

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LIGIA CAROLINA DA SILVA PRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS DE *Eugenia dysenterica* DC. E *Campomanesia
pubescens* O. Berg.**

**Uberlândia
2013**

LIGIA CAROLINA DA SILVA PRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS DE *Eugenia dysenterica* DC. E *Campomanesia
pubescens* O. Berg.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva

Uberlândia
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P896a Prado, Ligia Carolina da Silva, 1986-
2013 Avaliação da atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas
de *Eugenia dysenterica* dc. e *Campomanesia pubescens* o. berg / Ligia
Carolina da Silva Prado. -- 2013.
91f : il.

Orientador: Luiz Borges Bispo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Plantas medicinais - Teses. I. Silva, Luiz Borges
Bispo da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III.Título.

CDU: 576.3

À minha mãe e meu pai, que pela sua garra
e amor incondicional, sempre me deram a
base necessária para seguir em frente no
caminho que eu sempre sonhei para mim.

A GRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais, pessoas inspiradoras, que me ensinaram sobre caráter, respeito e humildade. Seu apoio incondicional, em todos os momentos, foi imprescindível para que eu chegassem até aqui. Vocês são minha maior riqueza. Ainda, agradeço ao meu irmão Yalle, que sempre me trouxe conforto nos momentos mais difíceis e que esteve ao meu lado por todo esse período.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva, o qual sempre se dedicou o máximo possível para que eu tivesse a melhor formação durante esse período. Muito obrigada pela dedicação, confiança, apoio e amizade.

Serei eternamente grata aos meus amigos, que vivenciaram comigo esse momento. Muitos dos quais eu conheci aqui e hoje são meus amigos-irmãos, de quem jamais quero me distanciar. Muito obrigada Bah, Fran, Rê e Tati por todos os dias em que vivemos juntos, chorando e sorrindo por um futuro, até então, tão inconstante. Muito obrigada Simone, Puebla, Juliana, Luana, Cristiane e Aline por estar ao meu lado sempre com palavras de conforto e amizade; vocês foram essenciais nessa caminhada.

Agradeço ainda a todos que passaram pela “laje” e jamais serão esquecidos: Ana Paula, Marília, Tanabe, Lara e demais moradores. Ainda, agradeço aos meus queridos “barretenses” pela alegria que sempre me trouxeram e às várias pessoas incentivadoras do meu sucesso.

Tenho muito a agradecer às minhas colegas de laboratório: Angélica, Camila, Raquel, Bianca, Grasielle e Nayara. Obrigada pela ajuda, apoio, paciência e amizade. Agradeço também às técnicas Débora e Simone, por toda a ajuda e pela amizade construída nesse período.

Agradeço também o Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes que, gentilmente disponibilizou, o Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP) para as análises fitoquímicas desse trabalho. Ainda, agradeço encarecidamente à Dra. Denise Brentan da Silva, a qual realizou tais análises, que muito enriqueceram o presente estudo. Agradeço

ainda, à Prof. Dra. Karen Hiraki pelas análises histológicas e o Prof. Dr. Hudson Canabrava pela sua contribuição nesse estudo.

Devo agradecer à Prof. Dra. Rosy Iara Ribeiro e ao Prof. Dr. Marcelo Beletti, incentivadores, por muito tempo, do meu ingresso na pós-graduação.

Muito obrigada à Dra. Adriana Arantes e à (minha amiga para assuntos botânicos) Esp. Francyelen Fernandes de Souza Faria pela identificação das espécies botânicas.

Aos professores desse programa de pós-graduação, por compartilhar comigo seus vastos conhecimentos.

À Universidade Federal de Uberlândia e a CAPES, pela estrutura e apoio financeiro.

“The greatest obstacle to knowledge is not
ignorance; it is the illusion of knowledge”
(Daniel Boorstin)

RESUMO

A *Eugenia dysenterica* e a *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae), conhecidas no Brasil como “cagaita” e “gabiroba”, respectivamente, são amplamente utilizadas pela população no tratamento de algumas desordens gastrintestinais. Considerando seu uso popular e que algumas plantas da família Myrtaceae apresentam efeitos protetores sobre a mucosa gástrica, selecionamos, utilizando uma abordagem taxonômica, os extratos aquosos das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens* para investigar seus possíveis efeitos gastroprotetores. A capacidade de ambos os extratos e da carbenoxolona em proteger a mucosa gástrica de lesões induzidas por HCl/etanol foi avaliada em camundongos. A contribuição do óxido nítrico (NO), dos compostos sulfidrílicos endógenos (-SH) e as alterações na produção de HCl sobre o efeito gastroprotetor do extrato de *E. dysenterica* também foi investigada, bem como, sua atividade antioxidante e a possível participação dos taninos nesses efeitos citoprotetores. O extrato de *E. dysenterica*, a carbenoxolona, mas não o extrato de *C. pubescens*, protegeu a mucosa gástrica de lesões induzidas por HCl/etanol, diminuindo a produção de HCl. O bloqueio de grupamentos - SH por NEM, mas não a inibição da sintase do NO pelo L-NAME, aboliu a atividade gastroprotetora do extrato de *E. dysenterica*. A presença de taninos no referido extrato foi confirmada pelas análises por MALDI; esses taninos foram identificados pelo padrão de fragmentação (MS/MS) como taninos condensados do tipo-B, com até 11 unidades flavan-3-ol e predominantemente constituídos por procianidinas e prodelfinidinas. Ainda, a remoção parcial de taninos do extrato de *E. dysenterica* aboliu o efeito citoprotetor do mesmo sobre a mucosa gástrica. Por fim, o extrato de *E. dysenterica* apresentou uma significativa atividade antioxidante *in vitro*. Assim, o extrato das folhas de *E. dysenterica*, mas não o extrato de *C. pubescens*, possui efeito gastroprotetor, o qual parece estar relacionado à inibição de HCl, à sua atividade antioxidante e aos compostos -SH endógenos. Essas ações pleiotrópicas parecem estar estreitamente relacionadas com os taninos condensados presentes no extrato das folhas de *E. dysenterica*.

Palavras-chave: *Campomanesia pubescens*; Gastroproteção; *Eugenia dysenterica*.

ABSTRACT

Eugenia dysenterica and *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae), known in Brazil as “cagaita” and “gabiroba”, respectively, have been used by the general populace to treat some gastrointestinal disorders. Considering their folk uses and that many plants of the Myrtaceae family exhibit protective effects toward the gastric mucosa, we applied a taxonomic approach to select the *E. dysenterica* and *Campomanesia pubescens* leaf extracts to evaluate their gastroprotective effects. The abilities both extracts and carbenoxolone to protect the gastric mucosa from ethanol/HCl-induced lesions were evaluated in mice. The contributions of nitric oxide (NO), endogenous sulphydryl (SH) groups and alterations in HCl production to the extract’s gastroprotective effect were investigated. We also determined the antioxidant activity of the extract and the possible contribution of tannins to the cytoprotective effects. *E. dysenterica* extract, carbenoxolone, but not *C. pubescens* protected the gastric mucosa from ethanol/HCl-induced ulcers and the former also decreased HCl production. The blockage of SH groups by NEM, but not the inhibition of NO synthesis by L-NAME, abolished the gastroprotective action of *E. dysenterica* extract. Tannins are present in this extract, which was analysed by MALDI; the identified tannins by fragmentation pattern (MS/MS) are condensed, type B with the coupling until eleven flavan-3-ol units and predominantly comprised procyanidin and prodelphinidin. Partial withdraw of tannins from the extract abolished its cytoprotective actions. Finally, the extract exhibits free radical scavenger activity *in vitro*. Therefore, *E. dysenterica*, but not *C. pubescens* leaf extracts has gastroprotective effects that appear linked to the inhibition of HCl production, to its antioxidant activity and to endogenous SH-containing compounds. These pleotropic actions appear strictly related to the condensed tannins contained in the *E. dysenterica* leaf extracts.

Keywords: *Campomanesia pubescens*; gastroprotection; *Eugenia dysenterica*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do estômago humano.....	18
Figura 2. Ativação da célula parietal	19
Figura 3. Controle da secreção de ácido pelas células parietais	20
Figura 4. Representação diagramática dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica	25
Figura 5. Sistema de defesa antioxidante.....	27
Figura 6. Imagens ilustrativas da <i>Eugenia dysenterica</i>	31
Figura 7. Imagens ilustrativas da <i>Campomanesia pubescens</i>	33
Figura 8. Estruturas básicas de um flavonoide e de seu derivado flavan-3-ol (um flavanol).	35
Figura 9. Estruturas dos monômeros e oligômeros constituintes de proantocianidinas	36
Figura 10. Proantocianidinas diméricas do tipo-A e tipo-B.....	37
Figura 11. Escore estabelecido para classificação das lesões gástricas	44
Figura 12. Efeitos gastroprotetores do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	48
Figura 13. Participação do óxido NO no efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	50
Figura 14. Atividade antioxidante do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> e do ácido ascórbico	51
Figura 15. Participação de compostos sulfidrílicos endógenos no efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	52
Figura 16. Detecção de compostos polifenólicos e de taninos no extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> e <i>C. pubescens</i>	53
Figura 17. Efeitos da diminuição do conteúdo de taninos sobre a ação gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	54
Figura 18. Capacidade dos taninos do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> em se ligar à proteínas da mucosa gástrica.....	55

Figura 19. Estruturas químicas de dois dos três compostos identificados no extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> pela cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas	56
Figura 20. Separação cromatográfica dos constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> por cromatografia líquida de ultraeficiência.....	58
Figura 21. Estrutura típica dos taninos condensados.....	60
Figura 22. Efeitos do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>C. pubescens</i> sobre as lesões induzidas pela administração de HCl/etanol.....	61
Figura 23. Comparação da capacidade de complexação de soluções de extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> e <i>C. pubescens</i> com Fe ³⁺	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo de algumas atividades descritas na literatura para <i>E. dysenterica</i> e <i>C. pubescens</i>	34
Tabela 2. Gradiente de eluição utilizado nas análises por UPLC-DAD-MS das frações obtidas com diclorometano da amostra Ceres-04.....	41
Tabela 3. Efeitos da administração intraduodenal do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> (ED; 1000 mg/kg) ou de cimetidina (100 mg/kg) sobre o pH, quantidade de acidez livre e total do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura pilórica.....	49
Tabela 4. Constituintes identificados no extrato aquoso de <i>E. dysenterica</i> por UPLC-DAD-MS.....	57
Tabela 5. Taninos condensados identificados no extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> por MALDI-MS/MS.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina 3,5' monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CBX	Carbenoxolona
CCK ₂	Colecistoquinina 2
CEUA/UFU	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (<i>Calcitonin gene-related peptide</i>)
CI ₅₀	Concentração inibitória em 50%
Cl ⁻	Cloreto
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Cicloxygenase
CP	Extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>Campomanesia pubescens</i>
DAG	Diacilglicerol
DHB	Ácido 2,5-diidroxibenzóico
DPPH [•]	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
ECL	Células enterocromafins-símiles
ED	Extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i>
EPM	Erro padrão da média
Fe ³⁺	Ferro
FeCl ₃	Cloreto férrico
GMPc	Guanosina 3',5' monofosfato cíclico
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GT-ED	Extrato aquoso de <i>Eugenia dysenterica</i> tratados com gelatina

H^+	Próton
H_2	Receptores para histamina do subtipo 2
H_2CO_3	Ácido carbônico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCO_3^-	Bicarbonato
HSP	Proteínas de choque térmico
HUFU	Herbarium da Universidade Federal de Uberlândia
I.U.	Índice de úlcera
IP_3	Trifosfato de inositol
K^+	Potássio
K^+/H^+ -ATPase	Bomba de prótons
$L\cdot$	Radical alquila
L-NAME	N^ω -nitro-L-arginina metil éster
$LO\cdot$	Radical alcoxila
$LOO\cdot$	Radical peroxila
m/v	Massa/volume
m/z	Massa/carga
M_2, M_3, M_4	Receptores muscarínicos dos subtipos M_2 , M_3 e M_4
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MS	Espectrometria de Massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectro de Fragmentação de Massa
N_2	Nitrogênio molecular
$NaCl$	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
$NaOH$	Hidróxido de sódio
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NOSe	Sintase do óxido nítrico endotelial
NOSi	Sintase do óxido nítrico induzível
NOSn	Sintase do óxido nítrico neuronal
O_2	Oxigênio

O_2^-	Ânion superóxido
OH^\bullet	Radical hidroxila
OMS	Organizaçāo Mundial de Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas (<i>Platelet-Activating Factor</i>)
PCY	Procianidina
PCYG	Procianidina O-galato
PDE	Prodelfinidina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	Prostaciclina 2
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C (<i>Phoslipase C</i>)
ROS	Espéciess reativas de oxigêniao
SAL	Salina (0,9% NaCl)
-SH	Grupamento sulfidrílicos
SOD	Superóxido dismutase
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Tempo de Voo (<i>Time Of Flight</i>)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-eficiēcia (<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>)
$\mu eq H^+$	Microequivalentes de H ⁺

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Mucosa gástrica.....	17
2.2. Secreção ácida	18
2.3. Mecanismos de defesa da mucosa gástrica	21
2.3.1 Fatores luminais e epiteliais de defesa da mucosa gástrica: camada de muco e bicarbonato, células epiteliais superficiais e renovação celular	22
2.3.2. Microcirculação e gastroproteção	23
2.3.3. NO e gastroproteção.....	23
2.3.4. Prostaglandinas e gastroproteção	24
2.3.5. Sistemas antioxidantes e gastroproteção	26
2.4. Úlcera péptica.....	27
2.5. Modelo experimental utilizado: lesões gástricas induzidas pela administração de solução hidroalcoólica acidificada	28
2.6. Produtos naturais de origem vegetal como fonte de novas drogas	29
2.7. Espécies estudadas	30
2.7.1. <i>Eugenia dysenterica</i>	31
2.7.2. <i>Campomanesia pubescens</i>	32
2.8. Compostos bioativos.....	33
2. OBJETIVOS	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Drogas e reagentes.....	39
4.2. Material vegetal.....	39
4.3. Preparação dos extratos aquosos	39
4.4. Análise fitoquímicas	40
4.4.1. Detecção de compostos polifenólicos e de taninos no extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> e <i>C. pubescens</i>	40
4.4.2. Comparação da capacidade de complexação do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> e <i>C. pubescens</i> com Fe^{3+}	40

4.4.3. Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-DAD-MS e UPLC-DAD-MS/MS)	41
4.4.4. Identificação dos constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> por MALDI-MS/MS	42
4.5. Animais	42
4.6. Avaliação do efeito da administração dos extratos aquosos liofilizados das folhas de <i>E. dysenterica</i> e <i>C. pubescens</i> sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol	43
4.7. Avaliação do efeito da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>, com diminuição do conteúdo de taninos, sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol.	44
4.8.Verificação da efetividade do método de precipitação de proteínas em remover compostos polifenólicos.....	45
4.9. Determinação da capacidade de ligação do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> com proteínas da mucosa gástrica e coloração com FeCl₃	45
4.10. Avaliação da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> sobre a secreção gástrica.....	45
4.11. Avaliação da participação de grupos sulfidrílicos endógenos e do NO na atividade gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	46
4.12. Determinação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	47
4.13. Análise Estatística	47
 5. RESULTADOS	 48
5.1. <i>Eugenia dysenterica</i>	48
5.1.1. Avaliação do efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	48
5.1.2. Avaliação do efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> sobre a secreção gástrica	49
5.1.3. Avaliação da participação do NO na atividade gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	50

5.1.4. Determinação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	51
5.1.5. Avaliação da participação dos compostos sulfidrílicos endógenos na atividade gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i>	52
5.1.6. Detecção de compostos polifenólicos e de taninos no extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> e <i>C. pubescens</i>	53
5.1.7. Avaliação do efeito da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> , com diminuição do conteúdo de taninos, sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol.....	54
5.1.8. Determinação da capacidade de ligação do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> com proteínas da mucosa gástrica e coloração com FeCl ₃	55
5.1.9. Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-DAD-MS e UPLC-DAD-MS/MS)	56
5.1.10. Identificação dos constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> por MALDI-MS/MS	59
5.2. <i>Campomanesia pubescens</i>	61
5.2.1. Avaliação do efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>C. pubescens</i>	61
5.2.2. Comparação da capacidade de complexação de soluções de extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>E. dysenterica</i> e <i>C. pubescens</i> com Fe ³⁺	62
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO	77
APÊNDICE A	78
APÊNDICE B	83

1. INTRODUÇÃO

Vários extratos derivados de plantas possuem efeitos gastroprotetores e representam uma grande fonte de compostos bioativos com potencial terapêutico para o tratamento de úlceras gástricas e duodenais, doenças que ainda são consideradas um problema de saúde em todo o mundo (BORRELLI e IZZO, 2000). Dessa forma, pesquisas nessa área são importantes, pois fornecem dados que auxiliam as instituições governamentais em suas políticas sobre o uso de plantas na indústria farmacêutica, no uso sustentável da biodiversidade e, consequentemente, na aplicação de fitoterápicos em programas de promoção de saúde pública.

