



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JÉSSICA ANDRÉIA PEREIRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, GASTROPROTETORA E
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
ORGÂNICOS DAS FOLHAS DE *Avicennia schaueriana* STAPF & LEECHMAN**

Recife 2018

Jéssica Andréia Pereira Barbosa

Avaliação das atividades antioxidante, gastroprotetora e antimicrobiana de extratos orgânicos das folhas de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Química para Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva

UFPE

Recife 2018

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Barbosa, Jéssica Andréia Pereira

Avaliação das atividades antioxidante, gastroprotetora e antimicrobiana de extratos orgânicos das folhas de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman/ Jéssica Andréia Pereira Barbosa- 2018.

90 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo

1. Fitoquímicos 2. Acanthaceae 3. Úlceras I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-118

Jéssica Andréia Pereira Barbosa

Avaliação das atividades antioxidante, gastroprotetora e antimicrobiana de extratos orgânicos das folhas de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Química para Saúde.

Aprovada em: 11/ 12/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof (a). Dra. Teresinha Gonçalves da Silva Instituição: Departamento de Antibióticos/UFPE

Prof(a). Dra. Elba Cavalcanti de Amorim: Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPE

Prof(a). Dra. Márcia Silva Nascimento Instituição: Departamento de Antibióticos/UFPE

Prof(a). Dra Andreia Lopes Bandeira Delmiro Santana: Departamento de Antibióticos/UFPE

Prof(a). Dra. Isla Vanessa Gomes Alves Bastos: Departamento de Antibióticos/UFPE

RESUMO

Avicennia schaueriana, espécie endêmica da vegetação de manguezal, é bastante utilizada pelas comunidades tradicionais no tratamento de reumatismo, infecções, úlceras e cicatrização de feridas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante, gastroprotetor e propriedade antimicrobiana dos extratos orgânicos das folhas de *A. schaueriana*. Os extratos acetato de etila (As-AcEOt) e etanol (As-EtOH) das folhas de *A. schaueriana* foram preparados pelo método de maceração. O perfil fitoquímico foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD), também determinado os teores de fenóis totais, flavonoides e taninos totais. Foi realizado o fracionamento do extrato As-AcEOt por cromatografia líquida em coluna e o composto isolado foi identificado por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. Os extratos As-AcEOt e As-EtOH também foram analisados por cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada com matriz de diodos e espectrometria de massa (UPLC-DAD-QTOF-MS/MS). A atividade antioxidante foi analisada através de DPPH e ABTS. A propriedade antimicrobiana foi avaliada pelos ensaios de difusão em ágar com disco de papel e microdiluição em caldo. Foi realizada a toxicidade aguda, segundo a OECD (423). A atividade gastroprotetora foi analisada através do modelo de úlcera induzida por etanol para ambos os extratos, e verificado o potencial do As-EtOH através do modelo de úlcera induzida por AINEs, em seguida determinado os níveis de mieloperoxidase (MPO) e a histologia da mucosa gástrica dos animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol. Para elucidar os possíveis mecanismos de ação, investigou-se o papel do óxido nítrico, compostos sulfidrílicos e prostaglandinas. A CCD demonstrou a presença de terpenos, flavonoides e taninos no As-AcEOt; flavonoides e taninos no extrato As-EtOH. O extrato As-AcEOt apresentou maiores teores de flavonoides (44,59 mgER/g) enquanto que o As-EtOH apresentou maiores teores de compostos fenólicos (216,86 mg EAT/g) e taninos (199,50 mg EAT/g). O fracionamento cromatográfico resultou no isolamento do ácido gálico do extrato As-AcEOt. A análise por UPLC-DAD-QTOF-MS/MS mostrou a presença de ácidos fenólicos e flavonoides. Os extratos As-AcEOt e As-EtOH apresentaram relevante atividade antioxidante (CE₅₀ de 42,25; 42,99 µg/mL) pelo método de DPPH e inibição de ABTS de 73,23 e 89,11%, respectivamente. Na avaliação da atividade antimicrobiana, os As-AcEOt e As-EtOH foram mais eficazes contra bactérias Gram-positivas e fungo. Na toxicidade aguda os extratos orgânicos não registraram mortes, sinais tóxicos ou alterações bioquímicas ou hematológicas. Na atividade gastroprotetora, ambos os extratos reduziram o índice de lesão ulcerativa, além de diminuir os níveis de MPO. A histopatologia

mostrou a preservação das fossetas gástricas e do tecido muscular, como também diminuição de infiltrados de neutrófilos e aumento da produção de muco dos animais tratados com As-AcEOt e As-EtOH nas doses de 100 e 200 mg/kg, respectivamente. A administração prévia dos antagonistas de óxido nítrico e compostos sulfidrílicos suprimiu o efeito gastroprotetor do As-AcEOt e As-EtOH mostra atuar pelas vias de óxido nítrico e prostaglandinas. O presente estudo revelou que os extratos orgânicos de *A. schaueriana* possuem propriedades antioxidante, antimicrobiana e gastroprotetora, sugerindo estas atividades podem estar associadas à capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nestes extratos.

Palavras-chave: Acanthaceae. Fenólicos. Úlcera.

ABSTRACT

Avicennia schaueriana, an endemic species of mangrove vegetation, is widely used by traditional communities in the treatment of rheumatism, infections, ulcers and wound healing. Thus, the objective of this study was to evaluate the antioxidant, gastroprotector and antimicrobial property of the organic extracts of the leaves of *A. schaueriana*. The extracts of ethyl acetate (As-AcEOt) and ethanol (As-EtOH) from the leaves of *A. schaueriana* were prepared by the maceration method. The phytochemical profile was analyzed by thin layer chromatography (TLC) and the determination of total phenols, flavonoids and total tannins. The As-AcEOt extract fractionation was performed by liquid chromatography on a column and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy identified the isolated compound. The extracts As-AcEOt and As-EtOH were analyzed by liquid chromatography coupled with diode matrix and mass spectrometry (UPLC-DAD-QTOF-MS/MS). The antioxidant activity was analyzed through DPPH and ABTS. The antimicrobial property was evaluated by diffusion assays on paper disc agar and microdilution in broth. Acute toxicity was performed according to OECD (423). The gastroprotective activity was analyzed through the ethanol-induced ulcer model for both extracts, and the potential of As-EtOH was verified through the NSAID-induced ulcer model, followed by myeloperoxidase (MPO) levels and mucosal histology of the animals submitted to the ethanol induced ulcer model. In order to elucidate the possible mechanisms of action, we investigated the role of nitric oxide, sulfhydryl compounds and prostaglandins. The CCD demonstrated the presence of terpenes, flavonoids and tannins in As-AcEOt; flavonoids and tannins in the As-EtOH extract. As-AcEOt extracts presented higher levels of flavonoids (44.59 mg RE/g) and As-EtOH had higher phenolic compounds (216.86 mg TAE/g) and tannins (199.50 mg TAE/g). Chromatographic fractionation resulted in the isolation of gallic acid from the As-AcEOt extract. Analysis by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS showed the presence of phenolic acids and flavonoids. The extracts As-AcEOt and As-EtOH presented a relevant antioxidant activity (EC_{50} of 42.25, 42.99 μ g/mL) by the DPPH method and ABTS inhibition of 73.23 and 89.11%, respectively. In the evaluation of antimicrobial activity, As-AcEOt and As-EtOH were more effective against Gram-positive bacteria and fungus. In acute toxicity the organic extracts did not register deaths, toxic signs or biochemical or hematological alterations. In the gastroprotective activity, both extracts reduced the ulcerative lesion index, in addition to reducing MPO levels. Histopathology showed preservation of gastric pits and muscle tissue, as well as reduction of neutrophil infiltrates and increase of mucus production in animals treated with As-AcEOt and

As-EtOH at doses of 100 and 200 mg/kg, respectively. Previous administration of nitric oxide antagonists and sulfhydryl compounds has suppressed the gastroprotective effect of As-AcEOt and As-EtOH, demonstrating to act via the nitric oxide and prostaglandin pathways. The present study revealed that the organic extracts of *A. schaueriana* possess antioxidant, antimicrobial and gastroprotective properties, suggesting that activities may be associated to the antioxidant capacity of the phenolic compounds present in these extracts.

Keywords: Acanthaceae. Phenolics. Ulcer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia funcional da mucosa gástrica humana.....	20
Figura 2: Representação esquemática das camadas do estômago.....	21
Figura 3: Regulação da secreção ácida gástrica.....	22
Figura 4: Mecanismo de defesa e injúria da mucosa gástrica.....	28
Figura 5: Distribuição de manguezais ao longo do litoral nordeste do Brasil entre os estados do Piauí e Pernambuco.....	36
Figura 6: <i>Avicennia schaueriana</i>	40
Figura 7: O cromatograma UPLC-DAD (340 nm) (A) e o pico de base ESI (BPI) do As- AcOEt das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i>	57
Figura 8: Espectro de Massas e Ultravioleta dos principais constituintes do extrato etanólico de <i>A. schaueriana</i>	60
Figura 9: Estrutura química do ácido gálico.....	64
Figura 10: Espectro de RMN ¹ H (399,74 MHz) do composto isolado.....	65
Figura 11: Espectro de RMN ¹³ C (100,53 MHz) do composto isolado.....	65
Figura 12: Efeito gastroprotetor do extrato acetato de etila das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As- AcOEt) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar (n=5 animais/grupo).....	69
Figura 13: Efeito gastroprotetor do extrato etanólico das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As- EtOH) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar (n=5 animais/grupo).....	70
Figura 14: Efeito gastroprotetor do extrato etanólico das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As- EtOH) nas doses de 100 e 200 mg/kg (v.o.) sobre lesões gástricas induzidas por AINEs em ratos Wistar (n=5 animais/grupo).....	70

Figura 15: Efeito do extrato acetato de etila das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-AcOEt) na dose de 100 mg/kg em relação aos níveis de mieloperoxidase no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.....	72
Figura 16: Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-EtOH) na dose de 200 mg/kg em relação aos níveis de mieloperoxidase no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.....	72
Figura 17: Secções histológicas da mucosa gástrica de ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol (100 X) na coloração HE.....	74
Figura 18: Secções histológicas da mucosa gástrica de ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol (40 X).....	74
Figura 19: Efeito do extrato acetato de etila das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-AcOEt) na dose de 100 mg/kg em relação ao papel do óxido nítrico no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.	76
Figura 20: Efeito do extrato acetato de etila das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-AcOEt) na dose de 100 mg/kg no índice de lesões ulcerativas em ratos previamente tratados com NEM (i.p.) (N-Etilmaleimida cristalina) no modelo de úlcera induzida por etanol.....	77
Figura 21: Efeito do extrato acetato de etila das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-AcOEt) na dose de 100 mg/kg no tecido da mucosa gástrica em ratos previamente tratados com indometacina e submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.....	77
Figura 22: Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-EtOH) na dose de 200 mg/kg, respectivamente em relação ao papel do óxido nítrico no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.....	78
Figura 23: Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-EtOH) na dose de 200 mg/kg no tecido da mucosa gástrica em ratos previamente tratados com indometacina e submetidos ao modelo de úlcera induzida po etanol.....	78

Figura 24: Efeito do extrato etanólico das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-EtOH) na dose de 200 mg/kg no índice de lesões ulcerativas em ratos previamente tratados com NEM (i.p.) (N-Etilmaleimida cristalina) no modelo de úlcera induzida por etanol.....

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Fatores de risco para a doença de úlcera péptica.....	29
Tabela 2: Fase móvel com os padrões e reveladores específicos para classes de metabólitos secundários utilizados na prospecção fitoquímica dos extratos acetato de etila e etanólico das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-AcEOt e As-EtOH).....	45
Tabela 3: Doseamento de fenóis totais, flavonóides, taninos totais e atividade antioxidante por DPPH e ABTS do extrato acetato de etila das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-AcEOt).....	55
Tabela 4: Doseamento de fenóis totais, flavonoides, taninos totais e atividade antioxidante por DPPH e ABTS do extrato etanólico das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-EtOH).....	56
Tabela 5: Dados de espectrometria de massa dos principais constituintes do extrato de acetato de etila das folhas de <i>A. schaueriana</i> (As-AcEOt).....	58
Tabela 6: Dados de espectrometria de massa dos principais constituintes do extrato etanólico das folhas de <i>A. schaueriana</i> (As-EtOH).....	61
Tabela 7: Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (CD ₃ COCD ₃ , 75 MHz, TMS, ppm) para ácido gálico.....	64
Tabela 8: Teste de difusão em ágar com disco de papel e Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Microbica (CMM) do extrato acetato de etila das folhas de <i>Avicennia schaueriana</i> (As-AcEOt) (30 mg/mL).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS/SÍMBOLOS

¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
ABTS ⁺	-2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato
AINEs	Anti-inflamatório não esteroides
AMH	Ágar Mueller Hinton
As - AcOEt	Extrato acetato de etila de <i>Avicennia schaueriana</i>
As - EtOH	Extrato etanólico de <i>Avicennia schaueriana</i>
ALT	Alanina amino transaminase
AST	Aspartato amino transaminase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	Concentração efetiva capaz de capturar 50% dos radicais
CEUA - UFPE	Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco
CMI	Concentração mínima inibitória
CMM	Concentração Microbicida Mínima
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase – 1
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG/g	Equivalente de ácido gálico por grama de extrato
EAT/g	Equivalente de ácido tânico por grama de extrato
ER/g	Equivalente de rutina por grama de extrato
H ⁺ /K ⁺ - ATPase	Bomba de hidrogênio/potássio ATPase
H ₂	Receptor de histamina tipo 2
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-1β	Interleucina 1- beta
ILU	Índice de lesão ulcerativa
IU	Índice ulcerativo
KOH	Hidróxido de potássio
L-NAME	Cloridrato de éster metílico de Nω-Nitro-L-arginina

MeOH Metanol

mDO/tecido Medida de densidade optica por amostra de tecido

MPO Mieloperoxidase

NCCLS *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NEM N-etilmaleimida

NEU Solução a 1% de difenilboriletoxietilamina

OECD Organization for Economic Cooperation And Development

Rpm Rotação por minuto

PAS Periodic acid-Schiff

PGs Prostaglandinas

pH Potencial Hidrogeniônico

TMS Tetrametilsilano

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

TSA Agar triptona soja

UFC Unidade formadora de colônia

δ Deslocamento químico

ng/mL Nanograma por mililitro

MHz Megahertz

mm Milímetros Kv - Kilovolt °C - Celsius

μ m Micrômetro μ L- Microlitro

Da Dalton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1.1.2 Sistema gástrico.....	20
1.1.3 Anatomia e Fisiologia do Estômago.....	20
1.1.4 Fisiologia da secreção gástrica.....	21
1.1.5 Distúrbios do Sistema Gástrico.....	23
1.1.6 Fatores de proteção da mucosa gástrica.....	24
1.1.7 Defesa Pré-Epitelial.....	24
1.1.8 Defesa Epitelial.....	25
1.1.9 Defesa Sub-Epitelial.....	26
1.1.10 Úlcera Péptica.....	27
1.1.11 Etiologia e epidemiologia da úlcera péptica.....	27
1.1.12 Farmacoterapêutica da Úlcera Péptica.....	30
1.1.13 Úlcera gástrica a partir de infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	31
1.1.14 Resistência microbiana	32
1.1.15 Uso de plantas medicinais.....	33
1.1.16 Plantas medicinais com potencial gastroprotetor.....	34
1.1.17 Plantas medicinais com potencial antimicrobiano.....	34
1.1.18 Ecossistema de Mangue.....	35
1.1.19 Família Acanthaceae.....	37
1.1.20 Gênero <i>Avicennia</i> L.....	38
1.1.21 <i>Avicennia schaueriana</i> Stapf & Leechman.....	39
1.1.22 Características gerais.....	39
1.1.23 Propriedades biológicas de <i>Avicennia schaueriana</i> Stapf & Leechman.....	40
1.2 OBJETIVOS.....	42
1.2.1 Objetivo Geral.....	42
1.2.2 Objetivos Específicos.....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	43

2.2 DROGAS, REAGENTES E SOLVENTES.....	43
2.3 MICRORGANISMOS.....	43
2.4 ANIMAIS.....	44
2.5 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE AVICENNIA SCHAUERIANA.....	44
2.6 SCREENING FITOQUÍMICO.....	44
2.7 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS E TANINOS TOTAIS.....	45
2.8 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES.....	45
2.9 ANÁLISE POR UPLC-DAD-QTOF MS.....	46
2.10 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA.....	47
2.11 MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES 2,2-AZOBIS-(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6- SULFONATO (ABTS+)).....	47
2.12 MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES POR DPPH.....	48
2.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	48
2.13.1 Método de Difusão em Disco.....	48
2.13.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM).....	49
2.14 TOXICIDADE AGUDA.....	49
2.15 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.....	50
2.16 ESTUDO DO EFEITO GASTROPROTETOR DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE A. SCHAUERIANA.....	50
2.16.1 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto.....	50
2.16.2 Úlcera gástrica induzida por AINEs.....	50
2.17 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO).....	51
2.18 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA.....	51
2.19 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE GASTROPROTECTORA DE AS- ACEOT E AS-ETOH.....	52
2.19.1 envolvimento do óxido nítrico, compostos sulfidrílicos e prostaglandinas na gastroproteção.....	52
2.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.1 SCREENING FITOQUÍMICO.....	54

3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES, TANINOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	54
3.3 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS POR UPLC-DAD-QTOF MS.....	56
3.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA.....	63
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA.....	66
3.6 TOXICIDADE AGUDA.....	68
3.7 ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA.....	68
3.7.1 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto e AINEs.....	68
3.7.2 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO).....	71
3.7.3 Análise histopatológica da mucosa gástrica.....	73
3.8 MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTIULCEROGÊNICO.....	76
3.8.1 Envolvimento do óxido nítrico, compostos sulfidrilícos e prostaglandinas na gastroproteção.....	76
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXO A-PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA	90

1 INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica é uma doença que afeta entre 8 a 10% da população que habita países industrializados (FERREIRA, 2005). Esse tipo de úlcera é caracterizado pelo surgimento de lesões aguda ou crônica na mucosa gástrica, estando suscetível à ação agressiva da secreção do suco ácido-péptico (CALAM; BARON, 2001).

A patogênese de úlcera gástrica pode ser causada por fatores endógenos, tais como, elevação da secreção gástrica e pepsina, inibição da proliferação celular da mucosa, redução do fluxo sanguíneo e supressão das prostaglandinas. Como também pode ser causado por fatores exógenos, tais como, fumo, álcool, uso contínuo de anti-inflamatórios não-esteróides, estresse e infecção por *Helicobacter pylori* (WALLACE, 2001). Apesar de encontrarmos uma variedade de tratamentos para úlcera péptica, a terapêutica atual revelou a incidência de efeitos colaterais, interações com outros fármacos e a recidiva depois da interrupção do tratamento (DEVAULT; TALLEY, 2009). Para minimizar os sintomas da úlcera, são utilizados fármacos que atuam como antagonistas de receptores H₂ e inibidores da bomba de prótons, porém o uso prolongado destes tratamentos pode levar ao desenvolvimento de câncer (RAGHUNATH et al., 2005).

Como alternativa para esse problema as plantas medicinais têm sido alvo na pesquisa científica, pois vêm demonstrando efeitos promissores no tratamento de algumas patologias, incluindo as úlceras gástricas (BORRELLI; IZZO, 2000). Faz-se necessário investigar o efeito antiulcerogênico de plantas medicinais que têm sido popularmente usadas para esse fim (SILVA et al., 2009). Os efeitos favoráveis de extratos de plantas no tratamento dessa doença têm sido avaliados por muitos estudos experimentais, onde se busca uma ação direcionada para atividades antissecretora, citoprotetora e antioxidante no intuito de proteger a mucosa do estômago (AL MOFLEH, 2010).

Atualmente, existem muitos antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções que também apresentam potencial cicatrizante, como o acetato de sulfanamida 10%, nitrofurazona 0,2% e o creme de gentamicina 0,1%. A resistência a antimicrobianos vem crescendo, e por conta disso, a pesquisa com plantas medicinais que tem potencial terapêutico como antimicrobiano vem se desenvolvendo, com intuito de auxiliar no tratamento de vários tipos de infecções humanas. (VERDI et al., 2005). Mesmo existindo uma grande quantidade de fármacos sintéticos, o uso de plantas medicinais na medicina científica aumentou, e os motivos para isso são o elevado preço dos medicamentos sintéticos e a dificuldade da

população em ter acesso à assistência médica.

Plantas da flora brasileira, encontradas em diferentes ecossistemas, apresentam uma diversidade e estão sendo exploradas na medicina popular (CECHINEL FILHO, 2000). O mangue é um desses ecossistemas, pois apresenta importância no equilíbrio ecológico, com papel fundamental no fornecimento de matéria orgânica para o ambiente marinho (BARROS et al., 2000).

O gênero *Avicennia*, pertencente à família Acanthaceae, é representado por duas espécies no Brasil: *Avicennia schaueriana* e *Avicennia germinans* (PROFICE, et al., 2010). As espécies deste gênero são bastante utilizadas por comunidades tradicionais para o tratamento de várias doenças, como por exemplo, o tratamento de tumores, reumatismo, úlceras e na cicatrização de feridas (BANDARANAYAKE, 1998). *Avicennia schaueriana* STAPF & LEECHMAN, conhecida popularmente como mangue preto, é uma espécie endêmica da vegetação de manguezal (RAMOS; GERALDO, 2007). Na literatura, já foram relatadas para essa espécie algumas atividades como: diurética (MADHU; MADHU, 1997) antibacteriana (SANTOS, 2010) e antifúngica (FARDIN, 2015).

Dessa forma, a investigação da caracterização química e propriedades farmacológicas de *Avicennia shaueriana* tornam-se importantes na tentativa de se obter novas substâncias com finalidade terapêutica e efeitos colaterais reduzidos, bem como validar práticas realizadas pelas comunidades tradicionais, por se tratar de um estudo inédito referente à utilização dos extratos orgânicos para as atividades antioxidante, antimicrobiana e gastroprotetora como também identificar os possíveis mecanismos de ação envolvidos com a úlcera gástrica.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

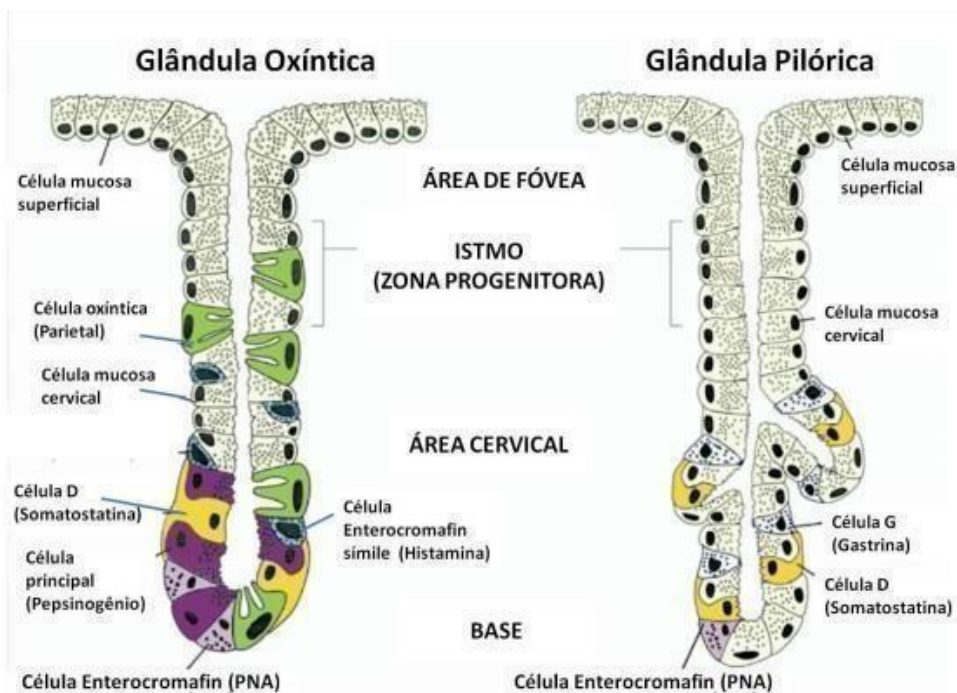
1.1.2 Sistema gástrico

1.1.3 Anatomia e Fisiologia do Estômago

A principal função do sistema gastrointestinal é a digestão e absorção de nutrientes a fim de manter o funcionamento normal do organismo. O estômago é dividido em quatro regiões: cárdia, fundo, corpo e antro (MERCHANT, 2007; SCHUBERT; PEURA, 2008). O epitélio do corpo e fundo do estômago apresenta quatro tipos celulares, tais como, células parietais, células principais da superfície, células mucosas e células enterocromafins (MILLS; SHIVDASANI, 2011).

