subfamília Caesalpinioideae, predominam árvores, arbustos e ervas. Abrangem em torno de 3.000 espécies distribuídas em cerca de 170 gêneros. Papilionoideae estão representadas por 467 gêneros e 14.000 espécies, sendo árvores, arbustos, ervas anuais ou perenes e trepadeiras (LEWIS et al., 2005; REIS; MIOTTO; BORTOLUZZI, 2006).

A presença de diferentes metabólicos secundários atribuem às espécies representantes dessa família diferentes atividades como analgésica e anti-inflamatória (HOSSAIN, 2017), antioxidante (SOLOMON, 2016), antimicrobiana e analgésica (GUPTA; SINGH, 2017), contribuindo para a consolidação do uso medicinal popular de plantas pertencentes a esta família.

3.6.2 Gênero *Mimosa*

Mimosa L. constitui o segundo maior gênero da subfamília Mimosoideae, com mais de 700 espécies aceitas (The Plant List, 2013), as quais podem ser encontradas em florestas, campos, savanas, caatingas e regiões desérticas, sendo encontradas na América do Sul (Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina) e no Centro – Sul do México (LAVIN, 1992). No Brasil existem cerca de 360 espécies aceitas, destas 56 ocorrem na caatinga (Flora do Brasil, 2020, em construção)

O gênero é caracterizado principalmente pelo fruto do tipo craspédio apresentando margens persistentes, com valvas inteiras ou segmentadas em artículos monospermicos. As flores são isostêmones ou diplostêmones, com anteras sem glândulas apicais, auxiliando na diferenciação de *Mimosa* com outros gêneros como *Anadenanthera* Speg., *Parapiptadenia* Brenan., *Plathymania* Benth., *Piptadenia*

Benth., *Prosopis* L. e *Pseudopiptadenia* Rauschert (QUEIROZ, 2009). As espécies deste gênero apresentam estruturas vegetais do tipo árvores, arbustos, trepadeiras ou ervas, inermes ou armadas de acúleos ou espinhos. Folhas bipinadas, inflorescências glomeruliformes e flores pequenas (SILVA; SALES, 2008).

Várias espécies desse gênero ocorrem em locais estressantes, como margens de estradas e de rios. Essa ocorrência é possível por conta do seu rápido crescimento e sua alta capacidade de regeneração vegetativa. Além disso, contribuem também para manutenção do ecossistema, e promovem o enriquecimento do solo, evitando sua erosão. Sendo assim, são importantes para restauração de áreas degradadas (DOURADO et al, 2013).

Estudos com diversas espécies desse gênero demonstram a amplitude de bioatividades atribuídas aos metabólitos secundários presentes. *Mimosa pudica* L. apresenta atividade antidepressiva (PATRO; BHATTAMISRA; MOHANTY, 2016), *Mimosa verrucosa*, rica em flavonoides bioativos, alcaloides e saponinas, possui atividade antioxidante (ROMANOSKI; SANTOS, 2017), *Mimosa scabrella* demonstrou atividade frente à modelo de atividade anti-inflamatória tópica, com expressiva redução do edema (BORSATO et al., 2014). Estudos etnobotânicos tem ressaltado os usos medicinais populares de espécies do gênero *Mimosa*, sendo principalmente utilizada para inflamação (*Mimosa tenuiflora* Poir. e *Mimosa caesalpinifolia* Benth.) (CARTAXO, et al., 2010), gastrite (*Mimosa verrucosa* Benth.), asma (*Mimosa arenosa* Willd. Poir), bronquite (*Mimosa ophtalmocentra* Mart.) (ALBUQUERQUE et al., 2007), como sedativo e contra diarreia (*Mimosa acutistipula* (Mart.) Benth.), e como diurético (*Mimosa candollei* R.Grether) (AGRA et al., 2008)

3.6.3 *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir., é uma planta de porte arbustivo ou arbóreo, podendo variar de 4 a 7 metros de altura. O caule é reto ou levemente inclinado, com muitas ramificações e conta com a presença de acúleos esparsos. Possuem ramos verdes, as folhas são viscosas (pegajosas) por conta da presença de glândulas. A casca do caule é marrom, rugosa e se desprende do tronco. As folhas são bipinadas;

os folíolos são brilhantes, sem pêlos e não são quebradiços. As flores são alvas e pequenas, reunidas em inflorescências do tipo espiga; a cor pode variar de branca a creme. O fruto do tipo craspédio, é quebradiço quando está maduro. As sementes são ovoides e de cor castanha a marrom. O período de floração ocorre de novembro à fevereiro e a frutificação de março à maio. A planta permanece coberta com suas folhas durante todo ano (COSTA et al., 2012).

Planta nativa do Nordeste brasileiro, *M. tenuiflora*, conhecida popularmente como Jurema Preta, tem como domínios fitogeográficos a Caatinga e o cerrado, sendo sua melhor forma de multiplicação o método a propagação por muda (DUTRA; MORIM, 2014). Seu cultivo é direcionado para ser utilizada como forrageio (CALDAS; BORGES; MEIRA, 2006), para manutenção da biodiversidade e funcionamento do ecossistema, pois age na melhoria da qualidade do solo e são resistentes a alagamentos periódicos. Além disso, são utilizadas para reflorestamento de áreas ciliares (CNIP, 2014).

Figura 2. Especime de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Fabaceae)

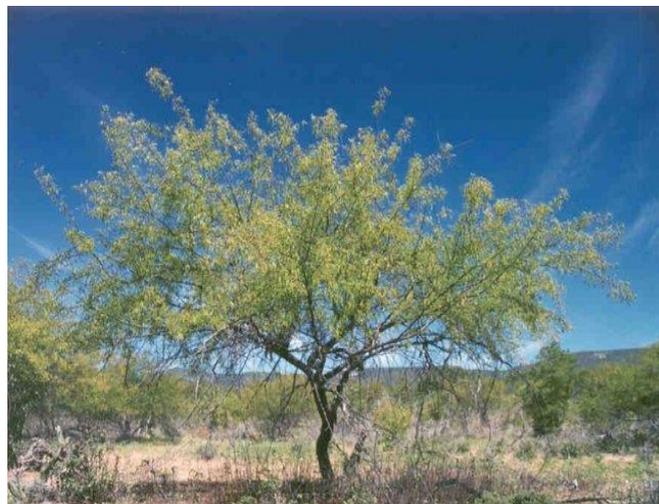


Foto: APNE/CNIP

Sendo amplamente utilizada na medicina popular no tratamento de queimaduras, acnes e lesões da pele, a jurema-preta é considerada como uma boa opção para o semiárido nordestino, pois além da adaptação às condições climáticas adversas, apresenta alta capacidade de se renovar após o pastejo (MAIA, 2004). No extrato de acetato de etila das casca de *M. tenuiflora*, foi constatada a presença de

substâncias fenólicas como taninos e flavonoides, conferindo-lhe atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (ALMEIDA, et al., 2005).

Levantamentos etnobotânicos demonstraram que a população utiliza, em larga escala, a decocção das cascas do caule de *M. tenuiflora*, no tratamento de úlceras externas, bronquite e tosse (AGRA, et al., 2008) na inflamação dentária, como antisséptico e inflamação no geral (CARTAXO et al., 2010). O chá frio das cascas do caule, utilizado para ferimentos na pele, psoríase e sarna (PEREIRA JÚNIOR, et al., 2014), a decocção das folhas para banhos e lavagens no tratamento de úlceras externas, bronquite e tosse (AGRA, et al., 2008).

Algumas bioatividades de *M. tenuiflora* tem sido comprovadas a partir de estudos científicos. A atividade cicatrizante (RIVERA-ARCE, 2007), filmes de quitosana aprimorados com o córtex *M. Tenuiflora* atuam no reparo tecidual (VALENCIA-GOMEZ, 2016), efeito teratogênico das sementes (MEDEIROS, 2008), atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (NASCIMENTO, et al.; 2016 CRUZ, et al., 2016), efeito neutralizante e anti-inflamatório em modelo de envenenamento por *Tityus serrulatus* (BITENCOURT et al., 2014). Por suas atividades biológicas comprovadas nos estudos descritos, com ênfase nas propriedades anti-inflamatórias desta espécie vegetal, buscou-se analisar o efeito de *M. tenuiflora* no tratamento de úlcera gástrica, visto que essa patologia desencadeia na mucosa gástrica um processo inflamatório.

3.7 Citocinas e Óxido Nítrico no Processo de Cicatrização da Úlcera Gástrica

A cicatrização de feridas é um processo complexo e multifatorial, caracterizado pela eliminação do agente agressor, pela irrigação, nutrição e oxigenação do tecido lesionado. Esse processo é resultante das interações celulares locais que ocorrem na epiderme, na derme e na matriz extracelular, como também da resposta sistêmica regulada, incluindo a imunidade celular, a imunidade humoral e a cascata de coagulação (EFRON; MOLDAWER, 2004).

O processo de cicatrização é composto por três fases, tais como a inflamatória, a proliferativa e a de maturação. A fase inflamatória é caracterizada pelo combate dos agentes agressores, através da ação dos neutrófilos, e pela ação dos macrófagos. Na fase proliferativa, ocorre a reconstituição dos vasos sanguíneos e linfáticos e constante migração celular, onde os fibroblastos originam tecido de granulação no local da lesão. Por fim, na maturação, ocorre a remodelação e reorganização do colágeno, diminuição do número de fibroblastos e macrófagos, e aumento do número de colágeno. Esta fase re-epiteliza a ferida e permite seu fechamento. (ROBBINS et al., 2005).

Todo esse processo de cicatrização é determinado pela ação de moléculas comunicantes, conhecidas como citocinas e fatores de crescimento, as quais concedem diversos sinais moleculares e celulares necessários para o desenvolvimento do processo de cicatrização. As citocinas são polipeptídios produzidos em resposta a presença de microrganismos e outros antígenos, responsáveis por mediar e regular reações imunológicas e inflamatórias. Os fatores de crescimento são mediadores de peptídeos envolvidos na proliferação celular, ciclagem celular e apoptose, podendo desempenhar o papel das citocinas, e o mesmo acontece com as citocinas, que podem ter propriedades dos fatores de crescimento (EFRON; MOLDAWER, 2004).

As citocinas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da inflamação da mucosa gástrica, podem ter propriedades anti-inflamatórias, pró-inflamatórias e imunossupressoras. Uma resposta inflamatória apropriada depende do controle do perfil pró-inflamatório (Th1) e anti-inflamatório (Th2) promovido por diferentes famílias de citocinas (MANJULA et al., 2006).

As respostas imunes e proliferativas mediadas por citocinas específicas, em que as células Th1 produzem IL-2, IL-6 e IFN- γ e as células Th2 liberam IL-4, -5, -10 e -13 (MELO et al., 2010). As citocinas anti-inflamatórias, induzem a síntese de PGE₂ por células musculares lisas e fibroblastos, podem anular o processo inflamatório através da inibição da migração de neutrófilos pelo TNF- α e suprimir a proliferação de linfócitos pelo TGF- β , atuando como inibidoras eficazes da secreção de ácido gástrico *in vivo* (LEHMANN; STALDER, 1998). As citocinas pró-inflamatórias regulam a expressão das moléculas de adesão em células endoteliais e recrutam leucócitos. A

interleucina (IL-6) produzida por células linfoides ativadas e uma variedade de células não-linfoides, está envolvida na regulação da hematopoese, respostas imunes e reações de fase aguda. O IFN- γ secretado por células T ativadas do subconjunto e células natural killer (NK) regula a defesa do hospedeiro, a inflamação e autoimunidade e estimula a produção de NO. No processo de desenvolvimento da úlcera gástrica, as citocinas pró-inflamatórias, atuam recrutando neutrófilos, linfócitos e macrófagos para o local lesionado, dando início à uma resposta inflamatória aguda (WANG et al., 2016). A IL-10, citocina imunorreguladora, influencia na resposta imune inata e adaptativa e promovem ainda a ativação e diferenciação de linfócitos T CD4+ em células Th17, importante nas reações autoimunes. Na mucosa gástrica, a IL-10 limita os danos causados pela inflamação da lesão, através da redução na produção de moléculas pró-inflamatórias (EAMLAMNAM, et al., 2006; MELO et al., 2011).

A infecção por *H. pylori* e o uso indiscriminado de AINES constituem as causas mais comuns da etiologia das úlceras gástricas. Essas causas são responsáveis pela infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica, através da indução de respostas inflamatórias mediadas por citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), as interleucinas (ILs), e as moléculas de adesão. Seguido dessa infiltração, ocorre a liberação de metabólitos tóxicos e enzimas lisossômicas, os quais serão responsáveis pelo dano tecidual local na úlcera péptica. Além da secreção aumentada de gastrina por conta da infecção por *H. pylori*, citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-2 e IFN- γ também estimulam o aumento da secreção ácida na mucosa gástrica através da estimulação das células G em liberar gastrina (LEHMANN; STALDER, 1998).

A mucosa gástrica inflamada ativa o sistema imune, especialmente através de macrófagos, que liberam uma série de mediadores pró-inflamatórios, as moléculas de adesão em células endoteliais promovem o rolamento, adesão e transmigração de leucócitos em áreas inflamadas gástricas. O aumento na produção de citocinas como TNF, a IFN- γ e interleucinas (IL-6 e IL-1), e também do óxido nítrico (NO), exercem funções regulatórias a fim de restaurar a homeostase da mucosa gástrica. A fagocitose desenvolvida pelos macrófagos compõe o início do conjunto das atividades biológicas de toda a resposta imunológica e da resposta inata. O NO produzido em níveis mais elevados pelos macrófagos, via estimulação IFN- γ , tem atividade citotóxica contra microrganismos, parasitas e células tumorais, exercendo uma função importante no sistema imunológico. Além disso, o NO é um importante mediador da

resposta inflamatória, produzido em grande quantidade pela enzima iNOS nas células inflamatórias ativadas, desempenhando um papel importante no desenvolvimento de úlceras ocasionadas pelo uso indiscriminado de AINES (KUMAR-ROINÉ et al., 2009; MELO et al., 2011; EAMLAMNAM, et al., 2006).

Diante da importância do papel que as respostas imunomodulatórias exercem na úlcera gástrica, é importante realizar as análises das citocinas a fim de descrever o perfil imunomodulatório do extrato aquoso de *Mimosa tenuiflora*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

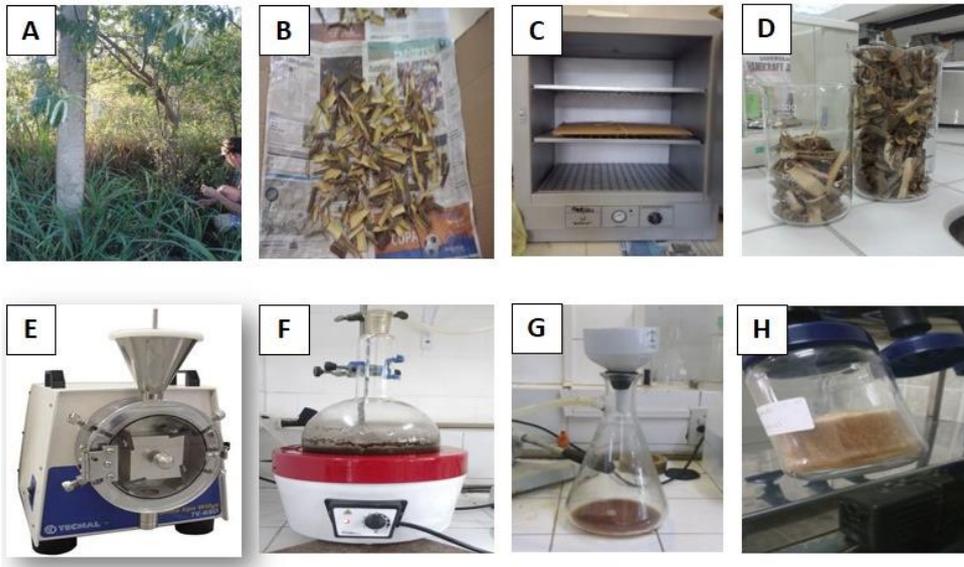
4.1 Coleta do Material botânico

O material vegetal utilizado foi obtido a partir das entrecascas do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir, coletadas no município de Pombos – Pernambuco, em fevereiro de 2015 (8°8.877”S 35°24.836”O). Uma exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob o número IPA 94.445.

4.2 Extração do Material Vegetal

O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar (45°C) durante 72 hrs. Após a secagem, as entrecascas foram moídas utilizando um moinho analítico de bancada tipo Willy, de rotor vertical (SP-31 SPLABOR). Do pó obtido, 100 gramas foi dissolvido em 1000 ml de água e colocados em manta aquecedora à temperatura de 100°C e após 15 minutos do ponto de ebulição, a solução foi filtrada utilizando papel filtro. O extrato resultante foi armazenado, congelado à - 20°C e liofilizado. (Figura 3).

Figura 3- Processo de Extração das entrecascas de *M. tenuiflora*



(A) Coleta de *M. tenuiflora* (B) e (C) Secagem das entrecascas, (D) Material vegetal seco; (E) Trituração em moinho analítico de bancada; (F) Decocção em manta aquecedora à 100°C; (G) Filtração à vácuo e (H) Liofilização.

4.3 Caracterização Fitoquímica

A presença dos principais grupos de metabólitos secundários no extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt), foi analisada através de cromatografia de camada delgada utilizando placas de sílica gel F₂₅₄ (ALUGRAM® 818131, Macherey-Nagel, Alemanha) em diferentes sistemas de solventes. Foi verificada a presença ou ausência de flavonoides, fenilpropanoides, terpenoides, esteroides, saponinas, alcaloides, cumarinas, proantocianinas, quinonas e açúcares redutores, como descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Sistemas e reveladores utilizados na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada.

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt, 1996 Brasseur & Angenot, 1986
Triterpenos e esteroides	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Saponinas	-	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, 1996
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al. 1957
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	n-BuOH-H ₂ O-AcOH (40:50:10 v/v)	Alúmen de ferro 1%	

4.4 Dosagem de Fenóis Totais

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Li, et al., 2008), com algumas modificações. Diferentes concentrações de ácido gálico, assim como a amostra, foram dissolvidos em metanol. Em cada poço, das placas de poços, foram adicionados 0,1 mL da solução de Folin diluída na concentração de 1:10 (v/v) e 0,02 mL da amostras diluída. Após 3 minutos no escuro, 0,08 mL de carbonato de sódio a 7,5% foi adicionado, deixando por mais 120 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após esse período as absorbâncias das amostras foram medidas à 765 nm contra um branco (reagentes adicionado ao metanol). Uma curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ($y = ax - b$, $R^2 = x$). A concentração de fenol total na amostra foi determinada a partir da curva de calibração. O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de extrato).