Dentre as plantas estudadas e que apresentam efeito gastroprotetor, aquelas da família Myrtaceae se destacam; de fato, diversas espécies são capazes de promover citoproteção na mucosa gástrica, incluindo a *Campomanesia lineatifolia* (MADALOSO *et al.*, 2012), *Campomanesia xanthocarpa* (MARKMAN, BACCHI, KATO, 2004), *Eugenia jambolana* (CHATURVEDI *et al.*, 2007, 2009; EL-SHENAWY, 2009), *Myrtus communis* (SUMBUL *et al.*, 2010), *Plinia edulis* (ISHIKAWA *et al.*, 2008), *Syzygium aromaticum* (AGBAJE, 2008; SANTIN, 2011), e *Syzygium cumini* (RAMIREZ e ROA Jr., 2003). A *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae), conhecida no Brasil como “cagaita” ou “cagaiteira”, encontra-se amplamente distribuída no Cerrado. Suas frutas são comestíveis e tradicionalmente usadas como agentes catárticos e suas folhas, por outro lado, são usadas no tratamento de diarreias (ALMEIDA *et al.*, 1998). A *Campomanesia pubescens* O. Berg, outra mirtácea, é um arbusto de ocorrência no Cerrado e suas folhas também são utilizadas tradicionalmente no tratamento de diarreia (PIVA, 2002).

Portanto, considerando o uso popular da *E. dysenterica* e da *C. pubescens* no tratamento de algumas desordens do trato gastrintestinal, bem como as referidas atividades gastroprotetoras descritas para muitas espécies da família Myrtaceae, incluindo aquelas do gênero *Eugenia* e *Campomanesia*, utilizamos a abordagem taxonômica para selecioná-las com o objetivo de estudar seus possíveis efeitos gastroprotetores. Cabe ressaltar que, a abordagem taxonômica baseia-se na premissa de que espécies do mesmo taxa possuem capacidade genética de produzir metabólitos secundários semelhantes (CORDELL *et al.*, 1996; CORDELL, 2000). Ainda, investigamos os mecanismos farmacológicos e os possíveis metabólitos secundários envolvidos nas ações gastroprotetoras observadas.

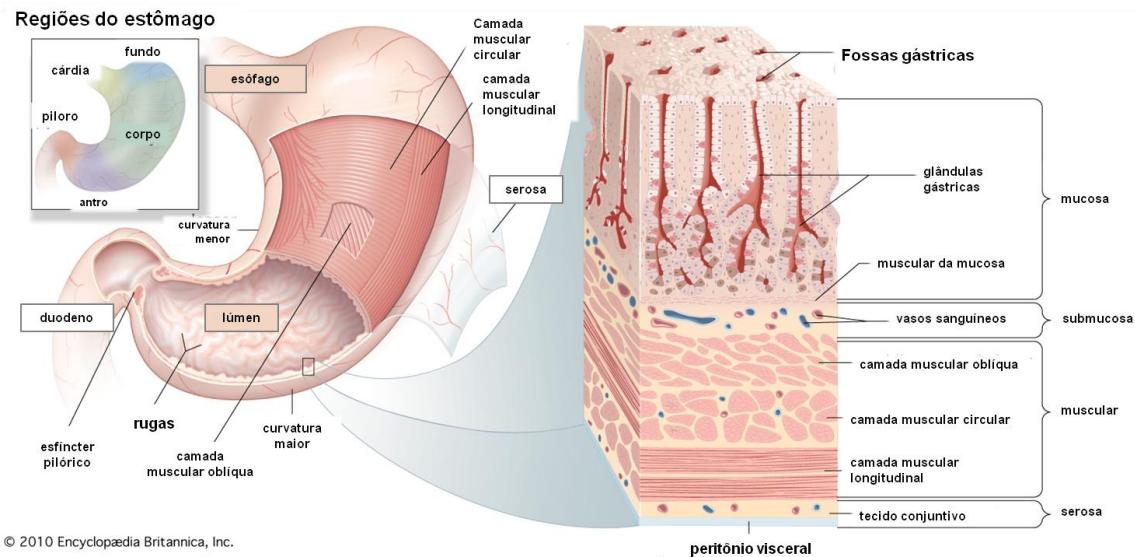
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como avaliamos no presente trabalho o possível efeito gastroprotetor de duas espécies vegetais, descreveremos a seguir uma breve revisão da literatura sobre aspectos morfológicos da mucosa gástrica, bem como forneceremos informações relevantes sobre o modelo experimental utilizado e sobre as espécies estudadas. Por fim, faremos considerações sobre o grupo de metabolitos secundários investigados nesse estudo.

2.1. Mucosa Gástrica

A parede estomacal pode ser dividida em quatro regiões: a mucosa, a submucosa, a camada muscular e a serosa. A mucosa é constituída de uma superfície epitelial, a qual é formada por uma camada de células simples colunares que recobrem as fossas gástricas; abaixo do epitélio encontra-se a lâmina própria, uma camada de tecido conjuntivo que se apoia sobre a muscular da mucosa (*muscularis mucosae*) (EROSCHENKO, 2008). O estômago também pode ser dividido em cinco regiões principais: cárdena, fundo, corpo, antro e piloro (Figura 1). O epitélio do corpo e do fundo do estômago (mucosa oxíntica ou glandular) contém vários tipos de células diferenciadas: as células parietais ou oxínticas (presentes no fundo das glândulas oxínticas), as células principais ou zimogênicas, células mucosas superficiais e, as células enteroendócrinas secretoras de hormônio (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008). Ainda, a mucosa glandular possui células mucosas na região do pescoço das glândulas gástricas e células indiferenciadas ou regenerativas, as quais originam as células da superfície epitelial (AIRES, 2008). As células parietais são as responsáveis pela secreção de ácido clorídrico (HCl) e de fator intrínseco (substância importante na absorção da vitamina B12), enquanto que as células principais secretam pepsinogênio. Esse último, quando secretado no lúmen da mucosa gástrica, em condições de pH ácido (entre 1,8 a 3,5), converte-se em pepsina ativa, uma enzima importante na digestão de proteínas. As células mucosas superficiais secretam muco e bicarbonato (HCO_3^-), que juntos, formam uma película protetora sobre a mucosa (GUYTON e HALL, 2006).

Figura 1. Estrutura do estômago humano.

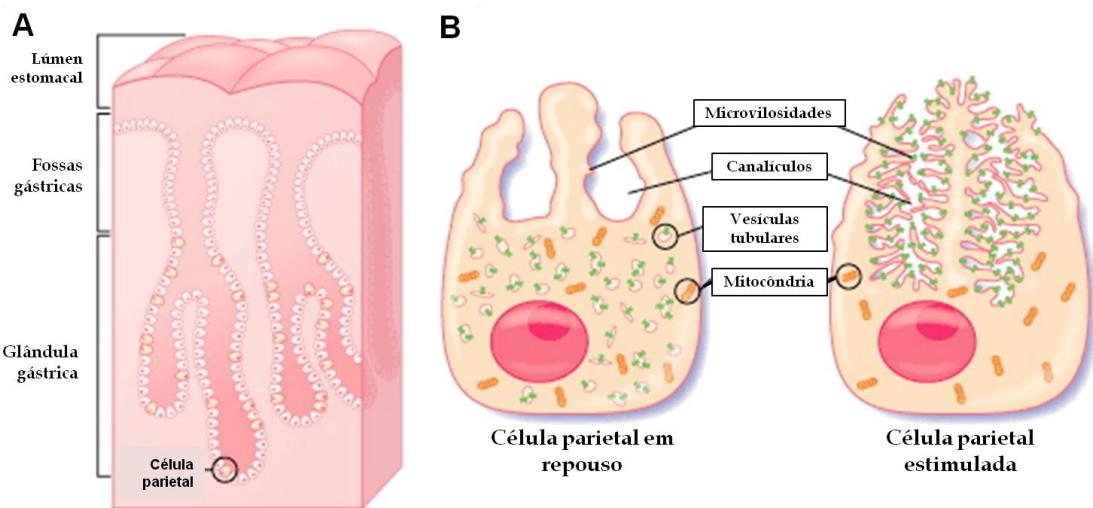


Do ponto de vista morfológico o estômago pode ser dividido em 4 regiões: cárnia, fundo, corpo, antro e piloro. A parede estomacal apresenta 4 camadas específicas: a serosa, a camada muscular, a submucosa e a mucosa. Essa última mucosa é rica em glândulas gástricas, as quais contêm células produtoras de enzimas digestivas, ácido clorídrico e muco. A submucosa, constituída de tecido conjuntivo é rica em vasos sanguíneos e possui um plexo nervoso. Ainda, na camada muscular do estômago as fibras musculares lisas apresentam-se em 3 orientações distintas: oblíqua, circular e longitudinal. Por fim, tem-se a serosa, uma camada de tecido conjuntivo revestida pelo peritônio visceral. Fonte: Encyclopædia Britannica Online (2013), com modificações.

2.2. Secreção ácida

A secreção ácida estomacal está envolvida na digestão de proteínas e na absorção de ferro, cálcio e vitamina B12, além de atuar contra bactérias invasoras (SCHUBERT e PEURA, 2008). A célula parietal em repouso possui canalículos intracelulares, que se abrem na membrana apical da célula, bem como um sistema túbulo-vesicular rico em bombas de prótons (H^+/K^+ -ATPase) secretoras de H^+ . Quando a célula é ativada, o sistema túbulo-vesicular funde-se à membrana celular de forma que as microvilosidades projetam-se nos canalículos, aumentando acentuadamente a área da referida membrana em contato com o lúmen gástrico (Figura 2). As moléculas de H^+/K^+ -ATPase ficam expostas ao K^+ no líquido extracelular e passam a trocar H^+ por K^+ . O H^+ secretado é oriundo do ácido carbônico (H_2CO_3), o qual é formado pela hidratação do dióxido de carbono (CO_2), uma reação catalisada pela anidrase carbônica (GANONG, 2006).

Figura 2. Ativação da célula parietal.

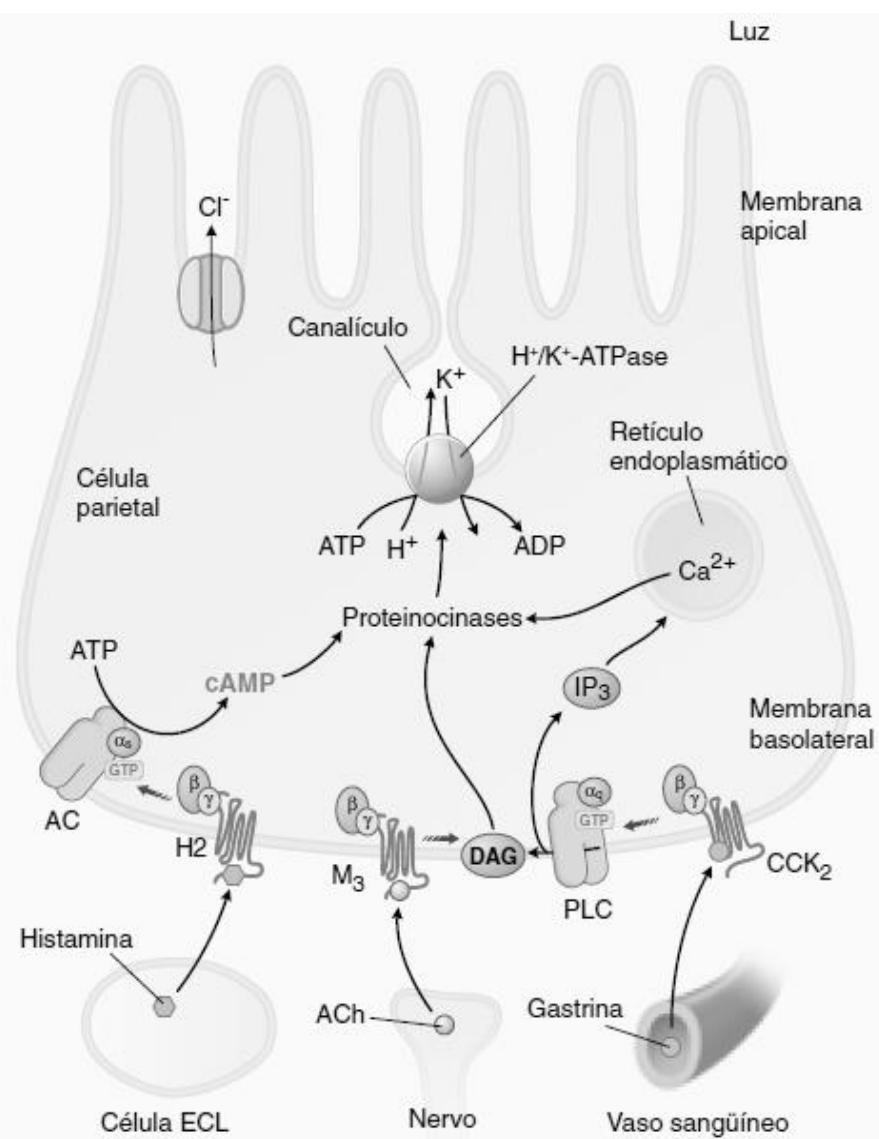


(A) Células parietais secretam ácido clorídrico e estão localizadas no interior de glândulas gástricas no estômago. (B) Quando as células parietais estão em estado de repouso, os canalículos presentes na superfície apical projetam-se para o interior da célula. As mitocôndrias e as vesículas tubulares [que formam o sistema túbulo-vesicular e que contém as bombas de prótons K^+/H^+ -ATPase (em verde)] estão localizadas no citoplasma da célula parietal. Após estimulação celular (por histamina, acetilcolina ou gastrina), o sistema túbulo-vesicular funde-se com a membrana plasmática, e os canalículos e microvilosidades tornam-se mais profundos, aumentando a área superficial e, consequentemente, a secreção de ácido. Fonte: Du *et al.* (2013), com modificações.

Assim, o HCO_3^- formado pela dissociação de H_2CO_3 deixa a célula parietal através de um antitransportador presente na membrana basolateral, o qual troca HCO_3^- por outro ânion; como o cloreto (Cl^-) é o ânion mais abundante no líquido intersticial, a troca envolve principalmente esse íon. Por fim, o Cl^- através de canais presentes na membrana apical deixa a célula, a favor do seu gradiente eletroquímico (GANONG, 2006). Cabe salientar que, a expressão e a atividade da bomba de prótons é controlada por proteínas quinases, cujas atividades estão relacionadas aos níveis intracelulares de adenosina 3',5'monofostato cíclico (AMPc), Ca^{2+} e diacilglicerol (DAG) (Figura 3). Assim, a estimulação de receptores na membrana da célula parietal através de sinalização mediada pela proteína Gs, ativa a adenilato ciclase (AC), a qual leva à formação de AMPc e consequente ativação da proteína quinase A (PKA). Ainda, a ativação da proteína Gq por receptores presentes no plasmalema da célula parietal causa ativação da fosfolipase C (PLC), que hidrolisa fosfolipídios de membrana, aumentando os níveis citoplasmáticos de trifosfato de inositol (IP_3) e DAG. O IP_3 causa liberação de

Ca^{2+} do retículo endoplasmático enquanto que o DAG possibilita a ativação da proteína quinase C (PKC) (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Figura 3. Controle da secreção de ácido pelas células parietais.