A glândula oxíntica é composta por células parietais e estas encontram-se no fundo e corpo do estômago. Já a área pilórica está localizada na região antral, sendo composta principalmente por células G produtoras de gastrina. As glândulas gástricas apresentam células neuroendócrinas como as enterocromafins (EC) que produz histamina e as células D que produz somatostatina (Figura 1) (SAMUELSON; HINKLE, 2003).

Figura 1. Anatomia funcional da mucosa gástrica humana

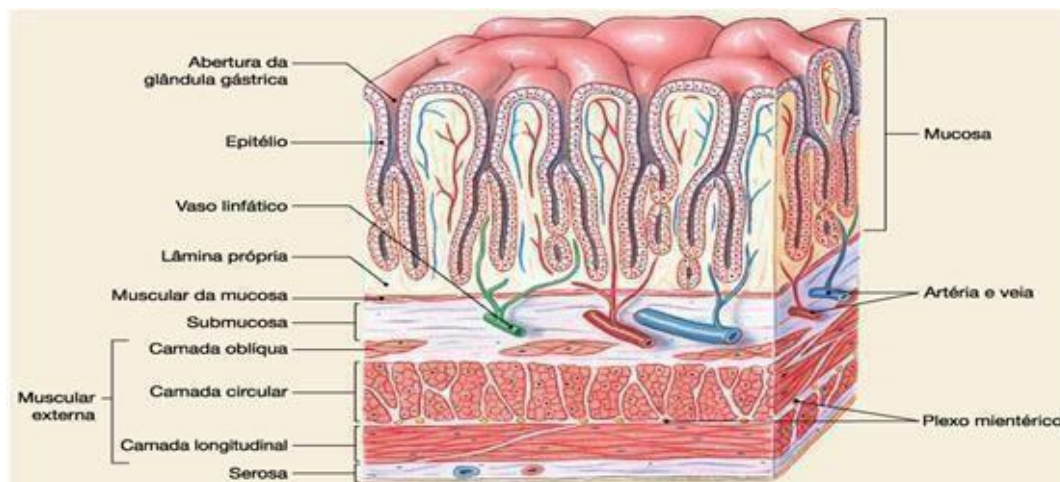


(SCHUBERT; PEURA 2008).

O estômago é constituído por quatro camadas (Figura 2) (LIU; CRAWFORD, 2005):

1. Mucosa, composta por uma camada de células epiteliais prismáticas que formam as fossetas gástricas, uma lâmina própria, que é formada por tecido conjuntivo frouxo, com camada delgada de músculo liso (muscular da mucosa);
2. Submucosa, formada por espessa camada de tecido conjuntivo que contém vasos sanguíneos e linfáticos;
3. Camada muscular externa, que representa a dupla camada de fibras musculares lisas;
4. Serosa: é a camada mais externa constituída por tecido conjuntivo recoberto por uma camada de tecido epitelial.

Figura 2. Representação esquemática das camadas do estômago



(SILVERTHORN, 2010).

1.1.4 Fisiologia da secreção gástrica

Os constituintes que estão associados à secreção gástrica são o pepsinogênio, bicarbonato (HCO_3^-), muco, eletrólitos, fator intrínseco e HCl (RAMSAY; CARR, 2011). Estes constituintes são importantes na fisiologia do processo digestório através da ativação de pepsinogênio ou da eliminação de bactérias, tornando o ambiente gástrico estável. O controle da secreção ácida é realizado pela interação de acetilcolina (ACh), histamina e gastrina, através da ativação dos seus receptores específicos muscarínico tipo 3 (M_3), receptor histamínico do tipo H_2 (H_2) e colecistocinina (CCK_2), respectivamente, que se localizam na

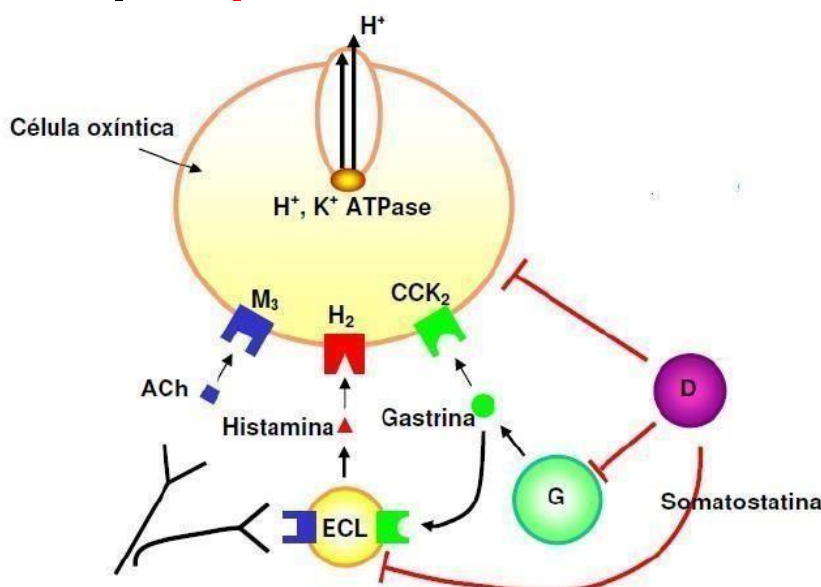
membrana basolateral das células parietais no corpo e fundo gástrico (SCHUBERT, 2011).

A ACh, histamina e gastrina desempenham funções fisiológicas importantes por meio de ativação dos seus receptores (SCARPIGNATO et al., 2006). A ACh estimula a secreção gástrica ácida pela ativação dos receptores M3 que estão acoplados a proteína G, promovendo a ativação de fosfolipase C (PCL). Esta promove a hidrólise de fosfolipídios de membrana, que produz 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diaclicerol (DAG), aumentando a concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) (SCHUBERT; PEURA, 2008).

As fibras colinérgicas podem atuar sobre as células G, estimulando a liberação de gastrina (FRY, 2009). Esse peptídeo, gastrina, age sobre receptores CCK_2 , que também é acoplado a proteína G, e induz o aumento da $[Ca^{2+}]$, o que acarreta a fusão das vesículas constituídas de H^+ , K^+ -ATPase (FRIIS-HANSEN, 2006). A gastrina ainda estimula a liberação de histamina pelas células enterocromafins-símiles (ECL). A histamina se liga ao receptor H_2 (acoplado a proteína G), que quando ativado estimula ciclase de adenilil (AC) e 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (CHEN et al., 2006; O'NEIL; LEONARD, 2011). A célula parietal secreta HCl através da troca de H^+ para o lúmen da célula por um íon K^+ proveniente do lúmen gástrico (SCHUBERT, 2011) (Figura 3).

A secreção de somatostatina (SST) pelas células D acontece quando ocorre a diminuição do pH luminal, que por sua vez suprime a produção de gastrina e histamina, e consequentemente a produção de ácido (SCHUBERT, 2009).

Figura 3: Regulação da secreção ácida gástrica. ACh: Acetilcolina; ECL: Células enterocromafins símiles; G: Célula G; D: Célula D; M3: receptor muscarínico; H2: receptor histaminérgico; CCK2: receptor colecistocinina. (Ativação: e inibição:).



(Adaptado de COLLARES-BUZATO; ARANA, 2005).

1.1.5 Distúrbios do sistema gástrico

A mucosa gástrica encontra-se em constante exposição a uma variedade de substâncias com diferente pH, osmolaridade, elevada produção de ácido clorídrico e pepsina, que são fatores fisiológicos sistêmicos; ou por fatores exógenos (irritantes), por exemplo, álcool, fumo, estresse, uso contínuo de anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), além de infecção por *Helicobacter pylori* (SAUL, 2007).

O consumo excessivo de álcool pode causar distúrbios na microcirculação, isquemia ou na produção de radicais livres, com liberação de mediadores vasoativos, por exemplo, histamina e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α (TAKAYAMA et al., 2011), inibição da produção de prostaglandinas e diminuição da produção do muco gástrico (ARAWAWALA et al., 2010). Além disso, o álcool também aumenta o fluxo de Na⁺, K⁺ e os íons H⁺ que sofrem extrusão para o lúmen gástrico (MORAES et al., 2009). Segundo Umamaheswari et al. (2007) durante a mobilização do etanol, acontece a produção de substâncias tóxicas, como o acetaldeído, que possibilita a liberação de superóxido e hidroperóxidos, que são espécies reativas que causam lesão tecidual, agredindo a integridade celular, promovendo o estresse oxidativo (JAINU; DEVI, 2006).

O estresse físico/emocional é um fator que está associado ao estilo de vida e muitas vezes situações como ansiedade, irritabilidade, impulsividade, entre outros, podem contribuir para o desenvolvimento de lesões gástricas (MARSOLLA, 2009).

Outro fator envolvido na agressão da mucosa gástrica é a infecção por *Helicobacter pylori*. Este bacilo Gram negativo apresenta-se na forma de espiral e consegue habitar ambientes com pH baixo, como no lúmen gástrico (USTUN et al., 2006). A sobrevivência de *H. pylori* na mucosa do estômago está relacionada à intensa atividade da enzima urease, sendo esta responsável pela conversão da ureia em amônia (NH₃) e dióxido de carbono. A amônia neutraliza os íons H⁺ e produz hidróxido de amônio (NH₄OH), que promove uma alcalinidade ao redor da bactéria, protegendo-a do meio ácido encontrado no lúmen gástrico (RAMSAY; CARR, 2011; BANSAL et al., 2009). A infecção por *H. pylori* promove o aumento da produção de gastrina devido à presença de amônia no epitélio e nas glândulas do antro, levando a inibição de somatostatina, causando o aumento da gastrina, e conseqüentemente, secreção ácida em excesso (MALFERTHEINER et al., 2009).

O uso contínuo de AINEs pode vir a causar danos na mucosa gástrica. A ação destes

danos ocorre pela inibição da ciclooxigenase (COX) e isso compromete a produção de prostaglandinas. A diminuição dos níveis de prostaglandinas afeta a produção de muco e bicarbonato, além de alterações no fluxo sanguíneo, agredindo diretamente a barreira protetora da mucosa gástrica e a reparação desta mucosa (STEWART; ACKROYD, 2011).

Uma variedade de substâncias químicas, como por exemplo, a fumaça do cigarro, pode causar estresse oxidativo, resultando em espécies reativas de oxigênio (ROS) (ZADÁK et al., 2009). O fumo pode influenciar de forma negativa na cicatrização e favorecer recidivas de lesões gástricas (NIETO, 2012).

Para evitar possíveis danos à mucosa gástrica, existem mecanismos próprios de proteção, tais como, fluxo sanguíneo contínuo na mucosa do estômago, secreção de muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico, fatores de crescimento, etc. Com o comprometimento desses mecanismos, a mucosa gástrica pode se tornar susceptível aos danos induzidos por fatores irritantes ou sistêmicos (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

1.1.6 Fatores de proteção à mucosa gástrica

Entre os mecanismos de defesa podemos destacar os fatores pré-epiteliais (muco, bicarbonato), fatores epiteliais (renovação do epitélio celular superficial, fatores de crescimento e prostaglandinas) e os fatores de defesa endotelial (fluxo sanguíneo, reconstituição do epitélio gástrico, óxido nítrico e o sistema de defesa antioxidante) (LAINE et al., 2008).

1.1.7 Defesa pré-epitelial

Representa a primeira linha de defesa da mucosa do estômago, com a barreira de muco, produção de bicarbonato e fosfolipídios tensoativos, que formam uma barreira protetora entre o lúmen gástrico e a mucosa (PHILLIPSON et al., 2008). Além disso, esses fatores assegura o tecido contra os efeitos lesivos causados pelo HCl e pepsina, evitando a

digestão proteolítica do epitélio (WALLACE, 2008). O muco encontra-se em grânulos citoplasmáticos, até que ocorra a exocitose pelas células superficiais, quando são estimuladas por hormônios como prostaglandinas (MONTROSE et al., 2006), e apresenta-se como um gel transparente, viscoso e aderente, com cerca de 95% de água e 5% de glicoproteínas (mucina), com pouco lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (ALLEN; FLEMSTROM, 2005). Os fosfolipídios revestem a superfície luminal do muco, impedindo a difusão de ácido, como HCl, e mantendo a integridade da mucosa (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

1.1.8 Defesa Epitelial

Essa linha de defesa é constituída por uma camada contínua de células epiteliais superficiais, que são unidas através de junções tipo GAP (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010). A proteção epitelial ocorre por meio da proliferação de células progenitoras (LAINE et al., 2008). A proliferação celular é regulada por fatores de crescimento, e o principal receptor para fator de crescimento expresso em células progenitoras gástricas é o receptor para fator de crescimento epidérmico (EGF-R) (HRITZ et al., 2005). Gastrina e prostaglandinas atuam ativando EGF-R, que por sua vez estimula a proliferação celular (PAI et al., 2002). Os fatores de crescimento também atuam protegendo a mucosa gástrica através da estimulação de fator de necrose tumoral α (TNF- α). Esta citocina é produzida durante a lesão gástrica, principalmente em lesões causadas por infecção por *H. pylori* ou uso de anti-inflamatórios não esteróides. TNF- α estimula a proliferação de células epiteliais (KOSONE et al., 2006).

A produção constante de prostaglandinas (PGs) é importante para proteção e manutenção da integridade da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos. As prostaglandinas agem inibindo a secreção gástrica ácida, como também estimulam a produção e secreção de bicarbonato, muco e fosfolipídios. As PGs são originadas a partir do ácido araquidônico, o qual é liberado por fosfolipídios de membrana de células lesadas, através da atuação catalítica da fosfolipase A₂, sendo as cicloxigenases (COX-1) enzimas que catalisam a síntese de prostaglandinas. Outro mecanismo de proteção das PGs é o aumento do fluxo sanguíneo no epitélio da mucosa gástrica acelerando a restituição e cicatrização (LAINE et al., 2008), além de inibir a liberação de histamina (WALLACE, 2008).

1.1.9 Defesa Sub-epitelial

Representa a linha de defesa da mucosa gástrica e está associada com fluxo sanguíneo, reconstituição do epitélio gástrico, óxido nítrico e o sistema de defesa antioxidante.

A relação entre o fluxo sanguíneo gástrico e as lesões gástricas ocorre por conta do equilíbrio ácido-base no tecido, além disso, promove aporte de nutrientes e oxigênio para as células (RAMSAY; CARR, 2011). A regulação do fluxo sanguíneo no trato gástrico é mediada pela óxido nítrico sintase (NOS), que tem importante papel na regulação da perfusão vascular, através da vasodilatação (SHAH et al., 2004). Os agentes vasodilatadores mantêm a viabilidade celular endotelial, impedindo a agregação plaquetária e adesão de leucócitos e evitando o comprometimento da microcirculação (LAINE et al., 2008). O óxido nítrico, sintetizado a partir da NOS, é um gás lipossolúvel que atua como relevante gastroprotetor, mantendo a integridade da mucosa gástrica (WALLACE, 2008). Esse mediador apresenta algumas funções importantes que estão associadas à proteção no estômago (MONCADA; HIGGS, 2006; LANAS, 2008), tais como, acentua a secreção de muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo contínuo na mucosa do estômago, inibe a secreção gástrica ácida, além de evitar ativação e aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, possibilitando a gastroproteção (FERREIRA et al., 2008; BRZOZOWSKI et al., 2008).

Quando a barreira da mucosa é rompida, como no caso da úlcera gástrica, o local torna-se fácil porta de entrada para microrganismos. Ao penetrarem a barreira das mucosas os microrganismos vão encontrar as defesas imunológicas do organismo que iniciarão uma reação inflamatória com importante participação de citocinas (CURFS et al., 1997).

Os processos de proliferação e migração celular também são importantes para que aconteça a recuperação e manutenção da mucosa do estômago, visto que são processos dinâmicos que estão envolvidos na cicatrização de úlceras gástricas (TARNAWSKI, 2010). Podemos destacar como agentes que estimulam a proliferação celular, as citocinas e os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre outros (KUMAR et al., 2005).

Citocinas são produzidas e liberadas em resposta à presença de antígenos, microrganismos ou morte celular com necrose, sendo importantes no processo de cicatrização tecidual. São polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares e hidrossolúveis (TREVISI et al., 2014). Estas conduzem a resposta inflamatória aos locais das infecções ou lesões, promovendo condições para a cicatrização da ferida. Porém, o excesso de citocinas pró-inflamatórias pode gerar problemas hemodinâmicos ou distúrbios metabólicos sistêmicos. As

citocinas interferem na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunológicas, além de regular a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (CURFS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2011). A reconstituição epitelial é extremamente importante na manutenção da estrutura e funcionamento da barreira mucosa. A formação dos radicais livres, as citocinas inflamatórias e o estresse fisiopatológico reduzem a taxa de proliferação celular, dificultando o processo de reconstituição das células gástricas (BEEJAY; WOLFE, 2000).

Suzuki et al. (2012) relataram que há evidências de correlação entre o estado de estresse oxidativo com mecanismos que envolvem doenças gástricas, tais como gastrite, úlcera péptica e carcinoma. Um exemplo disso são as lesões induzidas por etanol, que altera o metabolismo das mitocôndrias, possibilitando produção em excesso de radicais livres. Outros agentes etiológicos, como uso contínuo de AINEs e infecção por *H. pylori*, estão envolvidos na úlcera gástrica através do aumento das espécies reativas. Para evitar elevadas concentrações de espécies reativas, o organismo apresenta um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (VALKO et al., 2007). O sistema antioxidante enzimático é constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que contribuem para prevenir danos oxidativos às macromoléculas na célula (VASCONCELOS et al., 2007; BLAIR, 2010). Os antioxidantes não enzimáticos são constituídos de radicais livres de baixo peso molecular, como a glutathione reduzida (GSH), que é principal antioxidante intracelular, além de tocoferóis, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E e β -caroteno (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

1.1.10 Úlcera péptica

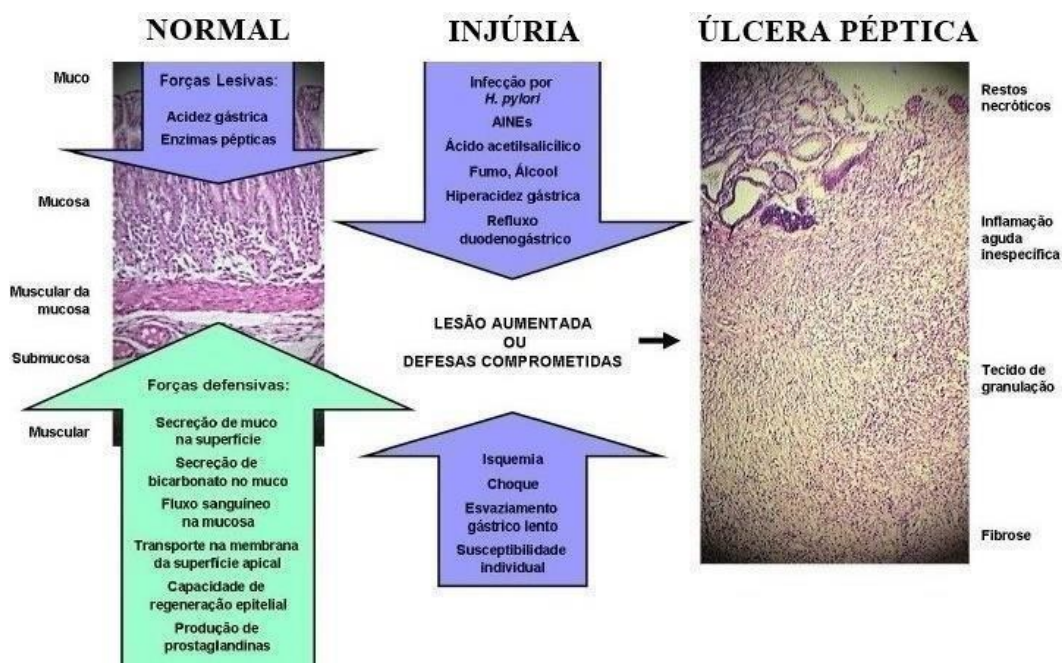
1.1.11 Etiologia e epidemiologia da úlcera péptica

Nas últimas décadas a incidência de úlceras gástricas varia de 2 a 10/100.000 pessoas por ano, sendo considerado um problema de saúde pública na sociedade moderna (KOMEN et al., 2008).

A úlcera péptica é uma doença caracterizada por causar lesões profundas na mucosa do estômago ou duodeno. No estômago as lesões encontram-se principalmente ao longo da pequena curvatura, entre o corpo e antro (GIBSON; ODZE, 2011). Os principais sintomas dessa patologia são a dor ou desconforto na porção superior do abdome (NIETO, 2012), náuseas, vômitos, azia, refluxo, fadiga (AWAAD et al., 2013). O desenvolvimento de lesões ulcerativas pode estar associado ao desequilíbrio entre fatores lesivos e defensivos da mucosa

gástrica (BANSAL; GOEL, 2012). Dentre os fatores lesivos endógenos podemos destacar secreção gástrica ácida e pepsina, produção de radicais livres e refluxo biliar; já em relação aos fatores lesivos exógenos incluem a presença da bactéria *H. pylori*, uso contínuo de AINEs, consumo excessivo de álcool, fumo e estresse. Como fatores defensivos da mucosa gástrica, tem-se a produção de muco e bicarbonato, o fluxo sanguíneo, óxido nítrico, prostaglandinas, fatores de crescimento e regeneração celular, além do sistema de defesa antioxidante (BRZOZOWSKI et al., 2012; NIETO, 2012; AWAAD et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4: Mecanismo de defesa e injúria da mucosa gástrica



(KUMAR, 2005).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de úlcera gástrica estão associados com os fatores lesivos endógenos, os quais já foram citados anteriormente, além de fatores exógenos como obesidade, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência renal e doença cardíaca coronariana (NAJM, 2011), demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores de risco para a doença de úlcera péptica.

Fatores de risco	Razão de prevalência
Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	3.7
<i>Helicobacter pylori</i>	3.3
Doença pulmonar obstrutiva crônica	2.34
Insuficiência renal	2.29
Usuários de tabaco	1.99
Doença cardíaca coronariana	1.46
Uso de álcool	1.29
Obesidade	1.18
Diabetes	1.3

Fonte: NAJM, 2011.

A úlcera péptica é uma patologia que afeta cerca de 10% da população mundial em alguma fase de suas vidas (NIETO, 2012), sendo predominante em países ocidentais, estando associado a fatores genéticos e dieta. Em relação ao gênero, as úlceras gástricas acometem mais homens que mulheres (JAIN et al., 2007). No Brasil é difícil mostrar em forma de dados a real incidência de úlceras pépticas, por conta das subnotificações dos casos, devido às variações das populações em estudo, divergências em coleta de dados e critérios para o diagnóstico (CASTRO et al., 2009).

Calcula-se que mais da metade da população mundial esteja infectado por *H. pylori* (NIETO, 2012), sendo cerca de 25% de adultos em países desenvolvidos e mais de 80% nos países em desenvolvimento (MAJUMDAR et al., 2011). O uso de AINEs pode ser outro fator para o desenvolvimento de úlceras pépticas (STEWART; ACKROYD, 2011), estando relacionado a úlceras com hemorragias e afetam pessoas entre 70 e 80 anos de idade, com predominância do sexo masculino, aproximadamente 1,5 vezes mais casos do que em mulheres (NAJM, 2011).