4.5 Dosagens de Flavonóides

A técnica colorimétrica com cloreto de alumínio descrita por Woisky e Salatino (1998) foi utilizada para estimativa de flavonoides, com algumas modificações. Diferentes concentrações de Quercitina, assim como a amostra, foram dissolvidas em metanol. Em cada poço, da placa de poços de fundo redondo, foi adicionado 0,05 mL do reagente de cloreto de alumínio (2g de cloreto de alumínio diluído em etanol a 2%), e misturado a 0,05 mL das amostras em triplicata. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 60 minutos. A absorvância da amostra foi medida à 420 nm contra um branco. A curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorvância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ($y = ax - b$, $R^2 = z$). A concentração de flavonoides foi determinada a partir da curva de calibração. O teor de flavonoides total no extrato foi expresso como equivalente Quercitina (mg QE/g de extrato).

4.6 Atividades Antioxidantes *in vitro*

4.6.1 Sequestro de Radicais Livres pelo DPPH•

Neste ensaio, a atividade sequestradora de radical livre do extrato, foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (BLIOS, 1958). Foi misturado 0,25 mL da solução de DPPH• (1 mM) em 0,04 mL de diferentes concentrações do extrato (31,25; 62,5; 125; 500 e 1000 µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorvância em 517 nm. Trolox (análogo da vitamina E, solúvel em água), Ácido gálico, BHT, Quercetina e Ácido ascórbico foram usados como compostos de referência. O controle foi o DPPH adicionado à 0,04 mL de metanol (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH• foi calculada pela fórmula:

$$\text{SRL [DPPH•]}(\%) = \frac{(Aa - Ac)}{Ac} \times 100$$

Onde: Aa = Absorvância da amostra e Ac = Absorvância do controle.

4.6.2 Inibição pelo Radical Livre ABTS (2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

O método do ABTS•⁺ (2,2' -azobis-(3- etilbenzotiazolina-6-sulfonato) foi feito baseado no método de Re et al. (1999) com algumas modificações. Uma solução estoque do radical ABTS•⁺ foi preparada, dissolvendo-se 7 nM de ABTS•⁺ em 2,45 mM de Persulfato de potássio, e deixado por 16 horas antes do uso. A solução trabalho foi preparada por diluição da solução de estoque em etanol até obter a absorbância de 0,700 ± 0.02 em 734 nm. Foi adicionada 0,01 ml das frações em diferentes concentrações à 1 ml da solução trabalho e lida exatamente após 6 minutos da reação em espectrofotômetro a 734 nm. Foi utilizado Trolox em diferentes concentrações (0 – 2000 µM) para comparar a atividade e para obtenção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC), e obteve-se a equação $Y = -0,0003x - 0,6367$, $R^2 = 0,9886$. A porcentagem de inibição também foi calculada através da equação:

$$\text{Inibição do ABTS (\%)} = \frac{A_c - A_a}{A_c} \times 100$$

Onde: A_c = Absorbância do controle e A_a = Absorbância da amostra.

4.6.3 Atividade antioxidante Total (ATT)

O extrato foi diluído em água. Foi misturado 0,1 ml da amostra à 1 ml da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e posteriormente, incubados em água a 95 °C por 90 minutos. Após voltarem à temperatura ambiente, as absorbâncias da amostra foram medidas à 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL do metanol) (PIETRO et al., 1999). A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico, calculada pela fórmula:

$$\text{ATT(\%)} = \frac{(A_a - A_c)}{(A_{aa} - A_c)} \times 100$$

Onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico. E sua atividade foi comparada com Sulfato Ferroso (SoFe₄).

4.6.4 Redução do Íon Férrico - FRAP

O ensaio de FRAP foi realizado segundo Benzie et al.(1996), com algumas modificações. A solução estoque foi preparada com 300 mM de tampão acetato (3,1g CH₃COONa e 16 mL CH₃COOH) em pH 3,6, 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-triazine) solubilizado em 40 mM de HCl, e 20 mM de solução de FeCl₃. A solução de trabalho foi preparada na hora, misturando 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL de TPTZ e 2,5 mL FeCl₃. Foram diluídas 0,02 mL das amostras em diferentes concentrações em metanol, foram misturadas à 0,180 mL do reagente de FRAP e deixadas em repouso por 30 minutos, à 37 °C, no escuro. Posteriormente, as absorbâncias foram medidas à 593 nm. Uma curva padrão com FeSO₄ (0 - 1000µg/mL) foi realizada para obtenção da equação $Y = ax - b$, $R^2 = z$. Os resultados foram expressos em mg EFeSO₄ (II) / g de extrato e comparado com os mesmos padrões utilizados nas outras atividades, nas mesmas condições das amostras.

4.7 Atividade Antimicrobiana

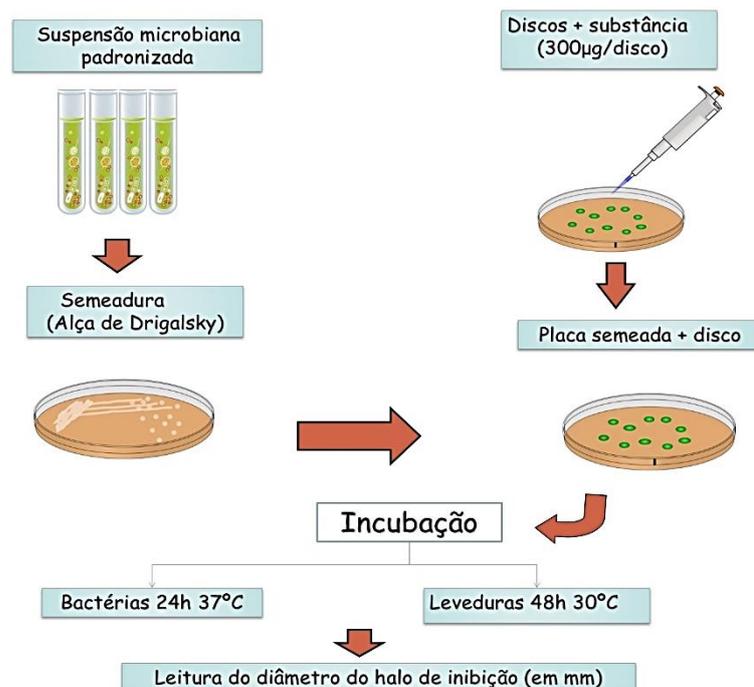
A atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) foi avaliada pelo método de difusão em disco de acordo com Bauer et al. (1966). O extrato foi testado contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* – UFPEDA 02, *Micrococcus luteus* – UFPEDA 06, *Bacillus subtilis* – UFPEDA 16, e *Enterococcus faecalis* – UFPEDA 138), Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* – UFPEDA 39, *Escherichia coli* – UFPEDA 224, e *Serratia marcescens* – UFPEDA 398) e álcool-ácido resistentes (*Mycobacterium smegmatis* – UFPEDA 71), além de levedura (*Candida albicans* – UFPEDA 1007). Foi realizada também a atividade antimicrobiana do extrato contra isolados clínicos provenientes de secreções de feridas, *S. aureus* (UFPEDA 679, 700 e 719) e *P. aeruginosa* (UFPEDA 261 e 262). Todos os microrganismos

foram obtidos da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

4.7.1 Teste de Difusão em Disco

Discos de papel (Whatman nº 2) com 6 mm de diâmetro foram impregnados com 20 μ L da solução de 20.000 μ g/mL do extrato dissolvidos em água. Os discos foram então colocados em meio semeado com um dos microrganismos (Figura 4). As seguintes drogas padrão foram usadas como controle: cetoconazol (Multifarma, Brasil), para levedura, cefalexina (Eurofarma, Brasil) e canamicina (Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico-CECON, Brasil) para bactérias. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados (diâmetro da zona de inibição em volta do disco) foram expressos em mm. O teste de controle negativo foi realizado com discos embebidos em DMSO.

Figura 4- Teste de Difusão em Disco de Papel.

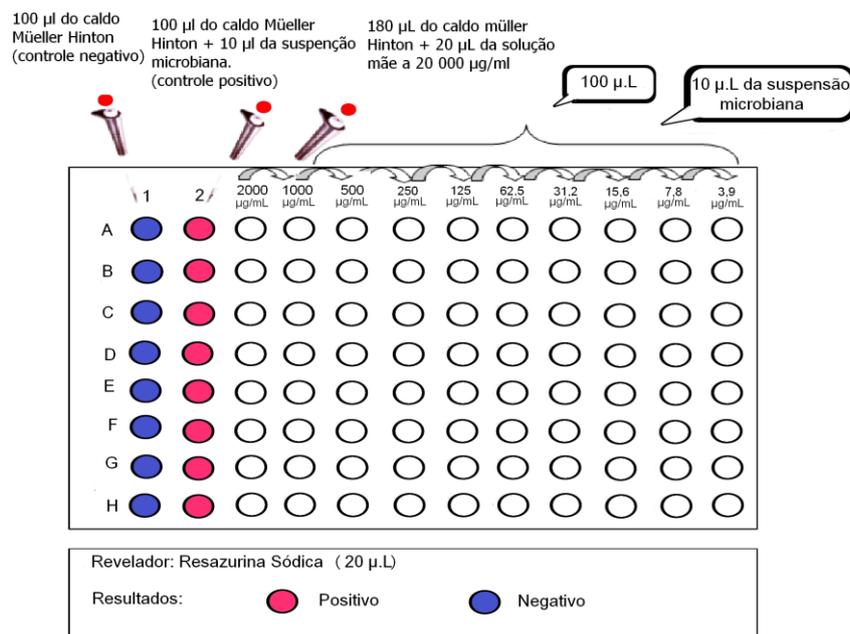


Fonte: Autor.

4.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI) e da Concentração Bactericida Mínima (CMB)

O EAMt foi testado contra isolados clínicos multirresistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, obtidos de feridas humanas. A concentração inibitória mínima (CMI) e a concentração bactericida mínima (CMB) foram calculadas pelo método de micro diluição. Os testes foram realizados em caldo Müller-Hinton, pH 7,4 e foi aplicada a técnica de dupla diluição em série. Uma solução estoque de 1,000 µg/mL do extrato foi preparada. Uma suspensão padronizada de microrganismos foi preparada para utilização com um tubo de 0,5 na escala McFarland. A placa foi incubada por 18 horas e depois disso um corante indicador resazurin (Sigma-Aldrich, USA) foi aplicado para mostrar se houve crescimento microbiano nos poços (Figura 5). A CMI foi determinada como a concentração do último poço onde não houve crescimento microbiano. As seguintes drogas padrão foram usadas como controle: Cefalexina (Medley, Brasil) e Canamicina (Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico-CECON, Brasil). A partir deste experimento, o conteúdo dos poços foi semeado em placas com meio ágar Müller-Hinton para estabelecer a concentração bactericida mínima (CMB), que é a concentração em que não há crescimento de colônias. Todas as análises foram realizadas em triplicata (CLSI, 2013).

Figura 5 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)



4.8 Animais

Camundongos fêmeas, da linhagem Swiss e BALB/C, pesando entre 25-30 g, foram utilizados para os experimentos de atividade antiulcerogênica e das atividades imunomodulatórias. Os animais utilizados foram obtidos no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, localizado na UFPE. Foram aclimatados às condições padrões de laboratório (20 – 22° C e ciclo claro/escuro controlado de 12hrs) com livre acesso a água e ração Presence® tipo pellets. Todos os procedimentos experimentais que foram realizados estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo de submissão nº 23076.023991/2014-24, Ofício de aprovação nº 61/14).

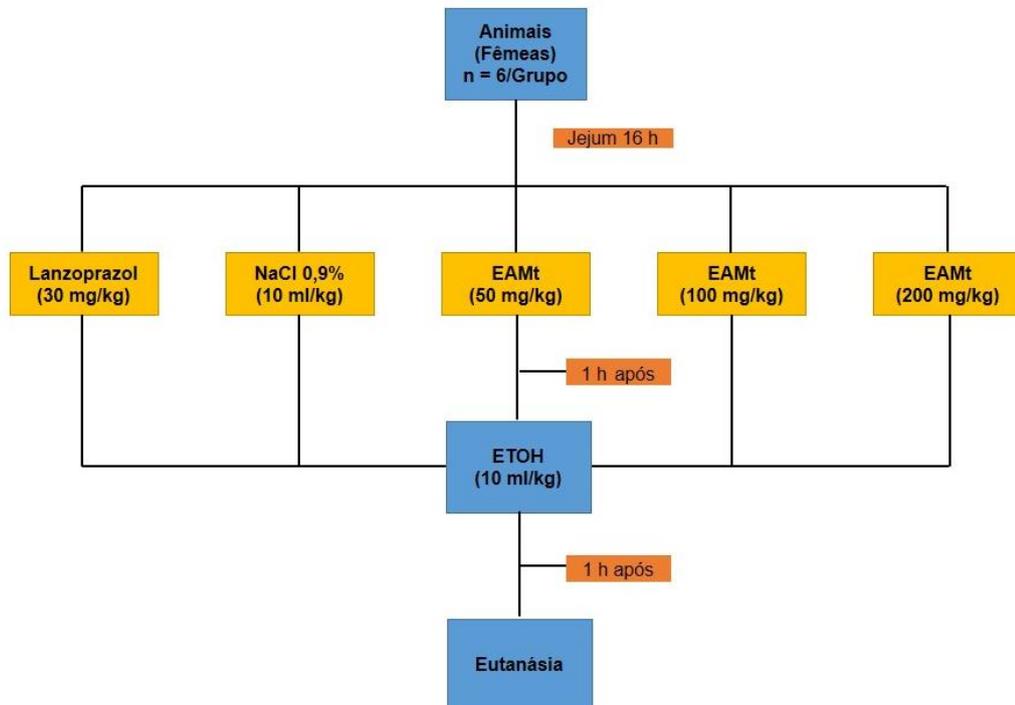
4.9 Avaliação da Atividade Gastroprotetora

4.9.1 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol (MORIMOTO et al., 1991, com modificações)

Os camundongos foram divididos em cinco grupos experimentais (Figura 6) e submetidos a um jejum inicial de 16 horas, posteriormente, pré-tratados por via oral com Lansoprazol 30 mg/kg para o controle positivo, veículo solução NaCl 0,9% para o controle negativo e EAMt nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Após 1 hora, foi administrado etanol absoluto (10 ml/kg) nos animais por via oral. Decorrida 1 hora dessa administração, os camundongos receberam anestesia geral prévia e foram eutanasiados com a administração de cloreto de potássio 1 mmol/kg via intraperitoneal. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da grande curvatura e o índice de lesão ulcerativa (ILU) foi determinado com o auxílio do programa

ImageJ®. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (mm²) em relação à área total do corpo gástrico (SZELENYI; THIEMER, 1978).

Figura 6- Desenho experimental das úlceras gástricas induzidas por Etanol.



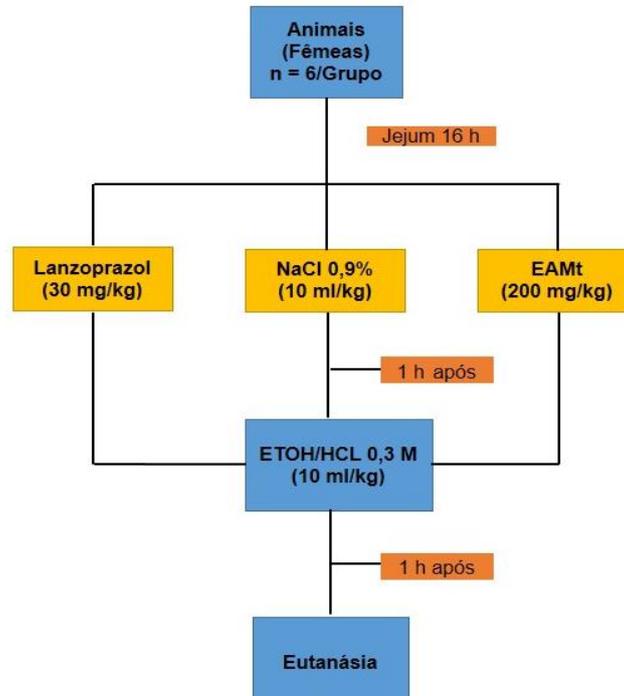
Fonte: Autor.

4.9.2 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol/HCL (MIZUI; DOUTEUCHI, 1983, com modificações)

Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais (Figura 7), e submetidos a jejum de sólidos por 16h, em seguida foram pré-tratados por via oral (v.o) com EAMt (200 mg/kg), Lanzoprazol (30 mg/kg) como controle positivo, ou solução salina (NaCl 0,9%) (10 ml/kg) como controle negativo. Após 1 hora, a úlcera foi induzida pela administração, por via oral, da solução 0,3 M Etanol/HCL 100%, uma hora depois, os camundongos foram previamente anestesiados e a eutanásia foi realizada pela administração de cloreto de potássio 1 mmol/kg. A cavidade abdominal foi aberta, os estômagos foram retirados e abertos pela grande curvatura, o conteúdo gástrico foi desprezado e a mucosa lavada cuidadosamente com solução NaCl 0,9% gelada. Os estômagos foram fotografados e determinado o ILU com o auxílio do

programa ImageJ®. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (mm²) em relação à área total do corpo gástrico.

Figura 7- Desenho experimental das úlceras gástricas induzidas por Etanol/ HCL.