A estimulação da secreção de ácido pelas células parietais é modulada pelas vias: parácrina (histamina), neuroendócrina [acetilcolina (Ach)] e endócrina (gastrina), que ativam seus respectivos receptores (H_2 , M_3 e CCK_2). A ativação do receptor H_2 aumenta os níveis intracelulares de AMPc, o que leva a ativação de proteína quinase A. A ativação dos receptores M_3 e CCK_2 estimula a liberação de Ca^{2+} e produção de diacilglicerol (DAG); ambos estimulam a atividade da proteínas quinases. A ativação das quinases resulta em fosforilação e ativação da H^+/K^+ -ATPase da membrana canalicular, que bombeia íons H^+ na luz do estômago. Um canal Cl^- da membrana apical acopla o efluxo de Cl^- com o efluxo de H^+ , enquanto um canal de K^+ da membrana apical (*não ilustrado*) recicla o K^+ para fora da célula. O resultado final desse processo consiste na rápida extrusão de HCl para a luz estomacal. Fonte: GOLAN *et al* , 2009.

A ativação das células parietais encontra-se sobre controle neuroendócrino e envolve a ação de: (i) histamina, um hormônio parácrino; (ii) acetilcolina, um neurotransmissor liberado por terminações nervosas colinérgicas parassimpáticas; (iii) gastrina, um hormônio endócrino secretado pelas células G (GUYTON e HALL, 2006). A histamina secretada pelas células enterocromafins-símiles (ECL) as quais estão adjacentes às células parietais, promove uma estimulação local. Esse hormônio atua diretamente na célula parietal, ligando-se a receptores para histamina do subtipo H₂, os quais estão acoplados à proteína Gs. A gastrina e a acetilcolina estimulam as células parietais através de suas ligações com receptores de colecistoquinina 2 (CCK₂) e receptores muscarínicos do subtipo M₃, respectivamente. Ambos os receptores se acoplam à proteína Gq, determinando um aumento nos níveis intracelulares de Ca²⁺ e na atividade da PKC (Figura 3). Assim, as vias de sinalização deflagradas pela estimulação dos receptores para histamina, acetilcolina e gastrina explicam o aumento na produção de HCl induzido por esses mediadores. Por fim, a gastrina e à acetilcolina podem intensificar a produção de H⁺ por estimularem células ECL que, como descrito anteriormente, liberam histamina (SCHUBERT e PEURA, 2008).

É importante ressaltar que, o HCl é capaz de inibir sua própria secreção através de uma alça de retroalimentação negativa a qual envolve: (i) ações indiretas relacionadas à liberação de somatostatina por células D da região antral (agindo como um hormônio, inibindo as células G secretoras de gastrina e, indiretamente a secreção de HCl); (ii) ações diretas da somatostatina liberada da região do corpo (agindo como um hormônio parácrino, ativando proteínas G_j e inibindo a adenilato ciclase, a síntese de AMP_c e a secreção de HCl pelas células parietais). A somatostatina também pode inibir a secreção de histamina pelas células ECL (AIRES, 2008; CORLETO, 2010). Além da somatostatina, outros inibidores endógenos da secreção de HCl, agem diretamente sobre as células parietais, como as prostaglandinas das séries E e I e os fatores de crescimento epidérmico (EGF) (AIRES, 2008).

2.3. Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

Além do HCl secretado e da pepsina, a mucosa gástrica está constantemente exposta a diversos agentes potencialmente lesivos como: sais biliares regurgitados, alimentos em altas temperaturas e/ou com alta osmolaridade, álcool, etc. Desse modo, a

mucosa apresenta diversos mecanismos de defesa que evitam que tais agentes induzam lesões tissulares. Esses mecanismos serão sucintamente descritos a seguir e encontram-se resumidos nas figuras 4 e 5.

2.3.1. Fatores luminais e epiteliais de defesa da mucosa gástrica: camada de muco e bicarbonato, células epiteliais superficiais e renovação celular

A primeira linha de defesa da mucosa gástrica é constituída por uma camada de muco secretado pelas células epiteliais, a qual é formada por glicoproteínas denominadas mucinas (aproximadamente 5%), que conferem viscoelasticidade ao mesmo, bem como por água (95%) (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008; DHARMANI *et al.*, 2009). O epitélio adiciona HCO_3^- a essa película mucosa, criando um microambiente estável com pH próximo da neutralidade, contrastando com aquele encontrado no suco gástrico luminal (WALLACE, 2008). Apesar da produção de bicarbonato ser baixa comparada à secreção ácida (cerca de 10% desta), o complexo muco/bicarbonato mantém o pH neutro devido à elevada viscosidade do mesmo. Assim, evita-se que o bicarbonato se difunda e seja perdido no lúmen gástrico, garantindo a proteção das células epiteliais (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008). O bicarbonato formado nas células parietais é transportado para a corrente sanguínea arterial, por mecanismos descritos anteriormente (vide página 18), determinando sua alcalinização; esse fenômeno é denominado de “maré alcalina” e é importante pois possibilita a captação de HCO_3^- pelas células epiteliais secretoras de muco, bem como auxilia na neutralização de H^+ que eventualmente consiga atravessar a barreira mucosa (NIV e FRASER, 2002; LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008).

As células epiteliais, *per se*, representam um importante mecanismo de defesa contra injúrias na mucosa gástrica. Estas células possuem fosfolipídios hidrofóbicos na superfície que atuam repelindo agentes lesivos solúveis em água (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008). Sanders *et al.* (1985) demonstraram que a membrana apical de células principais em cultura resistiu fortemente ao efeito lesivo de uma solução ácida (pH 2,0 durante 4h). Entretanto, a membrana basolateral dessas células apresentou alta sensibilidade a uma solução levemente ácida (pH 5,5). Essas observações evidenciam a importância da justaposição celular, a qual impede que agentes lesivos acessem camadas mais profundas da mucosa, regiões menos resistentes a interações com ácidos

ou agentes lesivos (WALLACE, 2008). É importante ressaltar que as células epiteliais superficiais são interconectadas através de junções aderentes, formando uma barreira que impede a difusão de ácido ou pepsina de volta para essas células. Ainda, essas células são conectadas metabolicamente e eletricamente por junções comunicantes (junções *gap*) (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008). Além disso, a intensa renovação das células da mucosa gástrica, que ocorre a cada 2-4 dias, garante sua integridade. Essa capacidade de substituição de células senescentes de forma contínua, rápida, e sem que ocorra perda da continuidade e da função da barreira epitelial, pode ser atribuída ao processo de extrusão celular. Nesse caso, as células em torno daquelas em estado apoptótico gradualmente comprimem a região basal das mesmas, até que a célula se desloque da membrana basal (WALLACE, 2008).

2.3.2. Microcirculação e gastroproteção

Como descrito anteriormente, a mucosa gástrica pode ser exposta continuamente à secreção ácida sem que um dano significativo ocorra. Isso se deve em parte à microcirculação local, que distribui sangue alcalinizado, o qual atua como tampão, além de remover e diluir o ácido e outros agentes lesivos. O aumento do fluxo sanguíneo na mucosa em resposta à lesão e à exposição à secreção ácida é mediado, em parte, pelo óxido nítrico (NO). Há relatos de que esse mediador protege a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol e endotelina-1, e a inibição da síntese de NO aumenta a formação das lesões na referida mucosa. O estímulo para a liberação de NO e outros fatores é regulado por reflexos locais, os quais são mediados por nervos aferentes sensoriais; assim, as terminações nervosas detectam a presença do ácido e respondem liberando, nas arteríolas submucosas, o CGRP (peptídeo relacionado ao gene de calcitonina) o qual estimula então as células endoteliais a liberarem fatores de relaxamento como o NO e a prostaciclina (PGI_2) (WALLACE, 2008; LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008).

2.3.3. NO e gastroproteção

Além do seu importante papel vasodilatador na mucosa gástrica, o NO atua também na regulação da secreção de muco, na inibição da agregação de neutrófilos e

auxilia no processo de cicatrização das úlceras. Esse mediador é um gás sintetizado a partir do aminoácido L-arginina e sua produção envolve a ação das sintases do óxido nítrico (NOS), para as quais já foram descritas 3 isoformas: duas constitutivas, a neuronal (NOSn) e a endotelial (NOSe), e uma induzível (NOSi). No trato gastrintestinal, as isoformas mais importantes são NOSe e NOSn. A atividade de NOSe e NOSn é regulada por alterações nas concentrações de Ca^{2+} intracelular, o qual se liga à calmodulina, formando um complexo que ativa a enzima. O NO liberado ativa então a guanilato ciclase solúvel que, consequentemente leva à formação de guanosina 3',5' monofosfato cíclico (GMPc); o GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que através da fosforilação de diversos alvos desencadeia a vasodilatação. Cabe salientar que o bloqueio da síntese, liberação e/ou sinalização mediada pelo NO aumenta o estresse oxidativo, ativando mastócitos, amplamente distribuídos na mucosa gástrica, os quais são responsáveis pela liberação de mediadores como histamina e fator ativador de plaquetas (PAF). Esses efeitos causam, em conjunto, aumento da permeabilidade epitelial e estimulação da produção de HCl (KANWAR *et al.*, 1994).

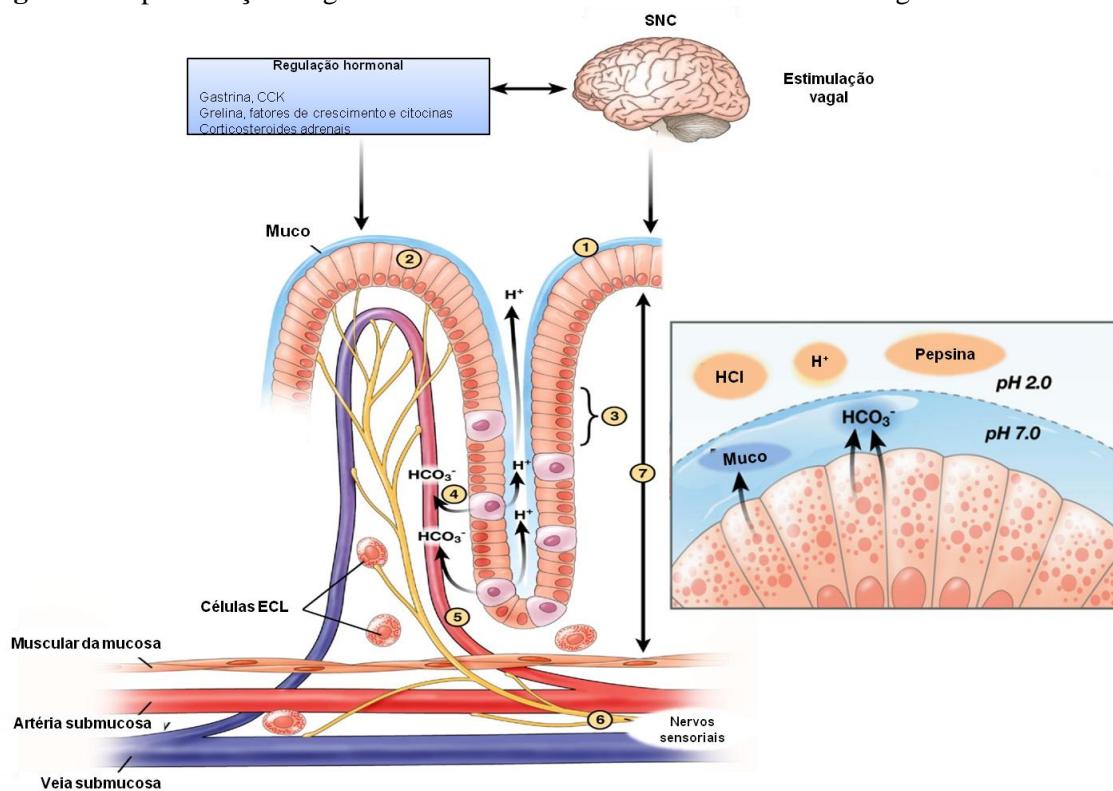
2.3.4. Prostaglandinas e gastroproteção

As cicloxygenases (COXs) são enzimas que convertem o ácido araquidônico, um ácido graxo presente nas membranas celulares, em prostaglandinas instáveis que servem de substrato para a síntese de diferentes prostanóides. Essas enzimas são amplamente distribuídas, sendo particularmente importantes no trato gastrintestinal, onde desempenham um papel primordial na proteção da mucosa contra agentes lesivos. Os principais produtos do metabolismo do ácido araquidônico produzidos no estômago e duodeno humano são as prostaglandinas E₂, F_{2α} (PGE₂ e PGF_{2α}) e a PGI₂ (CRYER, 2001). Duas isoformas de COX são importantes na periferia, uma enzima constitutiva designada de COX-1 e outra induzível, conhecida como COX-2. No tecido gástrico, a COX-1 parece regular funções de ordem homeostática, como o fluxo sanguíneo local e a secreção de muco e bicarbonato; por outro lado, a COX-2 é induzida em áreas de ulcerações e inflamação da mucosa. Prostaglandinas geradas pela COX-2 participam no processo de cicatrização de úlceras através do estímulo da proliferação celular, da angiogênese, bem como do restabelecimento da integridade da mucosa; ainda, essas prostaglandinas inibem a aderência leucocitária (KONTUREK, KONTUREK e

BRZOZOWSKI, 2005). As PGE₂ e PGI₂ são vasodilatadores potentes, pois aumentam o fluxo sanguíneo na mucosa, o que proporciona uma maior resistência da mesma à formação de lesões. Além disso, a vasodilatação auxilia na regeneração do epitélio, uma vez que propicia a criação de um microambiente alcalino em locais de lesão, regiões mais suscetíveis ao efeito deletério do HCl (WALLACE, 2008).

A ação de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) sobre a mucosa gástrica evidencia o papel crucial das prostaglandinas para a manutenção da integridade da mesma. De fato, diversos AINEs aumentam significativamente o risco de eventos gastrintestinais adversos, como o aparecimento de úlceras e sangramento gástrico (YUAN, PADOL, E HUNT, 2006), os quais estão relacionados à capacidade que estas drogas apresentam de inibir a atividade das COXs e, consequentemente, diminuir a síntese prostaglandinas (WALLACE, 2008).

Figura 4. Representação diagramática dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica.



A integridade da mucosa gástrica é mantida através de vários mecanismos de defesa, os quais atuam sinergicamente para protegê-la dos agentes nocivos, como ácido e pepsina. Esses mecanismos incluem: (1) uma barreira de muco e bicarbonato, (2) células epiteliais superficiais, (3) altos níveis de renovação celular, (4) maré alcalina, (5) microcirculação, (6) nervos sensoriais (os quais estimulam a liberação de NO) e, por fim, (7) prostaglandinas. Além de fatores locais, a defesa da mucosa gástrica é regulada, em parte, pelo sistema nervoso central (SNC) e por fatores hormonais. CCK (colecistoquinina); células ECL (enterocromafins-símiles). Fonte: LAINE *et al.* (2008), com modificações.

2.3.5. Sistemas antioxidantes e gastroproteção

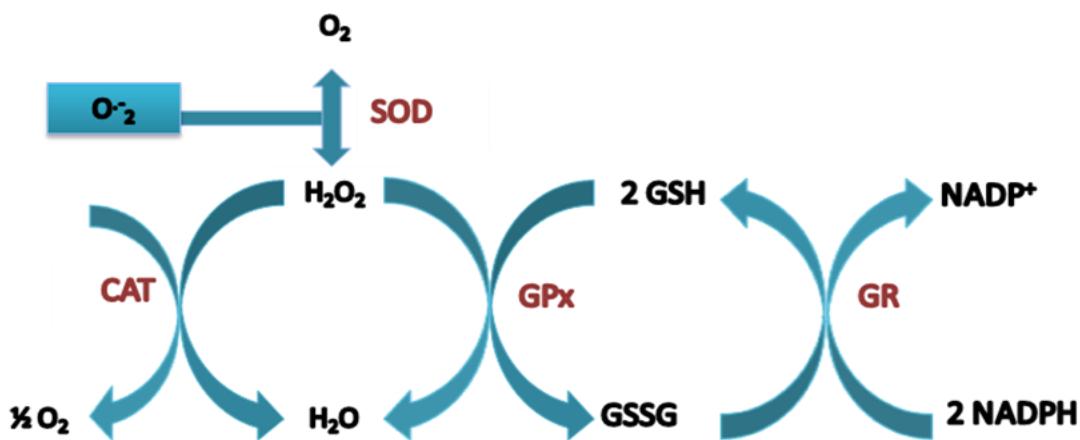
As espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico, plaquetas, macrófagos, e células do músculo liso, podem contribuir para a formação de lesões na mucosa gástrica. As ROS incluem todos os radicais de oxigênio, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}), alquila (L^{\cdot}), alcoxila (LO^{\cdot}) e peroxila (LOO^{\cdot}). Em um processo denominado peroxidação lipídica, radicais livres agem sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente L^{\cdot} , LO^{\cdot} e LOO^{\cdot} . As alterações produzidas na membrana geram então desordens na permeabilidade da mesma, alterando o fluxo de íons e de outras substâncias. Ainda, as ROS podem causar dano ao DNA, bem como comprometer componentes da matriz extracelular (LIMA e ABDALLA, 2001). Em conjunto, essas ações podem levar a morte celular, de forma que as células contam com importantes sistemas antioxidantes que as possibilitam lidar com a geração das ROS (NIKI, 2012).