O prevalecimento de úlcera péptica foi no início do século XX, porém alguns estudos epidemiológicos mostraram que nas últimas décadas houve uma diminuição considerável na incidência e no surgimento de complicações decorrentes de úlcera gástrica. Relatos epidemiológicos da Ásia, Austrália, América do Norte, América do Sul e Europa demonstraram uma diminuição da mortalidade dessa doença nos últimos anos (SOSTRES; LANAS, 2011).

1.1.12 Farmacoterapêutica da Úlcera Péptica

O tratamento farmacológico para úlceras gástricas está associado com a utilização de medicamentos que diminuem a secreção gástrica ácida, neutralização ácida e potencialização dos mecanismos de proteção (RANG et al., 2007).

Os inibidores da bomba de prótons são os mais eficientes na supressão do ácido gástrico, visto que inibem irreversivelmente a H^+/K^+ ATPase, e são pró-fármacos que exibem ativação em meio ácido. Eles atuam ligando-se a H^+/K^+ ATPase localizada na membrana da célula parietal e inibindo a liberação de íons H^+ para lúmen gástrico. Consistem em bases fracas lipofílicas e se armazenam no ambiente ácido dos canalículos da célula parietal, onde são ativados. A classe de fármacos inibidores da bomba de prótons é representada por omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol (JAIN et al., 2007). Todos os inibidores da bomba de prótons são pró-fármacos que necessitam de ativação em ambiente ácido. Os fármacos dessa classe entram na célula parietal a partir do sangue e acumulam-se nos canalículos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons, que resulta na formação de uma sulfenamidatíofílica ou ácido sulfênico. Essa forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+/K^+ ATPase, as quais são essenciais para a inibição da produção ácida (BRAGA et al., 2011). O uso contínuo de inibidores da bomba de prótons podem causar efeitos adversos, tais como, tontura, diarreia, além de estimular a hiperplasia gástrica, e isso pode possibilitar a reincidência da úlcera ou desenvolvimento de câncer gástrico (BABU et al., 2010; KESZTHELYI et al., 2010).

Dentre os antagonistas dos receptores de H_2 temos ranitidina, cimetidina, famotidina e nizatidina, estes tem ação de competir com a histamina pelos receptores H_2 nas células parietais, sendo absorvidos rapidamente no intestino (KATZUNG, 2006), além de serem seletivos também inibem a secreção ácida promovida pela gastrina, agonistas muscarínicos, alimentos, distensão fúndica e secreção ácida basal (MAHDY; WEBSTER, 2011). Apresentam entre os efeitos colaterais: diarreia, cefaleia, tontura, fadiga, dor muscular, constipação (PARIKH; HOWDEN, 2010). Embora os antagonistas de receptores H_2 sejam eficazes para reduzir a secreção ácida, estes não bloqueiam completamente a gastrina e a estimulação vagal ainda pode induzir a secreção de ácido pela célula parietal (STEWART; ACKROYD, 2011).

Os antiácidos compreendem carbonatos, hidróxido de alumínio e magnésio ou associações e atuam na neutralização da acidez. Apesar de serem efetivos e de baixo custo,

podem reduzir a disponibilidade oral de fármacos e minerais presentes em suplementos alimentares (SRINIVAS, 2009; TAYLOR et al., 2010), além de causar efeitos adversos, tais como, náusea, distensão abdominal, flatulência, diarreia e constipação (JAIN et al., 2007).

Quando a úlcera gástrica é causada pela infecção por *H. pylori* é preciso à associação de antimicrobianos e antagonistas dos receptores de H_2 ou inibidores da bomba de prótons, e geralmente são utilizados três fármacos, tais como, omeprazol/amoxicilina/metronidazol, omeprazol/claritromicina/amoxicilina ou ranitidina/metronidazol/tetraciclina, tetraciclina/metronidazol/compostos bismuto (MOSSER; CACA, 2005).

Outros agentes considerados citoprotetores são os análogos das prostaglandinas (sucralfato e misoprostol). O sucralfato (complexo de hidróxido de alumínio e sacarose sulfatada) é capaz de formar géis complexos com muco, limitando a difusão de íons H^+ além de inibir a ação da pepsina e estimular a secreção de muco, bicarbonato e prostaglandina. No caso do misoprostol inibe a secreção ácida, aumentando o fluxo sanguíneo, secreção de muco e bicarbonato, porém pode provocar diarreia, cólicas abdominais e abortos (JAIN et al., 2007).

1.1.13 Úlcera gástrica a partir de infecção por *Helicobacter pylori*

Atualmente cerca da metade da população mundial apresenta infecção por bactéria no estômago. Em populações da América do Norte e Norte Europeu, cerca de um terço dos adultos estão infectados, enquanto que no sul e leste da Europa, América do Sul e Ásia, o predomínio de infecção por *Helicobacter pylori* é, de forma geral, maior que 50% (EUSEBI et al., 2014).

A mucosa gástrica uma vez colonizada por bactérias, estas podem continuar por décadas ou por toda vida no hospedeiro, porém a maioria dos indivíduos permanece assintomática à infecção (YAMAOKA et al., 2010). A infecção por *H. pylori* geralmente está relacionada à presença de úlcera gástrica, que se caracteriza por um processo inflamatório na mucosa, com infiltrado de leucócitos (ISRAEL; PEEK, 2001). A possibilidade de persistência e adaptação de *H. pylori* ao meio gástrico se deve a alguns fatores, como por exemplo, a enzima uréase capaz de converter a ureia presente em condições fisiológicas (meio ácido) no suco gástrico em amônia, possibilitando uma alcalinidade ao redor da bactéria, protegendo-a dos efeitos deletérios da acidez do estômago (WEEKS et al., 2001). Além disso, para penetrar a camada de muco o microrganismo conta com sua morfologia em forma de espiral, flagelos e produção de lipases e proteases que destrói a camada de muco, facilitam sua progressão e conferem proteção contra atividade de macrófagos e neutrófilos impedindo uma resposta

imunológica do hospedeiro (JENKS; KUSTERS, 2000). Esse microrganismo Gram-negativo coloniza a mucosa do estômago, podendo causar distúrbios, tais como, gastrite aguda, linfoma, gastrite crônica (SIQUEIRA et al., 2007). Uma intervenção com medicamentos pode evitar a progressão da infecção para úlceras, dispepsias e principalmente para câncer gástrico. (COIMBRA, 2012). Portanto, o conhecimento da infecção, o diagnóstico e o monitoramento de cura são de fundamental importância para a não evolução para quadros mais graves. (REDÉEN et al., 2001; TONKIC et al., 2012). (Para o tratamento de *H. pylori* é utilizada uma terapêutica convencional que consiste em Inibidor de Bomba de Prótons) + claritromicina + amoxicilina (COELHO et al., 2004; FELGA et al., 2010). Outra opção está no uso de metronidazol ou levofloxacina no lugar de amoxicilina ou adotar sistemas que empregam tetraciclina e metronidazol e sais de bismuto. (GISBERT; ABRAIRA, 2006; RODRÍGUEZ et al., 2005). A combinação do esquema triplice com azitromicina pode minimizar os efeitos

colaterais, mas não aumenta a eficácia do tratamento anti-*H. pylori* (AGAH; SHAZAD, 2009).

1.1.14 Resistência microbiana

As drogas antimicrobianas são importantes na terapêutica que se estende desde o tratamento de infecções até ao suporte em cirurgias, transplantes de órgãos e terapias cancerígenas. No entanto, esses medicamentos são notoriamente utilizados pela clínica para o tratamento de algum tipo de infecção bacteriana (BRITO; CORDEIRO, 2012; WHO, 2012). O advento dos antibióticos na medicina revolucionou o tratamento de infecções bacterianas reduzindo o número de mortes causadas pelas doenças infecciosas. No entanto, o uso indiscriminado desses medicamentos tem potencializado a seleção de cepas mais resistentes. Entende-se por resistência antimicrobiana a capacidade de microrganismos em se proliferar na presença de concentrações de antimicrobianos superiores às doses terapêuticas. Um fator que permite a resistência é o desconhecimento de que os antibióticos são drogas de ação específica, o que acarreta em inúmeras prescrições errôneas e, por conseguinte, no aumento de microrganismos resistentes (WANNMACHER, 2004). Os mecanismos de resistência utilizados pelas bactérias são variados e consistem em alterações bioquímicas como, por exemplo, a síntese de enzimas com propriedades de inativar os antibióticos ou alterações na permeabilidade da sua membrana plasmática. Essa resistência aos medicamentos disponíveis no mercado tem se intensificado cada vez mais ao decorrer dos anos, tomando proporções a

nível global, levando a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que visem a criação de novos fármacos (MARINHO et. al., 2016). O surgimento dessas bactérias resistentes à terapia por antibióticos tem sido um dos problemas enfrentados pelo Sistema de Saúde individual e coletiva, devido ao grande número de casos de pacientes acometidos por algum tipo de infecção causada por esses múltiplos agentes patogênicos demonstrando a necessidade mais uma vez, de novos fármacos bacterianos e que estes, sejam mais potentes (WHO, 2012; GUIMARÃES; MOMESSO, 2010).

1.1.15 Uso de plantas medicinais

Para a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos vigente no Brasil, o uso do material vegetal, com segurança, em concentrações e meios de preparação adequados e finalidade terapêutica definida, auxilia tanto a acessibilidade à população como também o desenvolvimento industrial e tecnológico, além da utilização sustentável da biodiversidade brasileira e validação do conhecimento cultural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de validar as informações populares referentes ao uso de plantas medicinais, com o objetivo de descobrir novos princípios ativos e também aprimorar as descobertas de novas atividades farmacológicas de substâncias já conhecidas e oriundas de plantas (ARAÚJO et al., 2007).

A realização de pesquisas nesta área etnobotânica é de grande importância para descobrir a ação das plantas, seus efeitos tóxicos e colaterais (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005), além de contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos oriundos de plantas, com menor toxicidade e maior eficiência, como também uma fonte acessível à população mais carente (USTULIN et al., 2009).

Para a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos vigente no Brasil, o uso do material vegetal, com segurança, em concentrações e meios de preparação adequados e finalidade terapêutica definida, auxilia tanto a acessibilidade à população como também o desenvolvimento industrial e tecnológico, além da utilização sustentável da biodiversidade brasileira e validação do conhecimento cultural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Vale ressaltar, que devido à riqueza de sua flora, o Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo, tornando-se fonte de interesse para as comunidades científicas nacionais e internacionais (SOUZA E FELFILI, 2006).

1.1.16 Plantas medicinais com potencial gastroprotetor

Estudos de plantas medicinais que atuam sobre o trato gastrointestinal apresentam relevante importância, já que os fármacos utilizados para o tratamento de distúrbios gástricos apresentam variados efeitos indesejáveis, tais como, o uso de antiácidos pode provocar constipação ou diarreia (RANG et al., 2001), ou ainda pelo o uso contínuo de antagonistas dos receptores H_2 e inibidores da bomba de prótons podem causar transtornos, como gastrinemia (GARNETT, 1998).

Segundo Arrais et al. (1997) cerca de 24% da população mundial busca medicamentos que atuem sobre o aparelho digestivo, indicando que a maioria da população sofre de distúrbios gástricos, tornando-se necessário o desenvolvimento de fármacos mais eficiente e com menos efeitos colaterais. No continente americano foram encontradas 58 espécies que apresentam potencial gastroprotetor, estando distribuídas em 37 famílias, entre elas, Turneraceae (2 espécies), Fabaceae (6 espécies), Celastraceae (3 espécies) e Asteraceae (13 espécies), como a maioria das espécies encontradas no Brasil (FALCÃO et al., 2008).

1.1.17 Plantas medicinais com potencial antimicrobiano

Vários podem ser os potenciais terapêuticos apresentados por determinados extratos vegetais, ressaltando a atividade antimicrobiana frente a agentes patogênicos. Muitas plantas tem apresentado importante atividade antimicrobiana, por isso há intensa busca na medicina tradicional direcionada a caracterização antimicrobiana das plantas (DIAZ et al., 2010). O metabolismo das plantas pode ser dividido em metabolismo primário e secundário, sendo o primário responsável pôr sintetizar substâncias químicas relacionadas ao desenvolvimento e crescimento do organismo produtor, representados por celulose, lignina, proteínas, lipídios, entre outros. Os metabólitos secundários exerce a função de auxiliar a interação entre organismo e ambiente, devido a essa interação química podem apresentar uma grande variedade de atividades biológicas (BRIZUELA et al., 1998; KUTCHAN, 2001; HAIDA et al., 2007). Essas substâncias exercem mecanismos de defesa contra predação por herbívoros, insetos e microrganismos, alguns são fornecedoras de odores, outros como os taninos e quinonas responsáveis pelo pigmento e muitos responsáveis pelo sabor da planta (COWAN, 1999).

Os compostos secundários podem ser encontrados em várias partes da planta (SILVA

JUNIOR, 2003). No entanto, alguns aspectos podem influenciar o acúmulo e a distribuição desses compostos nos vegetais, tais como: temperatura, umidade, altitude, sazonalidade, localização geográfica, clima, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, composição do solo e o período da coleta (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

As vias metabólicas secundárias utilizadas pelos vegetais possui a responsabilidade de sintetizar várias classes de compostos, tais como, flavonóides, isoflavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas, poliacetilenos e glicosídeos terpenóides, ambos específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, da qual, suas principais funções eram desconhecidas até pouco tempo e apenas cerca de 10% foram isolados e identificados (COWAN, 1999).

Dentre esses metabólitos, os terpenóides são bastantes conhecidos por apresentar elevadas atividades antibacteriana e antifúngica. Sua atividade tem sido atribuída a sua propriedade lipofílica, promovendo um acúmulo nas membranas do microorganismo ou superfície da parede celular, causando danos funcionais e estruturais que causam a perda de energia nas células (DUARTE, 2006).

O mecanismo de ação antimicrobiana atribuída aos compostos fenólicos (taninos e flavonoides) pode ser explicado por três hipóteses. Na primeira acredita-se que os taninos promove a inibição das enzimas bacterianas e fúngicas, a segunda hipótese atribui o mecanismo dos taninos como o responsável pelas modificações no metabolismo dos microrganismos e a terceira fundamenta-se na interação entre os taninos e íons metálicos, promovendo um decréscimo da disponibilidade desses íons que estão diretamente associados ao metabolismo microbiano (SCALBERT 1991).

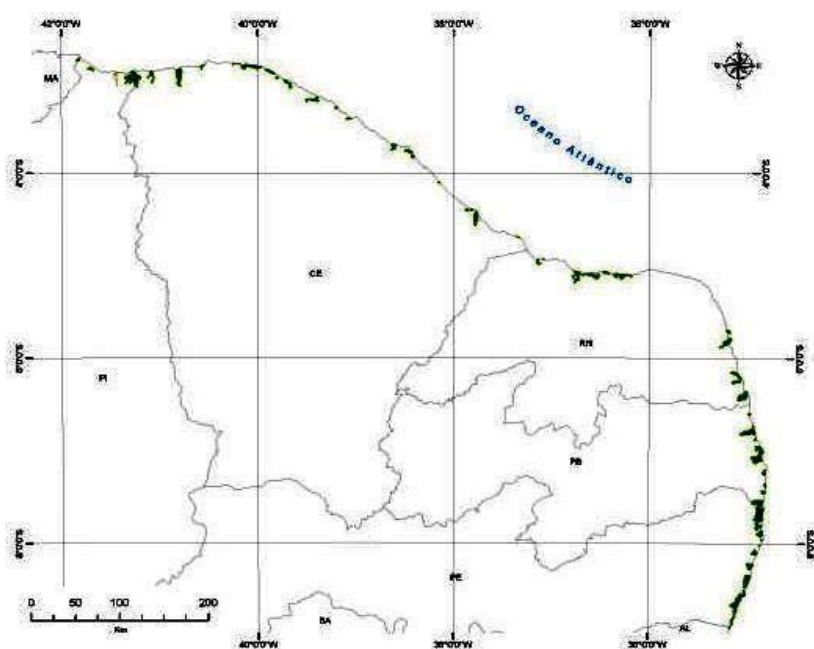
1.1.18 Ecossistema de Mangue

Manguezais são ecossistemas representados por plantas adaptadas morfológica e fisiologicamente às condições encontradas em ambientes de transição entre terra e mar. Sua biomassa pode ultrapassar algumas florestas tropicais (ALONGI, 2002). Os sedimentos desse ecossistema é tipicamente argiloso, com vegetação de texturas e composição química diferente (VANNUCCI, 1999). De modo geral, os solos são ricos em matéria orgânica, apresentam alta salinidade e coloração cinza-escuro (FERNANDES; PEREIRA, 1995). O mangue possui importante papel ecológico, porque oferece abrigo para muitas espécies de peixes e crustáceos, além de fornecer nutrientes para a fauna da área, contribuindo para as teias alimentares e transferência de energia (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001;

VANNUCCI, 2001). As florestas de mangue encontram-se amplamente distribuídas em regiões costeiras de zona tropicais e subtropicais (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). De acordo com Lacerda (1985), estima-se que existe cerca de 20 milhões de hectares de manguezais em todo o mundo, sendo que os maiores florestas encontradas estão na Malásia, Índia, Brasil, Venezuela, Nigéria e Senegal.

No Brasil, o manguezal ocorre em quase todo o litoral e abrange aproximadamente 13.762 Km², estendendo-se desde o Cabo Orange, litoral do estado do Amapá até Laguna em Santa Catarina (LACERDA et al., 1993). Os manguezais do nordeste brasileiro representam cerca de 10% da extensão total dos mangueais do Brasil, onde podemos ressaltar o sistema estuarino da ilha de Itamaracá, PE, com aproximadamente 46 km² (MONTEIRO et al., 2004) (Figura 5).

Figura 5. Distribuição de manguezais (áreas verdes cheias) ao longo do litoral nordeste do Brasil entre os estados do Piauí e Pernambuco (MONTEIRO et al., 2004).



Segundo Tomlinson (1986), os mangues podem ser divididos em três grupos: os mangues verdadeiros, elementos secundários de manguezal e associados de mangue. O primeiro é caracterizado por ser encontrado exclusivamente no mangue e tem papel importante na formação de estandes puros, apresentação de especializações morfológicas de adaptação ao ambiente e por possuir isolamento taxonômico ao nível de família e subfamília. Os elementos secundários não apresentam a capacidade de formar elementos conspícuos da

vegetação; e os associados de mangue nunca habitam comunidades de mangue, sendo encontrados em área de transição com outros ecossistemas.

Considerando esta classificação, os mangues verdadeiros brasileiros possuem como representantes da flora arbórea típica três gêneros, com ocorrência de quatro espécies (*Rhizophora mangle* L.(Rhizophoraceae); *Avicennia schaeuriana* Stapf & Leechm. e *Avicennia germinans* (L.) (Acanthaceae); *Laguncularia racemosa* (L.) (Combretaceae) e outros gêneros associados como *Conocarpus* (Combretaceae), *Hibiscus* (Malvaceae) e *Spartina* (Poaceae) (MATNI et al., 2006; BERNINI; REZENDE, 2010). Apesar de sua grande importância ecológica, esse ecossistema está entre os ecossistemas mais ameaçados no mundo. A degradação dos mangues é resultado da ação humana, através do desenvolvimento de centros urbanos, aquicultura, pesca/caça, mineração, utilização de madeiras, contaminação por metais pesados e despejo de efluentes de esgotos (FIRME, 2003). A desvalorização dos benefícios ecológicos proporcionados por este ecossistema tem levado a diminuição dos mangues em alguns locais (MACYNTYRE, 2009). A degradação do mangue está associada também à falta de conhecimento sobre o potencial medicinal de sua flora, tornando-se necessário ações voltadas para a preservação desses vegetais (BORRIS, 1996).

1.1.19 Família Acanthaceae

A família Acanthaceae compreende cerca de 250 gêneros com 2.500 espécies (WASSHAUSEN, 2004) distribuídas amplamente em trópicos de todo o mundo, com pouca representação em regiões temperadas (MABBEELEY, 1997). As árvores são geralmente raras, sendo a maioria arbustos, ervas ou trepadeiras, xerófitas e pantonosas. O Brasil apresenta aproximadamente 40 gêneros e 542 espécies (BARROSO, 1986).

Acanthaceae é uma das famílias que apresentam cristais de glândulas de sal, o que torna essa característica peculiar desta família (LARCHER; BOEGER, 2006). Esta família é constituída principalmente por ervas e arbustos, as folhas são geralmente decussadas, há presença de cistólitos (concreção de carbonato de cálcio), inflorescências com brácteas folhosas, comumente vistosas, flores gamopétalas com dois ou quatro estames, geralmente biloculares, e frutos, na maioria das vezes, com cápsula loculicida com deiscência explosiva e poucas sementes, em geral, achatadas e sem endosperma (JUDD et al., 2009). As flores das espécies desta família são bissexuais, zigomorfas, com brácteas e bractéolas grandes e coloridas; as sépalas e pétalas com variação entre pentalobada, biliabiada ou unilabiada; os estames, geralmente quatro ou dois; e fruto, quase sempre de deiscência explosiva com cada

semente em forma de gancho, derivado do funículo (retináculo), raramente drupa (Mendoncia), unisseminada indeiscente e carnosa (*Avicennia*); sementes geralmente planas, glabras ou pilosas, algumas mucilaginosas quando úmidas; endosperma geralmente ausente. (DURKEE, 1986).

Estudos taxonômicos envolvendo espécies que ocorrem no Brasil estão limitados a alguns gêneros tais como: *Aphelandra* R. Br. (WASSAUSSEN, 1975; PROFICE, 2011), *Mendoncia* Vell. ex Vand (PROFICE, 1988), *Ruellia* L. (EZCURRA, 1993), *Staurogyne* Wall (BRAZ, 2005), *Lepidagathis* Willd. (KAMEYAMA, 2008), *Thyrsacanthus* Moric (CORTÊS et al., 2010) e *Herpetacanthus* Nees (INDRIUNAS, 2011).

1.1.20 Gênero *Avicennia* L.

O gênero *Avicennia* pertence à família Acanthaceae e no Brasil é representado por duas espécies: *Avicennia schaueriana* e *Avicennia germinans* (PROFICE et al., 2010). As espécies deste gênero são consideradas mais tolerantes ao estresse, sendo encontradas em substratos salinos ou em áreas sujeitas a baixas temperaturas (SILVA et al., 2005). Este gênero ocorre em áreas afastadas da influência das marés, locais de elevada topografia, com sedimento mais seco e mais arenoso, com isso sofre menos frequência de inundações. Em geral, as espécies, apresentam folhas de coloração verde clara, brilhantes e com ápice arredondado e possuem glândulas que expelem sal (BRUNO, 1999). As glândulas de sal são estruturas importantes que evitam acúmulo de íons minerais nos tecidos de algumas espécies halófitas (CASTRO; MACHADO, 2003). O gênero *Avicennia* é caracterizado quimicamente pela presença de iridoides glicosilados (BOUSQUET-MELOU; FAUVEL, 1998; FENG et al., 2006), flavonoides (FENG et al., 2006) e naftoquinonas (ITO et al., 2000). Muitas comunidades tradicionais utilizam espécies deste gênero para o tratamento ou prevenção de algumas doenças, tais como, doença de pele (MAHASNEH, 2002), como quimiopreventivo (ITOIGAWA et al., 2001), hemorragia e reumatismo (DUKE; WAIN, 1981), antitumoral e cicatrização (GARCIA-BARRIGA, 1975).

Na literatura já foram relatadas algumas atividades biológicas do gênero *Avicennia*, tais como, anticolinesterásica em *A. officinalis* (SUGANTHY et al., 2009), potencial antiviral (ZANDI et al., 2009) e antioxidante em *A. marina* (RAMADAN et al., 2009; GAO et al., 2014), atividade antibactericida nas cascas e raízes de *A. schaueriana* (SANTOS et al. 2010), antiproliferativa em *A. marina* (MOMTAZI-BOROJENI et al., 2013), anti-inflamatória, antiulcerogênica e anticâncer em *A. officinalis* (SUMITHRA et al., 2011; SURA et al.,

2011).

Rajeswari et al. (2013) relatou que *A. germinans* possui atividade antibacteriana ao testar os extratos etanólico, éter de petróleo, metanólico, acetato de etila, diclorometano e hexânico em diferentes cepas por meio do teste de difusão em disco.