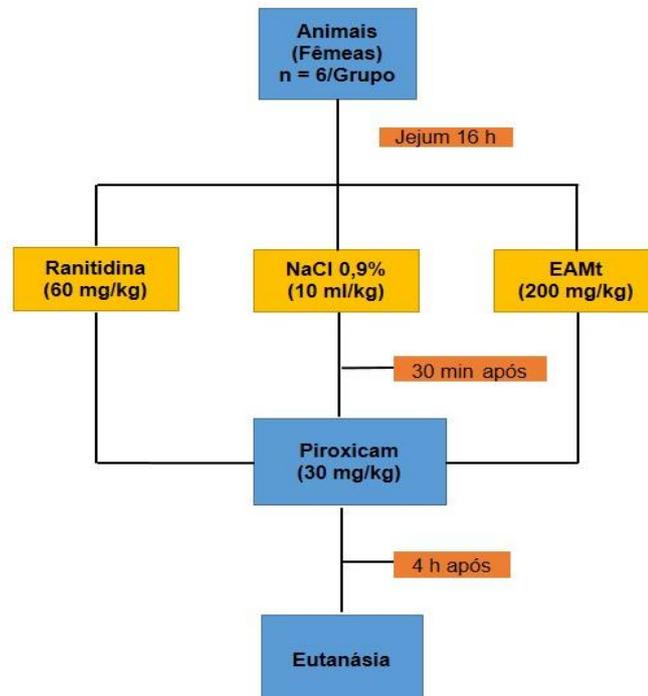


Fonte: Autor.

4.9.3 Úlcera Gástrica Induzida por Anti-inflamatório Não-esteróide (PUSCAS et al., 1997, com modificações)

Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais (Figura 8), e submetidos a um jejum de 16 h, posteriormente foram pré-tratados, por via oral, com ranitidina 60 mg/kg (controle positivo), veículo solução NaCl 0,9 % (controle negativo) e EAMt (200 mg/kg). Após 30 minutos, os animais receberam por via subcutânea (s.c), piroxicam 30 mg/kg para indução da lesão gástrica. Quatro horas após a indução, os camundongos foram eutanasiados por anestesia, os abdomens foram abertos, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

Figura 8- Desenho experimental das úlceras gástricas induzidas por AINE.



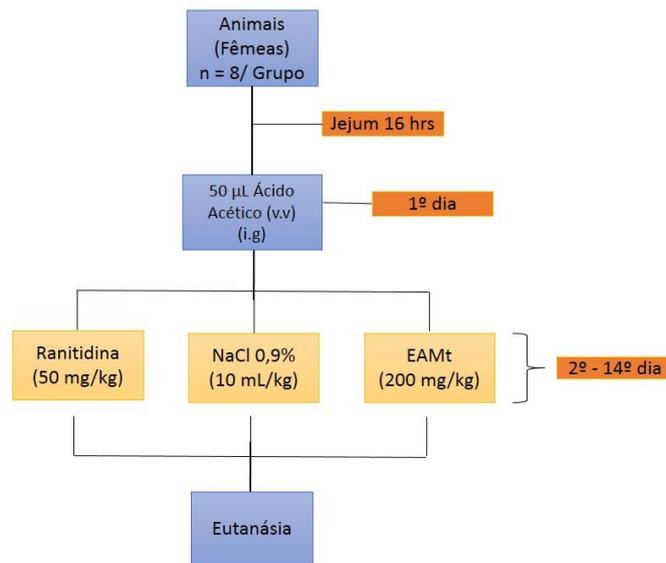
Fonte: Autor.

4.9.4 Úlcera Gástrica Crônica Induzida por Ácido Acético (OKABE et al., 1971)

A úlcera crônica foi induzida por ácido acético a 20%. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (Figura 9) e anestesiados com cetamina (0,5 ml/kg) e xilazina (0,25 ml/kg), via intraperitoneal, em seguida foi realizada a laparotomia para exposição do estômago. Foi realizada uma injeção na camada serosa do estômago, contendo uma solução de ácido acético a 80 %, para delimitar a área lesionada. Após a remoção da injeção, o local foi lavado com solução salina e a cavidade abdominal foi suturada. No segundo dia após a indução da úlcera, foi iniciado o tratamento, duas vezes ao dia, com veículo (solução NaCl 0,9 %, v.o.), ranitidina (40 mg/kg, v.o.) e o EAMt (200 mg/kg, v.o.), durante 14 dias. No 15° dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seus estômagos retirados e

abertos pela curvatura maior, lavados com água destilada, fotografados e determinado o ILU com o auxílio do programa ImageJ®. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (mm²) em relação à área total do corpo gástrico.

Figura 9- Desenho experimental das úlceras gástricas induzidas por Ácido Acético 20 %.



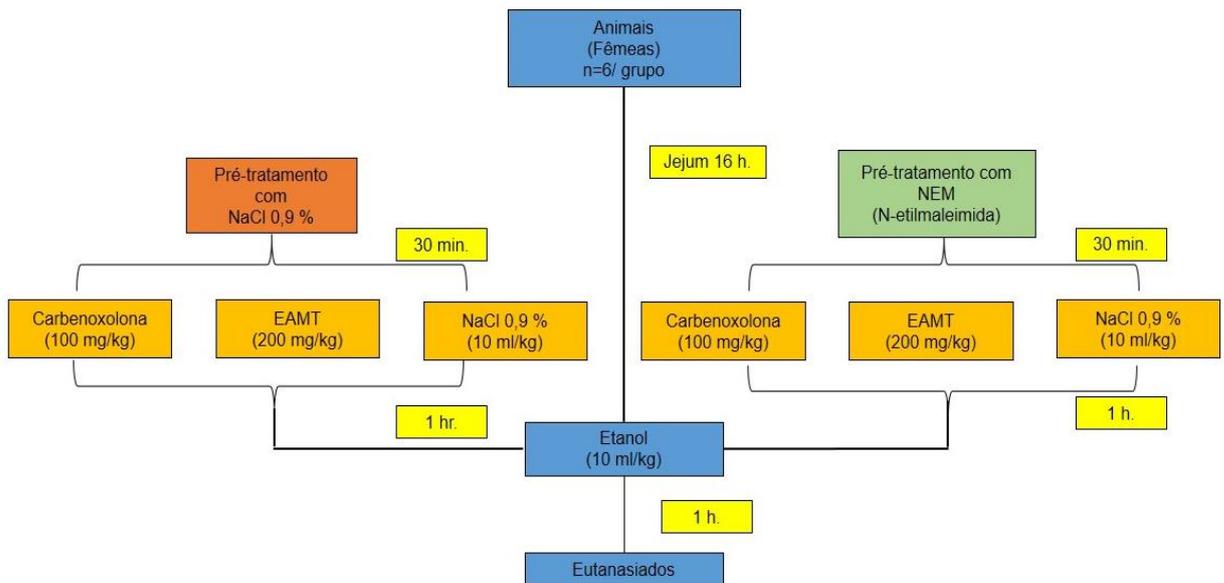
Fonte: Autor.

4.10 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidrílicos na Gastroproteção (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999).

Os animais foram submetidos a um jejum de sólidos por 16 hrs, e foram distribuídos em seis grupos experimentais (Figura 10). Conforme pré-tratamento, três grupos receberam solução salina 0,9 % e os outros três grupos receberam N-etilmaleimida (NEM), um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos, 10 mg/kg por via intraperitoneal. Após 30 minutos das respectivas administrações, os grupos foram tratados por via oral com solução salina 0,9% (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo) e o EAMt na dose de 200 mg/kg. Após 1 hora dos respectivos

tratamentos, os camundongos receberam etanol absoluto na dose de 10 ml/kg, por via oral, como agente lesivo. Decorridos 60 minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos foram abertos e fotografados para determinação da área de lesão ulcerativa (ALU), com o auxílio do programa ImageJ®.

Figura 10- Desenho experimental da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção.



Fonte: Autor.

4.11 Atividades Imunomodulatórias

4.11.1 Isolamento dos Esplenócitos

Todo procedimento experimental foi realizado de acordo com a metodologia de Melo et al. (2011). Após a eutanásia dos camundongos Balb/C, por deslocamento cervical, foi realizada a remoção do baço assepticamente e colocado em tubo Falcon, contendo meio RPMI 1640 com Soro Fetal Bovino (SFB). Em fluxo vertical, os baços foram transferidos para placas de Petri contendo meio preparado, onde foram macerados para obtenção das suspensões celulares. As suspensões foram

transferidas para tubos Falcon, contendo cerca de 10ml do meio incompleto. O homogenato dos baços macerados sobrepostos em um camada Ficoll-Paque TM Plus, com a densidade ajustada a 1.076 g/mL, foram centrifugados em temperatura ambiente em 500 g por 25 min. A interface da camada de células, que contém células do sistema imunológico, foi recuperada com uma pipeta Pasteur, lavada duas vezes em tampão fosfato salino (PBS) e centrifugada a 500 g por 10 min. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão, utilizando o azul de tripan. As células utilizadas constaram viabilidade maior que 98%.

4.11.2 Avaliação da Citotoxicidade através do Ensaio de Viabilidade Celular

Análise de viabilidade celular foi realizada através de anexina V-FITC e iodeto de propídio. Os esplenócitos (10^6 células) de cada animal, foram centrifugados a 4 °C em 450 g durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e 1ml de PBS foi adicionado ao precipitado e centrifugado a 4 °C em 450 g durante 10 min, sendo descartado o segundo sobrenadante. O sedimento foi resuspenso em um tampão de ligação (10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂), e foi adicionado, a cada tubo de citômetro devidamente identificado, a anexina V conjugada com isotiocianato de fluorescência (FITC) (1:500) e o iodeto de propídio (PI, 20µg/ml; 10^6 células). A citometria de fluxo foi realizada em um FACSCalibur (Beckton Dickinson Biosciences) e as análises realizadas utilizando-se o software CELL QUEST PRO (Beckton Dickinson). A análise dos resultados foram realizadas em gráficos dot plot, nos quais a Anexina-FITC⁻/PI⁺ foram consideradas células necróticas e Anexina-FITC⁺/PI⁻, representam esplenócitos na fase inicial de apoptose, e duplo negativo considerado o dot plot de células viáveis.

4.11.3 Dosagens de Citocinas em Esplenócitos de Camundongos

A dosagem de citocinas dos perfis Th1 e Th2 nos sobrenadantes de cultura coletados foi determinada através da técnica de Cytometric Bead Array System (CBA). A CBA foi utilizada para a mensuração quantitativa das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17, conforme recomendado pelo fabricante em amostras de sobrenadante de culturas submetidas aos estímulos do composto isolado. Esta técnica envolve uma mistura de 5 esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas detectadas no canal FL-2. Desta forma, 50 μ l da mistura de esferas de captura, marcadas com os anticorpos anti-TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 foram adicionadas em cada tubo e foram adicionados 50 μ l do sobrenadante de cultura e do reagente *Human Chemokine PE Detection* em todos os tubos. Após essa etapa, as amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e 1 ml da solução tampão foi adicionado aos tubos e centrifugados a 200 g por 5 min. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 100 μ l em cada tubo, onde foram adicionados 300 μ l de solução tampão (*Wash Buffer*) para ressuspender as esferas e posterior leitura das amostras no citômetro de fluxo, no software CellQuestPro (Beckton Dickson).

4.11.5 Ensaio de proliferação com Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Éster (CFSE)

Para o ensaio de proliferação celular foram utilizados três grupos experimentais: **Grupo I** – Esplenócitos estimulados apenas *in vitro* com EAMt na concentração de 6 μ g/ mL; **Grupo II**- Camundongos estimulados *in vivo*, através da inoculação por via subcutânea de EAMt na dose de 50 mg/kg e esplenócitos, dos mesmos camundongos, estimulados *in vitro* com 6 μ g/ml de EAMt e o **Grupo III**- Plasma sanguíneo dos animais estimulados *in vivo* com o EAMt. Em todos os grupos

experimentais, os animais receberam um único estímulo in vivo de EAMt, e foram eutanasiados 72 hrs após, por deslocamento cervical. Eles tiveram os baços removidos para isolamento de células imunes e a coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca. Os esplenócitos dos camundongos foram cultivados para isolamento de células imunes ($4 \cdot 10^6$ células / poço) em placas de cultura de 96 poços (TPP, St. Louis, Suíça) a 37 C e 5% de CO₂. As células receberam estímulos do EAMt, e após 48 horas foi avaliado o potencial mitogênico do extrato através do CFSE.

As células foram transferidas para tubos de centrifugação de polipropileno de 15 ou 50 ml, e lavadas por duas vezes em DPBS 1X para remover quaisquer proteínas séricas residuais. O CFSE de estoque foi adicionado à suspensão de células, as quais foram suspensas em banho maria a 37 °C durante 10-15 minutos. Em seguida foi adicionado o DPBS 1X nas células, o sobrenadante foi decantado e misturado suavemente para romper o sedimento celular, adicionou-se 10 mL de meio completo com FBS a 10%, seguido de centrifugação. As células foram resuspendidas em meio completo e realizado a análise por citometria de fluxo.

4.12 Análise Estatística

Nos resultados obtidos em ensaios de atividade gastroprotetora, os dados foram analisados utilizando ANOVA seguido com pós-teste (Dunnnett e/ou Tuckey). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (d.p.) e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados com software GraphPad Prisma 5.0 San Diego, CA, EUA.

Para os ensaios imunológicos, os dados foram analisados por testes não paramétricos. Para as diferenças entre grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney. Todos os resultados foram expressos pela média dos valores dos grupos \pm desvio padrão (d.p.) e analisados considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Química

5.1.1 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica permite a identificação qualitativa de diferentes grupos de metabólitos secundários presentes no extrato aquoso obtido das entrecascas de *M. tenuiflora* (EAMt). Foi verificado a presença de flavonoides, traços de fenilpropanoides, proantocianidinas e leucoantocianidinas, além de taninos hidrolisáveis. (Tabela 2)

Tabela 2 - Caracterização fitoquímica do extrato aquoso de *M. tenuiflora*.

Classe de metabólitos secundários	<i>Mimosa tenuiflora</i>
Flavonoides	+
Fenilpropanoides	tr
Triterpenos	-
Esteroides	-
Saponinas	-
Monoterpenos e Sesquiterpenos	-
Alcaloides	-
Proantocianidinas e leucoantocianidinas	+
Cumarinas	-
Quinonas	-
Taninos Hidrolisáveis	++

Legenda: (+++) forte; (++) médio; (+) fraco; (-) ausente; (tr) traços. Fonte: o autor.

Os metabólitos secundários, são substâncias responsáveis por atribuir as atividades biológicas exercidas pelas plantas, além de possuírem intensa atividade farmacológica. Possuem estrutura complexa e de baixo peso molecular, por suas características químicas, farmacológicas e toxicológicas, são capazes de assegurar o uso benéfico de plantas medicinais (PEREIRA & CARDOSO, 2012; JAIN, 2015).

Estudos fitoquímicos realizados com o extrato aquoso das cascas de *M. tenuiflora* por Zippel et al. (2009), atribuíram a atividade cicatrizante desta espécie à eficácia da combinação de diferentes metabólitos secundários, como taninos e saponinas. Taninos hidrolisáveis, saponinas e flavonoides foram identificados nos estudos feitos por Silva et al. (2013) a partir do extrato etanólico das cascas desta espécie. No extrato hidroetanólico das cascas de *M. tenuiflora* foram identificados a presença de fenóis, taninos, catequinas e flavonoides (NASCIMENTO et al., 2016).

No prospecção fitoquímica realizada, foi identificada a presença de flavonoides, traços de fenilpropanoides, taninos hidrolisáveis, proantocianidinas e leucoantocianidinas, estando de acordo com estudos realizados anteriormente com o EAMt, atribuindo uma elevada capacidade antioxidante e antimicrobiana desta espécie (ZIPPEL, 2009).

Tanto os taninos hidrolisáveis quanto os taninos condensados, proantocianidinas e leucoantocianidinas, possuem suas atividades farmacológicas atribuídas à três principais características: a capacidade de complexação com íons metálicos, a alta atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a habilidade de complexar-se a com outras moléculas. Os taninos também auxiliam no processo de cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações (SIMÕES et al., 2007). Estudos comprovaram a ação dos taninos no tratamento de úlceras gástricas, através da interação com as proteínas do muco, conferindo um efeito citoprotetor, através da formação de um revestimento proteico na mucosa gastrointestinal (MOLEIRO et al., 2009).

5.1.2 Teor de Fenóis Totais

Os fenóis totais quantificados no EAMt resultaram em $184,65 \pm 0,39$ mg EAG/g de extrato. Os compostos fenólicos compreendem uma das classes de metabólitos secundários amplamente distribuídas no reino vegetal, variam desde estruturas simples com um anel aromático até estruturas altamente complexas e poliméricas, como taninos e ligninas (SUMBUL; AHMAD, 2011).

A maioria desses compostos são encontrados sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo muito reativos quimicamente, e possuem alta propriedade de complexação com metais (SIMÕES et al., 2007). Esses metabólitos desempenham um papel fundamental na prevenção de doenças cardiovasculares, em tipos de câncer específicos, diabetes e disfunção cerebral (SCALBERT et al., 2005). Dentre as principais propriedades biológicas dos compostos fenólicos, a atividade antioxidante é enfatizada, sugerindo que estes neutralizam diretamente os oxidantes reativos através da ingestão de antioxidantes naturais (ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

Estudos comprovaram que alguns desses compostos fenólicos aumentam a atividade das PGs, induzem uma maior produção de muco na mucosa gástrica, e a protegem contra diferentes agentes necróticos, mostrando eficiente efeitos citoprotetores (ALARCÓN DE LA LASTRA et al., 1993, 1994; BORRELI & IZZO, 2000).

5.1.3 Teor de Flavonóides

A quantificação do teor de flavonoides no EAMt foi de $1,64 \pm 0,26$ mg EQ/g de extrato. Os flavonoides constituem o maior e mais importante grupo de polifenóis do reino vegetal, apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-proliferativas, e entre outras (MOTA et al., 2009). Estudos comprovaram sua eficácia na prevenção ou redução das lesões gástricas induzidas por diferentes agentes ulcerogênicos. Essa classe de metabólitos contribuem com o aumento no conteúdo de PGs na mucosa gástrica, diminuem a secreção de histamina, eliminam e inibem a

formação de radicais livres, além de impedir o crescimento de *H. pylori* (REPETTO; LLESUY, 2002).

Diversos mecanismos de ação estão envolvidos no efeito citoprotetor desses metabólitos. No que se diz respeito a atividade antiulcerogênica, os principais mecanismos são: as propriedades antioxidantes, a quelação de íons metálicos de transição, o aumento de proteínas e antioxidantes não proteicos e a redução da peroxidação lipídica (MOTA et al., 2009).