Assim, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) representam a primeira linha de defesa contra as ROS. A SOD converte o $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), enquanto que a catalase e a GPx convertem o H_2O_2 em água e O_2 ou água e glutationa oxidada (GSSG), respectivamente (Figura 5). A GPx, uma proteína dependente de selênio, requer outros cofatores para desempenhar adequadamente sua função, tais como: glutationa redutase (GR), glutationa reduzida (GSH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (WEYDERT e CULLEN, 2010).

Cabe salientar que, compostos sulfidrílicos (-SH) são agentes envolvidos na proteção de praticamente todos os tecidos às lesões quimicamente induzidas. A glutationa corresponde a maior parte de grupos -SH não proteicos do organismo e em conjunto com compostos sulfidrílicos de proteínas, apresenta um importante papel no sistema antioxidante celular (SZABO, NAGY e PLEBANI, 1992). Evidenciando o efeito gastroprotetor de compostos -SH não proteicos, Szabo, Trier e Frankel (1981) notaram que a indução de lesões gástricas após administração de solução etanólica acidificada estava associada a diminuições nas concentrações desses compostos. Além disso, está bem estabelecido que agentes bloqueadores de grupamentos -SH, como a N-etilmaleimida (NEM) abolem o efeito citoprotetor de diferentes substâncias sobre a

mucosa gástrica (SZABO, TRIER e FRANKEL, 1981; MIZUI e DOUTECHI, 1983; RASTOGI, PATNAIK e DIKSHITU, 1998).

Figura 5. Sistema de defesa antioxidante.



A superóxido dismutase (SOD) converte o superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). O H_2O_2 formado é então convertido pela catalase (CAT, presente principalmente nos peroxissomos, lisossomos e mitocôndrias) em água e oxigênio molecular. No citosol, a glutatona peroxidase (GPx) também forma água a partir de H_2O_2 , convertendo a glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG), a qual pode ser reconverteida em GSH pela ação da glutatona redutase (GR), em um processo que utiliza como doadores de elétrons a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). Fonte: a autora.

2.4. Úlcera péptica

Dentre as doenças que acometem o homem e que são consideradas um problema de saúde pública encontra-se a úlcera péptica, a qual compreende lesões ulcerativas presentes no estômago ou duodeno. O desenvolvimento da doença e das mortes a ela relacionadas coincide com o processo de urbanização e existem evidências de que o estresse possa ser um dos fatores envolvidos (SCHUBERT e PEURA, 2008; MALFERTHEINER, CHAN e McCOLL, 2009). A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da úlcera péptica sofreu profunda alteração no início da década de 1980, quando Warren & Marshall sugeriram que as lesões estavam associadas à infecção pelo micro-organismo *Campylobacter pyloridis*, atualmente denominado de *Helicobacter pylori* (WARREN e MARSHALL, 1983; MARSHALL e WARREN, 1984; MALFERTHEINER, CHAN e McCOLL, 2009). Essa constatação modificou a visão de que a úlcera péptica seria uma doença estritamente relacionada à lesão da

mucosa pelo HCl e pepsina, passando a ser encarada como uma doença infecciosa. De fato, a erradicação do *H. pylori* com o uso de antibióticos representa atualmente a conduta terapêutica padrão em casos de contaminação com o bacilo, o que leva à cura da doença. O reconhecimento de tal descoberta conferiu a Warren & Marshall o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2005 (MALFERTHEINER, CHAN e MCCOLL, 2009). Contudo, como apontado anteriormente, alguns casos de úlcera estão relacionados ao uso de AINES e outros, mais raros, acometem pacientes que não fazem uso dessa classe de drogas nem estão infectados com *H. pylori*, o que exige pesquisas no sentido de melhor compreendê-los, bem como na tentativa de buscar alternativas economicamente viáveis para o manejo farmacológico dos mesmos.

2.5. Modelo experimental utilizado: lesões gástricas induzidas pela administração de solução hidroalcoólica acidificada

Lesões gástricas induzidas por etanol são produzidas de forma confiável e simples, através da administração intragástrica de quantidades variáveis (0,5-2,0 mL) de etanol concentrado (50 a 100%). Dependendo da quantidade administrada, cerca de 10 a 40% das regiões glandulares do estômago glandular de roedores tornam-se cobertas de erosões hemorrágicas quando examinadas 1 a 2 horas após a administração. Vários mecanismos estão envolvidos na injuria tecidual causada pelo etanol na mucosa gástrica, dentre eles: diminuição da produção de muco e prostaglandinas, bem como redução do fluxo sanguíneo local (GLAVIN e SZABO, 1992). Ainda, esse agente lesivo aumenta a produção de ROS e induz peroxidação lipídica na mucosa (REPETTO e LLESUY, 2002) o que causa diminuição na concentração tissular de glutationa. Esse último efeito se deve em parte à oxidação da glutationa pelas ROS ou à ligação da mesma ao acetaldeído gerado pela biotransformação do etanol (LOGUERCIO *et al.*, 1993). Dados de literatura sugerem, ainda, que o metabolismo de leucócitos atraídos para as regiões lesionadas contribui para geração de ROS, constituindo um mecanismo que potencializa o poder lesivo do etanol (HALLIWELL, 1994). Em conjunto, esses efeitos afetam diversos mecanismos de defesa da mucosa gástrica, o que faz com que o referido modelo seja largamente utilizado em estudos que objetivem definir os mecanismos de ação de compostos biativos detentores de efeitos gastroprotetores. Cabe

ressaltar que a administração de etanol associado a uma solução ácida intensifica os efeitos lesivos desse álcool (GLAVIN e SZABO, 1992).

2.6. Produtos naturais de origem vegetal como fonte de novas drogas

O uso de plantas no tratamento de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), quase 65% da população mundial ainda utiliza plantas medicinais como modalidade primária de cuidados à saúde (FABRICANT e FARNSWORTH, 2001). Esse tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores de diversas áreas do conhecimento, tais como botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas possibilitam a obtenção de informações importantes, do ponto de vista terapêutico, a partir de uma fonte medicinal abundante: a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002). No Brasil, as plantas medicinais são amplamente utilizadas em áreas rurais e urbanas. A maioria é usada de acordo com a tradição popular desenvolvida por nativos ou que foi trazida ao país pelos europeus, africanos e asiáticos. Os vegetais são usados em preparações caseiras, como chás, tinturas, xaropes e pós, ou, menos frequentemente, os produtos naturais são utilizados pelas empresas farmacêuticas no preparo de medicamentos fitoterápicos (RATES, 2001).

A grande biodiversidade do território brasileiro coloca nosso país em uma posição estratégica no que tange à exploração e ao desenvolvimento racional e sustentado do uso de novos metabólitos com valor terapêutico (BASSO *et al.*, 2005). O Cerrado possui a flora mais rica dentre as savanas do mundo, com alto nível de endemismo. As taxas de desmatamento no Cerrado têm sido historicamente superiores às da floresta Amazônica e o esforço de conservação do bioma é muito inferior ao daquela: apenas 2,2% da área do Cerrado se encontram legalmente protegida (KLINK e MACHADO, 2005). A situação atual de exploração da vegetação mundial pode levar à extinção de algumas espécies, o que significa não só a perda de compostos químicos de interesse terapêutico, mas também a perda de patrimônio genético, o qual poderia ser utilizado no melhoramento e/ou biossíntese de novos compostos. Portanto, é crucial, tanto para o desenvolvimento de áreas com rica flora, como a Ásia e América Latina, quanto para a indústria farmacêutica, proteger e promover a exploração racional da biodiversidade como fonte de compostos químicos que tenham atividade biológica direta, ou que

possam ser utilizados no planejamento racional de novos medicamentos (RATES, 2001).

Dentre os tipos de abordagens empregadas na seleção de espécies vegetais para estudos farmacológicos, três se destacam: a abordagem randômica, a abordagem taxonômica/quimiotaxonômica (filogenética) e a abordagem etnofarmacológica. Na abordagem randômica escolhe-se a planta sem qualquer critério, sendo o fator determinante a disponibilidade de material vegetal; na abordagem taxonômica/quimiotaxonômica, a espécie é selecionada com base em informações de ocorrência de um dado efeito e/ou classe química de substâncias em um gênero ou família; por fim, na abordagem etnofarmacológica a espécie é selecionada a partir de relatos, por grupos étnicos, do uso de determinada planta com finalidade terapêutica (MACIEL *et al.*, 2002).

2.7. Espécies estudadas

A família botânica Myrtaceae comprehende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies distribuídas predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (BARROSO, 1991). De fato, várias mirtáceas são empregadas principalmente em distúrbios gastrointestinais, doenças hemorrágicas e infecciosas; as partes mais utilizadas são as folhas, cascas e frutos (CRUZ e KAPLAN, 2004). Vários membros da família Myrtaceae foram estudados e apresentam atividade gastroprotetora (MADALOSSO *et al.*, 2012; MARKMAN, BACCHI e KATO, 2004; CHATURVEDI *et al.*, 2007; SUMBUL *et al.*, 2010; ISHIKAWA *et al.*, 2008; AGBAJE, 2008; SANTIN *et al.*, 2011; RAMIREZ e ROA Jr, 2003), sugerindo que esta propriedade farmacológica possa ser uma característica comum aos membros desse taxa.

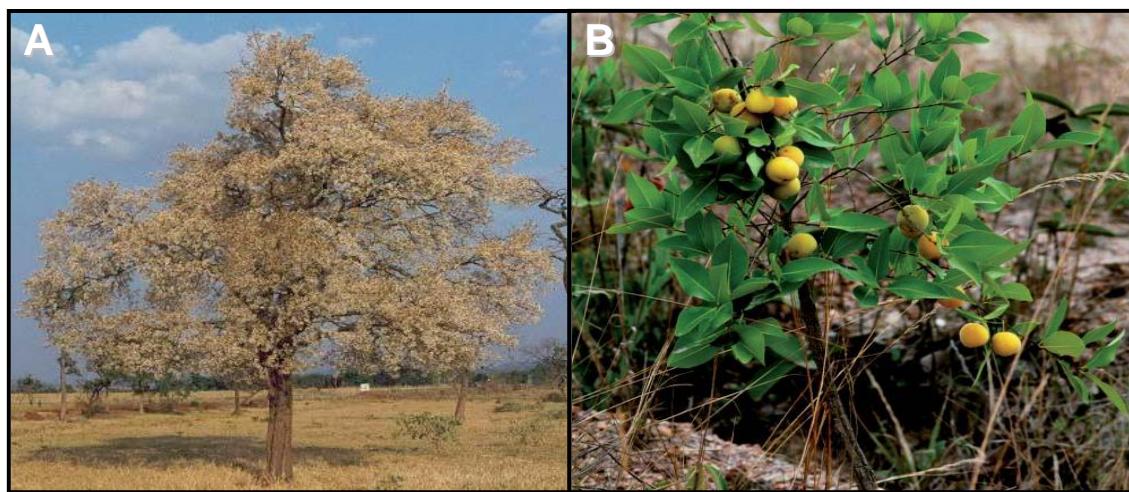
Assim, utilizamos a abordagem taxonômica para selecionar duas espécies da família Myrtaceae, de ocorrência no Cerrado mineiro, a *Eugenia dysenterica* DC. e a *Campomanesia pubescens* O. Berg. com o objetivo de determinar suas propriedades gastroprotetoras. Ainda, investigamos os possíveis mecanismos e metabólitos secundários envolvidos na instalação dos efeitos citoprotetores da mucosa gástrica.

2.7.1. *Eugenia dysenterica*

A *Eugenia dysenterica*, popularmente conhecida como cagaita ou cagaiteira, é uma árvore de altura mediana (4 a 10 metros) (Figura 6). Essa espécie ocorre naturalmente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Maranhão, Piauí e Goiás, além do Distrito Federal (CORRÊA, 1984; BRITO *et al.*, 2003). A principal importância econômica da cagaiteira se dá pelo potencial alimentício de seus frutos e pela extração de cortiça. Ainda, suas folhas são usadas tradicionalmente no tratamento de diarreia, desordens dos sistemas cardiovasculares, geniturinário e, por fim, como cicatrizante (CRUZ e KAPLAN, 2004).

Estudos recentes fornecem respaldo, ao menos parcial, para alguns dos efeitos descritos pela população (Tabela 1). Lima *et al.* (2010) demonstraram que a atividade antidiarreica do extrato etanólico das folhas de *E. dysenterica* está associada à inibição da motilidade gastrintestinal em ratos. Ainda, o extrato de *E. dysenterica* possui atividade inibitória sobre as enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase, indicando um possível papel no tratamento de diabetes (SOUZA *et al.*, 2012a).

Figura 6. Imagens ilustrativas da *Eugenia dysenterica*.



(A) A *E. dysenterica* (cagaita ou cagaiteira) é uma árvore de ocorrência no Cerrado com 4-10 metros de altura; (B) seus frutos quando maduros possuem cor amarelada, sendo utilizados na alimentação pela população, enquanto suas folhas são usadas no tratamento de diarréias. Fonte: Chaves e Telles, 2006.

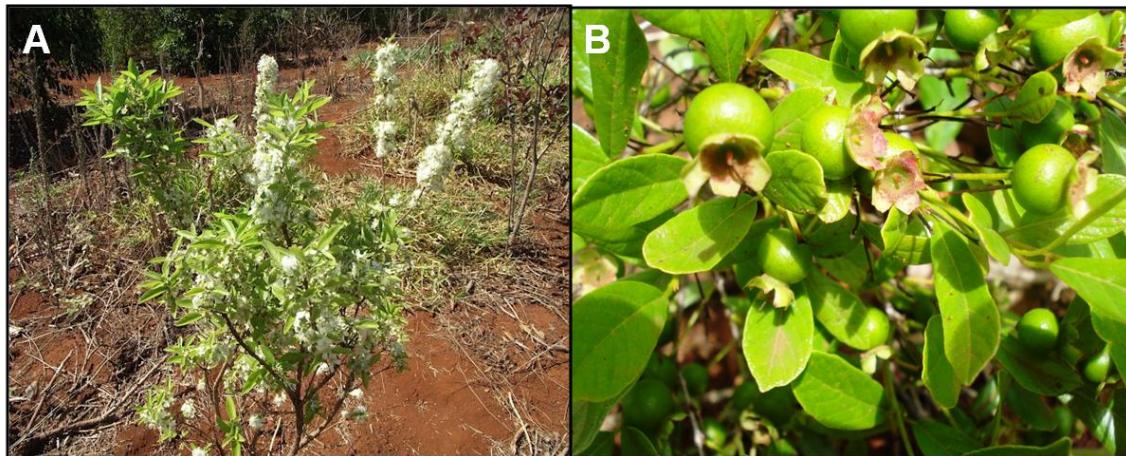
Tanto o nome vulgar quanto o nome científico da espécie se referem à propriedade laxativa de seus frutos, fato relatado por populações que consomem os mesmos. Esta propriedade se manifesta, principalmente, após a ingestão de frutos maduros e em início de fermentação. O efeito laxativo dos frutos foi recentemente demonstrado em ratos e parece estar relacionado à ação de um peptídeo ainda não identificado presente nos mesmos (LIMA *et al.*, 2010). O óleo essencial das folhas, rico em sesquiterpenos, como o β -cariofileno e o α -humuleno, e em monoterpenos, como o limoneno e o alfatujeno, apresenta atividade antifúngica (COSTA *et al.*, 2000). Com relação à atividade gastroprotetora, existem apenas dados preliminares do nosso laboratório, os quais evidenciaram o efeito citoprotetor do extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas de *E. dysenterica* sobre a mucosa gástrica em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina (JUNQUEIRA *et al.*, 2007). Contudo, os mecanismos responsáveis por tais efeitos, bem como os possíveis compostos envolvidos, permanecem por serem elucidados.