Rani e Rao (2013) por meio do método de difusão em disco em meio ágar relataram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *A. officinalis* contra bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*), gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*) e fungos (*Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*).

Al-Attar (2011) investigou a atividade gastroprotetora do extrato etanólico de *A. alba* através do modelo de úlcera induzida por etanol, sugerindo que os efeitos de *A. alba* está associado a sua intervenção nos fatores ofensivos e protetores da mucosa gástrica.

Sura et al. (2011) avaliaram o efeito antiulcerogênico do extrato etanólico de *A. officinalis* por meio de úlcera induzida por indometacina, e a sua atividade foi atribuída pela presença abundante de taninos.

1.1.21 *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman

1.1.22 Características Gerais

Avicennia schaueriana (Figura 6) conhecida popularmente como mangue preto ou siriúba (RAMOS; GERALDO, 2007) encontra-se distribuída geograficamente em tod litoral brasileiro (PROFICE et al., 2010). Esta espécie apresenta árvores com tronco com casca lisa castanho-claro, folhas verde oliva e esbranquiçadas na porção inferior. O formato das folhas pode variar do arbusto ao arredondado, ou até mesmo lanceolado (SUGIYAMA, 1995). Cada flor apresenta uma bráctea triangular e duas bractéolas, o cálice é constituído de cinco sépalas livres, a corola da flor é levemente zigomórfica, com quatro estames e anteras, medindo aproximadamente entre 10 e 12 mm e apresenta uma cor esbranquiçada. O ovário apresenta uma aparência aveludada, em decorrência da presença de pêlos e os frutos apresentam uma cor verde clara no pericarpo (TOMLINSON, 1986). Uma característica marcante desta espécie é seu extenso sistema radicular que se desenvolve horizontalmente, e a partir das raízes originam-se inúmeras projeções de consistências esponjosas que crescem para fora do substrato. Estas projeções são chamadas de pneumatófaros, que no seu interior apresenta desenvolvido paerênquimas que tem função de trocas gasosas entre a planta e o ambiente (SUGIYAMA, 1995).

A. schaueriana apresenta algumas adaptações morfológicas e fisiológicas que permite ocupar o ambiente salino, como por exemplo, a excreção do excesso de sais, através das glândulas de sal e a compartimentalização em vacúolos celulares, sendo eficientes na manutenção do equilíbrio iônico nas folhas, protegendo contra os danos causados pela hipersalinidade (MEDINA; SANTOS, 1998).

Figura 6. *Avicennia schaueriana* em seu habitat natural



Fonte: Própria autora (2015)

1.1.23 Propriedades biológicas de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman

Fardin e Young (2015) avaliaram o potencial antifúngico de frações éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila do extrato etanol das folhas de *A. schaueriana* pelo método de microdiluição em caldo frente à *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Colletotrichum lagenarium*. As frações éter de petróleo e clorofórmio foram mais eficazes, apresentando como valores de concentração mínima inibitória (CMI) de 1 e 1,15 mg/mL.

Santos et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólico das cascas, folhas e raízes de *A. schaueriana* através do método de difusão em disco e microdiluição em caldo frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella cholerae-suis* e *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados obtidos no teste de difusão em disco (1 mg/disco) mostraram que o foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* com halos de inibição de $9,67 \pm 0,58$

mm/cascas; $9,0 \pm 0,0$ mm/raízes e *M. luteus* com halos de inibição de $10,0 \pm 0,0$ mm/cascas; $16,0 \pm 0,0$ mm/raízes. Nos resultados de CMI da casca do extrato hidroalcólico de 2,5 mg/mL para *S. aureus* e 5 mg/mL para *K. pneumoniae*; e o extrato com as raízes mostrou CMI de 5 mg/mL para *K. pneumoniae*, 0,62 mg/mL para *S. aureus* e *M. luteus*.

Levando-se em consideração poucos estudos referentes à caracterização química e atividades biológicas de *A. schaueriana*, é importante a condução de estudos para conhecimento da constituição química e propriedades farmacológicas desta espécie, já que o gênero apresenta uma variedade de atividades biológicas comprovadas na literatura.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades antioxidante, gastroprotetor e antimicrobiana dos extratos orgânicos das folhas de *Avicennia schaueriana*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos orgânicos (acetato de etila e etanólico) das folhas de *A. schaueriana* e analisar o perfil fitoquímico dos extratos por cromatografia em camada delgada;
- Determinar os teores de fenóis totais, flavonoides e taninos totais dos extratos orgânicos;
- Analisar a atividade antioxidante dos extratos orgânicos;
- Avaliar propriedade antioxidante do extrato acetato de etila;
- Caracterizar compostos fenólicos por cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada à espectrometria de massa;
- Isolar compostos fenólicos do extrato acetato de etila;
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos acetato de etila e etanólico;
- Investigar o efeito gastroprotetor dos extratos orgânicos em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol e AINEs;
- Avaliar os níveis de mieloperoxidase e histopatologia a partir do modelo de úlcera induzida por etanol;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora dos extratos orgânicos das doses mais ativas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *A. schaueriana* foram coletadas no mangue da ilha de Itamaracá, localizado na costa norte do estado de Pernambuco (7° 48 '69 "S/34° 51' 34" W), em novembro de 2014. O material vegetal foi identificado por José Zanon de Oliveira Passavante, e uma espécie foi depositada no Herbário do Centro de Biociência da Universidade Federal de Pernambuco, sob número de 77.367.

2.2 DROGAS, REAGENTES E SOLVENTES

As drogas e os reagentes foram preparados imediatamente antes do uso. Foram utilizados os seguintes medicamentos: pantoprazol (Aché, Brasil); Solventes: hexano, acetato de etila, etanol, ácido acético glacial, acetonitrila, ácido fórmico e dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Alemanha); Reagentes: cloridrato de éster metílico de N ω -Nitro-L-arginina, N-Etilmaleimida, 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, hexadeciltrimetilamônio, Follin-Ciocalteu, cloreto de alumínio, rutina, ácido tânico, carbonato de sódio (Sigma Chemical Co, EUA).

2.3 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados foram obtidos da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Foram utilizadas quatro bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); três bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 352) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39); uma álcool-ácido-resistente: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

2.4 ANIMAIS

Ratos machos Wistar (200 - 250 g) e camundongos fêmeas Swiss (25-30 g) foram fornecidos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, no Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas com acesso livre a alimentos e água, em uma sala com temperatura controlada (21 ± 2 ° C), em ciclo luz /escuro de 12 horas, e umidade ($60 \pm 1.0\%$). O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número 23076.018743/2015-42. O número de animais e a dosagem/volume dos agentes ulcerogênicos foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos consistentes do tratamento. O jejum foi utilizado antes de todos os ensaios, porque os tratamentos foram administrados por via oral (por gavagem). Os animais foram mantidos em gaiolas com pisos de malha grande levantados para evitar coprofagia.

2.5 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA E ETANÓLOICO DAS FOLHAS DE *AVICENNIA SCHAUERIANA*

As folhas de *A. schaueriana* foram coletadas e secas em estufa (50° C) durante 3 dias. O material (200 gramas) foi triturado em moinho, e o pó obtido foi macerado sequencialmente à temperatura ambiente com hexano, acetato de etila e etanólico durante um período de 72 h com cada solvente. Os extratos foram filtrados, o solvente foi evaporado e concentrado num evaporador rotativo sob pressão a 50 ° C e 90 rpm.

2.6 SCREENING FITOQUÍMICO

Os AS-AcOEt e As-EtOH das folhas de *A.schaueriana* foram submetidos a rastreio fitoquímico para detectar a presença metabólitos secundários, de acordo com o método descrito por Waksmundzka-Hajnos et al. (2008). Uma amostra de cada extrato foi submetida à cromatografia em camada fina, utilizando como fase estacionária de gel de sílica F254 e fases móveis específicas de acordo com o metabólito analisado. Padrões cromatográficos específicos também foram utilizados de acordo com as classes de metabólitos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Fase móvel com os padrões e reveladores específicos para classes de metabólitos secundários utilizados na prospecção fitoquímica dos extratos acetato de etila e etanólico das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-AcEOt e As-EtOH).

Metabólitos	Padrões	Reveladores	Fase móvel/Proporção
Taninos	Ácido Tânico	Cloreto Férrico (1%)	Clorofórmio: Metanol: Água (65:30:05)
Alcaloides	Escopolamina	Dragendorff	Tolueno: Acetato de Etila: Dietilamina (70:20:10)
Flavonoides	Quercetina	NEU	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético glacial: Água (100:11:11:26)
Terpenoides	Lupeol	Liberman Burchard	Tolueno: Clorofórmio: Etanol (40:40:10)
Cumarina	Ácido Cumárico	KOH - EtOH (10%)	Clorofórmio: Metanol: Água (01:01)

2.7 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS E TANINOS TOTAIS

A quantificação de fenóis e taninos totais foi conduzida pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Amorim et al. (2008). As soluções de metanol foram preparadas a partir dos As-AcEOt e As-EtOH a 1 mg/mL, do padrão (ácido tânico a 0,1 mg/mL). Foram misturados alíquotas das soluções de extrato (0,2 mL) ou do padrão (0,01 a 0,2 mL) com soluções aquosas do reagente de Folin-Ciocalteu (0,5 mL a 10%, v/v), carbonato de sódio (1 mL a 75 %, p/v), o volume de 10 mL com água destilada foi medido, e cuidadosamente foi agitado e mantido durante 30 minutos protegido da luz. A absorvância foi medida a 760 nm, na espectofotometro UV-VIS. As concentrações totais de fenóis foram determinadas por interposições das absorbâncias das amostras contra uma curva de calibração elaborada com diferentes concentrações do ácido tânico, expressas como miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g). Para taninos totais foi pesado 1 g de caseína e transferido para Erlenmeyer de 50 mL, adicionando 6 mL da amostra diluída e 12 mL de água destilada. Após três horas de reação sob agitação, filtrou-se a solução em balão volumétrico e completou para 25 mL com água destilada. Foi retirada uma alíquota de 1 mL e quantificados os fenóis residuais pelo método de Folin-Ciocalteu. O teor de taninos foi calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.8 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

O teor total de flavonóides dos As-AcOEt e As-EtOH foi determinado pelo método descrito por Peixoto-Sobrinho (2008). Foi preparado uma solução, dissolvendo os extratos acetato de etila e etanólico em 1 mL de metanol (1 mg/mL). Em seguida, misturou-se 0,2 mL

desta solução com 0,12 mL de ácido acético glacial, 2 mL da solução de piridina (20%, v/v em metanol P.A.), 0,5 mL de cloreto de alumínio (5%, p/v em água destilada) e completou para 10 mL com água destilada. A mistura permaneceu em repouso durante 30 min à temperatura ambiente, e depois foi determinada a absorbância a 420 nm. O padrão usado foi rutina (0,1 mg/mL), e o teste foi realizado em triplicata. O teor de flavonóides foi expresso em miligramas equivalente de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

2.9 ANÁLISE POR UPLC-DAD-QTOF MS

O espectrômetro de massa XEVO-G2XSQTOF (Waters, Manchester, Reino Unido) foi conectado ao sistema ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, EUA) através de uma interface de ionização por eletropulverização (ESI). O detector analítico foi um detector de Waters Acquity PDA, que foi configurado para uma faixa de comprimento de onda de 200-400 nm. A separação cromatográfica dos compostos foi realizada no ACQUITY UPLC com um amostrador automático condicionado a 4 °C, usando uma coluna C18 (50 mm × 2.1 mm i.d., tamanho de partícula de 1,7 µm) (Waters, Milford, MA, EUA). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A fase móvel constituída por água com 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) foi bombeada a uma taxa de fluxo de 0,4 mL min⁻¹. O programa de eluição com gradiente foi o seguinte: 0-5 min, 5-10% B; 5-9 min, 10-95% B. O volume de injeção foi de 10 µL. A análise MS foi realizada em um Xevo G2 QTOF (Waters MS Technologies, Manchester, Reino Unido), um espectrômetro de massa acoplado a uma fonte de ionização por eletropulverização no modo iônico negativo ou modo iônico positivo. O intervalo de varredura foi de 50 a 1200 m/z para aquisição de dados. Além disso, foram realizadas experimentos de MSE que permitem que os dados de íons de precursores e produtos sejam adquiridos em uma única injeção. As condições de origem são as seguintes: tensão capilar, 3,0 kV; cone de amostra, temperatura da fonte, 100 °C; temperatura de dessinação 250 °C; taxa de fluxo de gás cone 20 Lh⁻¹; taxa de fluxo de dessolvatação (N₂) 600 Lh⁻¹. Todas as análises foram realizadas usando o lockspray, o que garantiu precisão e reprodutibilidade. A leucina-encefalina (10 ng mL⁻¹) foi utilizada como um composto padrão ou de referência para calibrar espectrômetros de massa durante a análise e introduzida por uma lockspray a 10 µL min⁻¹ para aquisição de massa precisa. Toda a aquisição e análise de dados foram controladas usando Waters MassLynx v 4.1.

2.10 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA

O As-AcOEt (1 g) foi fracionado por cromatografia líquida em coluna com fase fixa contendo sephadex LH 20 e eludia com metanol (MeOH). Foram obtidas 53 frações, que após sucessivas cromatografias em camada delgada (CCD) e recristalizações resultaram em 7 frações (Av-12; Av-17; Av-18; Av-19P; Av-19S; Av-19E e Av-27). A partir da fração Av-18 foi possível isolar o ácido gálico (23 mg) e identifica-lo por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C . Os espectros de ^1H -RMN foram obtidos a 399,74 MHz e o de ^{13}C -RMN a 100,53 MHz. O solvente utilizado foi acetona deuterada (CD_3COCD_3). As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2.11 MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES 2,2-AZOBIS-(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-SULFONATO (ABTS⁺))

Para realização deste ensaio, foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999). O radical ABTS⁺ (2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) foi formado a partir da reação de 7 mM de ABTS⁺ com 140 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz (tempo necessário para a formação do radical). Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorbância de 0,70 ($\pm 0,05$) a 734 nm. Foram misturados 30 μL do As-AcOEt e As-EtOH (1 mg/mL) com 3 mL da solução de obtida anteriormente e deixados em repouso durante 6 min antes de se medir a absorbância a 734 nm. As absorbâncias das amostras foram interpoladas na curva de padrão construída com Trolox (100 a 2000 μM). Os resultados foram expressos em μM equivalentes de Trolox/mg de extrato. Para calcular o percentual da atividade antioxidante, o Trolox foi utilizado como controle positivo e a solução de trabalho como controle negativo. A atividade sequestradora do radical ABTS⁺ foi expressa em percentagem de inibição de ABTS⁺ de acordo com a equação:

$$\text{Inibição do ABTS (\%)} = [(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}] \times 100$$

2.12 MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES POR DPPH

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada medindo a capacidade de um composto para remover os radicais livres do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), conforme descrito por Peixoto-Sobrinho et al. (2011) com modificações. O As-AcEOt e As-EtOH foram solubilizados em metanol (0,5 mg/mL) em balão volumétrico de 100 mL, em triplicata. Alíquotas de 100 a 1000 µL do extrato ou padrão foram transferidos para tubos de ensaio, aferindo-se o volume final para 5 mL com metanol. As concentrações finais de As-AcEOt e As-EtOH ou padrão foram de 10-500 µg/mL. Em um volume de 500 µL do extrato diluído em metanol foram adicionados a 3 mL da solução de DPPH a 40 µg/mL em cada tubo, sendo realizado em duplicata. As soluções foram agitadas cuidadosamente e deixadas em repouso por 30 minutos, protegido da incidência da luz, a temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi mensurada a 517 nm, contra um branco preparado com metanol. A solução do controle negativo consiste na utilização da solução de DPPH a 40 µg/mL. A atividade de remoção de radicais livres foi expressa como a concentração eficiente capaz de capturar 50% dos radicais livres (CE₅₀).

2.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.13.1 Método de difusão em disco

O ensaio antimicrobiano foi realizado através do método de difusão em disco (BAUER et al., 1996) seguindo o NCCLS (2003), onde cada disco estéril de papel filtro (Qualit, nº 045. PF) de 6,0 mm de diâmetro foi impregnado com alíquotas (10 µL) do As-AcEOt na concentração de 30 mg/mL (SANTOS et al., 2007). No teste controle negativo foi aplicado 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado na suspensão do extrato As-AcEOt. Os inóculos bacteriano e fúngico foram preparados por suspensão direta em solução salina (0,9%) e Agar triptona soja (TSA), respectivamente. A suspensão foi semeada em placa de Petri (90 mm) contendo Agar Mueller-Hinton (AMH). Um conjunto predeterminado de discos contendo o extrato orgânico foi colocado na superfície do AMH. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas (para bactérias) e 48 horas (para fungo). Após o período de incubação foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano, incluindo o diâmetro do disco.

2.13.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM)

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela metodologia de microdiluição em caldo para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM) seguindo o NCCLS (2003). O As-AcOEt com concentração inicial de 30 mg/mL foi adicionado à placa de 96 poços contendo meio Caldo Mueller Hinton, e em seguida, uma suspensão microbiana na concentração $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL) que correspondente a 0,5 da escala de McFarland foi adicionada na placa. A placa foi incubada por 24 ou 48 horas a fim de determinar a CMI para bactérias e fungos, respectivamente. Para melhor visualização do crescimento bacteriano, foi adicionado resazurina (0,01 mg/mL) a todos os poços, seguindo-se de incubação por 2 horas e posterior leitura das placas. Para a determinação da CMM foi repicada uma alíquota das concentrações que apresentaram atividade na placa do CMI. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e 28 °C por 48 horas para leveduras. Para Concentração Mínima Microbicida CMM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento do microrganismo sobre a superfície do Ágar Mueller Hinton (AMH).

2.14 TOXICIDADE AGUDA

Para a avaliação da toxicidade aguda foram usados grupos com três camundongos albinos Swiss fêmeas. Os animais receberam por via oral o As-AcOEt e As-EtOH na dose de 2000 mg/kg ou o veículo (grupo controle recebeu salina 0,9% com 5% de DMSO). Os animais foram observados na primeira hora após a administração pelo método de *screening* hipocrático (MALONE; ROBICHAUD, 1962). Durante os 14 dias seguintes foram avaliados o consumo de água, ração, peso corporal e mortalidade dos grupos experimentais. No último dia de observação, os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca para análise dos parâmetros hematológico e bioquímico. Este experimento foi repetido, utilizando o mesmo número de animais totalizando 6 animais por grupo (OECD, 2001).

2.15 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Para o teste hematológico, amostras sanguíneas foram coletadas em tubos contendo EDTA K₂ e analisadas em contador hematológico de células ABX micros 60 (HORIBE medical). Para o teste bioquímico, as amostras foram coletadas em tubos com ativador de coágulo e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. O soro obtido foi analisado no equipamento BIOPLUS 2000 utilizando kits bioquímicos Labtest para os seguintes parâmetros: glicose, triglicerídeos, proteínas, colesterol, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, AST (aspartato amino transaminase) e ALT (alanina amino transaminase).

2.16 ESTUDO DO EFEITO GASTROPROTETOR DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE A. SCHAUERIANA

2.16.1 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto

Os ratos Wistar machos foram distribuídos em grupos (n=5 animais/grupo) e submetidos a um jejum de 24 horas com livre acesso à água. Após este período, cada grupo recebeu um tratamento com As-AcOEt e As-EtOH (50, 100 e 200 mg/kg v.o.). Como controle negativo os animais receberam veículo (salina 0,9% com 5% de DMSO) e como controle positivo o pantoprazol (30 mg/kg). Após 1 hora da administração dos respectivos tratamentos, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol absoluto. Seguido 1 hora da administração do etanol, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e seus estômagos foram removidos e, abertos ao longo da maior curvatura para contagem das lesões ulcerativas (ROBERT et al., 1979). A contagem das lesões foi realizada a partir de imagens digitalizadas e analisadas por *ImageJ* software (1.51 d). A porcentagem de inibição foi calculada pela fórmula: % de inibição = IU tratado/ IU controle x 100) (BARROS et al., 2007).

2.16.2 Úlcera gástrica induzida por AINEs

O experimento foi realizado de acordo com a metodologia de Hayden et al. (1978). Os ratos Wistar machos foram distribuídos em grupos (n=5 animais/grupo) e submetidos a um

jejum de 12 horas com livre acesso de água. Os animais foram pré-tratados com veículo (salina 0,9% com 5% de DMSO), 200 mg/kg de cimetidina ou As-EtOH na dose de 200 mg/kg.. Depois de 1 h, todos receberam 100 mg/kg de indometacina diluída em 0,5% de bicarbonato de sódio para induzir a úlcera gástrica. Todas as administrações foram por via oral. Passado 12 h, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e seus estômagos foram removidos e, abertos ao longo da maior curvatura para contagem das lesões (ROBERT et al., 1979). A contagem das lesões ulcerativas foi realizada a partir de imagens digitalizadas e analisadas pelo software *ImageJ* (1.51 d). A porcentagem de inibição foi calculada como descrito acima.

2.17 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

Os tecidos dos estômagos dos animais submetidos ao modelo de úlceras induzidas por etanol (controles e tratados) foram homogeneizados e processados de acordo com a técnica descrita por Bradley et al. (1982). Fragmentos do tecido foram colocados em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (1,5 mL - 100 mg de tecido) em homogeneizador de Potter. O homogenato foi agitado em vórtex e centrifugado durante 15 minutos a 2.500 rpm. Posteriormente foram retirados 10 µl do sobrenadante e adicionados em microplaca de 96 poços, em duplicata, sendo a seguir, adicionado 200 µL de solução tampão contendo di-hidrocloreto de *o*-dianisidina (16,7 mg), água bidestilada (90 mL), tampão fosfato de sódio (10 mL) e H₂O₂ 1% (50 µL). Os níveis da enzima foram determinados pela medida da absorbância em leitor de microplaca (450 nm) e os resultados foram expressos como mDO/tecido.

2.18 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA

A análise histopatológica foi realizada em estômagos previamente submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto. Áreas do tecido foram removidas e fixadas em formalina tamponada (10%) por 48 horas a temperatura ambiente, e posteriormente transferidas para o álcool etílico a 70%, e então submetidas ao processo de desidratação com álcool etílico em várias concentrações, diafanizadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina. O corte do material emblocado foi realizado em micrótomo, ajustado para 5 µm. As lâminas montadas em duplicata foram mantidas em estufa 37°C por 24 h para

secagem e colagem do material. Posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (HE) para ambos os extratos e periodico ácido-schiff (PAS) para o extrato acetato de etila. A análise dos tecidos foi realizada em microscópio óptico.

2.19 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE GASTROPROTECTORA DE AS-ACEOT E AS- ETOH

2.19.1 Envolvimento do óxido nítrico, compostos sulfidrílicos e prostaglandinas na gastroproteção

Para investigar os possíveis mecanismos pelos quais os As-AcEOt e As-EtOH exerce seu efeito gastroprotetor, foram examinados o envolvimento de óxido nítrico (NO), compostos de sulfidrílicos e prostaglandinas. Para este conjunto de experiências, foram utilizados 100 mg/kg do As-AcEOt e 200 mg/kg de As-EtOH, uma vez que não apresentou toxicidade e foi efetivo na diminuição da lesão induzida em modelos experimentais de úlcera gástrica por etanol absoluto. Para avaliar o envolvimento desses diferentes alvos, utilizaram-se antagonistas específicos, tais como indometacina (5 mg/kg ip) para prostaglandinas, cloridrato de éster metílico de N ω -Nitro-L-arginina (5 mg /kg, ip) (L-NAME) inibidor de óxido nítrico para e N-etilmaleimida (5 mg/kg ip) (NEM) inibidor de compostos sulfidrílicos. Os animais foram submetidos a jejum durante 24 horas e divididos em 5 grupos (n = 5-7), de acordo com os pré-tratamentos: grupo 1 recebeu veículo (solução salina 0,9% com 5% de DMSO); o grupo 2 recebeu L-NAME (5 mg/kg; i.p.); o grupo 3 recebeu indometacina (5 mg/kg i.p.); o grupo 4 recebeu NEM (10 mg / kg, i.p.), grupo 5 que corresponde ao As-AcEOt (100 mg/kg) e grupo 6 que corresponde a As-EtOH (200 mg/kg). Trinta minutos após a administração do antagonista, os grupos foram tratados oralmente com o veículo ou o As-AcEOt na dose 100 mg/kg por via oral. Sessenta minutos depois, todos os grupos foram tratados oralmente com 1,0 mL de etanol para induzir úlcera gástrica. Uma hora depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, os estômagos foram excisados e o dano gástrico foi determinado conforme descrito anteriormente (BARROS et al., 2007).