5.2 Atividades Antioxidantes *in vitro*

Na avaliação da capacidade antioxidante foram utilizados diferentes metodologias. Para uma triagem inicial, foram realizados métodos que avaliam o sequestro de radicais livres através da doação de elétrons: os de inibição do radical ABTS[•], e o de sequestro de radical livre do DPPH^{•+}. Em seguida, foi realizado a atividade antioxidante total (ATT) e a redução do íon férrico (FRAP). A tabela 3 mostra os resultados das atividades antioxidantes.

Tabela 3- Atividades antioxidantes do extrato de *M. tenuiflora*.

Atividades antioxidantes	<i>Mimosa tenuiflora</i>
Sequestro do DPPH (IC ₅₀ µg/mL)	22,25 (17,61 a 28,10)
Inibição do ABTS (IC ₅₀ µg/mL)	94,16 (77,87 a 113,9)
ATT (1mg - %)	48,42 ± 2,86
FRAP (mg EFeSO ₄ /g extrato)	599,81 ± 2,32
Fenóis Totais (mg EAG/g extrato)	184,65 ± 0,39
Flavonóides (mg EQ/g extrato)	1,64 ± 0,26

Nota: (mg EFeSO₄)- miligrama equivalente sulfato ferroso; (mg EAG) - miligrama equivalente a ácido gálico; (mg EQ)- miligrama equivalente de quercetina.

A análise de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ fundamenta-se na capacidade de antioxidantes para reduzir o radical $ABTS^{\bullet}$, o $ABTS^{\bullet+}$ em solução etanólica se apresenta na cor azul. À medida em que a amostra sequestra os radicais livres, ocorre uma alteração na coloração da solução para amarelo, em que a absorvância máxima é de 734 nm (RE et al., 1999). O EAMt apresentou uma concentração inibitória (IC_{50}) de 94,16 $\mu\text{g/ml}$ do radical $ABTS$, enquanto que no sequestro de $DPPH^{\bullet}$, apresentou IC_{50} de 22,25 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 10).

No sequestro do radical livre do $DPPH^{\bullet}$, ocorre uma reação com um doador de hidrogênio, obtendo uma forma reduzida, a qual é acompanhada pelo desaparecimento da cor violeta. A diminuição de absorvância é dependente, linearmente da concentração do antioxidante (PISOSCHI, 2011).

Na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ o EAMt sequestrou quase 100% dos radicais livres de $DPPH^{\bullet}$. Estudos corroboram com os achados no presente estudo. Nascimento et al (2016) analisou a capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico e das frações das cascas de *M. tenuiflora*, mo qual as maiores atividades antioxidantes foram observadas nas frações de acetato de etila e na hidrometanólica. Com valores de EC_{50} de $7,63 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$ e $6,21 \pm 0,22 \mu\text{g/ml}$ quando comparadas com o ácido gálico, o controle. Essa alta atividade antioxidante foi atribuída à presença de compostos fenólicos presentes no extrato. Estudos realizados com própolis de *M. tenuiflora* apresentaram atividade de sequestro do radical $DPPH^{\bullet}$, correspondendo a aproximadamente 10% - 13% da atividade da Quercitina pura (FERREIRA et al., 2017).

O EAMt obteve uma alta atividade antioxidante, dependente do aumento de sua concentração, apresentando efeito protetor contra muitos processos patológicos causados por agentes oxidantes como os radicais livres.

Após a triagem inicial foram realizadas metodologias que atuam na redução de íons metálicos, no caso, a atividade antioxidante total (ATT) e a redução do íon férrico (FRAP). O ensaio do ATT é um método quantitativo de capacidade antioxidante, através da formação de complexo fosfomolibdênio. O ensaio baseia-se na redução de molibdênio, que encontra-se no estado de oxidação (VI), à fosfato/molibdênio (V) que possui a coloração verde em pH ácido (SHABBIR, et al., 2013).

No ensaio do ATT, o extrato EAMt apresentou 48,42 % \pm 2,32 de capacidade antioxidante, apresentando uma boa atividade quando comparado ao ácido ascórbico, composto utilizado como padrão, o qual possui 100% de atividade para este teste. O EAMt também possui uma excelente atividade antioxidante quanto ao FRAP, seu resultado está um pouco superior ao do padrão (Figura 10).

O método FRAP baseia-se na redução do complexo de Fe³⁺-TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) à sua forma ferrosa em pH ácido (PRIOR & CAO, 1999). A ligação de Fe²⁺ ao ligante gera uma cor azul muito intensa, correlacionando assim com a concentração de antioxidantes.

O estudo da atividade antioxidante de espécies do gênero *Mimosa* também foi realizado por Zhang (2011), que avaliou a atividade antioxidante de diferentes partes de *Mimosa pudica* Linn., e dentre os extratos analisados, o das folhas apresentou maior capacidade antioxidante quando comparado com a do caule. O autor atribuiu essa alta capacidade antioxidante aos flavonoides e compostos fenólicos presentes no extrato.

5.3 Atividade Antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana do EAMt, obtidos pelo método de difusão de disco, frente a bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*), Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. marcescens*), ácido-álcool resistentes (*M. smegmatis*) e levedura (*C. albicans*) estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise da atividade antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* frente a bactérias Gram-positivas, Gram negativas, álcool-ácido resistentes e a leveduras, pelo método de difusão de disco.

	Microrganismos								
	Gram-positivos				Gram-negativos			Levedura	Álcool-ácido resistente
	<i>S.aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. tenuiflora</i>	14,3± 0,33 mm	16,2± 0,33 mm	NI	13,0±0,33 mm	NI	NI	NI	NI	NI
Canamicina (30 µg/disco)	23,3± 0,58 mm	27,0± 1mm	13,3±0,58 mm	13 mm	19,7±0,58 mm	14,7± 0,58 mm	14,7± 0,58 mm	NT	40 ± 1 mm
Cetoconazol (300 µg/disco)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	24±1mm	NT

NI – Não inibiu; NT – Não testado

Fonte: Autor.

Através da análise dos resultados é possível observar a atividade de *M. tenuiflora* frente apenas à microrganismos Gram-positivos, apresentando halos de inibição de $14,3 \pm 0,33$ mm para *S. aureus*, $16,2 \pm 0,33$ mm para *M. luteus* e $13 \pm 0,33$ mm para *E. faecalis*. Como controle positivo foi utilizado a Canamicina, que apresentou halos de inibição superiores a 13 mm para todos os microrganismos Gram- negativos e ácido-álcool resistentes, além de cetoconazol para levedura. O EAMt não apresentou halos de inibição para *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. marcescens*, *M. smegmatis* e *C. albicans*. Segundo Stevam et al. (2009), são considerados ativos os extratos de plantas que formaram zonas de inibição ≥ 10 mm.

Estudos realizados por Bezerra et al. (2009) demonstraram a eficácia do extrato de *M. tenuiflora* sobre cepas de *S. aureus* em diferentes concentrações, sendo observado halos de inibição entre 6 e 25 mm. Neste estudo a atividade antimicrobiana do extrato foi atribuída à presença de taninos e flavonoides. Estudos farmacognósticos de *M. tenuiflora*, apontam os taninos como um dos principais compostos responsáveis pelas atividades biológicas do caule da planta (RIVERA-ARCE, 2007; MECKES-LOZOYA et al., 1990). O extrato etanólico das cascas foi ativo contra *M. luteus* e *B. subtilis* (HEINRICH et al., 1992).

Os taninos participam ativamente na ação antimicrobiana através da inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a complexação dos substratos dessas enzimas, alterando o metabolismo dos patógenos, levando à redução desses elementos no metabolismo dos microrganismos. Os flavonoides desempenham diversos sistemas enzimáticos, inclusive os relacionados à atividade antimicrobiana (SIMÕES et al., 2007).

A partir destes achados, o extrato foi testado frente isolados clínicos multirresistente de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Apresentando halos de inibição superiores a 15 mm para as cepas de *P.aeruginosa* e halos superiores a 31 mm para cepas de *S. aureus*. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana do EAMt frente a cepas de isolados clínicos multirresistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

	Microorganismos				
	<i>P. aeruginosa</i> (261)	<i>P. aeruginosa</i> (262)	<i>S. aureus</i> (679)	<i>S. aureus</i> (700)	<i>S. aureus</i> (719)
<i>M. tenuiflora</i>	16,33±	15,33±	34,66±	37 ± 2 mm	31,33±1,52mm
Canamicina	0,57mm	0,57mm	0,57mm		
	20,00±0,00 mm	19,35±0,33 mm	40,00±0,67 mm	42,33±1,20mm	40,00±1,22mm

Fonte: Autor.

A concentração mínima inibitória (CMI), bem como a concentração mínima bactericida (CMB) foram obtidas pelo método de microdiluição. Segundo Holetz et al. (2002) e Regasini et al. (2010), extratos de plantas com atividade antimicrobiana com valores de CMI e CMB entre 100-500 µg/mL possuem atividade moderada. Entre 500 e 1000 µg/mL, a atividade é considerada fraca e os extratos de plantas com CMI e CMB em 2000 e >2000 µg/mL são consideradas inativas.

O EAMt atuou em 40% das cepas 679 e 719 com CMI de 1000 µg/mL, caracterizando uma atividade moderada, e 20% sobre a cepa 700 de *S. aureus* na concentração 2000 µg/mL, caracterizando inatividade. Sobre as cepas 261 e 262 de *P. aeruginosa* a CMI apresentou valores >2000 µg/mL e a CMB atuou em 100% na concentração >2000 µg/mL para todas as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, essa alta atividade bacteriostática pode estar relacionada à presença de taninos no EAMt. Esse grupo de metabólitos secundários são bem conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, atuando através da inibição de enzimas bacterianas, impedindo a complexação com seus substratos, ou através da complexação com íons metálicos e assim diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (LOGUERCIO, et al., 2005; DJIPA, et al., 2000).

Estudos realizados com o EAMt apresentaram valores de CMI de 0,18 mg/mL a 0,36 mg/mL, frente a isolados clínicos de *S. aureus* (PADILHA, et al., 2008). O extrato etanólico à quente da entrecasca de *M. tenuiflora* apresentou atividade

bacteriostática e bactericida *S.aureus*, e apresentou halos variando seu diâmetro entre 11-15 mm, considerou-se a CIM a concentração de 2,5% (BEZERRA, et al., 2011). Os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6– Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração mínima bactericida (CMB) do extrato aquoso das entrecascas de *M.tenuiflora* frente a cepas de isolados clínicos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Cepas	Extrato de <i>M. tenuiflora</i>	
	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
261	>2000	>2000
262	>2000	>2000
679	1000	>2000
700	2000	>2000
719	1000	>2000

Cepas de *P. aeruginosa* (261, 262) Cepas de *S. aureus* (679, 700 e 719)

Fonte: Autor.

5.4 Atividades Gastroprotetoras

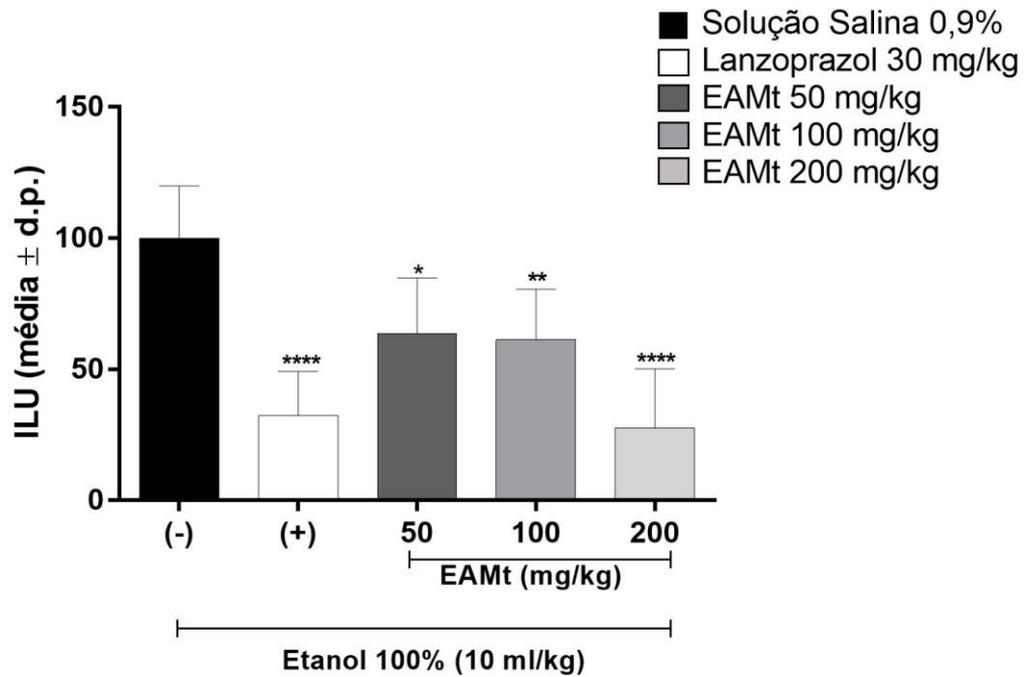
5.4.1 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Absoluto

Com o objetivo de avaliar o efeito gastroprotetor do extrato aquoso de *M. tenuiflora* foi realizado a indução de modelos ulcerogênicos agudos. No primeiro modelo, a úlcera gástrica foi induzida pela administração de etanol absoluto.

Os resultados mostraram que a administração do EAMt na dose de 200 mg/kg e o lansoprazol foram capazes de reduzir significativamente a formação de lesões ulcerativas induzidas por etanol absoluto. Após os tratamentos, os índices de lesões ulceradas corresponderam à 63, 61 e 27 %, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg de EAMt, respectivamente, em comparação com o grupo controle (Figura 11). Esses resultados foram confirmados pela realização dos estudos histopatológicos através de microscopia óptica. O pré-tratamento com EAMt na dose 200 mg/kg e o lansoprazol

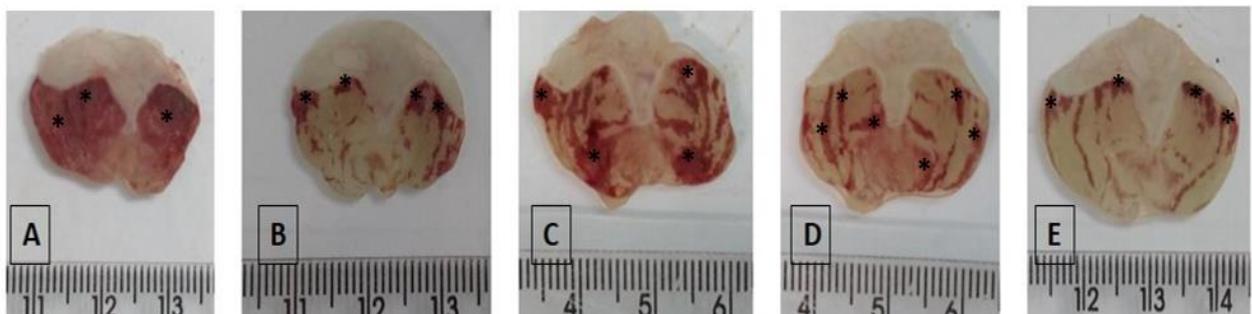
(30 mg/kg) se mostraram eficazes no tratamento da úlcera gástrica, promovendo a proteção da mucosa e consequente preservação do epitélio, quando comparados ao grupo controle negativo (Figura 12 e 13).

Figura 11. Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e do Lanzoprazol sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.



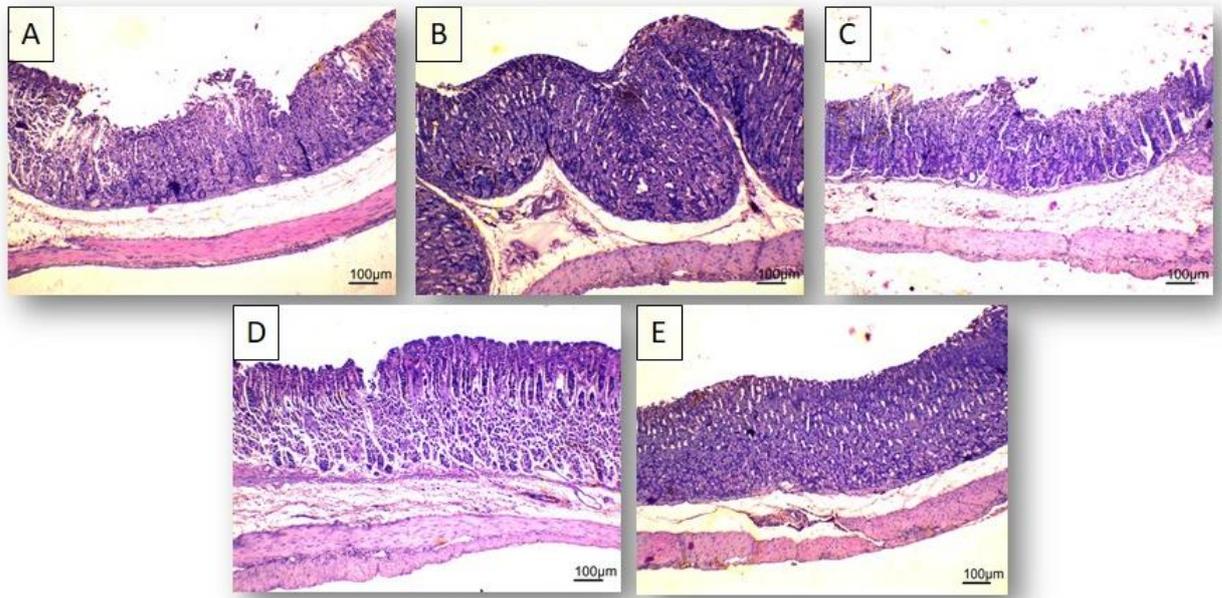
Os resultados estão expressos em média \pm d.p. de 6 animais, utilizando a análise de variância (ANOVA); seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, comparado ao controle negativo (-), **** $p < 0,0001$.

Figura 12- Estômagos de camundongos pré-tratados v.o. com solução salina 0,9 % (A), Lanzoprazol 30 mg/kg (B), EAMt 50 mg/kg (C), EAMt 100 mg/kg (D), EAMt 200 mg/kg (E). (Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto)



Fonte: Autor.

Figura 13- Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e do lansoprazol sobre lesões gástricas induzidas por etanol 100% em camundongos.