2.7.2. *Campomanesia pubescens*

As plantas do gênero *Campomanesia*, popularmente conhecidas como guavira ou gabiroba estão presentes em abundância em regiões de Cerrado. A espécie *Campomanesia pubescens* é um arbusto caducifólio de 1 a 2 metros de altura (Figura 7). Sua floração ocorre de agosto a setembro e os frutos amadurecem em novembro-dezembro, apresentando polpa suculenta de sabor acidulado (LORENZI *et al.*, 2006). Os frutos são redondos, de cor verde quando jovens e amarelos quando maduros. São usados no preparo de doces, sorvetes e licores. A infusão das folhas é usada na medicina tradicional no tratamento da diarreia (PIVA, 2002).

O óleo essencial das folhas de *C. pubescens* contém monoterpenos, principalmente limoneno e sesquiterpenos (SILVA, CARDOSO e RE-POPPI, 2009). No extrato hexânico das folhas foram identificados triterpenos e sesquiterpenos. A espécie conta com poucos estudos acerca de suas propriedades farmacológicas, não havendo relatos de ações gastroprotetoras (Tabela 1). Entretanto, cabe salientar que existem evidências, também preliminares, de que outras espécies de *Campomanesia* (*C. xanthocarpa* e a *C. lineatifolia*) apresentam ação citoprotetora sobre a mucosa gástrica (MARKMAN, BACCHI e KATO, 2004; MADALOSO *et al.*, 2012).

Figura 7. Imagens ilustrativas da *Campomanesia pubescens*.



(A) A *C. pubescens* (gabiroba) é um arbusto de 1-2 metros de altura de ocorrência no Cerrado; (B) os frutos jovens são verdes e tornam-se amarelhados quando maduros, são consumidos pela população *in natura* ou na forma de licores, sorvetes ou doces. Ainda, suas folhas são utilizadas tradicionalmente no tratamento de diarreia. Fonte: Plantas do Cerrado (2013)

2.8. Compostos bioativos

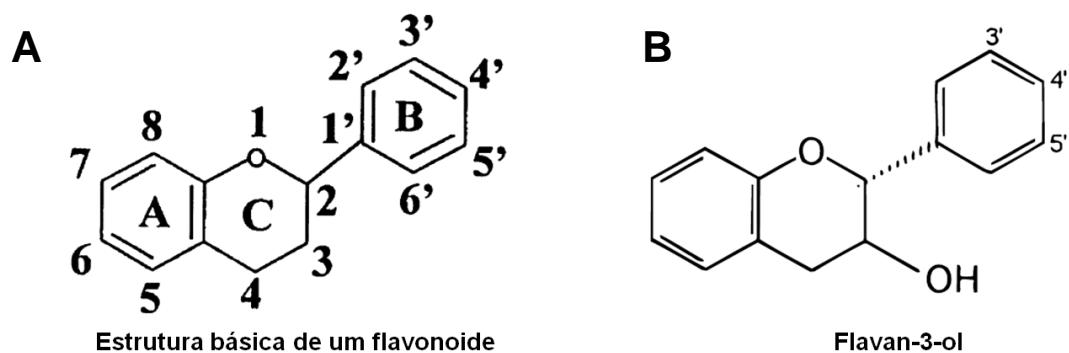
Os metabólitos vegetais podem ser classificados em primários e secundários, na dependência ou não destes serem essenciais para o metabolismo das plantas, bem como estarem universalmente presentes. Assim, a distribuição dos metabólitos secundários varia de planta para planta e sua ausência não compromete a sobrevivência das células. De acordo com a via biosintética que os origina, os metabólitos secundários podem ser agrupados em 3 grandes famílias: os compostos fenólicos (estruturas aromáticas que contém um ou mais grupos hidroxílicos: -OH), os terpenos e esteroides (formados a partir de unidades isoprénicas, detentoras de 5 átomos de carbono), e os alcaloides (bases orgânicas que possuem 1 átomo de nitrogênio usualmente ligado a estruturas cíclicas constituídas de 5-6 átomos de carbono). Cabe salientar que, existe uma miscelânea de outros compostos que não se enquadra nessa classificação geral, e que o efeito farmacológico de produtos de origem vegetal está relacionado, na maioria das vezes, à ação de substâncias oriundas do metabolismo secundário (HARBORNE, BEXTER e MOSS, 1999). Devido à importância para a compreensão do presente estudo, destacamos os compostos fenólicos, os quais constituem um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal.

Tabela 1. Resumo de algumas atividades descritas na literatura para *E. dysenterica* e *C. pubescens*

<i>Eugenia dysenterica DC.</i>				
Atividade	Veículo/Parte Utilizada	Método	Resultado	Referência
Antidiarréica	Extrato etanólico/ Folhas	<i>In vivo</i> , modelo de motilidade intestinal	Positivo	LIMA <i>et al.</i> , 2011
Antifúngica	Óleo essencial/Folhas	<i>In vitro</i> , diluição em ágar	Positivo	COSTA <i>et al.</i> , 2000
Laxativa	Extrato rico no peptídeo específico /Frutos	<i>In vivo</i> , modelo de motilidade intestinal	Positivo	LIMA <i>et al.</i> , 2010
Antidiabetes	Extrato aquoso, etanólico e hexânico/ Folhas	<i>In vitro</i> , modelo de inibição da α -amilase e α -glicosidase	Positivo	SOUZA <i>et al.</i> , 2012a
Genotoxicidade	Extrato etanólico/Folhas	<i>In vivo</i> , modelo de avaliação de eritrócitos policromático micronucleados	Positivo	VIEIRA <i>et al.</i> , 2012
Citotoxicidade	Extrato etanólico/Folhas	<i>In vivo</i> , modelo de avaliação de eritrócitos normo e policromáticos	Positivo	VIEIRA <i>et al.</i> , 2012
Antiviral	Extrato etanólico/Folhas	<i>In vitro</i> , inibição citopática do rotavírus em células em cultura	Positivo	CECÍLIO <i>et al.</i> , 2012
Antimelanogênese (inibição da tirosinase)	Extrato aquoso, etanólico e hexânico	<i>In vitro</i> , modelo de inibição da tirosinase	Positivo	SOUZA <i>et al.</i> , 2012b
<i>Campomanesia pubescens O. Berg.</i>				
Antioxidante	Extrato hexânico/ Folhas	<i>In vitro</i> , modelo por DPPH*	Muito discreto	CARDOSO <i>et al.</i> , 2008
Antimicrobiano	Extrato hexânico/ Folhas	<i>In vitro</i> , modelo de microdiluição para <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella setubal</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Positivo	CARDOSO <i>et al.</i> , 2010

Milhares de estruturas fenólicas são atualmente conhecidas e aproximadamente metade destas é representada por flavonoides. Esses últimos são formados a partir da unidade fundamental 2-fenilbenzopirona, a qual apresenta dois anéis fenólicos (A e B), ligados por uma ponte constituída de 3 átomos de carbonos (anel C; figura 8A) (HARBORNE, BEXTER e MOSS, 1999). De acordo com pequenas alterações na estrutura da 2-fenilbenzopirona, os flavonoides podem ser classificados em diferentes classes, das quais ressaltamos os flavanóis, um grupo que possui -OH ligados à estrutura fundamental, como por exemplo, o flavan-3-ol (Figura 8B). Outro grupo importante de compostos polifenólicos são os taninos, os quais são solúveis em água e apresentam pesos moleculares que variam de 500 a 3000 Daltons. Do ponto de vista químico, os taninos são divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis (ésteres de ácido gálico, ácido elágico e glicosídeos) e taninos condensados ou proantocianidinas (polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol) (DeJESUS *et al.*, 2012).

Figura 8. Estruturas básicas de um flavonoide e do seu derivado flavan-3-ol (um flavanol).

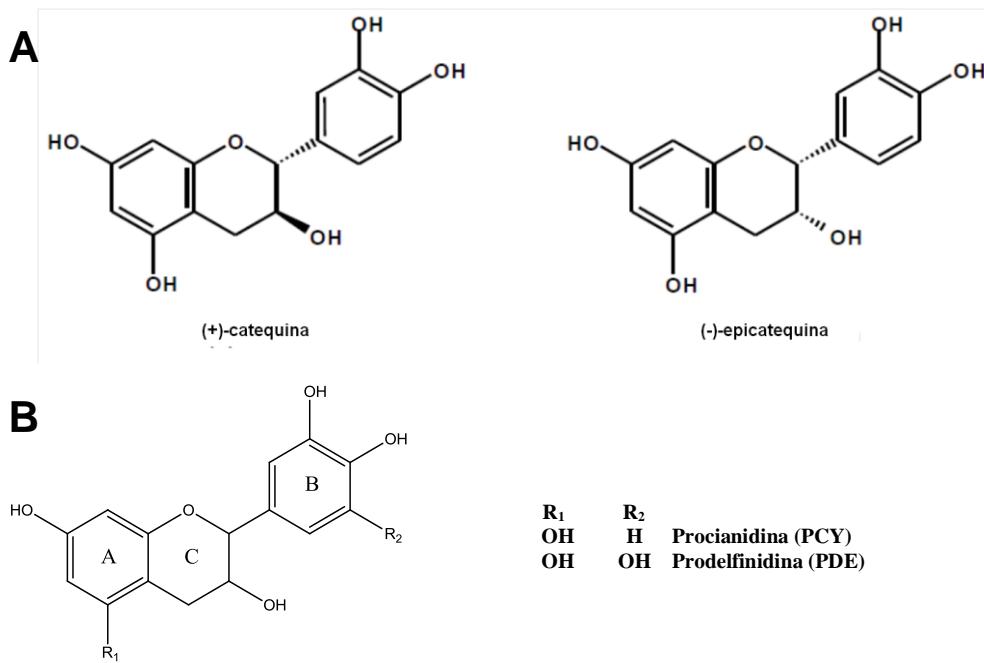


(A) Flavonoides possuem como estrutura básica 2 anéis aromáticos (A e B) ligados por uma estrutura com 3 carbonos (C). Os flavonoides variam de acordo com a hidroxilação de seus radicais, conjugação entre os anéis aromáticos, etc. (B) Assim, o flavan-3-ol é uma variante que possui uma hidroxila ligada à estrutura fundamental. A polimerização dessas estruturas básicas formam taninos condensados e outros complexos moleculares importantes. Fonte: Heim *et al.* (2002) em A e Pietta (2000) em B.

Muitas proantocianidinas são formadas a partir dos flavanóis (+)-catequina e (-)-epicatequina (8A); quando o anel B de um dos monômeros de (+)-catequina ou de (-)-epicatequina forem hidroxilados nas posições 3',4', os taninos condensados formados a partir da polimerização dos mesmos são denominados de procianidinas; quando os taninos condensados forem formados por pelo menos uma unidade contendo o anel B

tri-hidroxilado nas posições 3',4',5', os mesmos passam a ser denominados de prodelfinidinas. Portanto, do ponto de vista estrutural, as procianidinas se diferem das prodelfinidinas apenas pela presença de um -OH no anel B (Figura 9B). Ainda, de acordo com as ligações estabelecidas entre os monômeros, as procianidinas podem ser subdivididas em dois tipos, A e B; nas procianidinas do tipo-A, os carbonos 2 e 4 de um dos monômeros se une ao oxigênio da hidroxila de posição 7 e ao carbono de posições 6 ou 8, respectivamente, do outro monômero (Figura 10); nas procianidinas do tipo-B, as ligações ocorrem entre o carbono 4 de um monômero com o carbono 6 ou 8 do outro (Figura 10). Procianidinas do tipo-B representam uma classe dominante de proantocianidinas diméricas naturais. Cabe salientar que, dependendo do arranjo de unidades (+)-catequina e (-)-epicatequina, as procianidinas podem ser classificadas, ainda, em B1 [(-)-epicatequina → (+)-catequina], B2 [(-)-epicatequina → (-)-epicatequina], B3 [(+)-catequina → (+)-catequina] e B4 [(+)-catequina → (-)-epicatequina] (XIE e DIXON, 2005).

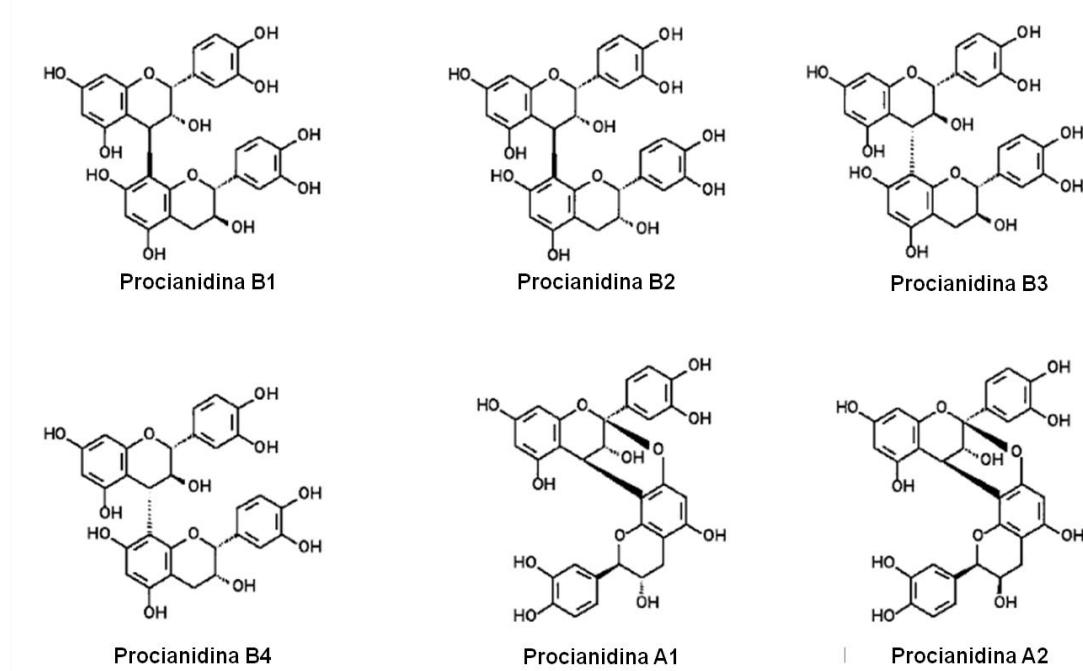
Figura 9. Estruturas dos monômeros e oligômeros constituintes de proantocianidinas.



(A) Estruturas dos monômeros de proantocianidinas (+)-catequina e (-)-epicatequina que, ao se polimerizarem em homo ou hetero-oligômeros, formam procianidinas e prodelfinidinas (B), as quais se diferenciam pelo padrão de hidroxilação de seus radicais. Fonte: Hurst *et al.* (2011) em A e a autora em B.

Os taninos apresentam importância tanto farmacológicas quanto nutricionais, sendo que a maioria dos estudos sobre a atividade biológica desses compostos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foram efetuados com catequinas monoméricas ou com extratos de plantas contendo tanto catequinas quanto taninos condensados. Uma característica dos taninos é sua capacidade de precipitar proteínas, além disso, como todo composto fenólico, essa classe de substâncias forma complexos cromogênicos com sais de Fe³⁺ (SCHOFIELD, MBUGUA e PELL, 2001). Essas propriedades explicam, ao menos em parte, o efeito antinutricional dos taninos bem como, o porquê dos mesmos serem os responsáveis pelo sabor adstringente de muitos produtos naturais (ALBUQUERQUE, MONTEIRO e ARAÚJO, 2005).

Figura 10. Proantocianidinas diméricas do tipo-A e tipo-B.



Em procianidinas do tipo-A, os carbonos 2 e 4 (presentes no anel C) se ligam ao oxigênio da hidroxila da posição 7 e ao carbono 6 ou 8 do outro monômero (presente no anel A), respectivamente (procianidina A1 e A2). Por outro lado, em procianidinas do tipo-B, as ligações ocorrem entre o carbono 4 de um monômero com o carbono 6 ou 8 do outro monômero (procianidina B1-B4). Note que a diferença entre os subtipos de procianidina B relacionam-se aos tipos de monômeros que participam da sua formação [(+)-catequina e/ou (-)-epicatequina].
Fonte: XIE e DIXON, 2005.