2.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como valores de média $\pm$ desvio padrão para cada grupo experimental, utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 6.0). Os dados foram avaliados por meio da análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey, ****P<0,0001, significativos após ANOVA quando comparados ao grupo controle.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SCREENING FITOQUÍMICO

Neste trabalho verificou-se a presença de terpenóides, flavonóides e taninos no extrato acetato de etila e flavonoides e taninos no extrato etanólico.

Nossos resultados estão de acordo com as classes de metabólitos encontradas no trabalho de Suman et al. (2011) que confirmaram a presença de terpenos, flavonóides e taninos no extrato etanólico de *Avicennia officinalis*, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

De acordo com Khattab et al. (2012) o extrato acetato de etila de *A. marina* apresentou fenóis taninos e glicosídeos. Shanmugapriya et al., (2012) avaliaram o perfil fitoquímico do extrato metanol de *A. officinalis* e observaram a presença de flavonoides e taninos. Mangrio et al. (2016) determinaram a partir do perfil fitoquímico a presença de flavonóides e taninos no extrato aquoso de *A. marina*, estando de acordo com os achados do presente trabalho.

3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES, TANINOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O As-AcOEt apresentou teores de fenóis totais de 36,41 mg EAT/g, 44,59 mg ER/g de flavonoides e 26,5 mg EAT/g de taninos. Na avaliação da propriedade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres ABTS o percentual de inibição foi de 73,23 %. Na avaliação da propriedade antioxidante do As-AcOEt pelo método de sequestro de radicais livres DPPH, foram obtidos os valores médios de CE_{50} de 42,25 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato acetato de etila e 13,04 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido ascórbico (Tabela 3).

O As-EtOH mostrou teores de fenóis totais, flavonoides e taninos totais de 216,86 mg ER/g, 17 mg ER/g e 199,5 mg EAT/g, respectivamente. Na avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres DPPH, o valor médio da CE_{50} foi de 42,99 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, a inibição de ABTS foi de 89,11 % (Tabela 4).

Thirunavukkarasu et al. (2011) realizaram o doseamento de fenóis totais e a atividade antioxidante por ABTS dos extratos etanol e aquoso de *A. officinalis*, e os teores de fenóis totais foram de 257 e 293 mg EAG/g, respectivamente. Os extratos mostraram melhor efeito antioxidante na concentração de 2 mg/mL, sendo o extrato etanólico com 81,53% de

inibição do ABTS.

Aladedunye e Matthäus (2014) sugerem que existe uma relação entre os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante em muitas espécies de plantas. Com o aumento de compostos fenólicos, também aumenta o número de hidroxilas disponíveis, e consequentemente aumenta a possibilidade de doação de hidrogênios para os radicais livres (RAJAEI et al., 2010). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e sequestradores de oxigênio (RICE-EVANS et al., 1996). Os agentes antioxidantes ganharam atenção em aplicações biomédicas devido à sua capacidade de agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, excludentes de radicais livres e receptores de oxigênio (CHUN et al., 2003). Uma classe importante de antioxidantes são os polifenóis, que apresentam capacidade de sofrer reações de oxidação/redução. Como por exemplo, o ácido gálico que quebram a reação em cadeia dos radicais livres através dos grupos hidroxilas nos seus anéis aromáticos (LLORENS et al., 2014).

A partir dos achados no presente trabalho, podemos sugerir que o As-AcOEt e As-EtOH apresentaram relevante atividade antioxidante podendo estar associada à presença das classes de compostos fenólicos, tais como, flavonoides e taninos.

Tabela 3: Doseamento de fenóis totais, flavonóides, taninos totais e atividade antioxidante por ABTS do extrato orgânico acetato de etila (As-AcEOt) das folhas de *Avicennia schaueriana*.

Extrato/Padrão	Fenóis totais (mg EAT/g)	Flavonóides (mg ER/g)	Taninos totais (mg EAT/g)	CE ₅₀ (µg/mL) ± D.P	ABTS ⁺ (%)
As- AcEOt Ácido	36,41 ± 1,95	44,59 ± 1,64	26,50 ± 1,75	42,25 ± 4,45	73,23 ± 0,59
Ascórbico				13,04	
TEAC					64,26

CE₅₀ = Concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH. TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (µM Trolox/mg de extrato) mg EAT/g : Equivalente de ácido tânico por grama de extrato. mg ER/g: Equivalente de rutina por grama de extrato
ABTS⁺: 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

Tabela 4: Doseamento de fenóis totais, flavonoides, taninos totais e atividade antioxidante por DPPH e ABTS do extrato etanólico (As-EtOH) das folhas de *Avicennia schaueriana*

Extrato/Padrão	Fenóis totais (mg EAT/g)	Flavonóides (mg ER/g)	Taninos totais (mg EAT/g)	CE ₅₀ (µg/mL)±D.P.	ABTS ⁺ (%)
As-EtOH	216,86 ± 4,85	17,50 ± 0,64	199,50 ± 5,40	42,99 ± 0,07	89,11 ± 0,09
Ácido Ascórbico				13,04	
TEAC					64,26

CE₅₀ = Concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH. TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (µM Trolox/mg de extrato)

D.P. = Desvio Padrão

3.3 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS POR UPLC-DAD-QTOF MS

A cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada à espectrometria de massa (UPLC/QTOF MS) foi utilizada para caracterizar estruturalmente os compostos no As-AcEOt. Os compostos foram identificados e as vias de fragmentação foram analisadas para facilitar a identificação estrutural. Foram obtidas informações essenciais para cada composto, incluindo o tempo de retenção (RT), os espectros UV/vis, o modo de ionização na polaridade negativa e os íons característicos, como evidenciados na Tabela 5. Três tipos de composto (três taninos, sete flavonóides e um triterpeno) foram obtidos a partir do As-AcEOt. A tabela 5 resume os fragmentos mais característicos observados no espectro MS/MS dos compostos. Os cromatogramas típicos UPLC-DAD (340 nm) e o pico íon de base ESI (BPI) são mostrados na Figura 7A e 7B. Três grupos de fenólicos podem ser distinguidos com base em seus espectros UV-vis, parecidos com o de ácido elágico (com duas absorbâncias máximas em torno de 252 e 364 nm), derivados de galoil (máximo em torno de 270 nm) e flavonóides (máximo de absorção cerca de 350). Os compostos 1 e 2 são isômeros. O pico 1 foi identificado como ácido gálico porque, além de apresentar uma absorção máxima no espectro UV-vis de 270 nm, a molécula desprotonada foi detectada em 169 m/z com um fragmento no MS² 125 m/z. A identificação foi confirmada por um padrão autêntico. O composto 2 parece ser um derivado do ácido gálico com o mesmo peso molecular. O pico 3 foi tentativamente identificado como ácido elágico com espectros UV com λ_{max} de 364 nm e características de padrões de fragmentação. Um total de 7 flavonoides O-glicosídeos foram identificados. Os dados espectrais de massa 4, 6 e 7 indicaram ter um resíduo de pentose com

perda de 132 Da, enquanto os flavonóides 5 e 8 apresentaram eliminação de 146 Da, indicativo de resíduo de desoxihexose. Os compostos 9 e 10 são isômeros. Íons em 463 m/z, perda de 152 Da do pico de base, sugeriu a presença de unidade de galoil na estrutura. A perda subsequente de 146 Da indicou que esta unidade de galoil pode ser acoplada a desoxihexose. Além disso, a fragmentação em 301 m/z foi observada nos flavonóides 6, 7 e 8 correspondendo ao íon molecular desprotonado da quercetina. Os flavonóides 4, 5, 9 e 10 apresentaram o íon 317 m/z, representativo do núcleo desprotonado de miricetina. O íon [M-H] a 487 m/z (composto 11) pode ser atribuído a um ácido triterpeno. O espectro MS/MS exibiu uma perda neutra de CO₂ e H₂O levando a formar o pico em 447 m/z.

Figura 7: O cromatograma UPLC-DAD (340 nm) (A) e o pico de base ESI (BPI) (B) do extrato acetato de etila folhas de *Avicennia schaueriana* (As-AcOEt).

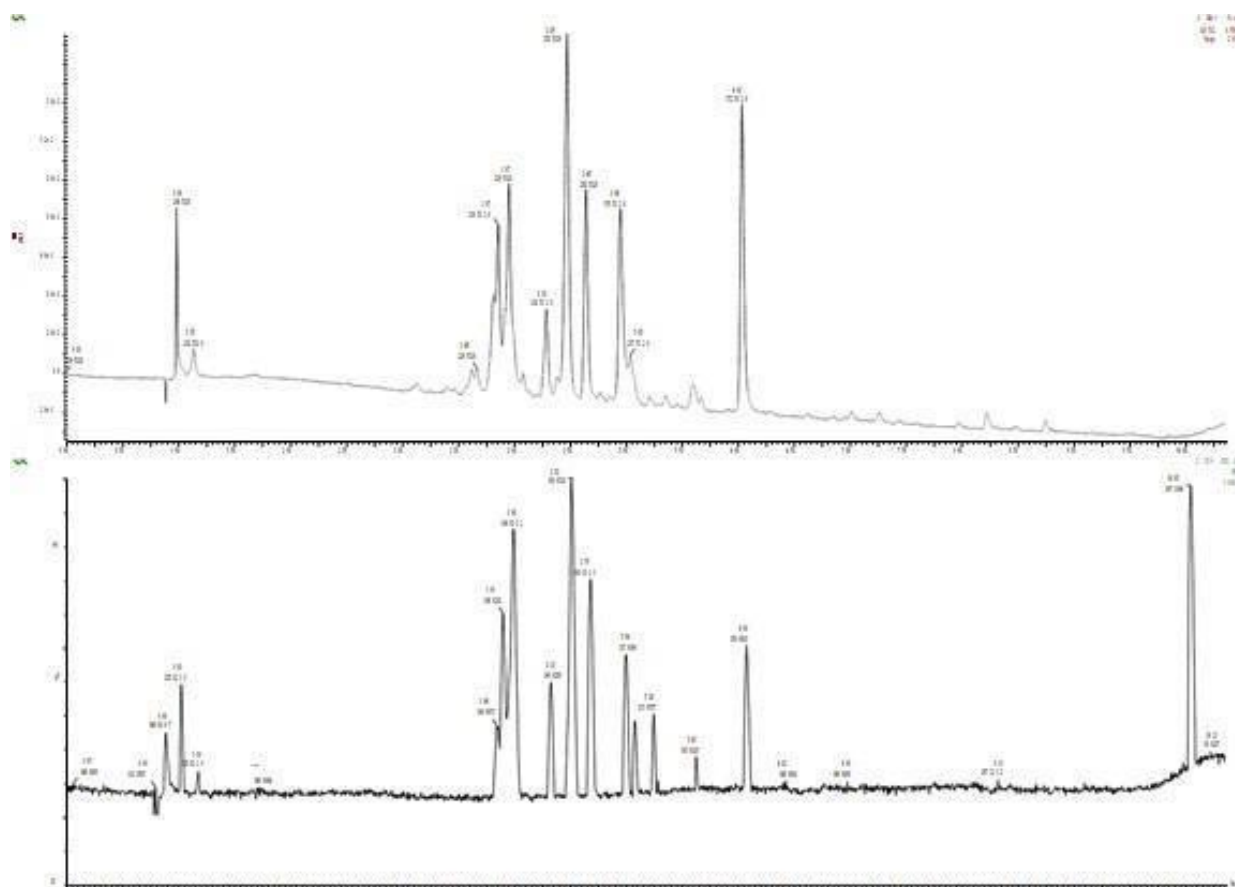


Tabela 5: Dados de espectrometria de massa dos principais constituintes do extrato de acetato de etila das folhas de *A. schaueriana* (As-AcOEt)

Pico	Retenção Tempo	λ_{max}	[M-H] ⁻	M-H] ⁻ calculado	MS ² (m/z)	Composto Identificado	Referência
1	1.04	270	169.0140	169.0142	125.0231	Ácido Gálico	Mena et al., 2012.
2	1.19	270	169.0140	169.0142	125.0231	Derivado de Ácido Gálico	Mena et al., 2012.
3	3.86	364	300.9993	300.9990	229.0107, 160.8407	Ácido Elágico	Wyrepkowski et al, 2014
4	3.91	357	449.0725	449.0726	317.0283, 271.0266	Miricetina-pentose	Diaz-de-Cerio et al., 2015.
5	4.01	350	463.0880	463.0882	317.0280, 287.0204	Miricetina deoxihexose	Diaz-de-Cerio et al., 2015
6	4.34	357	433.0776	433.0776	301.0324, 271.0235	Quercetina-pentose	
7	4.53	353	433.0771	433.0776	301.0331, 271.0241	Quercetina-pentose	
8	4.69	346	447.0916	447.0933	301.0331, 271.0248	Quercetina deoxihexose	
9	5.00	370	615.0992	615.0992	463.0909, 317.0269	Miricetina galoil deoxihexose	
10	6.09	359	615.0993	615.0992	463.0909, 317.0269	Miricetina galoil deoxihexose	
11	10.05	-	487.3423	487.3429	447.1413, 325.1845	Derivado de ácido Trihidroxí- ursen-oic	Xia et al., 2015.

A cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada à espectrometria de massa (UPLC/QTOF MS) do As-EtOH possibilitou a identificação de 15 substâncias (Figura 8) que englobam taninos hidrolisáveis, ácido elágico e gálico bem como flavonóides. Todos os compostos foram caracterizados pelos seus espectros de absorção na região do ultravioleta, sua fragmentação característica foi comparada com os dados da literatura.

O ácido gálico pico 2 (t_R = 0,41 min) e 3 (t_R = 0,46 min) apresenta absorção máxima em 270 nm e o íon desprotonado [M-H]⁻ 169 e o fragmento MS² m/z 125, correspondente a perda de massa de CO² [M-H-44]⁻. A presença de íons moleculares com o mesmo valor de fragmentação em diferentes tempos de retenção indica que esses compostos são isômeros. Seu modelo de fragmentação foi comparado e confirmado através de autênticas amostras de ácido gálico. Através dos espectros de massas e respectivos espectros de ultravioleta (λ_{max} 267) foi possível identificar através dos seus perfis de fragmentação que os compostos 1 e 4 são

taninos hidrolisáveis e que apresentam tanto o ácido gálico (A) quanto o hexahidroxidifênico (HHDP) nas suas estruturas.

Os espectros de UV de taninos hidrolisáveis podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo compreende compostos derivados do ácido elágico com 2 absorções máximas, em λ_{max} 250 nm e λ_{max} 365 nm. O Segundo grupo apresenta um λ_{max} 275 nm, típico de taninos com grupos galloil e hexahidroxidifenoil (HHDP). Uma molécula condensada de HHDP dá origem ao ácido elágico, razão pela qual também são considerados elagitatinos (CANTOS et al., 2003).

O composto correspondente ao **pico 1** (tR = 0,37 min) não teve sua estrutura tentativamente identificada. O pico da substância **4** (tR = 0,84 min) foi identificada como galloil-bis-HHDP-glucose com $[M - H]^-$ em 935 *m/z* e MS^2 fragmento em 633 *m/z* (perda de HHDP, 302 amu) e 301 (perda de galloil-glucose, 332 amu). O fragmento 169 *m/z* corresponde ao grupo galloil. O **pico 7** (tR = 2,22 min) foi identificado como ácido elágico com espectros UV com λ_{max} de 365 nm e foi confirmado através de autênticas amostras de ácido gálico. O **Pico 12** (tR = 3,21 min) corresponde a Miricetina e os **Picos 5** (tR = 1,84 min), **6** (tR = 2,06 min) e **13** (tR = 3,47 min) a Miricetina-glicosídeos. O **pico 12** (tR = 3,21 min) com íon desprotonado $[M-H]^-$ 317 corresponde a miricetina e MS^2 151 cujo fragmento caracteriza a presença de duas hidroxilas no anel A. A substância **5** foi tentativamente identificada como Miricetina-O-hexose e apresenta o íon desprotonado $[M-H]^-$ *m/z* 479 e MS^2 íon em 316 *m/z* (miricetina) $[M-H-162]$ cujo fragmento representa $[M-2H\text{-hexose}]$. A substância **6**, cujo íon desprotonado $[M-H]^-$ *m/z* 449 e fragmentação MS^2 316 corresponde a $[M-2H-132]$ sendo tentativamente identificada como Miricetina-O-pentose. O **pico 13** (tR = 3,47 min) com $[M-H]^-$ 615 *m/z*, representa Miricetina-galloil-deoxihexose, com MS^2 317 *m/z* (miricetina), cujo fragmentação correspondente a $[M-H\text{-galloil-deoxiribose}]$ e corresponde a $[M-H-152-146]$. Os picos **8**, **9**, **10**, **11** representam quercetina glicosídeos e **pico 15** a quercetina aglicona cujo íon desprotonado $[M-H]^-$ corresponde a *m/z* 303-301 e é caracterizado pelo fragmento MS^2 *m/z* 151 que representa a presença de 2 hidroxilas no anel A. Seu modelo de fragmentação foi comparado e confirmado através de autênticas amostras de quercetina. O **pico 8** (tR = 2,40 min), cujo íon desprotonado corresponde a $[M-H]^-$ 463 e MS^2 301 *m/z* sugere a perda de uma unidade de hexose $[M-H\text{-hexose}]$ que corresponde a $[M-H-162]$. O **pico 9** (tR = 2,45 min), apresenta o íon desprotonado $[M-H]^-$ 463 e MS^2 em 303 *m/z*, que corresponde quercetina. Baseados no espectro de massa estes isômeros foram tentativamente identificados com quercetina-O-hexose. Composto **10** (tR = 2,91 min) corresponde a $[M-H]^-$ 433 *m/z*. O espectro de MS^2 301 *m/z* $[M-H-132]^-$ indicando a perda de

uma pentose. Com base no seu espectro de massa o composto **10** foi tentativamente identificado como quercetina-*O*-pentose. Composto **11** (tR = 3,09 min) representa $[M-H]^-$ 447 m/z. O espectro de MS² 301 m/z $[M-H-146]^-$ indicando a perda de uma deoxihexose. Com base no seu espectro de massa o composto **11** foi tentativamente identificado como quercetina-*O*-deoxihexose (Tabela 6).

Figura 8: Espectro de Massas e Ultravioleta dos principais constituintes do extrato etanólico de *A. schaueriana*.

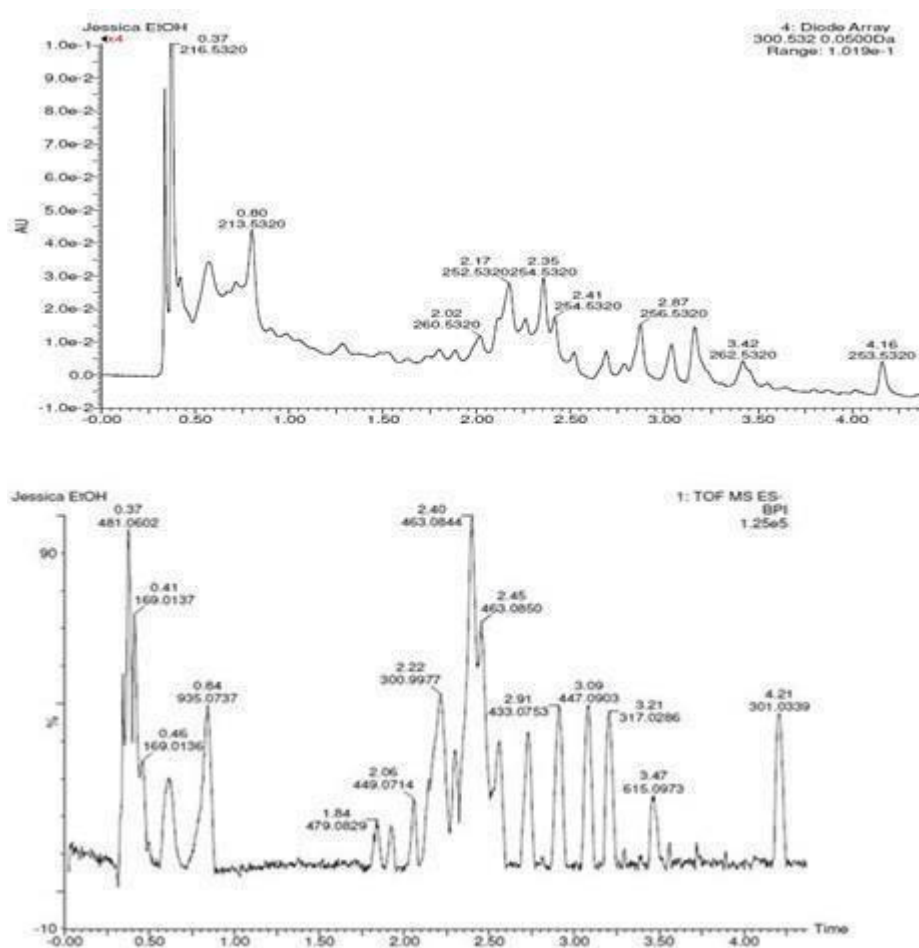


Tabela 6. Massas e Ultravioleta dos principais constituintes do As-EtOH.

Picos	Tempo de retenção	λ_{max}	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻ calculado	MS ² (m/z)	Compostos Identificados	Referência
1	0.37	276	481.0602	-	331.0670 300.9976 275.0189 169.0140	Galotannino	Kajdžanoska et al., 2010
2	0.41	270	169.0137	169.0142	125.0231	Ácido gálico	Mena et al., 2012.
3	0.46	270	169.0136	169.0142	125.0231	Ácido gálico	Mena et al., 2012.
4	0.84	270	935.0737	935.0796	783.0679 467.0326 300.9989 169.0148	Galloyl-bis-HHDP-Hexose	Suvanto et al, 2016
5	1.84	354	479.0714	479.0831	316.0214	Miricetina-O-hexose	Saldanha et al., 2013
6	2.06	355	449.0708	449.0726	316.0215	Miricetina-O-pentose	Saldanha et al., 2013
7	2.22	365	300.9977	300.9990	-	Ácido elágico	Wyrepkowski et al., 2014
8	2.40	347	463.0844	463.0882	303.0889	Quercetina-hexose	Saldanha et al., 2013
9	2.45	354	463.0850	463.0882	300.0259	Quercetina-hexose	Saldanha et al., 2013
10	2.91	355	433.0753	433.0776	301.0345	Quercetina-O-pentose	Saldanha et al., 2013
11	3.09	347	447.0903	447.0933	301.0337	Quercetina-O-deoxihexose	Saldanha et al., 2013
12	3.21	370	317.0286	317.0303	151.0029	Miricetina	Motta et al., 2005
13	3.47	346	615.0973	615.0992	317.0291	Miricetina-galloyl-deoxihexose	Lin et al., 2000
15	4.21	374	301.0339	301.0354	151.0035	Quercetina	Brito et al., 2015

A cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada à espectrometria de massa (UPLC/QTOF MS) do As-EtOH possibilitou a identificação de 15 substâncias (Figura 8) que englobam taninos hidrolisáveis, ácido elágico e gálico bem como flavonóides. Todos os compostos foram caracterizados pelos seus espectros de absorção na região do ultravioleta, sua fragmentação característica foi comparada com os dados da literatura.

O ácido gálico pico 2 (tR = 0,41 min) e 3 (tR = 0,46 min) apresenta absorção máxima em 270 nm e o ion desprotonado [M-H]⁻ 169 e o fragmento MS² m/z 125, correspondente a perda de massa de CO² [M-H-44]⁻. A presença de íons moleculares com o mesmo valor de fragmentação em diferentes tempos de retenção indica que esses compostos são isômeros. Seu modelo de fragmentação foi comparado e confirmado através de autênticas amostras de ácido gálico. Através dos espectros de massas e respectivos espectros de ultravioleta (λ_{max} 267) foi possível identificar através dos seus perfis de fragmentação que os compostos 1 e 4 são

taninos hidrolisáveis e que apresentam tanto o ácido gálico (A) quanto o hexahidroxidifênico (HHDP) nas suas estruturas.