Fonte: Autor

Cortes na coloração de hematoxilina e eosina (HE) (A-E). (A) Apresentação microscópica das lesões ulcerativas na mucosa gástrica induzidas por etanol pré-tratado com solução salina. (B) Mucosa gástrica do grupo pré-tratado com lansoprazol. (C-D-E) Mucosa gástrica dos grupos pré-tratados com EAMt nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, respectivamente. Escala: 100µm.

A administração oral do etanol, considerado um agente necrotizante de ação direta, é capaz de induzir lesões na mucosa gástrica promovendo alterações microvasculares acentuadas dentro de alguns minutos após sua aplicação. Agindo através da atenuação dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica e decorrente da combinação de diversos fatores, o etanol pode atingir a camada mucosa através da ruptura da barreira mucosa-bicarbonato, ocasionando rompimento celular na parede dos vasos sanguíneos (MOLEIRO, et al., 2009; FERREIRA, et al., 2008).

O etanol causa necrose nas células superficiais da mucosa gástrica através da precipitação dos componentes citoplasmáticos. Deste processo participam mediadores vasoativos, como leucotrienos C4 (LTC4) e histamina (JAMAL, et al., 2006). Esses mediadores fazem com que as membranas submucosas não realizem uma diminuição do fluxo sanguíneo da microcirculação na mucosa, promovendo a

formação do edema, e conseqüentemente o aumento das lesões ulcerativas (KONTUREK, et al., 1988; WALLACE, 2001).

O surgimento de lesões hemorrágicas lineares, edema extenso na camada submucosa, infiltração de células inflamatórias e perda de células epiteliais no estômago são características típicas de lesão induzida por etanol absoluto. Essas irregularidades ocasionadas pelo etanol ocorrem através de diferentes mediadores como citocinas e radicais livres derivados de oxigênio (ALRASHDI, et al., 2012).

O pré-tratamento com o EAMt exibiu capacidade de proteção à mucosa gástrica contra esses danos causados pelo etanol absoluto. Os resultados mostrados nas figuras 12 e 13 mostram a redução significativa das áreas de lesão ulcerada quando comparada com o grupo controle negativo, sugerindo que o grupo controle positivo, tratado com lansoprazol, e o grupo EAMt na dose de 200 mg/kg tenha um efeito gastroprotetor contra os efeitos necrotizantes da administração do etanol por v.o. O lansoprazol, utilizado como fármaco padrão no tratamento de úlceras gástricas, é um inibidor da bomba de prótons e exibe efeito protetor antissecretório (PEREIRA, et al., 2017). Não se sabe a causa específica deste efeito gastroprotetor, uma vez que o surgimento das úlceras pelo etanol tem causas multifatoriais, sendo assim, o extrato pode estar relacionado com a estimulação na produção de muco-bicarbonato, pela atividade antioxidante de *M. tenuiflora* ou pelo aumento do fluxo sanguíneo.

Estudos realizados com espécies da família Mimosoideae apresentam atividades antiulcerogênicas frente a diferentes agentes indutores de lesão gástrica. Fernandes et al. (2010) atribuíram à atividade gastroprotetora de *Parkia platycephala* Benth., a presença de compostos fenólicos no extrato etanólico das folhas. Os compostos antioxidantes, como os fenólicos e outros metabólitos secundários, participam do efeito gastroprotetor dos extratos vegetais, a partir do sequestro ou redução de espécies reativas de oxigênio. O extrato hidroetanólico de *Acacia nilotica* Willd. apresenta atividade gastroprotetora em diferentes modelos ulcerogênicos. Essa atividade foi atribuída à grande quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato vegetal testado (BANSAL & GOEL, 2012). Estudos realizados por Alambayan et al. (2015), mostraram que o extrato aquoso de *Acacia catechu* Willd. apresenta efeito antiulcerogênico.

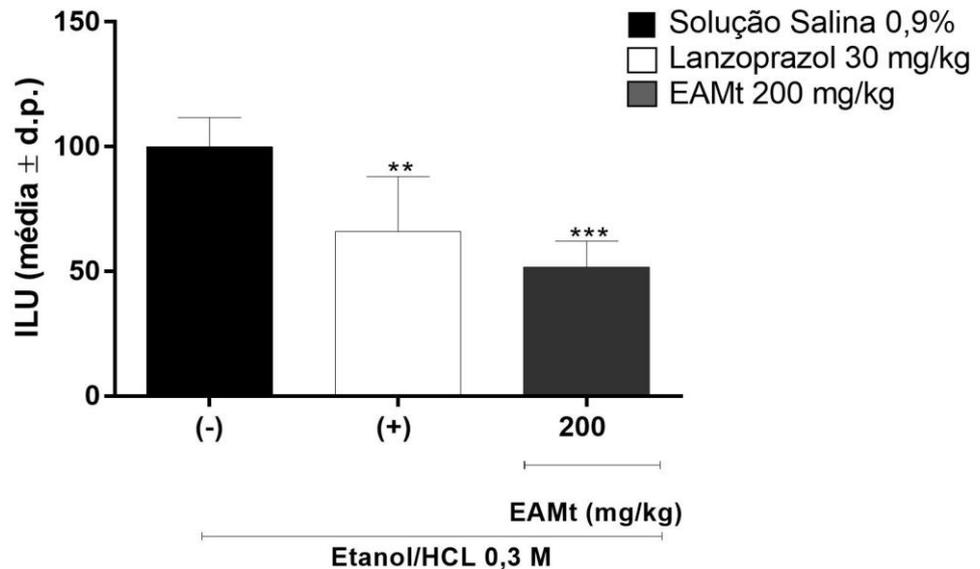
As espécies reativas de oxigênio são estimuladas na presença do etanol, sendo responsáveis pela peroxidação lipídica e quimiotaxia das células inflamatórias para o local da lesão (YU, et al., 2002). Sendo assim, a presença de compostos fenólicos no EAMt colaboraram para a eficácia no efeito gastroprotetor dessa espécie vegetal.

Espécies do gênero *Mimosa* apresentam em sua composição alta concentração de flavonoides e taninos. *Mimosa pudica* desempenha um papel importante na reparação das lesões gástricas. O efeito antiulcerogênico dessa espécie está relacionado à sua capacidade de inibição da secreção ácida e sua natureza antioxidante (DIVYA, et al., 2011). A presença de flavonoides no EAMt contribuem para o efeito gastroprotetor, uma vez que esses compostos estimulam a biossíntese de PGs. Azevêdo et al. (2015) identificaram a presença de taninos condensados nas entrecascas de *M. tenuiflora*. Estudos realizados por Gonçalves et al. (2010) mostraram que *Mimosa caesalpiniaefolia* apresenta altas quantidades de taninos em suas entrecascas. Os taninos conferem à planta atividades antissecretórias e citoprotetoras, através da formação de uma camada protetora na mucosa, evitando a absorção de substâncias tóxicas e promovendo resistência contra ação de enzimas proteolíticas (MEIRA-DE-FARIA, et al., 2012).

5.4.2 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol/HCL

Os resultados mostraram que a administração do EAMt na dose de 200 mg/kg e o lansoprazol foram capazes de reduzir significativamente a formação de lesões ulcerativas induzidas por etanol/HCL. O grupo tratado com lansoprazol apresentou índice de lesão de 65%. O grupo tratado com 200 mg/kg de EAMt, apresentou 51% de índice de lesão ulcerada, comparado com o grupo controle, mostrando que houve redução significativa da área lesionada (Figura 14).

Figura 14. Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e do lansoprazol sobre lesões gástricas induzidas por Etanol/HCL 0,3 M em camundongos.



Fonte: Autor.

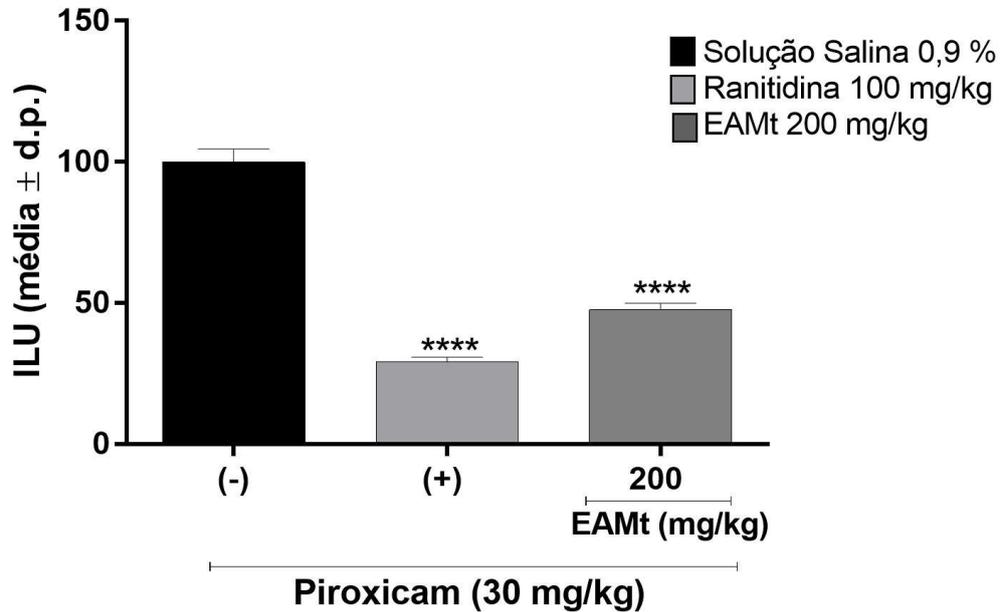
Os resultados estão expressos em média \pm d.p. de 6 animais, utilizando a análise de variância (ANOVA); seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, comparado ao controle negativo (-), **** $p < 0,0001$.

Além do etanol induzir a liberação de radicais livre, aumentar a peroxidação lipídica, aumentar o fluxo de Na^+ e K^+ no lúmen gástrico e estimular a secreção da gastrina, a presença de HCl na solução de etanol intensifica a necrose e o progresso de indução da lesão gástrica (SINGH, et al., 2008).

5.4.3 Úlcera Gástrica Induzida por Anti-inflamatório Não-esteróide

Através dessa metodologia foi possível observar que o EAMt na dose de 200 mg/kg e a cimetidina (100 mg/kg), fármaco utilizado como controle positivo, foram capazes de inibir o ILU de forma significativa, correspondendo a 47 % do grupo tratado com EAMt 200 e 29% tratado com piroxicam (Figura 15). Demonstrando o efeito gastroprotetor de EAMt frente à úlceras induzidas por piroxicam em camundongos.

Figura 15. Efeito de extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e da cimetidina sobre lesões gástricas induzidas por AINE em camundongos.



Fonte: Autor.

Os resultados estão expressos em média \pm d.p. de 6 animais, utilizando a análise de variância (ANOVA); seguido do teste de Dunnett, comparado ao controle negativo (-), **** $p < 0,0001$.

O uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais, como o piroxicam, danificam a mucosa gástrica através da inibição da enzima (COX) gástrica, resultando na redução da síntese de prostaglandinas. A inibição das prostaglandinas danifica de forma acentuada a citoproteção gástrica, por atuarem na síntese de muco e bicarbonato, na regulação da secreção ácida e no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (WALLACE, et al., 2000).

A administração de AINEs reduz o fluxo sanguíneo da mucosa, e consequente redução do pH no local do dano epitelial, dificultando o processo de restituição da mucosa e favorecendo o desenvolvimento de lesões hemorrágicas. Esses medicamentos são compostos neutros no ambiente ácido do estômago, agem localmente atravessando a membrana plasmática das células epiteliais gástricas, onde serão reionizados e retidos, ocasionando dano intracelular que representa lesão gastrointestinal local. Os AINEs também podem causar lesão sistêmica na mucosa gastrointestinal, devido à redução na síntese de PGs. As enzimas COX-1 e COX-2

catalisam a formação de prostaglandinas a partir de ácido araquidônico (HALTER; SCHMASSMANN; PESKAR et al., 2001).

A COX-1 é constitutiva, e sintetiza as prostaglandinas responsáveis por manter a integridade da mucosa, a inibição desta enzima por AINEs ocasiona a lesão ulcerativa na mucosa, devido à inibição da síntese das PGE₂. A COX-2 é indutível, por estímulos inflamatórios, os AINEs seletivos de COX-2 (coxibes) apresentam menor risco de formação de úlcera do que os não seletivos. Os AINEs também são responsáveis pelo aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular no endotélio vascular da mucosa gástrica, como os neutrófilos, provocando a liberação de radicais livres e proteases, causando lesão na mucosa gástrica (BANSAL, et al., 2009).

Os resultados obtidos demonstram que o EAMt (200 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente as lesões gástricas induzidas por piroxicam (Figura 14). Sugerindo que *M. tenuiflora* apresenta atividade gastroprotetora, atuando por um mecanismo citoprotetor frente à lesões gástricas, inibindo os mecanismos moleculares de lesões induzidas pelo efeito citotóxico direto causado pelo piroxicam.

Lacerda Neto et al. (2016) atribuiu a atividade gastroprotetora, frente a esse agente lesivo, à presença de polifenóis, flavonoides e taninos. Esses metabólitos secundários foram quantificados no extrato aquoso de *M. tenuiflora*, podendo estar relacionados com a atividade gastroprotetora do mesmo.

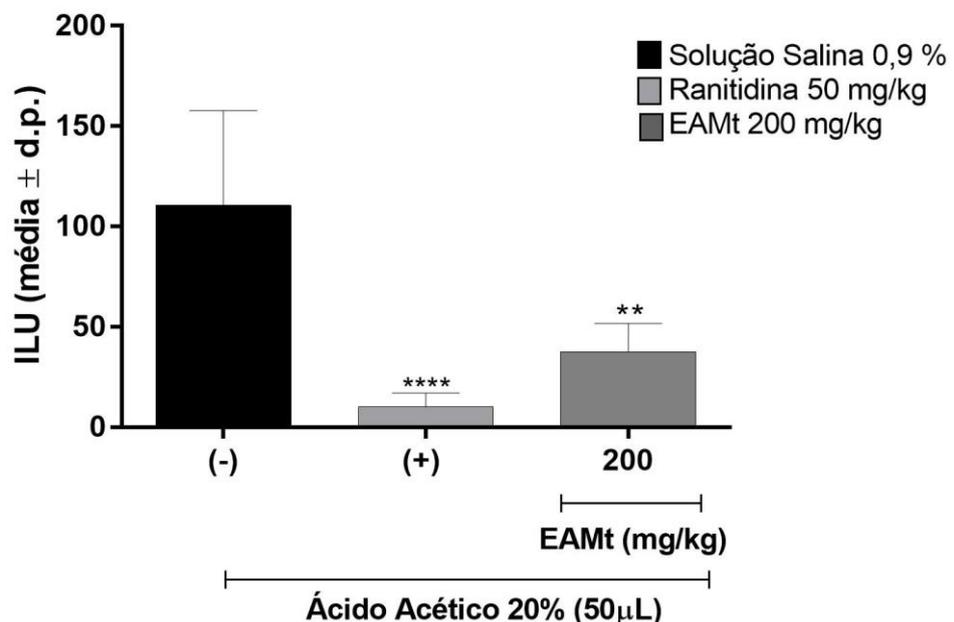
5.4.4 Úlcera Gástrica Crônica Induzida por Ácido Acético

Após a avaliação do efeito gastroprotetor do EAMt em modelos ulcerogênicos agudos, o modelo de indução por ácido acético foi utilizado para avaliar o mecanismo de cicatrização da úlcera gástrica crônica.

Os resultados obtidos demonstram que o EAMt (200 mg/kg) foi capaz de reverter os efeitos da lesão induzida pelo ácido acético na mucosa gástrica e proporcionou a cicatrização da úlcera crônica. O ILU foi de 10 % nos animais tratados com ranitidina (50 mg/kg) e 37 % nos animais tratados com EAMt na dose de 200

mg/kg, em comparação com o grupo controle. Esses resultados foram confirmados pela realização dos estudos histopatológicos através de microscopia óptica, onde o pré-tratamento com EAMt na dose de 200 mg/kg e a ranitidina (50 mg/kg) se mostraram eficazes no tratamento da úlcera gástrica, promovendo a cicatrização das lesões, quando comparados ao grupo controle negativo (Figura 16 e 17).

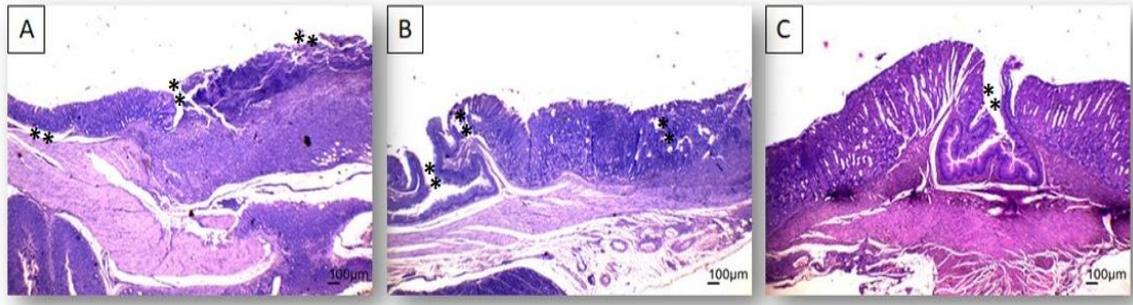
Figura 16. Efeito de extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e da ranitidina sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético 20% em camundongos.



Fonte: Autor.

Os resultados estão expressos em média \pm d.p. de 6 animais, utilizando a análise de variância (ANOVA); seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, comparado ao controle negativo (-), **** $p < 0,0001$.

Figura 17- Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (EAMt) e da ranitidina sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético 20% em camundongos.



Fonte: Autor.

Cortes na coloração de hematoxilina e eosina (HE) (A-C). (A) Apresentação microscópica das lesões ulcerativas(*) na mucosa gástrica induzidas por ácido acético 20% pré-tratado com solução salina. (B) Mucosa gástrica do grupo pré-tratado com ranitidina. (C) Mucosa gástrica do grupo pré-tratado com EAMt na doses de 200 mg/kg. Escala: 100µm.

A administração do ácido acético na superfície da camada serosa induz a formação de úlcera gástrica em camundongos, muito semelhante às úlceras gástricas humanas em termos de localização, gravidade e cronicidade, indicando que o processo de cicatrização é semelhante (OKABE & PFEIFFER, 1972).