3. OBJETIVOS

1. Avaliar a atividade gastroprotetora dos extratos aquosos liofilizados das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens* utilizando o modelo de indução de úlcera por administração de solução hidroalcoólica acidificada;
2. Avaliar a presença de compostos polifenólicos e de taninos nos extratos aquosos liofilizados das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens*;
3. Avaliar a possível participação de taninos no efeito gastroprotetor induzido pela administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*;
4. Identificar os compostos polifenólicos e os taninos presentes no extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*;
5. Avaliar a ação antioxidante do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* *in vitro*;
6. Avaliar o efeito da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* sobre a secreção de ácido clorídrico utilizando o modelo de ligadura do piloro;
7. Avaliar a participação de compostos sulfidrílicos endógenos e do NO na gastroproteção induzida pela administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Drogas e reagentes

A carbenoxolona, NEM (N-etilmaleimida), L-NAME (cloridrato de N^ω-nitro-L-arginina-metil-ester), 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH[•]) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (EUA). A cimetidina foi obtida da Fluka Analytical (EUA), o tiopental sódico da Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, a xilazina do Sespo Indústria e Comércio Ltda e a cetamina da Rhobiofarma Indústria Farmacêutica Ltda. Os demais reagentes utilizados no trabalho foram fornecidos pela Universidade Federal de Uberlândia e apresentavam grau de pureza analítico.

4.2. Material vegetal

As folhas de *E. dysenterica* e da *C. pubescens* foram coletadas sempre após o período de floração e frutificação de cada espécie, respectivamente, nos municípios de Lassance (georreferenciamento: 17° 59' 14,23'' S e 44° 44' 38,00'' W) e Ituiutaba (georreferenciamento: 19° 04' 18,96'' S, 49° 46' 49,8'' W), ambos no Estado de Minas Gerais, Brasil. A *E. dysenterica* foi identificada pela Dra. Adriana Arantes e a *C. pubescens* pela Esp. Francyelen Fernandes de Souza Faria. Exsicatas de ambas as espécies foram depositadas no Herbarium da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia, MG, Brasil) com o número HUFU-45956 (*E. dysenterica*) e HUFU-65522 (*C. pubescens*).

4.3. Preparação dos extratos aquosos

As folhas foram separadas dos galhos e lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida foram banhadas em álcool 70% por 10 min e posteriormente imersas em hipoclorito de sódio 0,2% por 5 min, sendo lavadas novamente em água corrente e colocadas em estufa (Nova Ética[®]) a 40° durante 2 dias para secagem. Depois de secas as folhas foram trituradas em liquidificador e pesadas. O material processado foi colocado em provetas contendo água destilada na proporção de 20% (m/v). A extração foi realizada a temperatura ambiente durante 48 h. Posteriormente, o líquido foi

duplamente filtrado, inicialmente em um funil contendo algodão e em seguida contendo papel de filtro. O extrato obtido foi colocado em tubos Falcon® de 50 mL e acondicionado a -20°C. Então, o material congelado foi submetido à liofilização a -34°C (Liofilizador L101, Liotop®) até a total remoção do conteúdo de água e acondicionado em freezer a -20° até o uso. O rendimento obtido foi de cerca de 0,71% de extrato liofilizado.

4.4. Análises fitoquímicas

4.4.1. Detecção de compostos polifenólicos e de taninos no extrato aquoso liofilizados das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens*

A presença de compostos polifenólicos e de taninos foi detectada através da reação das amostras do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* com FeCl₃ e gelatina, respectivamente. As amostras do extrato liofilizado das folhas de *C. pubescens* foi submetido apenas à reação com gelatina. O método utilizado foi descrito por Costa (2000), com algumas modificações: a uma solução de extrato (1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 50 mg/mL) foi adicionada uma gota de HCl (10%), posteriormente, foi adicionada, gota a gota, uma solução de gelatina (2,5% em 10% de NaCl) para verificar a formação de precipitado. Ainda, uma solução de FeCl₃ (1%) foi adicionada, gota a gota, a 5 mL do extrato de *E. dysenterica* (1 mg/mL). A solução foi monitorada para a observação do desenvolvimento de coloração verde-escuro ou azul-escuro, bem como para a observação da formação de precipitado.

4.4.2. Comparação da capacidade de complexação do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens* com Fe³⁺

A presença de compostos polifenólicos nos extratos aquosos liofilizados das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens* foi detectada através da sua capacidade de complexação com Fe³⁺ e desenvolvimento de coloração. Assim, em 1 mL de FeCl₃ (0,01% em 0,01M de HCl) foi adicionado 0,25 mL de solução de extrato (2,5 mg/mL) de *E. dysenterica* ou *C. pubescens*, obtendo, assim, uma concentração final de 0,5 mg/mL de extrato. Após 45 min, absorbância foi lida em espectrofotômetro (BEL

Photonics® SP 2000 UV) a 510 nm. O controle foi feito com 0,25 mL da respectiva solução de extrato (de *E. dysenterica* ou *C. pubescens*) e com 1 mL da solução de 0,01M de HCl, sem FeCl₃. Os dados foram apresentados como unidades de absorbância por mg de extrato.

4.4.3. Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-DAD-MS e UPLC-DAD-MS/MS)

As amostras foram solubilizadas em acetonitrila:água (1:1), mantidas em banho de ultrassom por 5 min e filtradas em filtro Millex® de 0,22 µm para serem analisadas por cromatografia líquida de ultraeficiência (UPLC, *Ultra-Performance Liquid Chromatography*). O cromatógrafo e espectrômetro de massas utilizados foram o UPLC-TQ Waters, modelo Acquity e a coluna cromatográfica C18 Shim-pack XR-ODS da Shimadzu (2,2 µm; 2,0 mm x 50 mm).

As condições de operação do espectrômetro de massas utilizadas foram as seguintes: N₂ como gás de nebulização, argônio como gás de colisão, temperatura do gás de nebulização de 350 °C, fluxo do gás de 6,5 L/h. As análises foram realizadas nos modos positivo e negativo.

A fase móvel empregada foi acetonitrila (B) e água deionizada (A) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, o gradiente utilizado está descrito na Tabela 1 e o volume de injeção foi de 5 µL.

Tabela 2. Gradiente de eluição utilizado nas análises por UPLC-DAD-MS das frações obtidas com diclorometano da amostra Ceres-04

Tempo (min)	Porcentagem de B*
0,01	5
0,9	5
5,1	20
8,5	100
9,2	100

*B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico; A: água deionizada com 0,1% de ácido fórmico

Os cromatogramas obtidos foram apresentados nos comprimentos de onda de 254, 280 e 320 nm.

4.4.4. Identificação dos constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* por MALDI-MS/MS

Foram utilizados o espectrômetro de massas UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF Instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Operado em *pulsed ion extraction* de 120 ns, frequência do laser de 1000 Hz, modo *reflectron*. Modo de ionização positiva.

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* foi analisado por MALDI-MS/MS. A amostra foi solubilizada em acetonitrila e água deionizada com 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético) na proporção 3:7. Uma alíquota de 10 µL desta amostra foi misturada a 10 µL de uma solução da matriz DHB (ácido 2,5-diidroxibenzóico, na concentração de 20 mg/mL) e 1 µL de solução de NaCl a 0,1 M. Em seguida, a solução foi homogeneizada e alíquotas de 1 µL destas soluções foram acondicionadas na placa de MALDI. Após a secagem, a placa foi introduzida no equipamento para a realização da análise.

4.5. Animais

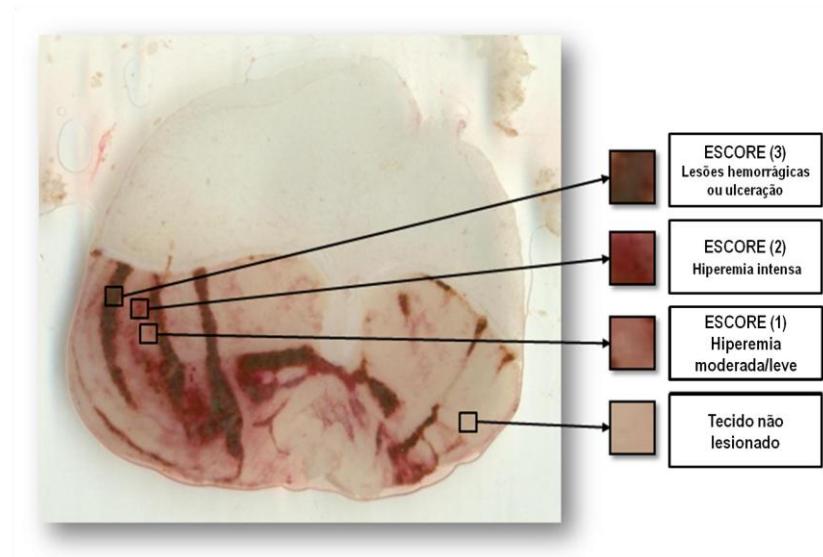
Os experimentos foram realizados utilizando camundongos Swiss machos (n= 5-10 animais) pesando entre 35-45 g, fornecidos pelo Instituto Vallée S.A. (Uberlândia-MG, Brasil). Os animais foram mantidos no depósito de animais da Área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ARFIS/ICBIM/UFU) em condições controladas de temperatura (21°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h). Os animais tiveram livre acesso à água filtrada e ração comercial (Nuvilab®), exceto quando especificado. Todos os protocolos utilizados foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU); processo nº 022/11, adendo nº 175/11; anexo A.

4.6. Avaliação do efeito da administração dos extratos aquosos liofilizados das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens* sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol

O modelo de lesões gástricas induzidas por solução hidroalcoólica acidificada (MIZUI e DOUTEUCHI, 1983) foi utilizado para avaliar as atividades citoprotetoras do extrato das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens*. Os camundongos foram divididos em 6 grupos ($n = 6-10$) e mantidos em jejum por 24 h antes da administração intragástrica, utilizando de uma agulha de gavagem, (volume: 0,8 mL) de salina (0,9% NaCl), carbenoxolona (250 mg/kg) ou dos extratos (100, 300, 550 e 1000 mg/kg). A carbenoxolona, usada nesse trabalho como controle positivo, é um triterpenoide semissintético obtido da *Glycyrrhiza glabra* e seus efeitos gastroprotetores estão relacionados com as prostaglandinas endógenas, bem como com o aumento da secreção de HCO_3^- e muco (CHAVEZ-PINÃ *et al.*, 2011). 50 min após os tratamentos, todos os animais receberam, via oral, 0,26 mL de uma solução hidroalcoólica acidificada (0,3 M de HCl/etanol 60%). Depois de 1 h os animais anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg, i.p.) foram mortos por deslocamento cervical. Foi realizada laparatomia para a remoção dos estômagos, os quais foram abertos através da curvatura maior, lavados em salina e montados entre duas placas de vidro. O material foi escaneado com o Scanner HP Scanjet 2400. O software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi usado para analisar as imagens dos estômagos e os resultados obtidos foram expressos como índice de úlcera (I.U.).

Para calcular o I.U., as lesões gástricas foram classificadas e receberam escores de acordo com a severidade das mesmas, da seguinte maneira: área de lesões hemorrágicas ou ulceração propriamente dita (3), área de hiperemia intensa (2) e área de hiperemia moderada/leve (1) (Figura 11). O I.U. foi então determinado conforme previamente descrito (SZELENYI e THIEMER, 1978) com pequenas modificações: I.U.= 3 X área de lesão hemorrágica (mm^2) + 2 X área de hiperemia intensa (mm^2) + 1 X área de hiperemia moderada/leve (mm^2).

Figura 11. Escore estabelecido para classificação das lesões gástricas.



Classificação das lesões da mucosa gástrica induzidas por HCl/etanol em escores. A área de lesão hemorrágica ou ulcerativa recebeu o escore 3, enquanto que a área de hiperemias intensas e áreas de hiperemias moderadas/leves receberam os escores 2 e 1, respectivamente. Fonte: a autora.

4.7. Avaliação do efeito da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*, com diminuição do conteúdo de taninos, sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol

Para avaliar se os taninos eram os componentes do extrato responsáveis pelo efeito gastroprotetor, os mesmos foram parcialmente extraídos como previamente descrito por Karamać (2009), com pequenas modificações. Assim, 1,5 mL de solução de gelatina (2,5%) em tampão acetato (0,2 M, pH 5,0 com 0,17 M de NaCl) foi adicionada a 1,5 mL de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (80 mg/mL) e misturados cuidadosamente. Após 15 min, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. O extrato controle foi preparado adicionando-se 1,5 mL do mesmo (80 mg/mL) a 1,5 mL de tampão acetato sem gelatina.

O sobrenadante dos extratos tratados com gelatina ou o extrato controle foram utilizados no pré-tratamento de camundongos submetidos a jejum de 24 h (1,0 mL/40g

de animal, i.e., 1000 mg/kg), 30 min antes da administração da solução hidroalcoólica acidificada. Após 1 h, os animais foram então eutanasiados e tiveram seus estômagos removidos e analisados como descrito no item anterior.

4.8. Verificação da efetividade do método de precipitação de proteínas em remover compostos polifenólicos

Alíquotas de 20 µL de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (n=5), tratados ou não com gelatina como descrito no item anterior, foram adicionadas a 2980 µL de solução de FeCl₃ (0,01 M em HCl 0,01 M) e tiveram suas absorbâncias determinadas a 510 nm (BEL Photonics® SP 2000 UV) e comparadas com aquelas de alíquotas de extrato adicionadas apenas à solução de HCl (0,01 M). Note que a concentração final do extrato submetido à complexação com Fe³⁺ foi de 0,25 mg/mL. Os dados obtidos foram expressos como unidades de absorbância/miligrama de extrato.

4.9. Determinação da capacidade de ligação do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* com proteínas da mucosa gástrica e coloração com FeCl₃.

Animais controles foram sacrificados por deslocamento cervical após anestesia (tiopental sódico, 60 mg/kg) e os estômagos foram removidos e fixados em tampão fosfato com formalina 4%. Os cortes desparafinizados e hidratados foram tratados com uma solução de extrato das folhas de *E. dysenterica* (5%) por 60 min. Posteriormente, os cortes foram lavados com água destilada (3 vezes) e tratados com FeCl₃ (2%) por 15 min, lavados em água destilada, e, após imersão em soluções com concentrações crescentes de álcool e xileno, as lâminas foram montadas com goma Damar, como previamente descrito, com algumas modificações (PIZZOLATO e LILLIE, 1973). Não foi usada nenhuma contracoloração e as lâminas foram observadas em microscopia de luz.

4.10. Avaliação da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* sobre a secreção gástrica

O ensaio foi realizado segundo o método de Shay e Komarov (1945), com modificações. Os camundongos em jejum de 36h, com livre acesso a água, foram anestesiados (10 mg/kg xilazina e 100 mg/kg cetamina, i.p.) e submetidos à laparatomia para a posterior amarração do piloro. Em seguida, administrou-se, intraduodenalmente (0,5 mL), extrato das folhas de *E. dysenterica* (1000 mg/kg; maior dose capaz de produzir gastroproteção), cimetidina (100 mg/kg) ou salina (NaCl 0,9%) e o abdômen foi então suturado. 4h após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg, i.p.) e mortos por deslocamento cervical. O abdômen foi reaberto e realizou-se a amarração na porção final do esôfago, próximo ao diafragma, para remoção dos estômagos, cujos conteúdos foram coletados e pesados (mg); o volume do conteúdo gástrico foi corrigido para 5 mL com a adição de água destilada e a solução obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O pH foi determinado em pHâmetro (Gehaka® PG 2000) e a acidez total do sobrenadante foi determinada por titulação com NaOH (0,01 M) até atingir pH 7,0, utilizando fenolftaleína com indicador do ponto de viragem. A acidez livre e total foram expressas como valores de pH e/ou como microequivalentes de H⁺ por grama ($\mu_{eq}H^+/\text{g}$) de conteúdo gástrico, respectivamente.

4.11. Avaliação da participação de grupos sulfidrílicos endógenos e do NO na atividade gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*

Os experimentos foram conduzidos como descrito previamente por Arrieta *et al.* (2003), com pequenas modificações. Os camundongos foram mantidos em jejum de 24 h, com livre acesso à água e divididos em 6 grupos.

Para avaliar a participação dos compostos sulfidrílicos e do NO na gastroproteção produzida pela administração de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*, os camundongos foram pré-tratados com NEM (10 mg/kg, i.p.; bloqueador de grupos - SH), L-NAME (70 mg/kg, i.p.; inibidor da síntese de NO) ou salina (0,5 mL, i.p.). 30 min depois, os animais receberam os seguintes tratamentos por via oral (0,8 mL): salina, carbenoxolona (250 mg/kg) e extrato (1000 mg/kg). Decorridos 50 min, as lesões na mucosa gástrica foram induzidas como descrito no item 4.6 desse trabalho e após 1 h, os estômagos foram removidos e as lesões avaliadas como descrito no referido item.