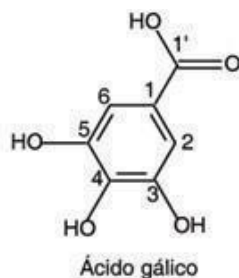
O composto correspondente ao **pico 1** (tR = 0,37 min) não teve sua estrutura tentativamente identificada. O pico da substância **4** (tR = 0,84 min) foi identificada como galloil-bis-HHDP-glucose com $[M - H]^-$ em 935 *m/z* e MS² fragmento em 633 *m/z* (perda de HHDP, 302 amu) e 301 (perda de galloil-glucose, 332 amu). O fragmento 169 *m/z* corresponde ao grupo galloil. O **pico 7** (tR = 2,22 min) foi identificado como ácido elágico com espectros UV com λ_{max} de 365 nm e foi confirmado através de autênticas amostras de ácido gálico. O **Pico 12** (tR = 3,21 min) corresponde a Miricetina e os **Picos 5** (tR = 1,84 min), **6** (tR = 2,06 min) e **13** (tR = 3,47 min) a Miricetina-glicosídeos. O **pico 12** (tR = 3,21 min) com íon desprotonado $[M-H]^-$ 317 corresponde a miricetina e MS² 151 cujo fragmento caracteriza a presença de duas hidroxilas no anel A. A substância **5** foi tentativamente identificada como Miricetina-O-hexose e apresenta o íon desprotonado $[M-H]^-$ *m/z* 479 e MS² íon em 316 *m/z* (miricetina) $[M-H-162]^-$ cujo fragmento representa $[M-2H-\text{hexose}]$. A substância **6**, cujo íon desprotonado $[M-H]^-$ *m/z* 449 e fragmentação MS² 316 corresponde a $[M-2H-132]^-$ sendo tentativamente identificada como Miricetina-O-pentose. O **pico 13** (tR = 3,47 min) com $[M-H]^-$ 615 *m/z*, representa Miricetina-galloil-deoxihexose, com MS² 317 *m/z* (miricetina), cujo fragmentação correspondente a $[M-H-\text{galloil-deoxiribose}]^-$ e corresponde a $[M-H-152-146]^-$. Os picos **8**, **9**, **10**, **11** representam quercetina glicosídeos e **pico 15** a quercetina aglicona cujo íon desprotonado $[M-H]^-$ corresponde a *m/z* 303-301 e é caracterizado pelo fragmento MS² *m/z* 151 que representa a presença de 2 hidroxilas no anel A. Seu modelo de fragmentação foi comparado e confirmado através de autênticas amostras de quercetina. O **pico 8** (tR = 2,40 min), cujo íon desprotonado corresponde a $[M-H]^-$ 463 e MS² 301 *m/z* sugere a perda de uma unidade de hexose $[M-H-\text{hexose}]^-$ que corresponde a $[M-H-162]^-$. O **pico 9** (tR = 2,45 min), apresenta o íon desprotonado $[M-H]^-$ 463 e MS² em 303 *m/z*, que corresponde quercetina. Baseados no espectro de massa estes isômeros foram tentativamente identificados com quercetina-O-hexose. Composto **10** (tR = 2,91 min) corresponde a $[M-H]^-$ 433 *m/z*. O espectro de MS² 301 *m/z* $[M-H-132]^-$ indicando a perda de uma pentose. Com base no seu espectro de massa o composto **10** foi tentativamente identificado como quercetina-O-pentose. Composto **11** (tR = 3,09 min) representa $[M-H]^-$ 447 *m/z*. O espectro de MS² 301 *m/z* $[M-H-146]^-$ indicando a perda de uma deoxihexose. Com base no seu espectro de massa o composto **11** foi tentativamente identificado como quercetina-O-deoxihexose (Tabela 5).

De acordo com Fang e Bhandari (2010), os flavonoides, substâncias que eliminam e estabilizam radicais livres, diminuem o oxigênio singlete, age nas reações de oxidação lipídica, bem como na quelação de metais, possibilitando a proteção contra o estresse oxidativo. Estes compostos são potentes agentes antioxidantes capazes de neutralizar e suprimir a produção de radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), proteger os ácidos graxos insaturados presentes em membranas celulares e impedir a oxidação de antioxidantes endógenos (TODOROVA; TRENDALFOLOVA 2014). Trabalhos vêm demonstrando que os flavonóides possuem importantes atividades anti-inflamatórias devido as suas ações neutralizadoras sobre os radicais livres (LIMA; BEZERRA, 2012). Considerando suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, os flavonóides têm sido julgados contra várias doenças as quais estão diretamente relacionadas aos processos oxidativos e inflamatórios como diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas e as doenças inflamatórias intestinais (BARBOSA et al., 2010). Os taninos são considerados polifenóis, devido a grande quantidade de anéis fenólicos presentes em sua estrutura, com massa molecular variando entre 500 a 3000 g/mol aproximadamente.

Extratos abundantes em taninos são comumente utilizados no tratamento de gastrites e úlceras (KHENNOUF et al., 2003; XIE; DIXON, 2005). Os taninos são classificados quimicamente em taninos hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis expressam em sua constituição monômeros de ácido gálico ou ácido elágico, já os taninos condensados são polifenóis com peso molecular diversificado, consistindo de unidades flavonóidicas (flavan-3-ol e flavan-3,4-diol), em vários graus de condensação (MORI et al., 2003). Há dois mecanismos de ação principais para a proteção de doenças gastro-intestinais: químico, com ativação de defesas antioxidantes (BONACORSI et al., 2012), e físico, com formação de uma camada tanino/proteína, que protege a mucosa gástrica promovendo maior resistência a lesões químicas, mecânicas e irritações (JESUS et al. 2012).

3.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA

A partir da fração Av-18 foi possível obter um derivado fenólico, ácido gálico (Figura 9). O composto isolado (23 mg) apresentou-se como um sólido cristalino de coloração amarelada, solúvel em acetato de etila e acetona, que após a CCD demonstrou a presença de uma única banda de coloração amarela e amarelo-esverdeada nos reveladores anisaldeído e cloreto de alumínio, respectivamente.

Figura 9: Estrutura química do ácido gálico.

O espectro de RMN ^1H do isolado apresentou um único sinal intenso em δ 7,02, característico de prótons aromáticos, atribuídos aos dois hidrogênios equivalentes (H-2 e H-6) representado na figura 10. Já a análise de RMN ^{13}C apresentou cinco sinais de carbono sp^2 sugestivos de núcleo aromático, com sinal em δ 169,4 sendo característico de carbono ligado a carbonila em éster ou ácido carboxílico; além disso foi possível observar um sinal δ 111,85 relativo aos carbonos C-2 e C-6; um sinal em δ 123,86 equivalente a C-1; um sinal em δ 140,37 associado ao C-4; e um outro sinal em δ 147,75 referente aos outros dois carbonos equivalentes: C-3 e C-5 (Figura 11). Nossos achados corroboram com os resultados de RMN ^{13}C obtidos por Lu e Foo (1999) que encontram-se destacados na tabela 7.

Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 75 MHz, TMS, ppm) para ácido gálico.

Posição	Composto Isolado RMN ^{13}C (ppm)	Ácido gálico RMN ^{13}C (ppm) Lu, Foo, 1999
1	123,86	121,38
2	111,85	110,52
3	147,75	144,94
4	140,37	135,93
5	147,75	144,94
6	111,85	110,52
1'	169,4	170,76

Figura 10: Espectro de RMN ^1H (399,74 MHz) do composto isolado.

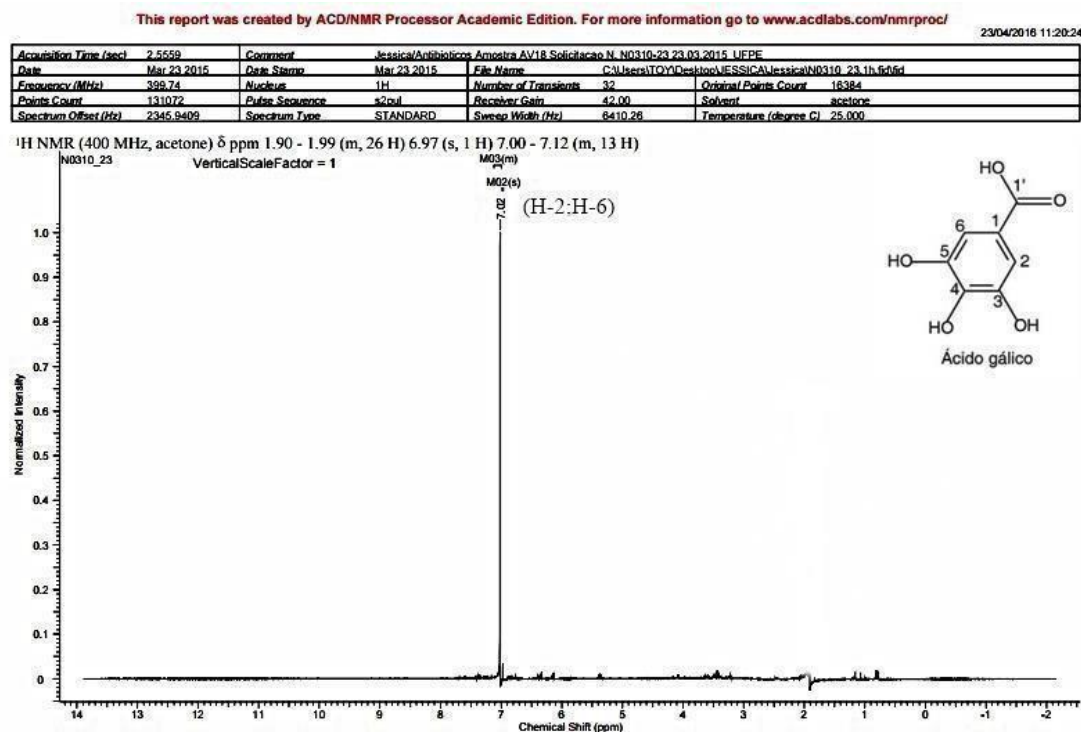
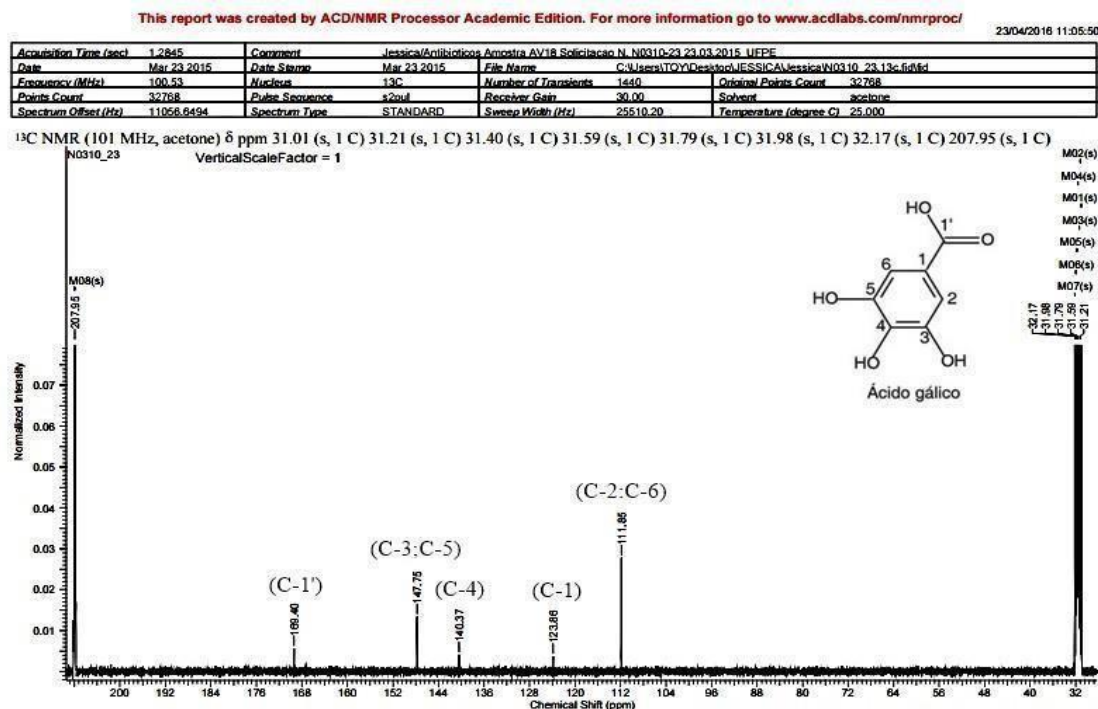


Figura 11: Espectro de RMN ^{13}C (100,53 MHz) do composto isolado.



Almeida et al. (2005) fracionaram o extrato etanólico de *Cochlospermum vitifolium* por cromatografia líquida em coluna com sílica gel e após sucessivas cromatografias forneceu o ácido gálico que foi identificado por RMN ^1H e RMN ^{13}C . Os autores obtiveram no RMN ^1H (300 MHz, CD_3COCD_3) um sinal em 7,08 s; e no RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD): 120,7 (C-1), 109,1 (C-2), 145,1 (C-3), 138,3 (C-4), 145,1 (C-5), 109,1 (C-6), 169,1 (C-7).

Souza-Filho et al. (2006) isolaram através de Cromatografia em Coluna de sílica gel por via úmida e identificaram por RMN ^1H e RMN ^{13}C o ácido gálico de *Myrcia guianensis*. O espectro de RMN ^1H do ácido gálico mostrou apenas um intenso singleto em 7,05. No espectro de RMN ^{13}C foram observados: um sinal em δ 110,3; outro sinal em δ 146,4 e um sinal em δ 170,4.

Os resultados espectrais obtidos nesse trabalho comparados com dados na literatura possibilitaram a identificação do composto como ácido gálico.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA

Os resultados obtidos no teste de difusão com disco de papel mostraram que o As-AcOEt inibiu o crescimento de microrganismos Gram-positivos, tais como, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, Gram-negativos como *Escherichia coli*, Álcool ácido resistente como *Serratia marcescens*, *Mycobacterium smegmatis* e para o fungo *Candida albicans*, com inibição de crescimento que variou de 15 a 24 mm (Tabela 7).

No ensaio de sensibilidade de microdiluição em caldo foi possível observar que o extrato acetato de etila se mostrou mais eficiente para *Staphylococcus aureus* com 0,93 mg/mL e CMM de 1,87 mg/mL; *Enterococcus faecalis* com CMI de 0,93 mg/mL e CMM de 7,5 mg/mL; *Escherichia coli* com CMI de 0,47 mg/mL e CMM de 1,8 mg/mL e *Candida albicans* com CMI de 0,94 mg/mL e CMM de 3,75 mg/mL (Tabela 8).

Santos et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcólico de folhas, cascas e raiz de *Avicennia schaueriana* através do teste de difusão em disco (concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL do extrato) e microdiluição em caldo (concentrações de 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50; 5,00; 10,00; 20,00 mg/mL do extrato) frente a *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella cholerae* *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados obtidos no teste de disco mostram que o extrato hidroalcólico da raiz apresentou uma maior atividade antibacteriana, com formação de halo de inibição entre 7

e 18 mm e CMI (** $p < 0,01$) para *Staphylococcus aureus* (0,62 mg/mL) e *Micrococcus luteus* (0,62 mg/mL).

Fardin e Young (2015) avaliaram a propriedade antifúngica das frações do extrato etanólico, éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila das folhas de *Avicennia schaueriana* frente a espécies do gênero *Cladosporium* através do teste de microdiluição em caldo. A partir dos resultados encontrados foi possível destacar que as frações éter de petróleo e clorofórmio foram as mais eficientes com valores de concentrações mínimas inibitórias de 1 e 1,5 mg/mL, respectivamente.

Tabela 8. Teste de difusão em ágar com disco de papel e Concentração Mínima Inibitória (CMI)/Concentração Mínima Microbicida (CMM) do extrato acetato de etila (As- AcEOt) das folhas de *Avicennia schaueriana* (30 mg/mL). Resultados representados como média e desvio padrão.

Microrganismos	As- AcEOt	As- AcEOt
	Halo de inibição	CMI/CMM
	Média $\pm$ D.P. (mm)	Média $\pm$ D.P. (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,3 $\pm$ 0,5	0,93/1,87
<i>Micrococcus luteus</i>	24,3 $\pm$ 0,5	1,87/1,87
<i>Bacillus subtilis</i>	11,0 $\pm$ 0,5	3,75/3,75
<i>Enterococcus faecalis</i>	15,3 $\pm$ 0,5	0,93/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,0 $\pm$ 1,0	3,75/15,0
<i>Escherichia coli</i>	15,6 $\pm$ 0,5	0,47/1,8
<i>Serratia marcescens</i>	16,3 $\pm$ 0,5	1,87/15,0
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	15,3 $\pm$ 0,5	3,75/15,0
<i>Candida albicans</i>	16,3 $\pm$ 0,5	0,94/3,75

Compostos como os flavonoides e derivados fenólicos parecem agir na membrana ou parede celular do microrganismo, causando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO et al., 2005).

Nos taninos as propriedades antimicrobianas parecem estar associadas com a hidrólise de uma ligação éster do ácido gálico, que serve como um mecanismo de defesa natural contra as infecções microbianas (HO et al., 2001; KIM et al., 2006; LOPES et al., 2011).

Kubo et al. (2001) testaram a atividade antimicrobiana de ésteres de ácido gálico, especificamente dos galatos de propila, octila e dodecila contra 16 microrganismos. No geral, bactérias Gram-positivas e fungos foram mais sensíveis, enquanto as bactérias Gram-

negativas foram menos sensíveis aos galatos. Estudo recente também mostrou maior atividade dos ésteres do ácido gálico com cadeia carbônica de 7 a 14 carbonos contra várias espécies de fungos patogênicos (DE PAULA et al., 2014).

3.6 TOXICIDADE AGUDA

No estudo de toxicidade aguda, todos os animais tratados por via oral com os extratos acetato de etila e etanólico na dose de 2.000 mg/kg permaneceram vivos e não manifestaram sinais visíveis significativos de toxicidade. Não houve alterações nos parâmetros fisiológicos (ganho de peso, ingestão de ração e água). Não houve alteração dos parâmetros hematológicos avaliados (glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, concentração média de hemoglobina corpuscular, volume celular médio, hemoglobina corpuscular média, glóbulos brancos e plaquetas), como também dos parâmetros bioquímicos mostraram-se dentro da faixa de valores normais de referência.

Beula et al. (2012) avaliaram a toxicidade aguda do extrato de *A. marina*, e o valor de DL₅₀ foi de 2 500 mg/kg e a análise da toxicidade não evidenciou mudanças significativas nos parâmetros séricos e hematológicos quando comparados com o grupo controle. Foi realizado o ensaio de toxicidade aguda do extrato aquoso de *A. marina*, onde o valor de DL₅₀ foi de 10.000 mg/kg, não demonstrando alterações nos padrões fisiológicos (GAO et al. 2008).

Sura et al. (2011) avaliaram a toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Avicennia officinalis* e não foi registrado óbito após a administração da dose de 2.000 mg/kg durante os 14 dias de experimento. Em outro estudo realizado por Gandoman e Malati (2013) avaliaram a toxicidade aguda do extrato hidroalcólico das folhas de *A. marina* e não observaram sinais tóxicos e nem registro de mortalidade.

Dessa forma, de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, a DL₅₀ foi acima de 2.000 mg/kg, não apresentando grau de toxicidade, segundo o guia 423 da OECD (2001).

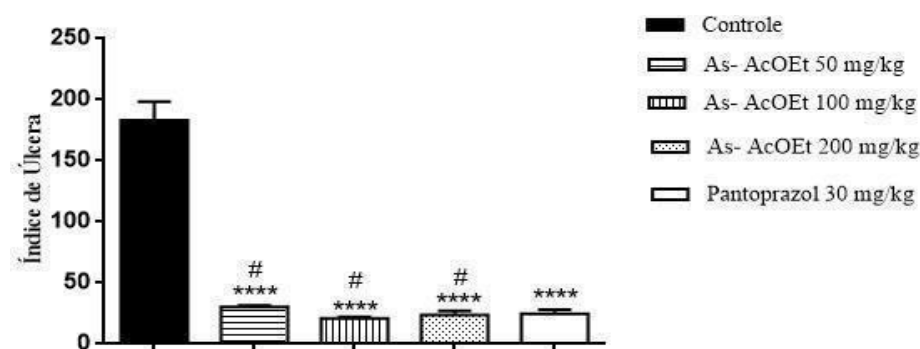
3.7 ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

3.7.1 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto e AINEs

Os resultados obtidos no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto

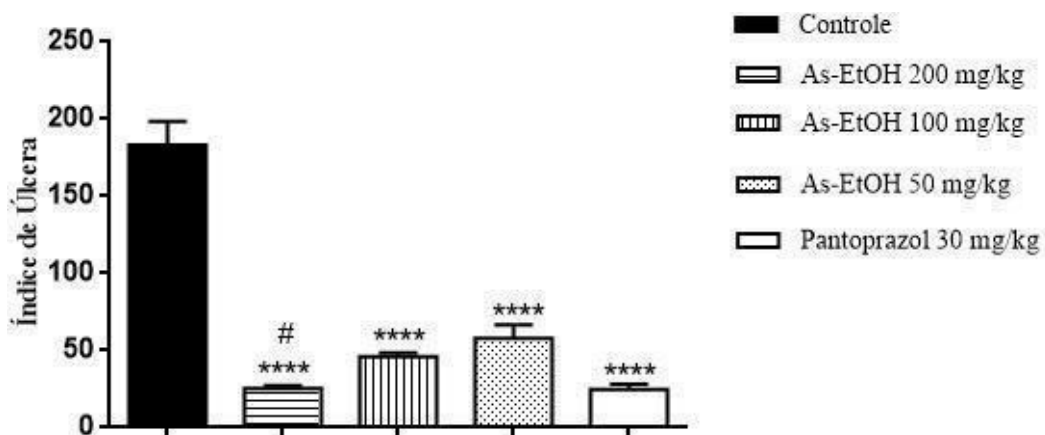
mostraram que o tratamento com o As-AcOt nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg diminuíram de forma significativa as lesões gástricas quando comparados com o grupo controle (Figura 12), com porcentagem de inibição do índice de lesão ulcerativa (ILU) foi de 83,8; 88,5 e 86,9% para as doses citadas, respectivamente, sendo a dose de 100 mg/kg que demonstrou o maior % de inibição de ILU. O tratamento com o As-EtOH nas doses de 200, 100 e 50 mg/kg diminuíram de forma significativa as lesões gástricas quando comparados com o grupo controle (Figuras 13), com porcentagem de inibição do índice de lesão ulcerativa (ILU) foi de 86,1; 74,8; 68,3% para as doses citadas, respectivamente, sendo a dose de 200 mg/kg que demonstrou a maior % de inibição do ILU. Foi investigada também a propriedade antiúlcera do As-EtOH pelo modelo de púlvera por AINEs e o tratamento reduziu a área ulcerada, com porcentagem de inibição do ILU de 66,2 % e 40,9 % para dose 200 e 100 mg/kg, respectivamente (Figura 14).

Figura 12: Efeito gastroprotetor do extrato acetato de etila das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-AcOEt) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar (n=5 animais/grupo).