O desenvolvimento das lesões gástricas induzidas pelo ácido acético é um processo multifatorial, iniciando com a redução do conteúdo mucoso da parede gástrica, resultante da síntese significativa de radicais livres, e causando danos à célula e à membrana celular devido ao estresse oxidativo excessivo. A síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) podem causar peroxidação lipídica, especialmente em membranas, resultando em lesão tecidual (TARNAWSKI, 2005).

De acordo com Ateufack e colaboradores (2015), os antagonistas de receptores H_2 , como a ranitidina, promovem a cicatrização de úlceras gástricas induzidas por ácido acético. Esse processo de cicatrização inclui redução da inflamação, proliferação celular, regeneração epitelial, reconstrução da glândula, formação de tecido de granulação e neovascularização.

Resultante da necrose tecidual, a úlcera é iniciada pela isquemia da mucosa, pela formação de radicais livres e pela retenção no fornecimento de nutrientes. Esses fatores atraem, para o local da lesão, células do sistema imunológico como macrófagos e citocinas pró-inflamatórias, que irão atrair fibroblastos locais, células endoteliais e epiteliais. O processo de cicatrização da úlcera é complexo, envolve migração celular, proliferação, re-epitelização, angiogênese e deposição matricial, proporcionando a formação de cicatrizes. Todas as fases desse processo são reguladas por fatores de crescimento, fatores de transição e citocinas (TARNAWSKI, 2005).

O fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), são alguns fatores de crescimento primordiais no processo de cicatrização da úlcera gástrica. Esses fatores de crescimento produzidos localmente ativam a migração e proliferação de células epiteliais através por mecanismos autócrinos e/ou parácrinos. Contribuem na regulação dos granulócitos, fibroblastos e no epitélio da re-epitelização da área lesionada. A presença desses fatores aceleram o processo de reparo da úlcera (WALLACE, 2001).

A região mucosa da margem da úlcera é caracterizada por uma "zona de cicatrização", onde as glândulas gástricas se dilatam, sofrem desdiferenciação, expressam o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) e proliferam ativamente, iniciando a re-epitelização da superfície mucosa e a reconstrução das glândulas gástricas. Em seguida, estas células migram para o tecido de granulação para re-epitelizar a base da úlcera. A re-epitelização requer migração e proliferação de células epiteliais, sendo iniciada e regulada pelos fatores de crescimento e fatores de transcrição (TARNAWSKI, 2005).

O VEGF estimula a angiogênese, processo essencial para a entrega de oxigênio e nutrientes para o local de cicatrização da lesão gástrica. E para concluir o processo de cicatrização, EGF e TGF β ₁ ativam a migração e proliferação de células epiteliais, acelerando a cicatrização de úlceras (WALLACE, 2001).

A presença de taninos proporciona a ativação de fatores de defesa gástricos e de processos cicatrizantes da mucosa. Os flavonoides participam no processo de ativação de hormônios e fatores de crescimento responsáveis pela proliferação e

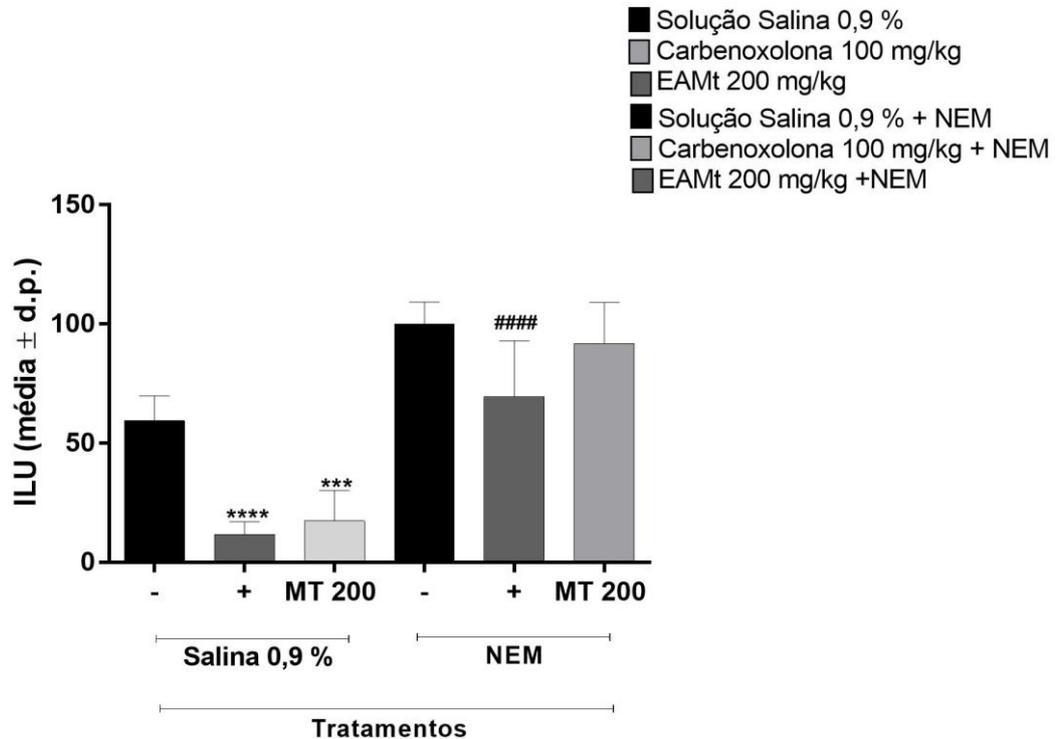
migração de células epiteliais, re-epitelização e regeneração (JÚNIOR et al.; MAJTAN et al., 2013). Esse metabólitos secundários, flavonoides e taninos, estão presentes no EAMt, e podem atribuir a atividade gastroprotetora, através da cicatrização de úlceras gástricas crônicas observadas pela redução da área de ulceração em todos os modelos experimentais testados.

5.5 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidrílicos na Gastroproteção

Diante dos resultados satisfatórios obtidos nos modelos ulcerogênicos estudados, a fim de dar continuidade à pesquisa, foi realizado a avaliação da participação dos compostos sulfidrílicos na atividade gastroprotetora do EAMt em camundongos. Os resultados mostram que os grupos previamente tratados com solução salina 0,9% (i.p) e em seguida tratados com EAMt na dose de 200 mg/kg, v.o. ou carbenoxolona (100 mg/kg, v.o.), apresentaram uma redução significativa da área de lesão de úlcera, obtendo um ILU correspondente à 11 % no grupo tratado com carbenoxolona e 17 % de inibição no grupo tratado com EAMt, comparados ao grupo controle negativo.

Nos grupos pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM), bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos, e pós-tratados com EAMt (200 mg/kg) o ILU foi de 69 % para o grupo tratado com carbenoxolona e 91% o tratado com EAMt, comparados ao grupo controle negativo. Mostrando que com a presença do bloqueador, tanto a carbenoxolona quando o EAMt não conseguiram alcançar percentuais de inibição de úlcera como os do grupo sem a presença do bloqueador. O grupo pré-tratado com NEM e EAMt apresentou uma área de lesão ulcerada maior do que o grupo sem o NEM e com o EAMt, evidenciando que a participação dos grupamentos sulfidrílicos compõe um importante mecanismo de ação gastroprotetor de *M. tenuiflora* (Figura 18 e 19).

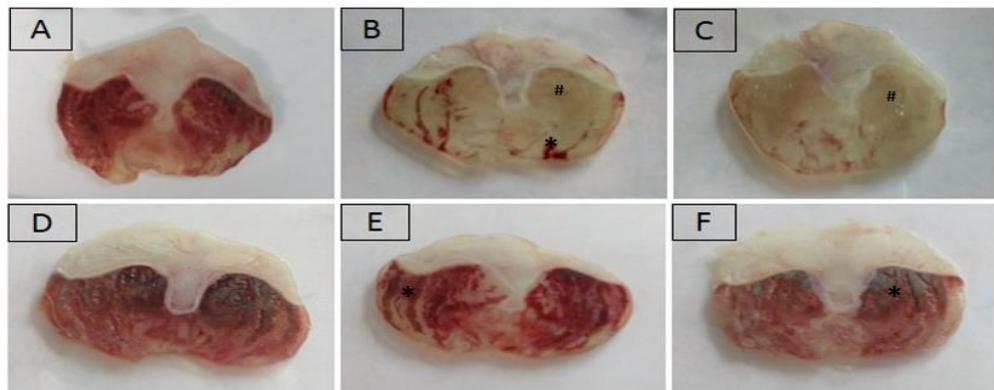
Figura 18- Efeito gastroprotetor de EAMt e da carbenoxolona após o tratamento com NEM, inibidor dos grupamentos sulfidrílicos, nas úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.



Fonte: Autor

Os resultados estão expressos com média \pm d.p. (n=5-6) utilizando a análise de variância (ANOVA); seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, comparado ao controle negativo (-) – solução salina, 0,9%, ****p<0,001; e controle negativo + NEM, ####p<0,001.

Figura 19- Estômagos de camundongos sem bloqueador, tratados com: (A) salina; B) carbenoxolona; (c) EaMt. Com bloqueador, tratados com: (D) salina; (E) carbenoxolona e (F)EAMt. Todos as úlceras foram induzidas por etanol absoluto.



Fonte: Autor

Os grupamentos sulfidrílicos endógenos são fundamentais para manutenção da integridade da mucosa gástrica e acredita-se que sejam os principais citoprotetores contra as lesões gástricas induzidas pelo etanol. Possuem a propriedade de aderir continuamente à camada de muco, formando uma barreira para a pepsina luminal, além de formar uma camada estável capaz de suportar a neutralização da superfície do ácido, evitando a digestão proteolítica da mucosa subjacente (ZARAIRA, et al., 2016).

Os grupamentos sulfidrílicos estão associados à gastroproteção através do controle natural da produção de muco. No processo de desenvolvimento das lesões gástricas, as espécies reativas de oxigênio (EROS) são liberadas e iniciam uma reação de peroxidação lipídica, culminando em morte celular. Os grupamentos sulfidrílicos se ligam a estas espécies reativas e auxiliam na redução da gravidade das lesões gástricas, impedindo a morte celular (UESHIMA; TAKEUCHI; OKAB, 1992).

O pré-tratamento com bloqueadores dos grupamentos sulfidrílicos impedem a citoproteção da mucosa gástrica promovida por compostos que contenhas esses grupamentos. Dentre as diversas atividades relacionadas a estes grupamentos, tem ênfase também, a capacidade de unir os radicais livres gerados por agentes nocivos, atuando como antioxidantes de reciclagem (RIBEIRO, et al., 2016).

No presente estudo, EAMt inibiu significativamente as úlceras induzidas por etanol na ausência do NEM. Nos grupos bloqueados, o EAMt não conseguiu inibir as úlceras induzidas por etanol e, de forma contrária, acabou acentuando o processo de formação das úlceras induzidas por etanol. Conclui-se então que o efeito gastroprotetor de *M. tenuiflora* depende da produção ou da presença dos grupamentos sulfidrílicos, através de mecanismos citoprotetores e antioxidantes.

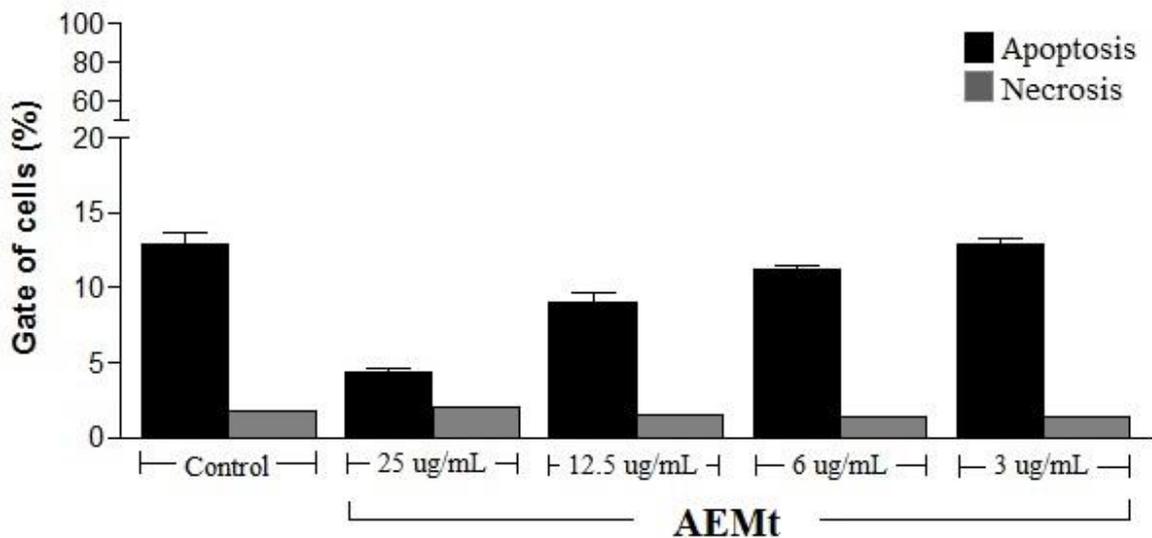
5.6 Atividades Imunomodulatórias

5.6.1 Avaliação da Citotoxicidade através do Ensaio de Viabilidade Celular.

A utilização de células do sistema imune são essenciais para estudo de atividades imunomodulatórias. Estas células são utilizadas com o intuito de simular processos *in vivo* que ocorrem quando qualquer substância é capaz de se ligar a sublinhagens linfocitárias específicas do hospedeiro. Esses ensaios podem ser utilizados para análises de viabilidade celular, proliferação celular e atividade citotóxica (MELO, et al., 2010).

Os ensaios *in vitro* deste estudo tiveram por objetivo avaliar o perfil citotóxico e imunomodulador do EAMt frente à esplenócitos de camundongo BALB/cO EAMt também foi avaliado quanto à sua citotoxicidade em culturas de células de baço de camundongos BALB/c. Nos ensaios de citotoxicidade, o EAMt não exibe um perfil tóxico à concentrações de 3 a 25 µg/mL. Fitohemaglutinina (PHA) foi utilizado como controle positivo na atividade imunomodulatória e não apresentou citotoxicidade. Os resultados mostraram que *M. tenuiflora* não induziu apoptose ou necrose, garantindo assim a segurança experimental da concentração escolhida para imunomodulação do presente estudo (Figura 20).

Figura 20- Teste de morte celular em células do baço de camundongo utilizando anexina V e iodeto de propídio. Barras verticais significam a média de 2 experimentos realizados em triplicata.



O ensaio de morte celular foi realizado para analisar o tratamento com o EAMt frente à esplenócitos de camundongo e determinar os valores de viabilidade dessas células em diferentes concentrações do extrato. Anexina V é uma proteína utilizada para marcação de células apoptóticas, ao conjugar a anexina V ao FITC (isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo. O marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (PI) é utilizado para marcar células necróticas. Corar células simultaneamente com anexina V-FITC e com PI é possível a distinguir qual o perfil de morte apresentado pelas células experimentais (STURM et al., 2006).

Nosso estudo corrobora com os achados de Valencia-Gómez et al. (2009) que também analisaram, quanto à citotoxicidade, o biocomposto Quitosana/*M. tenuiflora* e seus resultados não apresentaram perfil de dano celular.

5.6.2 Ensaio de Proliferação Celular com CFSE

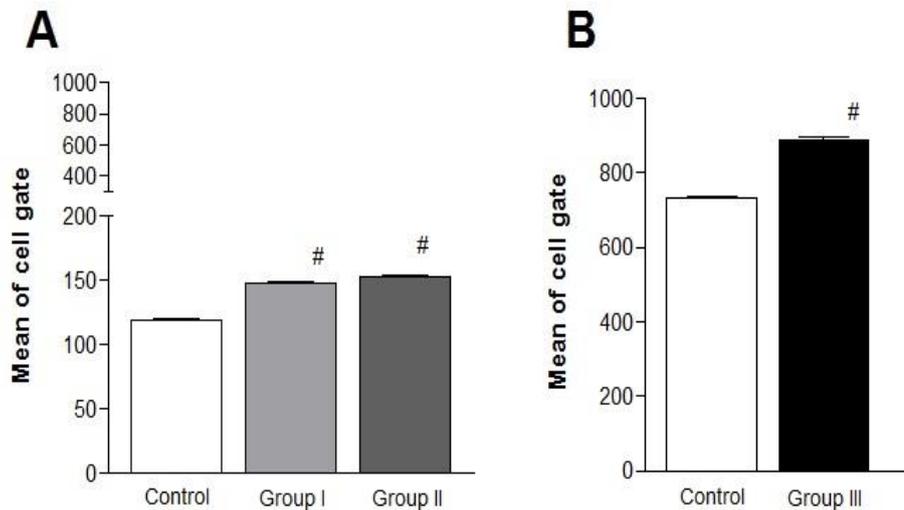
A análise do potencial mitogênico induzido pelo EAMt em esplenócitos de camundongos inoculados com EAMt e estimulados *in vitro* com o mesmo extrato foi obtido através do ensaio de proliferação celular com CFSE. Esses ensaios, com inoculação prévia *in vivo* e posterior estimulação *in vitro* de compostos, concedem informações relacionadas à memória imunológica que esses compostos-alvo são capazes de induzir em animais previamente inoculados e consistem um dos principais mecanismos para compreender a resposta imunológica das células imunes em relação a agentes estimulantes (MELO, et al., 2011).

A padronização da inoculação de 50 mg/kg de EAMt, por via subcutânea, foi estabelecida por ser a menor em apresentar atividade anti-inflamatória, por essa via de administração (CRUZ, et al., 2016). Após a coleta dos esplenócitos (Grupo I e II) e do sangue dos animais (Grupo III), as células foram incorporadas ao CFSE, a fim de mensurar os índices de proliferação induzidos pelo EAMt.

CFSE é utilizado para rotulagem *in vitro* e *in vivo* de células com o intuito de rastrear múltiplas gerações usando diluição de corante e análise por citometria de fluxo. O uso desta técnica gerou um grande interesse pelo rastreamento de células *in vivo* e também pelo rastreamento de sua atividade mitótica (FULCHER e WONG, 1999).

Os resultados destas estimulações mostraram que todos os grupos experimentais foram capazes de estimular a resposta proliferativa, porém a maior resposta mitogênica celular induzida por EAMt foi observada no grupo que recebeu apenas estímulo *in vivo*, o grupo III, em relação ao grupo controle, não estimulado (Figura 21).