4.12. Determinação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*

A atividade antioxidante do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* foi analisado *in vitro* através da sua capacidade de sequestrar o radical livre DPPH[•] (BRAND-WILLIAMS, CUVERLIER e BERSET, 1995). Para tanto, 0,5 mL de água ou do extrato dissolvido em água foram adicionados a 1,5 mL de solução etanólica de DPPH[•] de forma a obter as seguintes concentrações finais nos tubos de reação: 0,06 mM de DPPH[•]; 0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,3 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2,0 µg /mL, 3,0 µg/mL, 10 µg/mL ou 30 µg/mL de extrato.

Após um período de 30 min de incubação à temperatura ambiente, em condições de baixa luminosidade, a absorbância das amostras foi determinada a 510 nm. A diferença entre a absorbância de soluções contendo apenas DPPH[•] e àquelas contendo extrato e DPPH[•] foi então determinada. Os testes foram realizados em duplicatas, utilizando-se etanol como branco e ácido ascórbico como controle positivo. A concentração de extrato capaz de diminuir a absorbância das amostras em 50% (CI₅₀) foi calculada através de regressão não linear (equação hiperbólica) utilizando o software *GraphPad Prism*[®].

4.13. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média±erro padrão da média (EPM) e os resultados foram comparados através no teste “*t*” de Student ou através da análise de variância (ANOVA), conforme apropriado. A fim de identificar as diferenças entre os grupos foi utilizado o teste de Dunnett. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando P foi menor que 0,05.

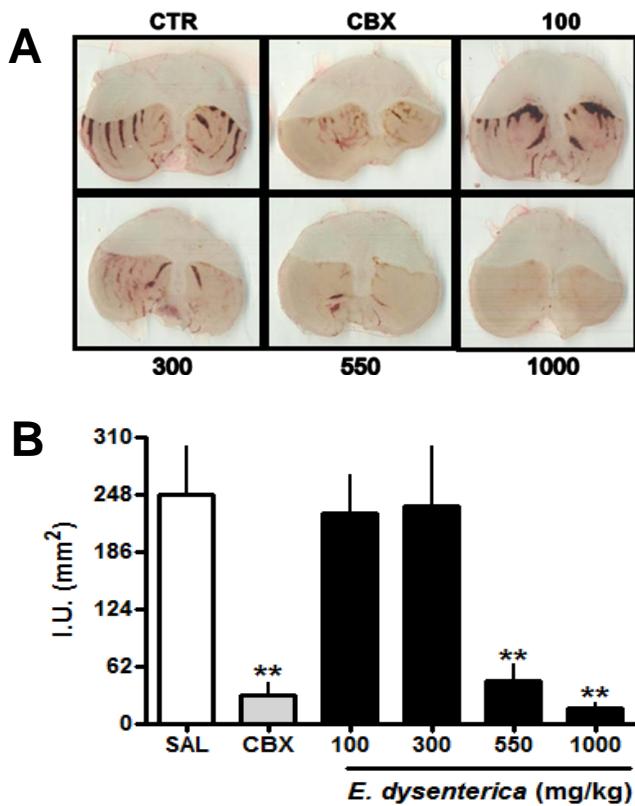
5. RESULTADOS

5.1. *Eugenia dysenterica*

5.1.1. Avaliação do efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* diminuiu o índice de úlcera (Figura 12A e 12B) de maneira dose-dependente. As doses de 550 e 1000 mg/kg diminuíram significativamente a formação de lesões gástricas, assim como a droga padrão, a carbenoxolona (250 mg/kg).

Figura 12. Efeitos gastroprotetores do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*.



(A) Imagens representativas das lesões induzidas na mucosa gástrica após administração de HCl/etanol em animais controles (SAL), tratados com carbenoxolona (CBX, 250 mg/kg, v.o.) ou com extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (100-1000 mg/kg, v.o.). (B) Índice de úlcera (I.U.) em mm² obtidos nos diferentes grupos. Os resultados representam a média±EPM, de 6-10 experimentos. *P<0,05 vs. controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

5.1.2. Avaliação do efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* sobre a secreção gástrica

A administração intraduodenal do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* ou de cimetidina diminuiu a acidez total e livre do suco gástrico de camundongos submetidos à ligadura pilórica (Tabela 3). No entanto, nem o extrato nem a cimetidina alteraram significativamente a massa do conteúdo gástrico.

Tabela 3. Efeitos da administração intraduodenal do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Eugenia dysenterica* (ED; 1000 mg/kg) ou de cimetidina (100 mg/kg) sobre o pH, quantidade de acidez livre e total do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura pilórica.

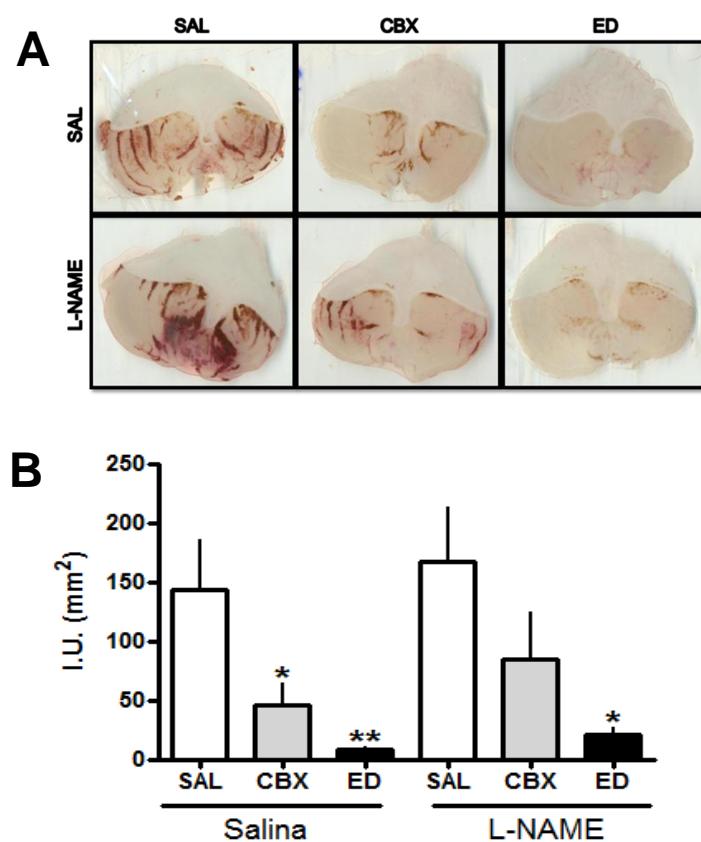
Parâmetros/Tratamentos	Controle	Cimetidina	ED
Conteúdo gástrico (g)	0,47±0,07	0,27±0,04	0,35±0,10
pH	3,41±0,20	5,77±0,54**	5,36±0,54**
Acidez livre ($\mu\text{eq H}^+/\text{g}$)	6,42±5,69	0,86±0,51*	2,21±1,55*
Acidez total ($\mu\text{eq H}^+/\text{g}$)	62, 60±7,6	36,0±7,0*	34,6±7,64*

Os valores representam a média±EPM de 5-8 experimentos. *P <0,05, **P<0,01 vs. controle (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

5.1.3. Avaliação da participação do NO na atividade gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (1000 mg/kg) diminuiu significativamente o índice de úlcera (Figura 13A e 13B) em camundongos pré-tratados com L-NAME. Já a carbenoxolona, na presença de L-NAME, teve seu efeito protetor sobre a mucosa gástrica significativamente diminuído.

Figura 13. Participação do óxido NO no efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*.

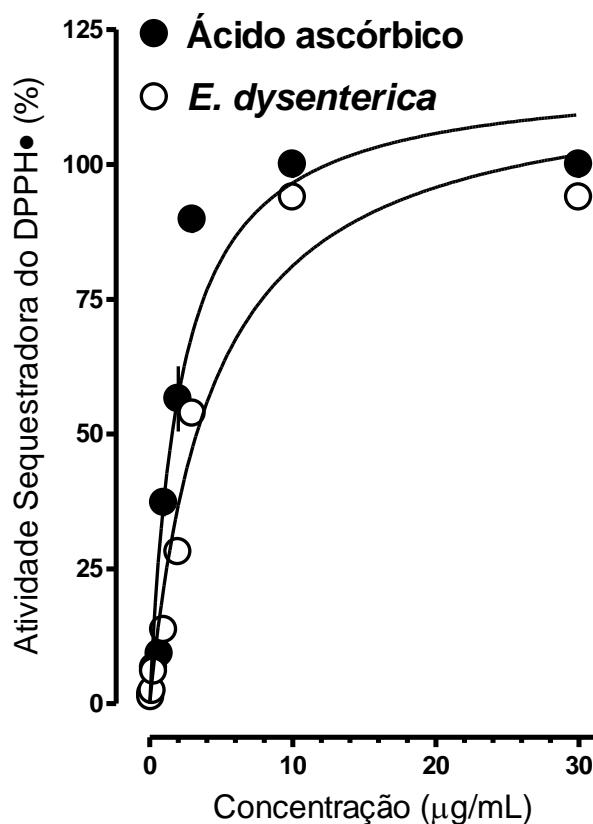


(A) Imagens representativas das lesões induzidas na mucosa gástrica após administração de HCl/etanol em animais controles, tratados com carbenoxolona (CBX, 250 mg/kg, v.o.) ou com extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (1000 mg/kg, v.o.); um grupo de animais foi pré-tratado com salina (SAL) e outro com L-NAME (70 mg/kg, i.p.), 30 min antes da administração do agente lesivo. (B) Índice de úlcera (I.U.) em mm² obtidos nos diferentes grupos. Os resultados representam a média±EPM, de 9-10 experimentos. *P<0,05 e **P<0,01 vs. seu respectivo controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

5.1.4. Determinação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* reduziu o DPPH[•] para um produto amarelado de maneira concentração-dependente e com quase metade a da potência do agente antioxidante padrão, o ácido ascórbico. A CI₅₀ do extrato foi de 3,97±0,05 µg/mL e do ácido ascórbico foi de 2,09±0,01 µg/mL (Figura 14).

Figura 14. Atividade antioxidante do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* e do ácido ascórbico.

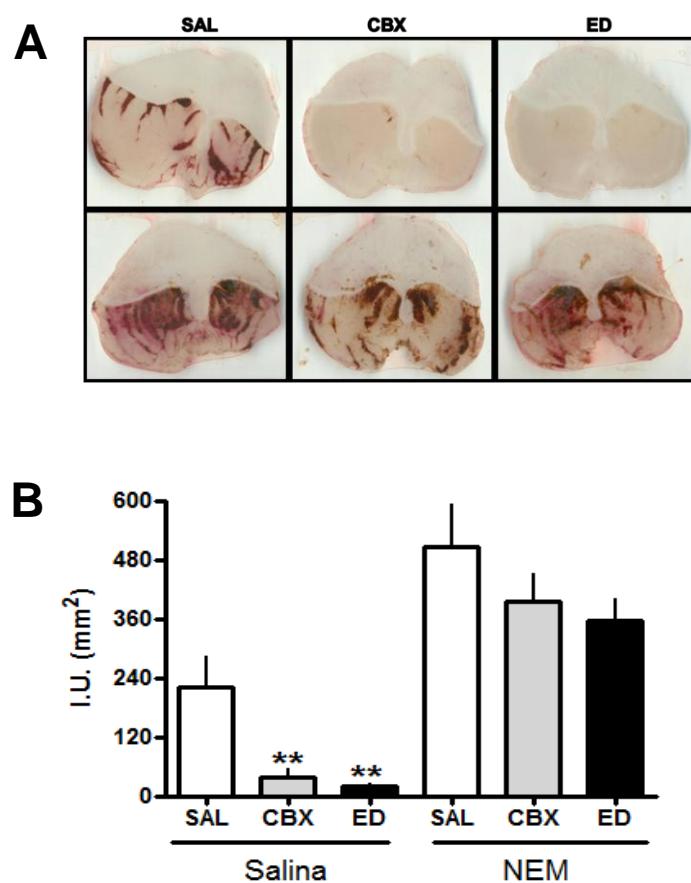


Curva dose-efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Eugenia dysenterica* e do ácido ascórbico sobre o sequestro de radicais DPPH[•] *in vitro*. Os valores representam a média±EPM de experimentos realizados em duplicatas e as curvas foram obtidas através de regressão não linear.

5.1.5. Avaliação da participação dos compostos sulfidrílicos endógenos na atividade gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (1000 mg/kg) e a carbenoxolona perderam suas capacidades de proteger a mucosa gástrica de lesões induzidas por solução hidroalcoólica acidificada (Figura 15A e 15B) em camundongos pré-tratados com NEM.

Figura 15. Participação de compostos sulfidrílicos endógenos no efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*.

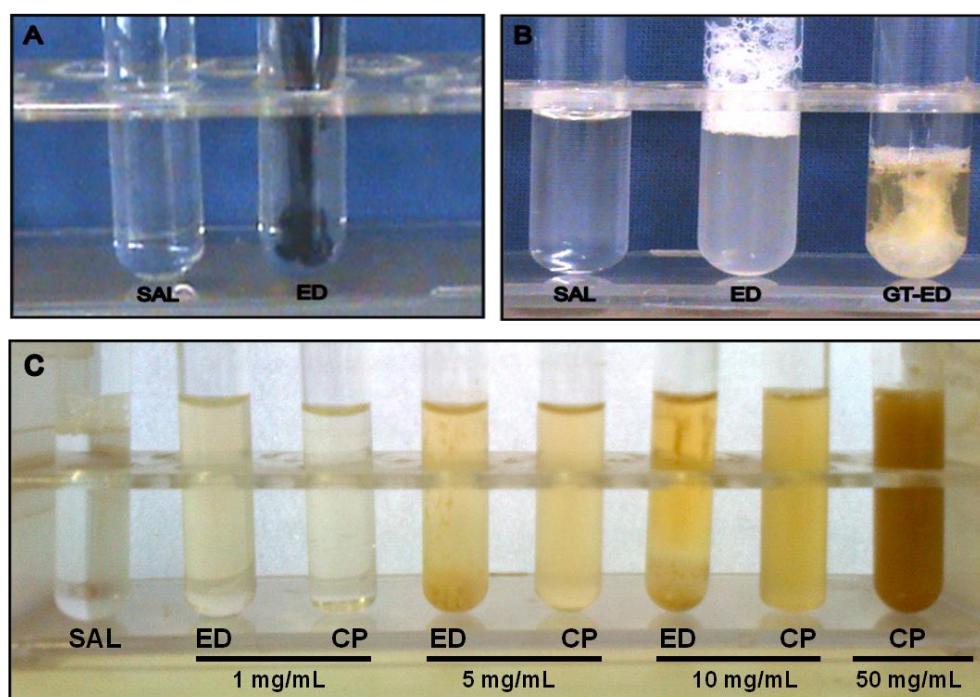


(A) Imagens representativas das lesões induzidas na mucosa gástrica após administração de HCl/etanol em animais controles, tratados com carbenoxolona (CBX, 250 mg/kg, v.o.) ou com extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (1000 mg/kg, v.o.); um grupo de animais foi pré-tratado com salina (SAL) e outro com NEM (10 mg/kg, i.p.), 30 min antes da administração do agente lesivo. (B) Índice de úlcera (I.U.) em mm^2 obtidos nos diferentes grupos. Os resultados representam a média±EPM, de 9-10 experimentos. ** $P<0,01$ vs. seu respectivo controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

5.1.6. Detecção de compostos polifenólicos e de taninos no extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens*

A adição de uma solução de FeCl₃ à solução de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* determinou o instantâneo desenvolvimento de coloração azul-escura na mesma (Figura 16A). A adição de gelatina a soluções de extratos aquosos liofilizados das folhas de *E. dysenterica* e de *C. pubescens* promoveu a formação de precipitados; porém, no extrato de *C. pubescens* a precipitação com gelatina foi evidente apenas nas doses mais altas (10 e 50 mg/mL), enquanto que no extrato de *E. dysenterica* a precipitação foi observada na dose de 1 mg/mL (Figura 16B e 16C).

Figura 16. Detecção de compostos polifenólicos e de taninos no extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens*.