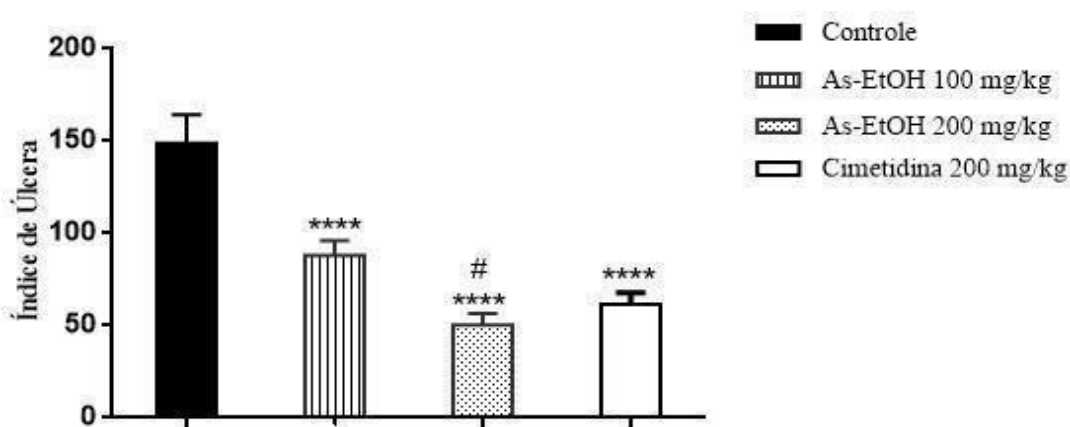
Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foi determinada por meio da análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle e # não significativo vs. pantoprazol. ILU (índice de lesão ulcerativa).

Figura 13: Efeito gastroprotetor do extrato etanólico das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-EtOH) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar (n=5 animais/grupo).



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foi determinada por meio da análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle e # não significativo vs. pantoprazol. ILU (índice de lesão ulcerativa).

Figura 14: Efeito gastroprotetor do extrato etanólico das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-EtOH) nas doses de 200 e 100 mg/kg (v.o.) sobre lesões gástricas induzidas por AINEs em ratos Wistar (n=5 animais/grupo).



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foi determinada por meio da análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle e # não significativo vs. pantoprazol. ILU (índice de lesão ulcerativa).

Aparna et al. (2014) avaliaram a atividade antiulcerogênica do extrato metanólico das folhas de *Avicennia officinalis* (200 e 400 mg/kg) e observaram redução significativa das lesões gástricas, com porcentagem de inibição do índice de lesão ulcerativa de 50,8% (200 mg/kg) e 76,1% (400 mg/kg) quando comparado ao grupo controle.

Foi investigado a propriedade antiúlcera do extrato etanol de *A. officinalis* através do modelo de úlcera induzida por indometacina, e o tratamento reduziu a área da úlcera, com índice de lesão de 11,6% e 25,3%, com as doses de 250 e 500 mg/kg, respectivamente (SURA et al., 2011).

Estudos evidenciam que os compostos fenólicos, como ácido gálico e seus derivados, são capazes de inibir a bomba protônica nas células parietais da mucosa gástrica, sendo importantes sequestradores de radicais livres, atuando como antioxidantes naturais, que diminuem a peroxidação lipídica, tornando-se compostos relevantes para terapia de úlcera gástrica (RAO et al., 2008).

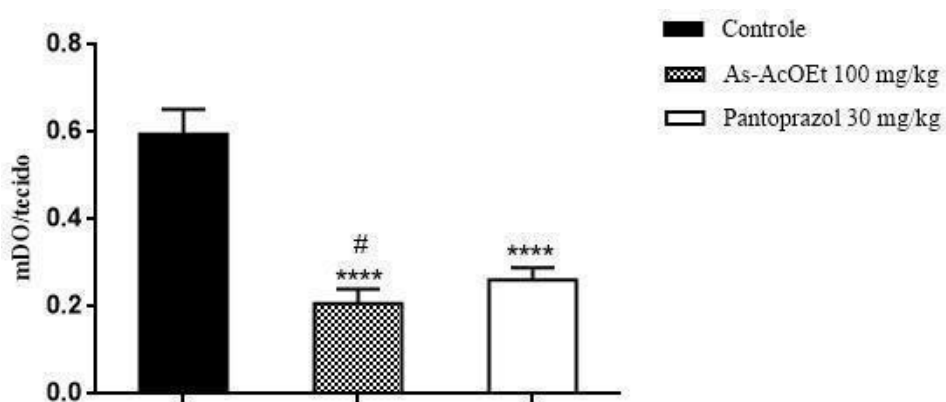
Os flavonóides mostram-se proeminentes devido às suas propriedades biológicas, tais como, gastroprotetora e anti-inflamatória (SANDHAR et al., 2011; LA CASA et al., 2000). Esta classe de metabólitos protege a mucosa gástrica estimulando a produção de muco gástrico e libertação de radicais livres gerados pelo etanol (ABDELWAHAB et al., 2011). Além dos flavonóides, os triterpenos podem exibir atividade gastroprotectora através da ativação de fatores de proteção da membrana mucosa gástrica (CHOUDHARY et al., 2013). A atividade biológica dos flavonóides pode ser evidenciada pela prevenção da peroxidação lipídica através do aprisionamento de radicais de iniciação lipídica, tais como superóxido, hidroxila e hidroperóxil (HAVSTEEN, 2002). Os radicais livres e a peroxidação lipídica desempenham um papel importante na patogênese das lesões gástricas induzidas pelo etanol (KVIETYS et al., 1990).

Portanto, o efeito antiulcerogênico do As-AcOEt pode estar correlacionado com a presença de compostos fenólicos que por sua vez podem estar associados com a inibição da bomba de prótons e consequentemente redução da produção da secreção gástrica ácida.

3.7.2 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)

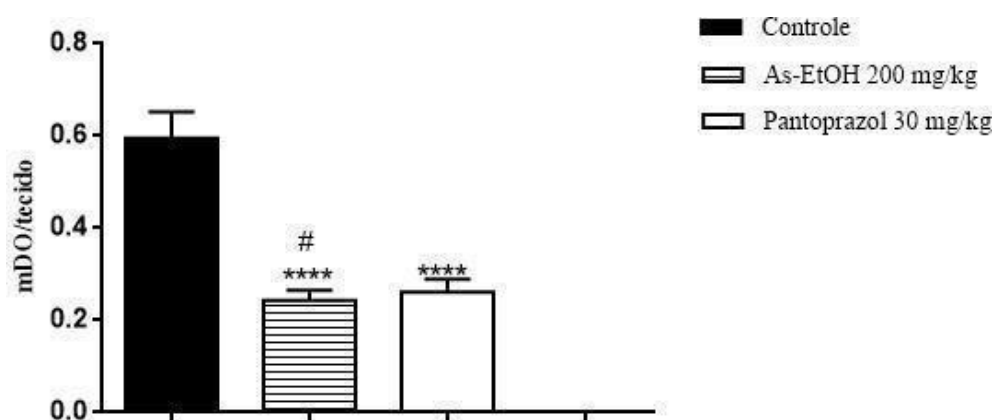
Em relação aos níveis de mieloperoxidase no tecido da mucosa gástrica, os grupos tratados com As-AcOEt e As-EtOH nas doses de 100 e 200 mg/kg, respectivamente reduziu os níveis de MPO quando comparado ao grupo controle (Figura 15 e 16).

Figura 15: Efeito do extrato acetato de etila das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-AcOEt) na dose de 100 mg/kg em relação aos níveis de mieloperoxidase no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle e # não significativo vs. pantoprazol.

Figura 16: Efeito do extrato etanólico das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-EtOH) na dose de 200 mg/kg sobre aos níveis de mieloperoxidase no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle e # não significativo vs. pantoprazol.

A interação do agente ulcerogênico com a mucosa gástrica provoca um processo inflamatório local. A ativação dos neutrófilos provenientes do processo inflamatório é uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio (KWIECIEN et al., 2014). Além disso, os neutrófilos produzem MPO, enzima que libera radicais livres que causam danos a mucosa, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da úlcera gástrica (POTRICH et al., 2010). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos que está

envolvida em processos de formação de espécie reativas de oxigênio, radicais livres e oxidação de membranas, uma vez que ela catalisa a oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio. Dessa forma, níveis de MPO nos tecidos se elevam em condições inflamatórias, estando geralmente associados com morte bacteriana e lesão oxidativa tecidual (ARNHOLD, 2004).

Estudos tem ressaltado o aumento da atividade da MPO nas lesões induzidas por etanol e substâncias, com efeito, gastroprotetor neste modelo são capazes de reduzir os níveis de mieloperoxidase (ROCHA et al., 2011; LI et al., 2011). Esta enzima atua na presença de superóxido e do ânio cloreto (Cl^-) para formar o ácido hipoclorídrico, que é lesivo para as células da mucosa gástrica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Pesquisas demonstram que a úlcera gástrica induzida por AINEs em animais elevam a síntese dos níveis de MPO, o que pode estar relacionado ao aumento da infiltração neutrofílica em tecidos danificados, utilizado assim como um parâmetro para a inflamação e infiltração de neutrófilos (YANG et al., 2016; SANTANA et al., 2015; SILVA et al., 2013).

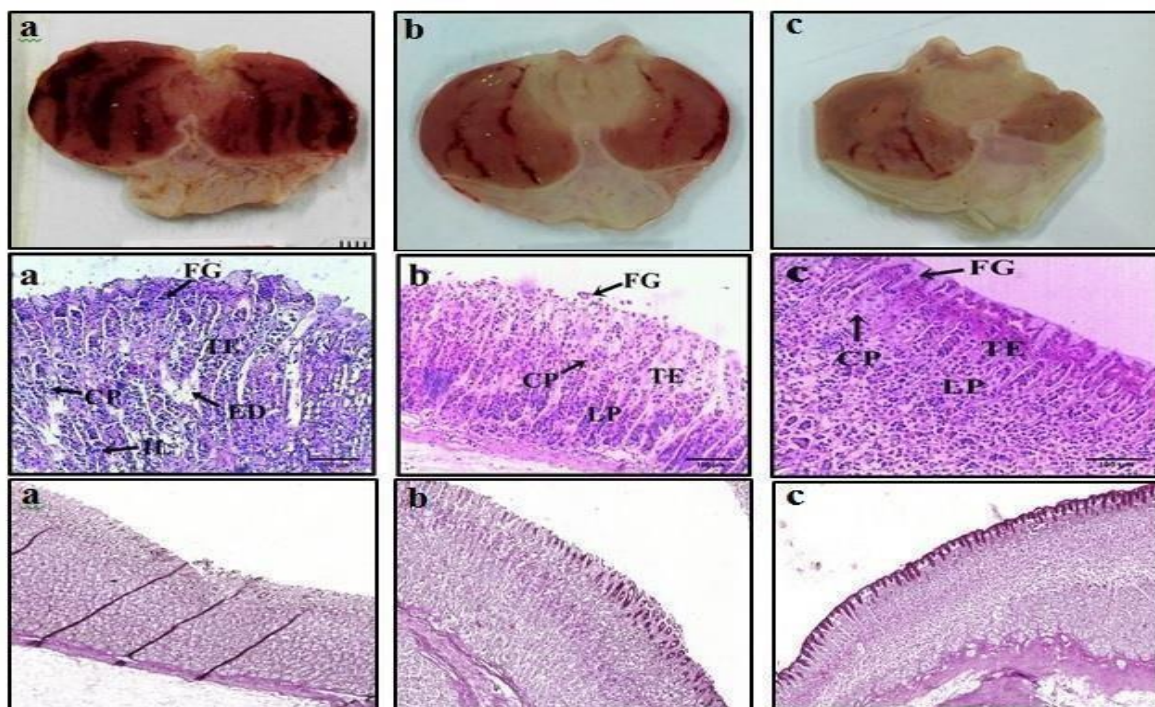
Neste estudo, foi verificado que o As-EtOH (200 mg/kg) de *A. schauermani* diminuiu significativamente a migração de neutrófilos para os tecidos lesados, através da diminuição da concentração de MPO no local da inflamação.

3.7.3 Análise histopatológica da mucosa gástrica

A análise histopatológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol revelou que o grupo controle apresentou destruição do tecido epitelial simples cilíndrico, áreas com intensa acidofilia, infiltrado leucocitário, lesões severas caracterizadas por danos hemorrágicos, edema na superfície da mucosa e desarranjo das fossetas gástricas. O extrato As-AcOEt (100 mg/kg) mostrou ação gastroprotetora com preservação das fossetas gástricas, da lâmina própria e células parietais, além de não apresentar hemorragia e edema (Figura 16). Os animais tratados com pantoprazol (30 mg/kg) demonstrou leve destruição das fossetas gástricas, pouco desarranjo do tecido epitelial simples cilíndrico e moderada destruição da lâmina própria, porém não apresentou danos hemorrágicos ou edema na mucosa gástrica. A partir da histopatologia foi possível observar o aumento da produção de muco quando os animais foram tratados com As-AcOEt (100 mg/kg), sendo representado através das secções histológicas com coloração PAS (figura 17). O As-EtOH (200 mg/kg) mostrou ação gastroprotetora com neovascularização e preservação

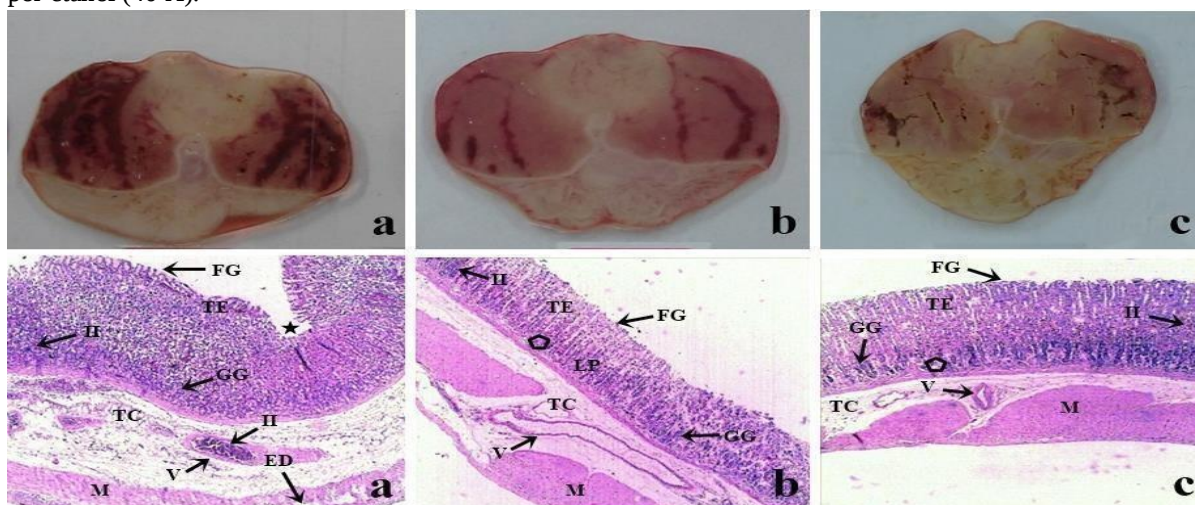
do tecido conjuntivo da submucosa, organização das fossetas gástricas, lâmina própria e preservação das glândulas gástricas (Figura 18).

Figura 17: Secções histológicas da mucosa gástrica de ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol (100 X) na coloração HE e PAS.



As imagens representam fotografias macroscópicas e cortes histológicos das lesões gástricas após tratamento com veículo (salina 0,9% com 5% de DMSO (a), pantoprazol 30 mg/kg (b), As-AcOEt 100 mg/kg (c). FG = Fossetas gástricas; TE= Tecido epitelial simples cilíndrico; ED = Edema; CP = Células epiteliais; IL = Infiltrado leucocitário; LP = Lâmina própria

Figura 18. Secções histológicas da mucosa gástrica de ratos Wistar submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol (40 X).



As imagens representam fotografias macroscópicas e cortes histológicos das lesões gástricas após tratamento com veículo (salina 0,9% com 5% de DMSO (a), pantoprazol 30 mg/kg (b), As-EtOH 200 mg/kg (c). FG = Fossetas gástricas; TE= Tecido epitelial simples prismático; ED = Edema; II = Infiltrado inflamatório; LP = Lâmina própria; V= Vaso; M= Músculo liso; GG= Glândulas gástricas; TC= Tecido Conjuntivo; *= Úlcera.

A administração do etanol provoca edema no tecido gástrico, hemorragia subepitelial, infiltração de células inflamatórias que podem contribuir para indução da lesão gástrica e geração de espécies reativas de oxigênio (KOUNTOURAS et al., 2001). Este agente químico pode induzir ainda um aumento da secreção do ácido gástrico e consequentemente diminuir a vascularização local, desencadeando processos necróticos no tecido (TABATA et al., 1996).

A classe dos inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e esomeprazol) é considerada mais eficiente na supressão da secreção gástrica ácida. Estes fármacos se acumulam em canalículos secretórios da bomba de prótons onde são ativados na forma de sulfonamida. Esta forma ativada reage com grupo sulfidril, promovendo a inibição da secreção do ácido clorídrico (SCHUBERT, 2011). Porém, a farmacoterapia não se dá somente pela inibição da secreção gástrica ácida, mas também pelo aumento dos fatores protetores da mucosa gástrica.

A produção de muco foi um dos principais fatores de proteção no presente estudo. O muco gástrico é a primeira camada de defesa do ácido gástrico, e atua como uma barreira contra agentes agressores da mucosa (ALLEN; FLEMSTRO, 2005). Os resultados obtidos mostrou um aumento na produção de muco nos animais pré-tratados com As-AcOEt. Os extratos de plantas apresentaram coloração roxo intenso, refletindo maior secreção de muco nas glândulas gástricas.

As lesões induzidas na mucosa do estômago podem estar associadas à produção excessiva de radicais livres e aumento do conteúdo de peróxidos lipídicos derivados de oxigênio resultando em alterações significativas em nível celular causando danos às membranas, morte celular e erosão epitelial (LA CASA et al., 2000; LI et al., 2008; JUNG et al., 2013).

De acordo com Suzuki et al. (2012) existe uma correlação entre o estresse oxidativo com o mecanismos que originam afecções gástricas, como gastrite e úlcera péptica, a exemplo das lesões induzidas por etanol, que provoca alterações metabólicas nas mitocôndrias, e possibilita a produção excessiva de radicais livres.

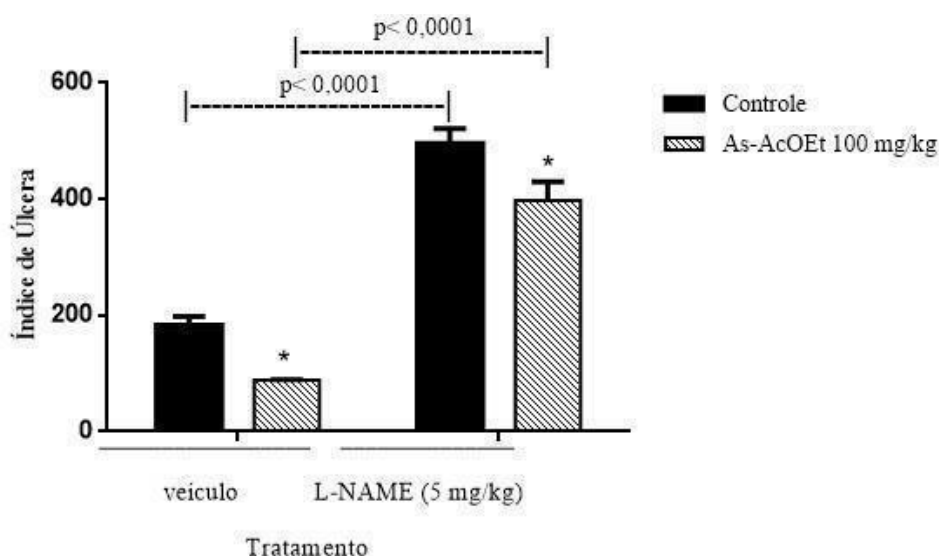
A propriedade antiulcerogênica por meio apenas da inibição da secreção ácida não é interessante, porque diminui a proteção do estômago contra o crescimento de microrganismos em excesso (CENTANNI et al., 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008). Alguns estudos já mostraram a propriedade gastroprotetora dos flavonóides e taninos encontrados em diversas plantas utilizadas pela população (GONZALEZ; DI STASI, 2002); pois eles atuam produzindo prostaglandinas, substâncias envolvidas na produção de muco impedem a formação de radicais livres, agindo como antioxidante, e assim protegem e cicatrizam a mucosa.

3.8 MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTIULCEROGÊNICO

3.8.1 Envolvimento do óxido nítrico, compostos sulfidrilícos e prostaglandinas na gastroproteção

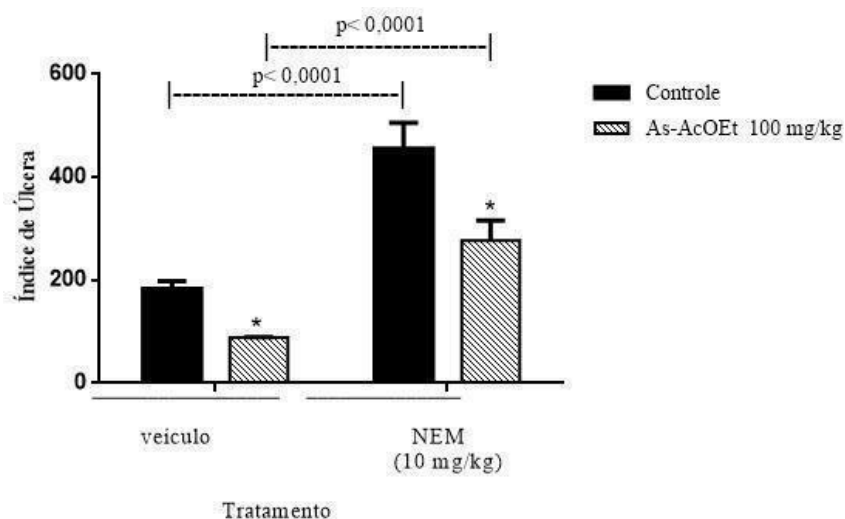
De acordo com os resultados obtidos verificou-se que a administração prévia de L-NAME no modelo de úlcera induzida por etanol reverteu à atividade gastroprotetora do As-AcOEt (100 mg/kg). Esses resultados sugerem que o As-AcOEt tem atividade gastroprotetora através da modulação das vias do óxido nítrico (Figura 19). Em relação ao mecanismo de ação envolvendo os compostos sulfidrilícos, os resultados mostraram que a administração prévia de NEM no modelo de úlcera induzida por etanol também reverteu à atividade gastroprotetora do As-AcOEt (100 mg/kg). Esses resultados sugerem que o As-AcOEt apresenta atividade gastroprotetora através da modulação de compostos sulfidrilícos (Figura 20). A administração do inibidor da produção de prostaglandina não suprimiu a atividade gastroprotetora do As-AcOEt, sugerindo que a atividade gastroprotetora do extrato acetato de etila não está associado ao mecanismo da produção de prostaglandinas (Figura 21).

Figura 19: Efeito do extrato acetato de etila das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-AcOEt) na dose de 100 mg/kg em relação ao papel do óxido nítrico no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.



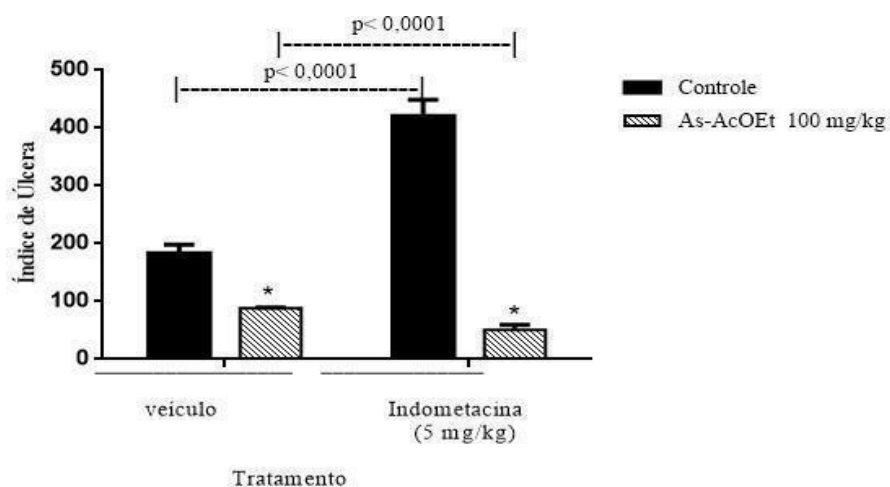
Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, ****p<0,0001 vs controle.