Figura 21 - Atividade proliferativa induzida pelo EAMt nos grupos experimentais. (A) Controle, Grupo I e Grupo II, (B) Controle, Grupo III.



Os esplenócitos receberam estímulo *in vitro* com EAMt na concentração de 6 µg/mL, os índices de proliferação foram avaliados por incorporação do CFSE. O grupo III, tratado *in vivo*, demonstrou valores mais elevados em relação ao controle, sem estímulo. Os resultados foram expressos pelos índices de proliferação (PI), e $PI \pm 3$ foram considerados positivos para a proliferação. * $P < 0,05$.

Estudos realizados com saponinas isoladas de *M. tenuiflora* mostraram que em diferentes concentrações esses compostos podem ativar significativamente a proliferação de linfócitos murinos e tímócitos, medidos pela incorporação de Timidina (3H TdR) no DNA das células, submetidos à uma exposição de 24 ou 48 hrs. Os mesmos estímulos foram realizados com esplenócitos, que demonstraram baixa atividade proliferativa quando comparado com os tímócitos (JIANG, et al., 1992).

5.6.3 Dosagens de Citocinas em Esplenócitos de Camundongos

Diante dos resultados obtidos com os testes anteriores, nos quais foi comprovado a ausência de citotoxicidade do EAMt e de sua alta capacidade proliferativa, buscou-se compreender qual o perfil celular proliferativo desse composto. As células imunes exercem suas atividades diretamente ou através da

ação de citocinas, que são as responsáveis em produzir uma resposta imunológica do hospedeiro frente ao antígeno (JÚNIOR, et al., 2010). Foi realizado então a quantificação de citocinas através da técnica de Cytometric Bead Array System (CBA).

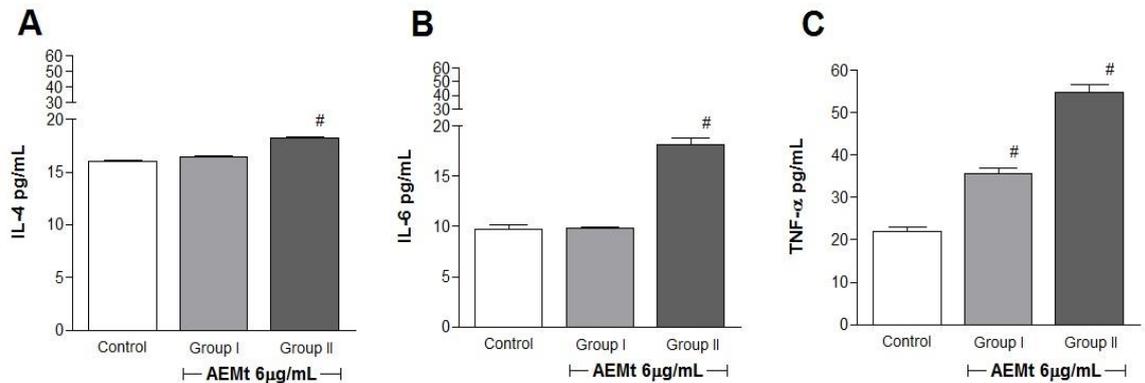
Após a estimulação antigênica, os linfócitos proliferam-se e diferenciam-se em subtipos efetores com características próprias, os subtipos Th0/Th1/Th2/Th3, que são determinadas pelo perfil de citocinas produzidas e por suas propriedades funcionais. As respostas Th1 estimulam mecanismos de hipersensibilidade tardia, ativam macrófagos e eliminam patógenos intracelulares de forma eficaz. As células Th2 são mais eficientes em auxiliar a resposta imune humoral, ativam produção de imunoglobulinas e são importantes no combate aos patógenos extracelulares. O perfil Th1, é definido como pró-inflamatório e o perfil Th2, como anti-inflamatório. As citocinas de ambos perfis se direcionam para o estabelecimento de sua respectiva via, uma sempre prevalecerá sobre a outra, deste modo, uma vez direcionada a resposta imune para o perfil Th1, a via Th2 será inibida, mas nunca será nula (SOUZA, et al., 2010).

Um outro fator importante a ser considerado é a presença de uma úlcera gástrica em determinado organismo. A úlcera gástrica é definida como uma lesão inflamatória e o processo de cicatrização envolve migração celular, proliferação, reepitelização, angiogênese e deposição matricial. A lesão epitelial gástrica está intimamente relacionada à resposta inflamatória celular e humoral ao agente ulcerogênico, resultando numa resposta imune celular inicial ao organismo, a qual é baseada no recrutamento de neutrófilos, seguida de linfócitos T e B, células plasmáticas e macrófagos (TAHARA, 2008).

Para analisar a resposta imune *in vitro* induzida pelo EAMt nos diferentes grupos experimentais, em esplenócitos de camundongos, foi quantificado os níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17.

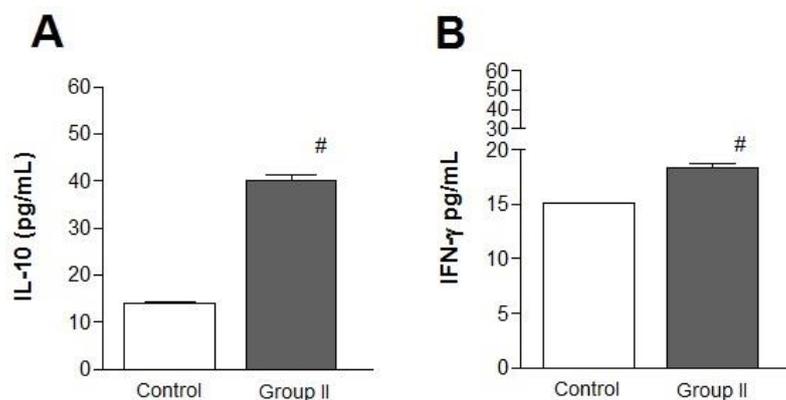
A produção de IL-4 e IL-6 foi analisada em esplenócitos do grupo I tratados com EAMt *in vitro*, e no grupo II, tratados *in vivo* e reestimulado *in vitro* com EAMt, quando comparados em relação ao controle. IL-10 e IFN- γ foram produzidos pelo Grupo II, porém, a produção de IL-10 foi induzida em níveis mais elevados no grupo II em relação ao IFN- γ . Todos os estímulos apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, não estimulado (Figura 22).

Figura 22 – A produção de IL-4, IL-6 e TNF- α induzidas, *in vitro* (Grupo I), *in vitro* e *in vivo* (Grupo II) pelo estímulo de EAMt.



A expressão de IL-10 e INF- γ foi analisado em esplenócitos do grupo II, tratados *in vitro* e reestimulado *in vivo* com EAMt, quando comparados em relação ao controle, sem estímulo. IL-10 foi produzido com uma expressividade maior em relação ao INF- γ , todos os estímulos apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, não estimulado (Figura 23).

Figura 23 – A produção de IL-10 e INF- γ induzidas *in vitro* e *in vivo* (Grupo II) pelo estímulo de EAMt.



TNF- α atua no processo inflamatório, recrutando leucócitos para o local inflamado, aumentando os níveis de citocinas e quimiocinas e ampliando a cicatrização das úlceras crônicas. INF- γ responsável pelo recrutamento leucocitário e

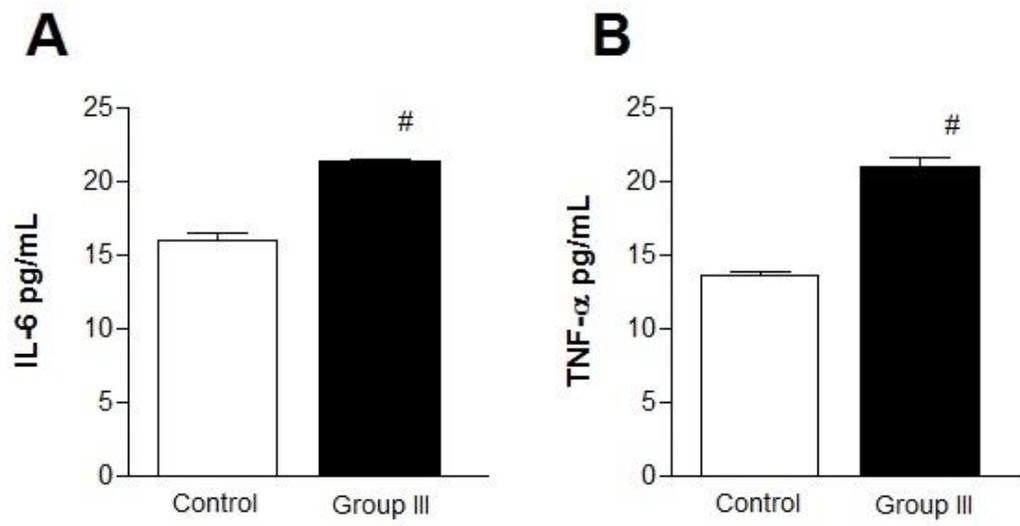
estimulação de macrófagos, IL-2 induz a expansão clonal de células T, sendo importante na diferenciação de células T CD4 + em subconjuntos efetores Th1 e Th2. A IL-6, desempenha um papel importante nas respostas imunes mediadas por células T, atua como um cofator para a proliferação de células T e evita a morte celular, IL-10 inibe a produção de moléculas pró-inflamatórias e quimiocinas, como IL-1, IL-6 e IL-8, TNF- α e IFN- γ . IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células Th17 e tem papel importante na resposta imune frente a certos patógenos (SOUZA, et al, 2010; SUGIMOTO, et al, 2011; MELO, et al., 2010).

A mucosa gástrica responde ao agente agressor, como o ácido acético, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-8, TNF- α , os quais estão todos envolvidos na resposta imune celular (SUGIMOTO, et al., 2009).

A maior expressividade de citocinas com perfil anti-inflamatório, como a IL-10, em relação à expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , é considerado um dos eventos responsáveis por agilizar o processo de cicatrização da úlcera induzida por ácido acético (MOORE, et al., 2001).

As citocinas IL-6 e TNF- α foram analisadas no plasma sanguíneo dos animais do Grupo III, estimulados apenas *in vivo* com o EAMt, todos os estímulos apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, não estimulado (Figura 24). A presença dessas citocinas de perfil pró-inflamatório, permite a elucidação do mecanismo de cicatrização da úlcera gástrica. TNF- α atua no processo inflamatório, além de recrutar leucócitos para o local inflamado, aumenta os níveis de citocinas e quimiocinas, e inicia o processo de cicatrização das úlceras crônicas (MOORE, et al., 2001).

Figura 24 – A produção de IL-6 e TNF- α induzidas *in vivo* (Grupo III) pelo estímulo de EAMt.



6. CONCLUSÃO

Fundamentados nos resultados obtidos a partir da prospecção fitoquímica e da avaliação da atividade antioxidante, podemos concluir que o extrato aquoso das entrecascas de *Mimosa tenuiflora* apresentou considerável atividade antioxidante.

O EAMt exibiu atividade antimicrobiana e bacteriostática, apresentando atividade frente a bactérias Gram-positivas e frente aos isolados sensíveis de *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Relevante atividade gastroprotetora foi observada nos modelos ulcerogênicos agudos induzidos por etanol, etanol/HCL e AINE. EAMt apresentou atividade cicatrizante no modelo ulcerogênico crônico induzido por ácido acético a 80%, podendo estar associada ao perfil de citocinas expressos nos estudos imunomodulatórios, em que o EAMt apresentou um perfil anti-inflamatório com caráter de resolução pró-cicatrizante.

Diante da investigação do mecanismo de ação desempenhado do EAMt, o efeito gastroprotetor promovido é dependente da participação dos grupamentos sulfidrílicos.

Pode-se concluir, então, que *M. tenuiflora* apresenta atividade gastroprotetora possivelmente relacionada aos mecanismos citoprotetores e antioxidantes, provavelmente provenientes da presença dos metabólitos secundários tais como flavonoides, compostos fenólicos e taninos, responsáveis pela inibição dos radicais livres e por funções anti-inflamatórias na mucosa gástrica.

7. REFERÊNCIAS

- AASE, S. Disturbances in the balance between aggressive and protective factors in the gastric and duodenal mucosa. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, V. 24, p. 17-23, 1989.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, P. F. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- ALAMBAYAN, J.; VATS, M.; SARDANA, S.; SEHRAWAT, R. Evaluation of antiulcer activity of roots of *Acacia catechu* Willd. (Mimosoideae). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.3, p. 79-84, 2015.
- ALARCO'N DE LA LASTRA, C.; LO'PEZ, A.; MOTILVA, V. Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. **Planta Medical Journal**, v. 59, p.497– 501, 1993.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p. 325-354, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; RAMOS, M. A.; LUCENA, R. F. P.; ALENCAR, N. L. Methods and Techniques Used to Collect Ethnobiological Data. In: ALBUQUERQUE, U.P; CUNHA, L. V. F.; L. V. F.; LUCENA; ALVES, R. R. N. Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology. **Humana press**,p.15-38, 2014.
- ALLEN, A. & FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, V. 288: C1–C19, 2005.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; LIMA E SILVA, T. C.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127-142, 2005.
- ALRASHDI, S. A.; SALAMA, S. M.; ALKIYUMI, S. S. et al. Mechanisms of Gastroprotective Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Jasminum sambac* against HCl/Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

ANDRADE, A. L. P.; MIOTTO, S. T. S. & SANTOS, E. P. A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guartelá, Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 36, p. 737-768, 2009.

As Bases Farmacológicas da Terapêutica de **Goodman & Gilman** - 12.ed. Front Cover. Laurence L. McGraw Hill Brasil, Medical - 2112 pages - Jun 1, 2012.

ATANAZOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 1582-1614, 2015.

ATEUFACK, G.; MOKAM, E. C. D.; MBIANTCHA, M. et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of *Piptadeniastrum africanum* on experimentally induced gastric ulcers in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 2015.

AZEVEDO, T. K.B.; PAES, J. B.; CALEGARI, L.; NASCIMENTO, J. W. B. *Mimosa tenuiflora* tannin quality for the production of tannin formaldehyde adhesive. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 507-514, 2015.

BANSAL, V. K.; GOYAL, S. K.; GOSWAMI, D. S. et al. Herbal approach to peptic ulcer disease- review. **Journal of Biosciences Technology**, v. 1 p. 52-58, 2009.

BANSAL, V.K. & GOEL, R.K. Gastroprotective effect of *Acacia nilotica* young seedless pod extract: Role of polyphenolic constituents. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.523-528, 2012.

BARBETA, B. L.; MARSHALL, A. T.; GILLON, A. D.; CRAIK, D. J.; & ANDERSON, M. A. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteron larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, p. 1221–1225, 2008.

BARBOSA, J. A. SCHINONNI, M. I. *Helicobacter pylori*: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. ISSN 1677-509. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 2010.

BERNE & LEVY. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BEZERRA, D. A. C.; PEREIRA, A. V.; LÔBO, K. M. S. et al. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 814-817, 2009.

BIGHETTI, A.E.; ANTONIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Regulation and modulation of gastric secretion. **Revista de Ciências Médicas**, v. 11, p. 55 – 60, 2002.

BITENCOURT, M. A.O.; LIMA, M. C. J. S.; TORRES-RÊGO, M. et al. Neutralizing Effects of *Mimosa tenuiflora* Extracts against Inflammation Caused by *Tityus serrulatus* Scorpion Venom. **BioMedical Research International**, 2014.

BORRELLI, F. & IZZO, A. A. The Plant Kingdom as a Source of Anti-ulcer Remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BORSATO, D. M. et al. Topical anti-inflammatory activity of a Monofloral Honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in Southern Brazil. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, p. 817-825, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASSEUR & ANGENOT, un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate d'aminoethanol -peg 400. **Journal Chromatography**, 351,351-355, 1986.

BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CALDAS, P. M. S.; BORGES, M. A.C.; MEIRA, M.V. A. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. **Revista Eletrônica Veterinária**, v. 7, p. 1-10, 2006.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples. **Total antioxidant activity**. Methods in enzymology, vol. 299, 1999.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326–342, 2010.

CNIP. Centro Nordeste de Informações Sobre Plantas. Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*). Recife: Associação de Plantas do Nordeste, 2017. Disponível em: <http://www.cnip.org.br/PFNMs/jurema_preta.html>. Acesso em: 21 de junho de 2017.

COLAK, E.; USTUNER, M. C.; TEKIN, N. et al. The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats Colak et al. **Springer Plus** 5:216, 2016.

COLGRAVE, M. L.; KOTZE, A. C.; HUANG, Y. H.; O'GRADY, J.; SIMONSEN, S. M. & CRAIK, D. J. Cyclotides: Natural, circular plant peptides that possess significant activity against gastrointestinal nematode parasites of sheep. **Biochemistry**, V.47, p. 5581–5589, 2008.

CORADIN, L; SIMINSKI, A; REIS, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul. 934p. **Brasília: MMA**, 2011.

COSTA, J. A. S. et al. **Leguminosas forrageiras da caatinga: espécies importantes para as comunidades rurais do sertão da Bahia**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2012.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

CRUZ, M. P.; ANDRADE, C. M. F. SILVA, K.O. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). **PLOS ONE**, v. 11, 2016.

CRUZ, M. P.; ANDRADE, C. M. F.; SILVA, K. O. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). **Plos One**, 2016.

DAY, I.; LEJEUNE, M. & CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p. 611 – 623, 2006.

DeFONESKA, A.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**. 26: 604 – 610. 2010.

DIVYA, T.; GIRIJA, K.; LAKSHMAN, K.; NIRMALA, M. Anti-ulcer activity of *Mimosa pudica* on experimental animal models. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v.2, p. 462-466, 2011.

Djahanguri, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, p. 265-267, 1969.

DJIPA, C.D.; DELME, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.307–313, 2000.

DOURADO, D. A. O.; CONCEIÇÃO, A. S. & SANTOS-SILVA, J. The genus *Mimosa* L. (Leguminosae: Mimosoideae) in the Serra Branca APA/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, v.13, 2013.

DUTRA, V. F. & MORIM, M. P. 2010. **Mimosa In: Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB023084>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. **Mimosa in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23084>>. Acesso em: 27 maio de 2017.