Figura 20: Efeito do extrato acetato de etila das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-AcOEt) na dose de 100 mg/kg no índice de lesões ulcerativas em ratos previamente tratados com NEM N-Etilmaleimida cristalina (i.p.) no modelo de úlcera induzida por etanol



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle.

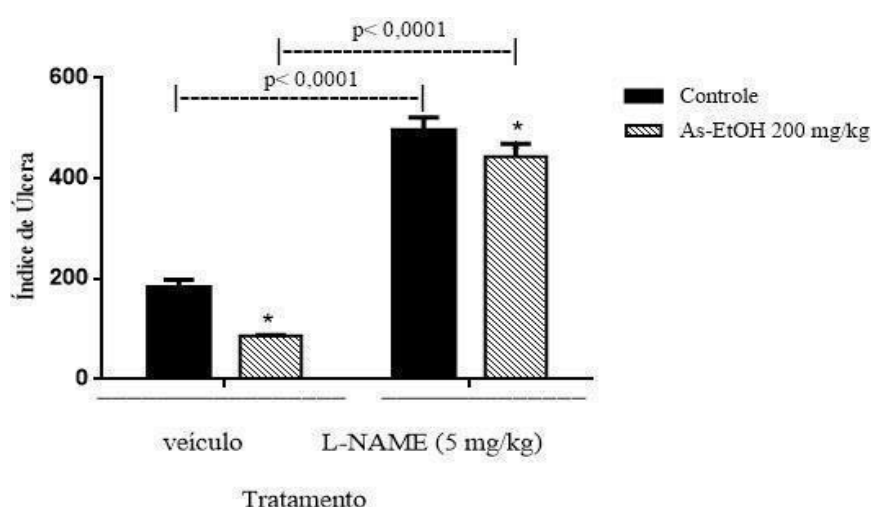
Figura 21: Efeito do extrato acetato de etila das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-AcOEt) na dose de 100 mg/kg no tecido da mucosa gástrica em ratos previamente tratados com indometacina e submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle.

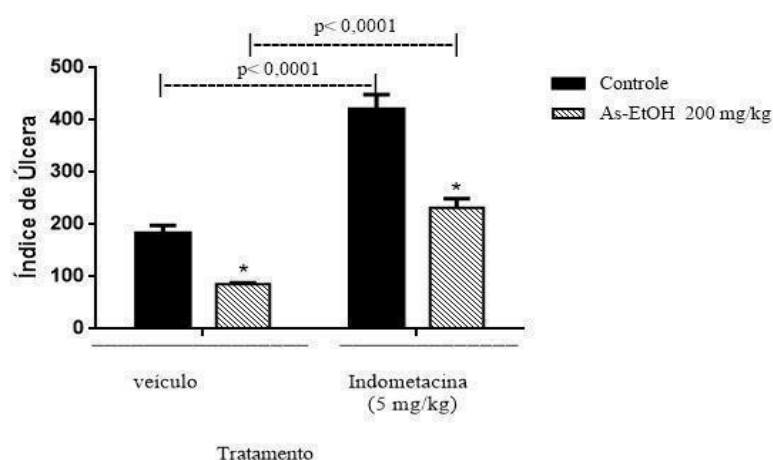
A administração prévia de L-NAME e indometacina no modelo de úlcera induzida por etanol reverteu à atividade gastroprotetora do As-EtOH (200 mg/kg). Esses resultados sugerem que o As-EtOH tem atividade gastroprotetora através da modulação da via de NO e prostaglandinas (Figuras 22 e 23). Em relação ao mecanismo de ação envolvendo os compostos sulfidrílicos os resultados mostraram que a administração prévia de NEM não reverteu a atividade gastroprotetora do extrato etanólico representado na figura 24.

Figura 22: Efeito do extrato etanólico das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-EtOH) na dose de 200 mg/kg na via do óxido nítrico no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.



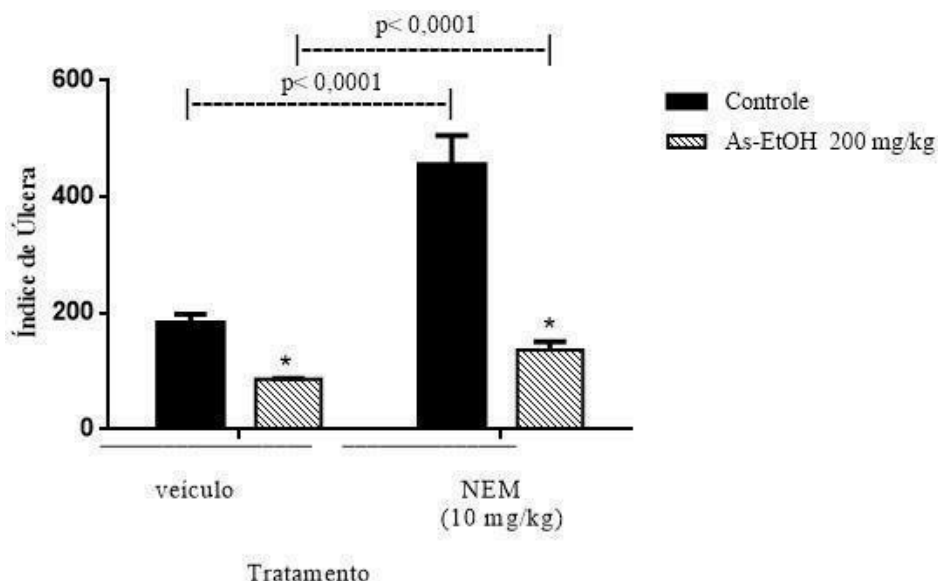
Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle.

Figura 23: Efeito do extrato etanólico das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-EtOH) na dose de 200 mg/kg nas prostaglandinas no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle.

Figura 24: Efeito do extrato etanólico das folhas de *Avicennia schaueriana* (As-EtOH) na dose de 200 mg/kg na via dos compostos sulfidrílicos no tecido da mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre os grupos foram determinados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, **** $p < 0,0001$ vs controle.

O óxido nítrico, produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, possui ação vasodilatadora, possibilitando o aumento da permeabilidade vascular, como também, atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra microrganismos (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008), e na mucosa gástrica promove a vasodilatação, redução de peroxidação lipídica e ação anti-inflamatória nos tecidos (KWIECIÉN et al., 2008). No trato digestivo o NO está associado a produção de muco, fluxo sanguíneo, como também na resistência da mucosa contra elementos agressores. A sua ação gastroprotetora se dá por promover a vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, acelerando a retirada de íons H^+ , nocivos à mucosa, além de aumentar o aporte de nutrientes para a mesma (WALLACE, 2008; MUSUMBA et al., 2009). Santin et al. (2013) observaram que o NO diminui a agregação de neutrófilos no tecido gástrico inflamado; e esta situação também pode ser observado no presente estudo em que a migração de neutrófilos para a mucosa gástrica lesionada foi diminuída quando foi determinada a atividade da MPO.

Os compostos sulfidrílicos protegem a mucosa gástrica através do seu potencial antioxidante e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco, impedindo a sua dissociação. Inversamente, a administração de NEM, agente que promove a inativação dos grupamentos sulfidrílicos não proteico (NP-SH), reverte os efeitos protetores de compostos tióis (SZABO, 2014).

Os mecanismos biológicos de possíveis efeitos dos compostos fenólicos foram atribuídos às suas propriedades antioxidantes através de vários mecanismos, tais como, a sua capacidade de eliminar radicais livres, quebrar as reações em cadeia dos radicais, reduzir diretamente os peróxidos e estimular as atividades da enzima de defesa antioxidativa (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

Os mecanismos que protegem o estômago envolvem a secreção de muco gástrico e bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo, inibição da secreção de ácido gástrico, reiteração das células epiteliais, produção de prostaglandinas, óxido nítrico e mecanismos antioxidantes (compostos sulfidrilicos) (YANDRAPU; SAROSEIK, 2015).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A totalidade dos resultados alcançados com este trabalho possibilitou a comprovação científica da atividade gastroprotetora e antimicrobiana de *Avicennia schaueriana*, fato que respalda a utilização etnofarmacológica dessa espécie pela população de Vila Velha (Ilha de Itamará/PE).

A identificação química de terpenoides, flavonoides e taninos possibilitou inferir que essas substâncias além de estar associada à atividade antioxidante podem apresentar outros mecanismos que possibilitem sua atuação como agente gastroprotetor. Por fim, com esse trabalho será possível contribuir com a política do uso racional de plantas medicinais através da disseminação do conhecimento e da comprovação científica das propriedades biológicas da *A. schaueriana*, bem como propiciar opções inovadoras para o mercado de fitomedicamentos.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, S.I.; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; SUKARI, M.A.; ABDUL, A.B.; TAHA, M. M.; SYAM, S.; AHMAD, S.; LEE, K.H. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces antiulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. **Journal Ethnopharmacology**, v. 137, p. 963–970, 2011.
- ALADEDUNYE, F.; MATTHÄUS, B. Phenolic extracts from *Sorbus aucuparia* (L.) and *Malus baccata* (L.) berries: antioxidant activity and performance in rapeseed oil during frying and storage. **Food Chemistry**, v. 159, p. 273-281, 2014.
- ALLEN, A.; FLEMSTRO, M. G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288: p.1–19, 2005.
- ALMEIDA, S. C. X.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 57-60, 2005.
- AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n 1, p. 88-94, 2008.
- APARNA, N.; SAUMYA, R. P.; SUMAN, K. M.; NABIN, K. D.; SABUJ, S.; SAGAR, K. M. Ulcer-protective effect of *Avicennia officinalis* L., A common mangrove plant. **Pharmaceutical and Biological Evaluations**, v. 1, n 1, p. 1-8, 2014.
- ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. L.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARROS, M. P.; SOUSA, J. P. B. S.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 567–571, 2007.
- BEULA, J. M.; GNANADESIGAN, M.; RAJKUMAR, P. B.; RAVIKUMAR, S.; ANAND, M. Antiviral, antioxidant and toxicological evaluation of mangrove plant from South East coast of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 352-357, 2012.
- BONACORSI, C.; RADDI, M. S. G.; FONSECA, L. M.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic Constituents on *Helicobacter pylori* Induced Neutrophils Oxidative Burst. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 133-141, 2012.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRITO, A. F.; RIBEIRO, M.; ABRANTES, A. M.; GONÇALVES, A. C.; SARMENTO-RIBEIRO, A. B.; TRALHÃO, J. G.; BOTELHO, M. F. Ação anticancerígena da quercetina no carcinoma hepatocelular: o papel do GLUT-1. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, n. 25, p. 798-806, 2015.

CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; LÓPEZ-BOTE, C.; DE LA HOZ, L.; ORDÓÑEZ, J. A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main-dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6248-6255, 2003.

CENTANNI, M.; GARGANO, L.; CANETTIERI, G.; VICECONTI, N.; FRANCHI, A.; DELLE FAVE, G.; ANNIBALE, B. Thyroxine in goiter, *Helicobacter pylori* infection, and chronic gastritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 17, p. 1787-1795, 2006.

CHOUDHARY, M.K.; BODAKHE, S.H.; GUPTA, S.K. Assessment of the antiulcer potential of *Moringa oleifera* root-bark extract in rats. **Journal of Acupuncture Meridian Studies**, v. 6, n. 4, p. 214-220, 2013.

CHUN, O. K.; KIM, D.O.; LEE, C.Y. Superoxide Radical Scavenging Activity of the Major Polyphenols in Fresh Plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 51, p. 8067–8072, 2003.

DE PAULA SILVA, A. C. A.; COSTA-ORLANDI, C. B.; GULLO, F. P.; SANGALLILEITE, F.; OLIVEIRA, H. C.; SILVA, J. F.; SCORZONI, L.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, S. A.; BENADUCCI, T.; WOLF, V. G.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Antifungal activity of decyl gallate against several species of pathogenic fungi. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

DÍAZ-DE-CERIO, E.; VERARDO, V.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; ALBERTO FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC-qTOF-MS Platform as Valuable Tool for the Exploratory Characterization of Phenolic Compounds in Guava Leaves at Different Oxidation States. **Mol2Net**, 1(Section A), p. 1-8, 2015.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.

FARDIN, K. M.; YOUNG, M. C. M. Antifungal potential of *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech. (Acanthaceae) against *Cladosporium* and *Colletotrichum* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, p. 50-57, 2015.

GANDOMANI, M. Z.; MALATI, E. F. Evaluation of Protective Efficacy of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh Leaves against Complete Freund's Adjuvant-induced Arthritis in Wistar. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 945-951, 2013.

GAO, X.; HAN, W. D.; YU, Z. J. The acute toxicity and bone-marrow micronucleus tests of water extract from *Avicennia marina* fruits in mice. **Journal of Coastal Development**, v. 11, n. 12, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Clarendon Press, Oxford, UK, 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67–202, 2002.

HO, K.Y.; TSAI, C.C.; HUANG, J.S.; CHEN, C.P.; LIN, T.C.; LIN, C.C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 187–191, 2001.

JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. A.; LIMA, G. R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S. Athayde-Filho P. F., Batista L. M., Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3203-3228, 2012.

JUNG, J.; BAE, K. H.; JEONG, C.. Anti-*Helicobacter pylori* and antiulcerogenic activities of the root cortex of *Paeonia suffruticosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n.10. p.1535-1539, 2013.

KAJDŽANOSKA, M.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. **Journal of the Chemical**, v. 29, p. 181–194, 2010.

KHATTAB, R. A.; GABALLA, A.; ZAKARIA, S. A.; EL-SAYED, A. A.; SALLAM, I. S.; TEMRAZ, T. Phytochemical analysis of *Avicennia marina* and *Rhizophora mucronata* by GC-MS. **Catrina**, v.7, p. 115–120, 2012.

KHENNOUF, S.; BENABDALLAH, H.; GHARZOULI, K.; AMIRA, S.; ITO, H.; KIM, T.H. Effect of Tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* Leaves on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1469-1473, 2003.

KIM, S. H.; JUN, C. D.; SUK, K.; CHOI, B. J.; LIM, H.; PARK, S.; LEE, S. H.; SHIN, H. Y.; KIM, D. K.; SHINK, T. Y. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicological Sciences**, v.91, p.123-131, 2006.

KOUNTOURAS, J.; CHATZOPOULOS, D.; ZAVOS, C. Reative oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. **Hepatogastroenterology**, v. 48, p. 743-751, 2001.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorg. Med. Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 347-350, 2001.

KVIETYS, P.R.; TWOHING, B.; DANZEL, J.; SPECIAN, R.D. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophil and xantina oxidase-derived radicals. **Gastroenterology**, v. 98, p. 909-920, 1990.

KWIECIEN, S.; PAWLIK, M.W.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; SLIWOWSKI, P.C.; PAWLIK, W. W.; KONTTUREK, S. J. Nitric oxide (no)-releasing aspirin and (no) donors in protection of gastric mucosa against stress. **Journal Physiology Pharmacology**, v.59, n. 2, p. 103-115, 2008.

KWIECIEN, M.; WINIARSKA-MIECZAN, A.; ZAWISLAK, K.; SROKA, S. Z. Effect of copper glycinate chelate on biomechanical, morphometric and chemical properties of chicken femur. **Annales of Animal Science**, v.14, p. 127-139, 2014.

LACASA,C.;VILLEGAS,I.;ALARCÓNDELALASTRA,C.;MOTILVA,V.;MARTÍNCALERO, M.J.Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal Ethnopharmacology*., v. 71, p. 45-53, 2000.

LI, C. Y.; XU, H.D.; ZHAO, B. T.; CHANG, H. I.; RHEE, H. I. Gastroprotective effect of cyanidin 3-glucoside on ethanol-induced gastric lesions in rats. **Alcohol**, v.40, n.8, p.683-687, 2008.

LI, N.S.; LUO, X. J.; ZHANG, Y.S.; PENG, J. Phloroglucinol protects gastric mucosa against ethanol-induced injury through regulating myeloperoxidase and catalase activities. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 25, n 4, p. 462-468, 2011.

LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas*, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.

LIN, K.C.; LIN, H.Y.; CHOU, P. Community based epidemiological study on hyperuricemia and gout in Kin-Hu, Kinmen. *The Journal of Rheumatology*, v. 27, n. 4, p. 1045-1050, 2000.

LLORENS, E.; DEL VALLE, L. J.; PUIGGALÍ, J. Inhibition of radical-induced oxidative DNA damage by antioxidants loaded in electrospun polylactide nanofibers. **Macromolecules**, v. 22, p. 388-396, 2014.

LOPES, F. C. M.; ROCHA, A.; PIRRACO, A.; REGASINI, L. O.; SIQUEIRA, J. R.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; CARLOS, I. Z.; SOARES, R. Alchornea glandulosa ethyl acetate fraction exhibits antiangiogenic activity: preliminary findings from in vitro assays using human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Medical Food**, v. 14, n. 10, p. 1244-53, 2011.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495-506, 2008.

LU, Y.; FOOD, L.Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, v. 65, p. 1-8, 1999.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R.C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Llooydia**, v. 25, p.320-322, 1962.

MENA, P.; CALANI, L.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BRUNI, R.; CROZIER, A.; DEL RIO, D. Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly) phenolic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSⁿ. **Molecules**, v.17, p. 14821-14840, 2012.

MORI, F. A.; MORI, C. L. S. O.; MENDES, L. M.; SILVA, J. R. M.; MELO, V. M. Influência do sulfito e hidróxido de sódio na quantificação em taninos da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 86-92, 2003.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 30, p. 517-531, 2009.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically** – M7-A6.6. ed. NCCLS, Wayne: USA, 2003.

OECD - **Organization for Economic Cooperation And Development. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. Guideline For The Testing Of Chemicals, p. 1-14, 2001.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. D.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; CASTRO, V. T. N. A.; SARAIVA, A. M.; ALMEIDA, D. M.; TAVARES, E. A.; AMORIM, E. L. C. Phenolic content and antioxidant capacity of four Cnidoscopus species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 2310-2316, 2011.

RAJAEI, A.; BARZEGAR, M.; MOBAREZ, A. M.; SAHARI, M. A.; ESFAHANI, Z. H. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 107-112, 2010.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAPAGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

POTRICH, F.B.; ALLEMAND, A.; DA SILVA, L. M. “Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system.” **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 85–92, 2010.

RAO, C.V.; VERMA, A.R.; VIJAYAKUMAR, M.; RASTOGI, S. Gastroprotective effect of standardized extract of *Ficus glomerata* fruit on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 323–326, 2008.

RE, R.; NICOLETTA, P.; 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.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROCHA, N.F.; OLIVEIRA, G.V.; ARAÚJO, F.Y.R.; CARVALHO, A.M.R.; VASCONCELOS, L.F.; MACÊDO, D.S.; SOARES, P.M.; SOUSA, D.P.; SOUSA, F.C.F. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, N 4, p. 455-461, 2011.

SALDANHA, J.H.S.; PEREIRA, A. P; M.; NEVES, R. F.; LIMA, M. A. C. Facilitadores e barreiras de retorno ao trabalho de trabalhadores acometidos por LER/DORT. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.38, n.127, p.122-138, 2013.

SANDHAR, H.K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **International Pharmaceutica Science**, v.1, p. 25-41 2011.

SANTANA, A. P.; TAVARES, B. M.; LUCETTI, L.T.; GOUVEIA, F. S. JR.; RIBEIRO, R. A.; SOARES, P. M.; SOUSA, E. H.; LOPES, L. G.; MEDEIROS, J. V.; SOUZA, M. H. The nitric oxide donor cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO](PF₆) increases gastric mucosa protection in mice-involvement of the soluble guanylate cyclase/K(ATP) pathway. **Nitric Oxide**, v. 45, p. 35-42, 2015.

SANTINI, J. R.; UCHOA, F. D.; LIMA, M. C.; RABELLO, M. M.; MACHADO, I. D.; HERNANDES, M. Z.; AMATO, A. A.; MILTON, F. A.; WEBB P., NEVES, F.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; FARSKY, S. H. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **European Journal Pharmaceutical Science**, v. 48, p.689-697, 2013.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n 2, p. 215-219, 2007.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; DAMIÃO, A. O.; BARROS, T. F.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n 1, P. 124-9, 2010.

SCAZZOCCHIO, F.; D' AURIA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 4, p. 327-333, 2005.

SCHUBERT M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, p. 536-542, 2011.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842–1860, 2008.

SHANMUGAPRIYA, R.; RAMANATHAN, T.; RENUGADEVI, G. Phytochemical characterization and antimicrobial efficiency of mangrove plants *Avicennia marina* and *Avicennia officinalis*. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive**, v. 3, p. 348–351, 2012.

SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R.; CARVALHO, N. S.; PRUDÊNCIO, R. S.; ARAGÃO, K. S.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPOS, S. A.; VÉRAS, L. M.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J. R.; BARBOSA, A. L.; MEDEIROS, J. V. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071-7, 2013.

SOUZA-FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Allelopathic potential of *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n 4, 2006.

SUMAN, S.; ANBU, J.; SULTAN, A. B. Antiulcer effect of ethanolic leaf extract of *Avicennia officinalis*. **Pharmacology**, v 3, p. 12-19, 2011.

SURA, S.; ANBU, J.; BASHA, S. A; MAHESHB. Antiulcer effect of ethnolic leaf extract of *Avicennia officinalis*. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 12-19, 2011.

SUVANTO, M.; PATRAKKA, J.; JAHNUKAINEN, T. Novel NPHS2 variant in patients with familial steroid-resistant nephrotic syndrome with early onset, slow progression and dominant inheritance pattern. **Clinical and Experimental Nephrology**, p. 1–8, 2016.

SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TSUGAWA, H.; MOGAMI, S.; HIBI, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 35-39, 2012.

SZABO, S. "Gastric cytoprotection" is still relevant. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 29, p. 124-132, 2014.

TABATA, M.; TOMOMASA, T.; ITOH, K.; MORIKAWA, A. Effect of 10% ethanol and sofalcone on prostaglandin E2 content, mucus gel thickness, and experimental ulcers in the stomach of developing rats. **Digestion**, v. 57, p. 47-53, 1996.

THIRUNAVUKKARASU, P.; RAMANATHAN, T.; RAMKUMAR, L.; SHANMUGAPRIYA, R.; RENUGADEVI, G. The antioxidant and free radical scavenging effect of *Avicennia officinalis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n.19, p. 4754-4758, 2011.

TODOROVA, M.; TRENDAFILOVA, A. *Sideritis scardica* Griseb an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 256-265. 2014.

XIA, B.; BAI, L.; LI, X.; XIONG, J.; XU, P.; XUE, M. Structural Analysis of Metabolites of Asiatic Acid and Its Analogue Madecassic Acid in Zebra fish Using LC/IT-MSⁿ. **Molecules**, v.20, n.2, p. 3001-3019, 2015.

XIE, Y. X. Dixon R. A. Proanthocyanidin biosynthesis- still more questions than answer. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2127-2144, 2005.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Current Gastroenterology Reports**. v. 17, p.17-24, 2015.

YANG, Y.; HE, J.; SUO, Y.; LV, L.; WANG, J.; HUO, C.; ZHENG, Z.; WANG, Z.; LI, J.; SUN, W.; ZHANG, Y. Anti-inflammatory effect of taurocholate on TNBS-induced ulcerative colitis in mice. **Biomed Pharmacother**, v. 81, p. 424-30, 2016.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin Layer **Chromatography in Phytochemistry**. Nova York: CRC Press, 2008.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 243S-255S, 2005.

WYREPKOWSKI, C. C.; COSTA, D. L. M. G.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W.; DE GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; SANTOS, L. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, v.19, n.10, p. 16039-16057, 2014.

ANEXO – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 10 de setembro de 2015

Ofício nº 86/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.^a Terezinha Gonçalves da Silva
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.018743/2015-42

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da atividade antimicrobiana e efeito gastroprotetor das folhas de Avicennia Shaueriana"**,

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição; Animal Camundongo heterogênico; Linhagem; Swiss; idade; 60 dias; peso; 25-30g; nº de animais 24 (fêmea) e ratos heterogênico; Linhagem wistar; idade; 90 dias; peso; 250-300g; nº de animais 95 (macho); total de animais a ser utilizado; 119

Atenciosamente


 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584