EAMLAMNAM, K.; PATUMRAJ, S.; VISEDOPAS, N.; THONG-NGAM, D. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, p. 2034-2039, 2006.

EAMLAMNAM, K.; PATUMRAJ, S.; VISEDOPAS, N.; THONG-NGAM, D. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 2034-2039, 2006.

EFRON, P. A. & MOLDAWER, L. L. Cytokines and Wound Healing: The Role of Cytokine and Anticytokine Therapy in the Repair Response. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, 2004.

FERNANDES, H. B.; SILVA, F. V.; PASSOS, F. F. B. et al. Gastroprotective effect of the ethanolic extract of *Parkia platycephala* Benth. leaves against acute gastric lesion models in rodents. **Biological Research**, v. 43, p. 451-457, 2010.

FERREIRA, J. M; FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A; NEGRIA, G.; MESSAGEB, D. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of Sciences Food Agriculture**, 2017.

FERREIRA, J.M.; FERNANDES-SILVA, C.C.; SALATINO, A.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2017.

FERREIRA, M. D. P; NISHIJIMA, C. M.; SEITO, L. N. et al. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryl's and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 170–174, 2008.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F.; 2006. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Construindo a História dos Produtos Naturais*. http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm, acesso em junho de 2017.

FONESKA, A. & KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, p. 604-610, 2010.

FOX, R.K. & MUNIRAJ, T. Pharmacologie Therapies in Gastrointestinal Diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 100, 2016.

FRED, A. C.; CHIEDOZIE, O.; AGBATA, C. A. & EZEOKAFOR, E. Preliminary phytochemical screening , evaluation of acute toxicity and antipyretic activity of methanolic extract of *Pterocarpus santalinoides* (Fabaceae). **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 06, p. 343- 346, 2012.

FULCHER, D. A. & WONG, S. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. **Immunology and Cell Biology**, v.77, p. 559–564, 1999.

GONÇALVES, O.; LIMA, A. P. G.; LIMA, C. G.; OLIVEIRA, I. R. O uso terapêutico da papaína em úlceras por pressão. PERQUIRERE- **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**. Patos de Minas: UNIPAM, n. 8, vol. 1, pp. 12-31, 2011.

GORANSSON, U.; SJOGREN, M.; SVANG ARD, E.; CLAESON, P. & BOHLIN, L. Reversible antifouling effect of the cyclotide cycloviolacin O2 against barnacles. **Journal of Natural Products**. v.67, p.1287 1290, 2004.

GUPTA, S. & SINGH, A. Antimicrobial, analgesic and anti - inflammatory activity reported on *Tamarindus indica* Linn Root Extract. **Pharmacognosy Journal**, v.09, p.410-416, 2017.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HALTER F.; TARNAWSKI A. S.; SCHMASSMANN A. et al. Cyclooxygenase 2— implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut** , v. 49, p.443-453, 2001.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B.M. et al. Cyclooxygenase 2— implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, p.443–453, 2001.

HARBORNE J. B., *Phytochemical Methods*. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall, 1998.

HEINRICH, M.; KUHN, M.; WRIGHT, C. W.; RIMPLER, H.; PHILLIPSON, J. D.; SCHANDELMAIER, A.; & WARGURST, D. C. Parasitological and Microbiological Evaluation of Mixe Indian Medicinal Plants (Mexico). **Journal of Ethnopharmacology**, v.36, p. 81-85, 1992.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97. p. 1027-1031, 2002.

HOSSAIN, M. I.; BASHAR, M. K.; IBRAHIM¹, M. & ISLAM, M. T. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activity of the methanol *Mimosa himalayana* extract. **International Journal of Medicine**, v. 05, p. 87-89, 2017.

HUANG, J. HUNT, R. H. Pharmacological and pharmacodynamics essentials of H₂-receptor antagonists and proton pump inhibitors for the practising physician. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, p. 355-370, 2001.

ISACKSON, H.; ASHLEY, C. C. Secretory functions of the gastrointestinal tract. *Surgery* 30:6. **Basic Science**. 2011.

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

JIANG, Y.; WENIGER, B.; HAAG-BERRURIER, M. et al. Effects of Saponins from *Mimosa tenuiflora* on Lymphoma Cells and Lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 310-313, 1992.

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**. 94 93–100, 2004.

JÚNIOR, F. E.; OLIVEIRA, D. R.; BENTO, e. b. et al. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Croton campestris* A St-Hill in rodents, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

KANGWAN, N.; PARK, J. M.; KIM, E. H.; HAHM, K. B. Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 5, p. 40-47, 2014.

KATZUNG, M. D.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KHAN, M. S. A.; NAZAN, S.; JAIS, A. M. M. Flavonoids and anti-oxidant activity mediated gastroprotective action of leathery murdah, *Terminalia coriacea* (roxb.) wight & arn. leaf methanolic extract in rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2017.

KINGSTON, F. G. I. Recente advances in chemistry of taxol. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 5, p. 726-734, 2000.

KOLLIA, E.; MARKAKI, P.; ZOUMPOULAKIS, P.; PROESTOS, C.; Antioxidant activity of *Cynara scolymus* L. and *Cynara cardunculus* L. extracts obtained by different extraction techniques. **Natural Product Research**. 2016.

KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D.; BECK, G. Role of leukotrienes in acute gastric lesions by ethanol, taurocholate, aspirin, platelet

activating factor and stress in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 33, p. 806-813, 1988.

KUMAR-ROINÉ, S.; MATSUI, M., REYBIER, K., DARIUS, H. T.; CHINAIN, M.; PAUILLAC, S.; LAURENT, D. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 2677 macrophage. **Journal of Ethopharmacology**. 2009.

LACERDA NETO, A. G; BARBOSA RAMOS, A. G.; SALES, V. S. et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of hydroethanolic extract of leaves of *Caryocar coriaceum*: Mechanisms involved in the gastroprotective activity. **Chemico-Biological Interactions**, 2016.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K. & TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41-60, 2008.

LANAS, A. & CHAN, F. K. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, 2017.

LAVIN, M. *Sensitivae Censitae: A Description of the Genus Mimosa Linnaeus (Mimosaceae) in the New World* by Rupert C. Barneby. **American Society of Plant Taxonomists**, 1991.

LEHMANN, F. S. & STALDER, G. A. Hypotheses on the role of cytokines in peptic ulcer disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 28, p. 511–519, 1998.

LEWIS, G. P.; SCHIRERE, B.; MANCHINDER, B. & LOCK, M. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens**, Kew. 2005.

LI, H.; WONG, C.; CHENG, Z.; CHEN, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in metanol extracts from medicinal plants. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p.385–390, 2008.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C. et al. Antibacterial activity of hydro-alcoholic extract leaves of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.371-376, 2005.

LOGUERCIO, A.P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcóolico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.371-6, 2005.

MAIA, G. N. **Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo. D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237- 246, 2004.

MAJTAN, J.; BOHOVA, J.; GARCIA-VILLALBA, R. et al. Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- α -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing. **Archives of Dermatology**, v. 305, p. 619-627, 2013.

- MANJULA, B. GAYATHRI, K. S. VINAYKUMAR, N. P. SHANKERNARAYANAN, R. A. VISHWAKARMA, A. BALAKRISHNAN. Inhibition of MAP kinases by crude extract and pure compound isolated from *Commiphora mukul* leads to down regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-2. **International Immunopharmacology** 6 122– 132, 2006.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxid, sulphhydryls and prostaglandins in gastroprotection by mormodin ic, an oleanolicacid oligoglycosid , on ethanol induced gastric mucosal lesionin rats. **Life Science**, v. 65, p. 27-32, 1999.
- MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; GONZALEZ, J. & MARTINEZ, M. Efecto producido por la fracción de alcaloides de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) sobre el reflejo peristáltico del ileón del cobayo. **Archivos de Investigación Médica**, v. 21, p. 171-174, 1990.
- Medeiros, R.M.T.; Figueiredo, R.M.T.; Benício, T.M.A.; Dantas, F.P.M.; Riet-Correa, F. Teratogenicity of *Mimosa tenuiflora* seeds to pregnant rats. **Toxicon**, v. 51, p. 316-319, 2008.
- MEIRA DE-FARIA, F.; ALMEIDA, A.C.A.; LUIZ-FERREIRA, A. et al. Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 234–243, 2012.
- MELO, C. M. L.; CASTRO, M. C. A. B.; OLIVEIRA, A. P.; GOMES, F. O. S.; PEREIRA, V. R. A. CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Immunomodulatory Response of Cramoll 1,4 Lectin on Experimental Lymphocytes. **Phytotherapy research** Phytother. Res. 24: 1631–1636, 2010.
- MELO, C. M. L.; PAIM, B. A.; ZECCHIN, K. G.; MORARI, J.; CHIARATTI, M. R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry** 342:163–169, 2011.
- MELO, C. M. L.; PAIM, B. A.; ZECCHIN, K. G.; MORARI, J.; CHIARATTI, M. R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 342:163–169, 2011.
- Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir (imagem) Disponível em: http://www.cnip.org.br/banco_img/Jurema%20Preta/mimosatenuiflorawilldpoir11.html Acesso abril de 2017.
- MIZUI, T.; DOUTEUCHI, M. **Journal of Pharmacology**, v. 33, n.5, p.939-945, 1983.
- MOLEIRO, F. C.; ANDREO, M. A.; SANTOS, R. C. S. *Mouriri Elliptica*: validation of gastroprotective, healing and anti-helicobacter pylori effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.359–368, 2009.

- MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jpn. Journal Pharmacology.*, v.57, p. 495-505, 1991.
- MOTA, K.S.L.; DIAS, G.E.N.; PINTO, M.E.F. et al. Flavonoids with Gastroprotective Activity. **Molecules**, v. 14, p. 979-1012, 2009.
- NASCIMENTO, M. S.; PAIVA-SOUZA, I. O.; XIMENE, A.F. Anti-inflammatory and antioxidant activities of the hydroethanol extract and fractions of the bark of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir et al. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.10,p. 823-831, 2016 .
- NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T.; Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 19(2B): 553-556, Abr./Jun. 2009
- OKABE, S.; MATSUMOTO, J.; TAKEUCHI, K.; UESHIMA, K. Role of capsaicin-sensitive afferent neurons in mucosal blood flow response of rat stomach induced by mild irritants. **Digestive Diseases and Sciences**. Volume 37, **Issue 9**, pp 1336–1344, 1992.
- OKABE, S.; PFEIFFER, C. J. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. **American Journal of Digestive Diseases** v. 17, p. 619–629, 1972.
- PADILHA, I. Q. M.; PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O. G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. From Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p. 45-47, 2010.
- PATEL, S. & SHAH, D. B. Phylogeny in Few Species of Leguminosae Family Based on matK Sequence. **Computational Molecular Biology**, 2014
- PATRO. G.; BHATTAMISRA, K. S.; MOHANTY, K. B. Effects of *Mimosa pudica* L. leaves extract on anxiety, depression and memory. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v.6, p. 696-710, 2016.
- PEREIRA JÚNIOR, L. R. et al. Espécies da Caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Floresta e ambiente**, 2014.
- PEREIRA, A. C. H.; LENZ, D.; NOGUEIRA, B. V.; et al. Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. **Pharmaceutical Biology**, 2016.

PEREIRA, A. C. H.; LENZ, D.; NOGUEIRA, B.V. et al. Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, p. 472-480, 2017.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, N. 4: pp. 146-152, November 2012.

POTH, A. A. G.; COLGRAVE, M. L.; REYNOLD, P.; BOMAI, K.; NORELLE L. D.; ANDERSON, M. A. & CRAIK, D. J. Discovery of cyclotides in the Fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution, and distribution of circular proteins. **ACS Chemical Biology**, v.6, p. 345-355, 2011.

PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; et al. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam induced gastroduodenal lesions. **Arzneimittelforschung**, v. 47, p. 568-572, 1997.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

Rahman. SZ, Singhal KC 2002. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports**. January Supplement, 2002.

RANG, H.P., et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REGASINI, L.O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; GIANNINI, M.J.S.M.; BARREIRO, E. J.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p.706-711, 2010.

REIS, A.; MIOTTO, S. T. S. & BORTOLUZZI, R. L. C. Leguminosas – Cesalpinoídeas. **Flora ilustrada Catarinense**, 2006.

REPETTO, M. R.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Volume 35(5) 523-534, 2002.

RIVERA-ARCE, E. et al. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p.523–528, 2007.

RIVERA-ARCE, E.; CHAVÉZ-SOTO, M. A.; HERRERA-ARELLANO, A. et al. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p.523–528, 2007.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V. ; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia: Bases Patológicas das doenças**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROBERTS E. A. H.; CARTWRIGHT R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal Science Food Agricultural**. 8: 72-80, 1957.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.

ROMANOSKI, V. C. & SANTOS, R. A. F. Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Mimosa verrucosa* Benth. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v.9, p. 100-104, 2017.

SALEM, M. B.; AFFES, H.; ATHMOUNI, K. e et. al. Chemicals Compositions, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Cynara scolymus* Leaves Extracts, and Analysis of Major Bioactive Polyphenols by HPLC. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Article ID 4951937, 14 pages, 2017.

SCALBERT, A.; IAN, T.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: Antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p. 215-217, 2008.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A.; Control of gastric acid secretion in health and disease. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842 – 1860, 2008.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Gastroenterology**, v. 30, p. 578 – 582, 2014.

SILVA, A. J.; PEREIRA, S. M.; RODRIGUES, A. ROCHA, A. P. Custo econômico do tratamento das úlceras por pressão: uma abordagem teórica. Revista da escola de enfermagem. USP vol.47 no.4 São Paulo -- Agosto. 2013.

SILVA, J. S. & SALES, M. F. O gênero *Mimosa* (leguminosae-mimosoideae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco. **Rodriguésia**, v. 59, p. 435-448, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2007.

SIMON, M. F.; GREYER, R.; QUEIROZ, L. P.; SARKINEN, T. E.; DUTRA, V.F. & HUGHES, C. E. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): Toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, p.1201-1221, 2011.

SINGH, S.; KHAJURIA, A.; TANEJA, S. C. et al. The gastric ulcer protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*, in rats. **Phytomedicine**, v. 15, p. 408-415, 2008.

SOLOMON, S.; MURUGANANTHAM, N.; SENTHAMILSELVI, M. M. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of *Bauhinia tomentosa* (flowers). **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v.06, 2016.

SOUZA, A. W. S.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P. et al. Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p.665-694,2010.

SOYBEL, DI: Anatomy and physiology of the stomach, **Surg Clin North Am** 85:875, 2005.

STEVAM, C. S.; CAVALCANTI, A. M.; CALUMBI, E. V. F.; NETO, V. A.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M.; ARAUJO, B. S.; PORFÍRIO, Z.; SANT ANA, A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 299-303, 2009.

STURM, A.; AMINO, R.; SAND, C. V. et al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. **Science**, v.313, 2006.

SUGIMOTO, M.; OHNO, T.; GRAHAM, D.Y.; YAMAOKA, Y. Gastric mucosal interleukin-17 and -18m RNA expression in Helicobacter pylori-induced Mongolian gerbils. **Cancer Science**, v. 100, p. 2152-2159, 2009.

SUHAIMY, M. W. I.; AZMI, A. K. N.; MOHTARRUDIN, N., et al. Semipurified Ethyl Acetate Partition of Methanolic Extract of Melastoma malabathricum Leaves Exerts Gastroprotective Activity Partly via Its Antioxidant-Antisecretory-Anti-Inflammatory Action and Synergistic Action of Several Flavonoid-Based Compounds. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

SUMBUL, S.; AHMAD, M.; AFTAB, M; ASIF, M. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.3, p.361-367, 2011.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Archives of Toxicology**, v. 41, p. 99-105, 1978.

TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. A. Pharmacological and Toxicological Study of Maytenus ilicifolia Leaf Extract. Part I – Preclinical Studies. **Phytotherapy Research**. 2017.

TAHARA, T.; ARISAWA, T.; SHIBATA, T.; et al. Effect of RANTES promoter genotype on the severity of intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori*-infected Japanese subjects. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, p. 1247-1252, 2009.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Disease and Sciences**, v. 50, p. 24–33, 2005.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

TRIPATHI, I. P.; TRIPATHI, R. & TIWARI, A. Investigation of biologically active phytoconstituents present in selected plants material of Verbenaceae, Lamiaceae and Fabaceae Family. **International Journal of Multidisciplinary and Current Research**, v. 05, 2017.

VALENCIA-GOMEZ, L.E. et al. Chitosan/*Mimosa tenuiflora* films as potential cellular patch for skin regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.16, 2016.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.464-71, 2008.

VEROTTA, L.; APPENDINO, G.; JAKUPOVIC, J.; BOMBARDELLI, E. Hyperforine analogues from St. John's worth (*Hypericum perforatum*). **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 3, p. 412-415, 2000.

VIDAL, C. S.; MARTINS, A. O. B. P. B.; SILVA, A. A., et al. Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.89, p.47-55, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis - *A thin layer chromatography atlas*. **Springer**. 2.ed. Munich, 1996.

WALLACE, J. L. & MILLER, M. J. S. Nitric Oxide in Mucosal Defense: A Little Goes a Long Way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512–520, 2000.

WALLACE, J. L. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **The American Journal of Medicine**, v. 110, 2001.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **The FASEB Journal**, v.10, p. 731 – 740, 1996.

WAYNE, P. A. Clinical and Laboratory Standards Institut (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23 rd informational suplemento, M100-S23, 2013.

WHO – World Health Organization. Draft Guidelines for Herbal ATC Classification. Uppsala Monitoring Centre. Geneva, 2002.

WHO - World Health Organization. Guidelines on safety monitoring and of herbal medicines. Geneva, 2003.

WOISKY, R.G. & SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p. 99-105, 1998.

YU, J. H.; LIM, J. W.; NAMKUNG, W.; KIM, H.; KIM, K. H. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. **Nature**, v. 82, p. 1359-1368, 2002.

YUAN, Y.; PADOL, I. T. & HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 03, 2006.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. *Nature clinical practice, Gastroenterology & Hepatology*. February, vol. 3. n° 2, 2017.

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

ZHANG, J.; YUAN, K.; ZHOU, W.; ZHOU, J. & YANG, P. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. **Pharmacognosy Magazine**, v. 25, p. 35-39, 2011.

ZIPPEL, J.; DETERS, A.; HENSEL, A. Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p.391–396, 2009.