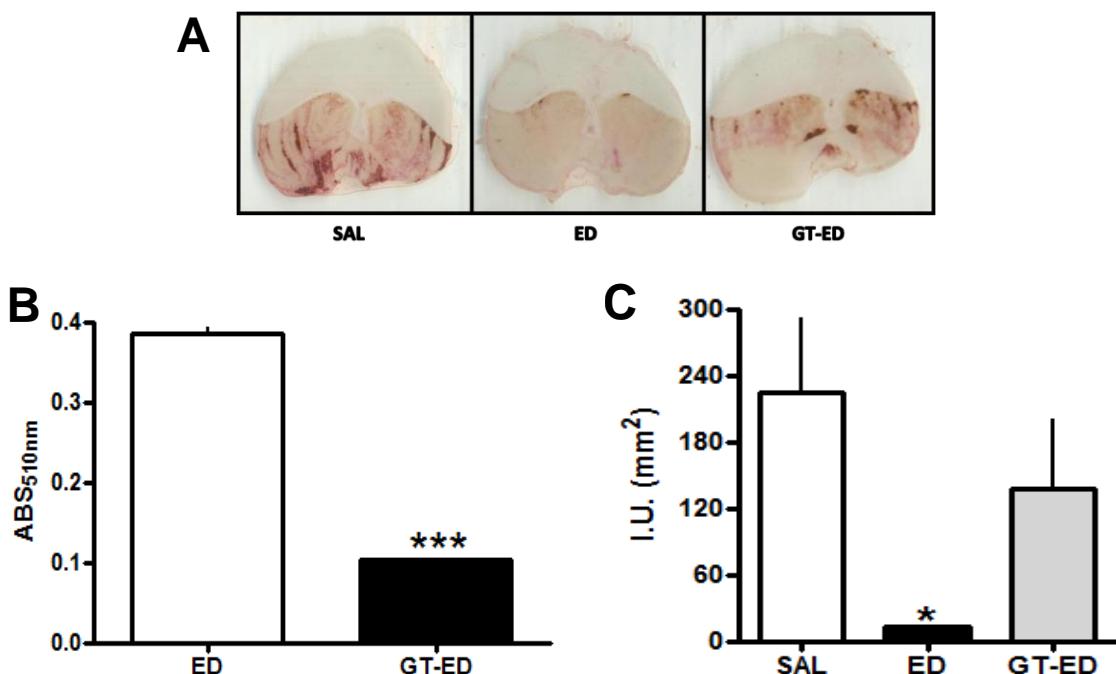


(A) Efeito da adição de FeCl₃ (1%) à solução salina (SAL) ou à solução de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (ED; 1 mg/mL). Observe que a solução desenvolveu uma coloração azul-escura, indicando a presença de compostos polifenólicos. (B) Detecção de taninos no extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (GT-ED) ou salina (SAL) após adição de gelatina (2,5% em 10% de NaCl). O controle foi preparado com a solução de extrato de *E. dysenterica* mais NaCl 10% (ED). Note que houve formação de precipitado em GT-ED, indicando a presença de taninos. (C) Efeito da adição de gelatina (2,5% em 10% de NaCl) à solução salina, à solução de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (1-10 mg/mL) ou à solução de extrato aquoso liofilizado das folhas de *C. pubescens* (CP, 1-50 mg/mL). Note que a precipitação em ED ocorre com concentrações menores (5 mg/mL) quando comparadas com CP (a partir de 10 mg/mL).

5.1.7. Avaliação do efeito da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*, com diminuição do conteúdo de taninos, sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol

A adição de gelatina (2,5%) a soluções de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (80 mg/mL), na proporção 1:1 (v/v), determinou: diminuição significativa da absorbância das mesmas em 510 nm, após a adição de FeCl₃ (Figura 17B); perda da atividade gastroprotetora do extrato (Figura 17A e 17C).

Figura 17. Efeitos da diminuição do conteúdo de taninos sobre a ação gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*.

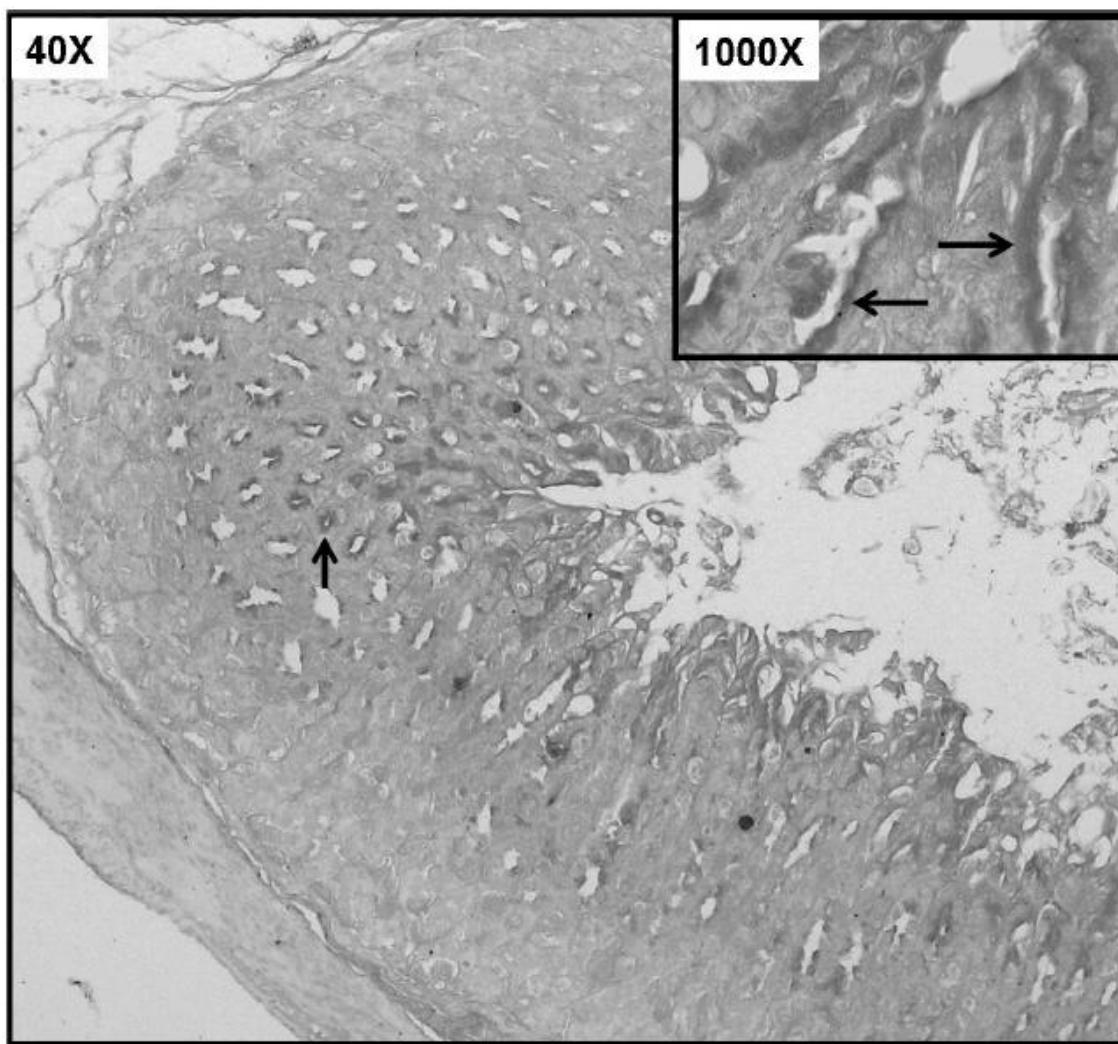


(A) Imagens representativas das lesões induzidas na mucosa gástrica após administração de HCl/etanol em animais controles (SAL) ou tratados com o extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (ED; 1000 mg/kg, v.o.); um grupo de animais recebeu o extrato submetido à precipitação com gelatina (GT-ED), o qual apresentou uma diminuição na absorbância em 510 nm (B). (C) Índice de úlcera (I.U.) em mm² obtidos nos diferentes grupos. Os resultados representam a média±EPM de 5-7 experimentos. *P<0,05 e ***P<0,001 vs. controle (teste “t” de Student em B e ANOVA seguido do teste de Dunnett em C).

5.1.8. Determinação da capacidade de ligação do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* com proteínas da mucosa gástrica e coloração com FeCl₃.

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* após a adição de FeCl₃ corou a superfície de células epiteliais com um cinza mais escuro que o restante do tecido gástrico fixado com formalina (Figura 18). Por outro lado, tanto o extrato de *E. dysenterica* quanto à solução de FeCl₃ sozinhos não foram capazes de corar a superfície epitelial das células (dados não apresentados).

Figura 18. Capacidade dos taninos do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* em se ligar à proteínas da mucosa gástrica.

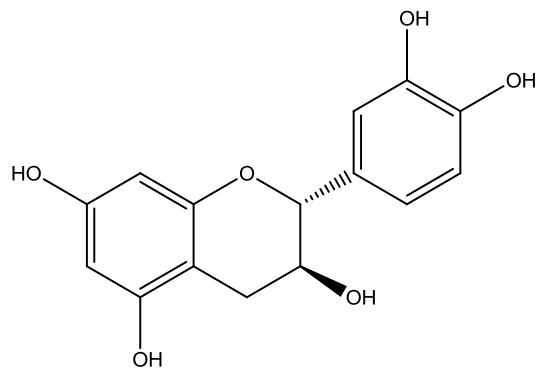


Cortes histológicos de tecido gástrico glandular de camundongos após o tratamento com o extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (5%) e posterior coloração com FeCl₃ (2%). Observa-se que a superfície das fossetas gástricas (setas), bem como a superfície epitelial foram coradas em cinza-escuro (n=2). Não foi realizada contracoloração.

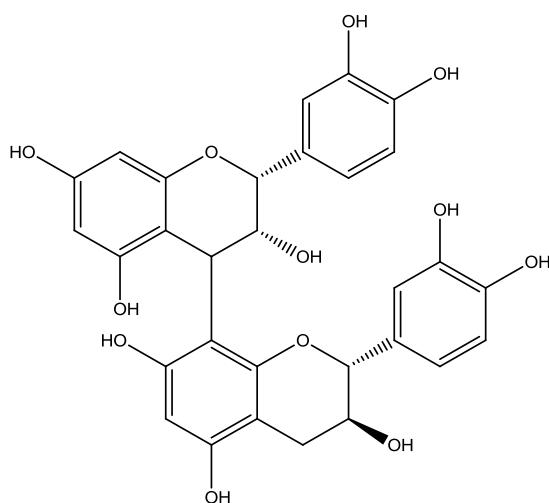
5.1.9. Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-DAD-MS e UPLC-DAD-MS/MS)

As análises do extrato aquoso de *E. dysenterica* pela cromatografia de ultraeficiência (UPLC) evidenciou a presença de três picos majoritários (Figura 20); estes picos foram identificados por espectrometria de massas e correspondem à procianidina B1, procianidina-O-galato e catequina, cujas estruturas moleculares estão apresentadas na Figura 19. A descrição analítica dos constituintes químicos está apresentada na Tabela 4 e os espectros das amostras estão apresentados no Apêndice A.

Figura 19. Estruturas químicas de dois dos três compostos identificados no extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* pela cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas.



Catequina



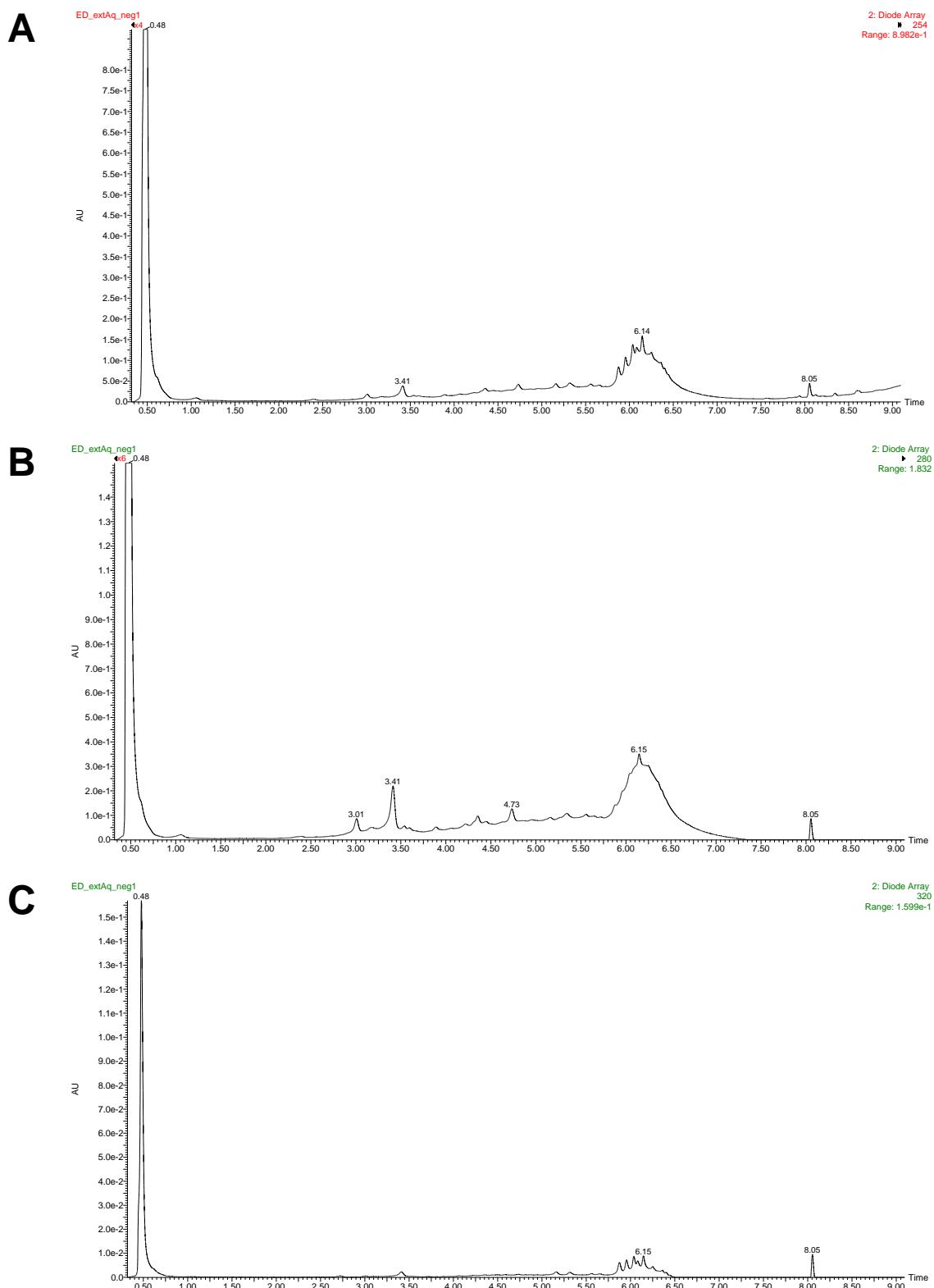
Procianidina B1

Tabela 4. Constituintes identificados no extrato aquoso de *E. dysenterica* por UPLC-DAD-MS.

Pico	TR (min)	Substância	UV max. (nm)	Negativo (m/z)		Positivo (m/z)	
				MS	MS/MS	MS	MS/MS
1	3,01	Procianidina B1*	278	577 [M-H] ⁻	577 (20 eV)→451, 425, 407, 339, 299, 289, 245, 161, 125	579 [M+H] ⁺	579 (20 eV)→427, 409, 301, 289, 275, 247, 205, 163, 139, 127
2	3,41	Catequina*	278	289 [M-H] ⁻ 579 [2M-H] ⁻	289 (20 eV)→248, 227, 217, 203, 188, 164, 151, 125, 123	291 [M+H] ⁺	291 (20 eV)→165, 147, 139, 123, 119, 111
3	4,73	Procianidina-O-galato	277	729 [M-H] ⁻		731 [M+H] ⁺	731 (20 eV)→471, 440, 427, 410, 317, 301, 290, 247, 180, 163, 140, 127

TR: Tempo de Retenção; *: confirmado através da coinjeção de padrão autêntico.

Figura 20. Separação cromatográfica dos constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* por cromatografia líquida de ultraeficiência.



Cromatogramas a 215 (A), 254 (B) e 280 nm (C) do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*. Observa-se a presença de 3 picos majoritários em (A) e (B) e apenas 2 picos em (C).

5.1.10. Identificação dos constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* por MALDI-MS/MS

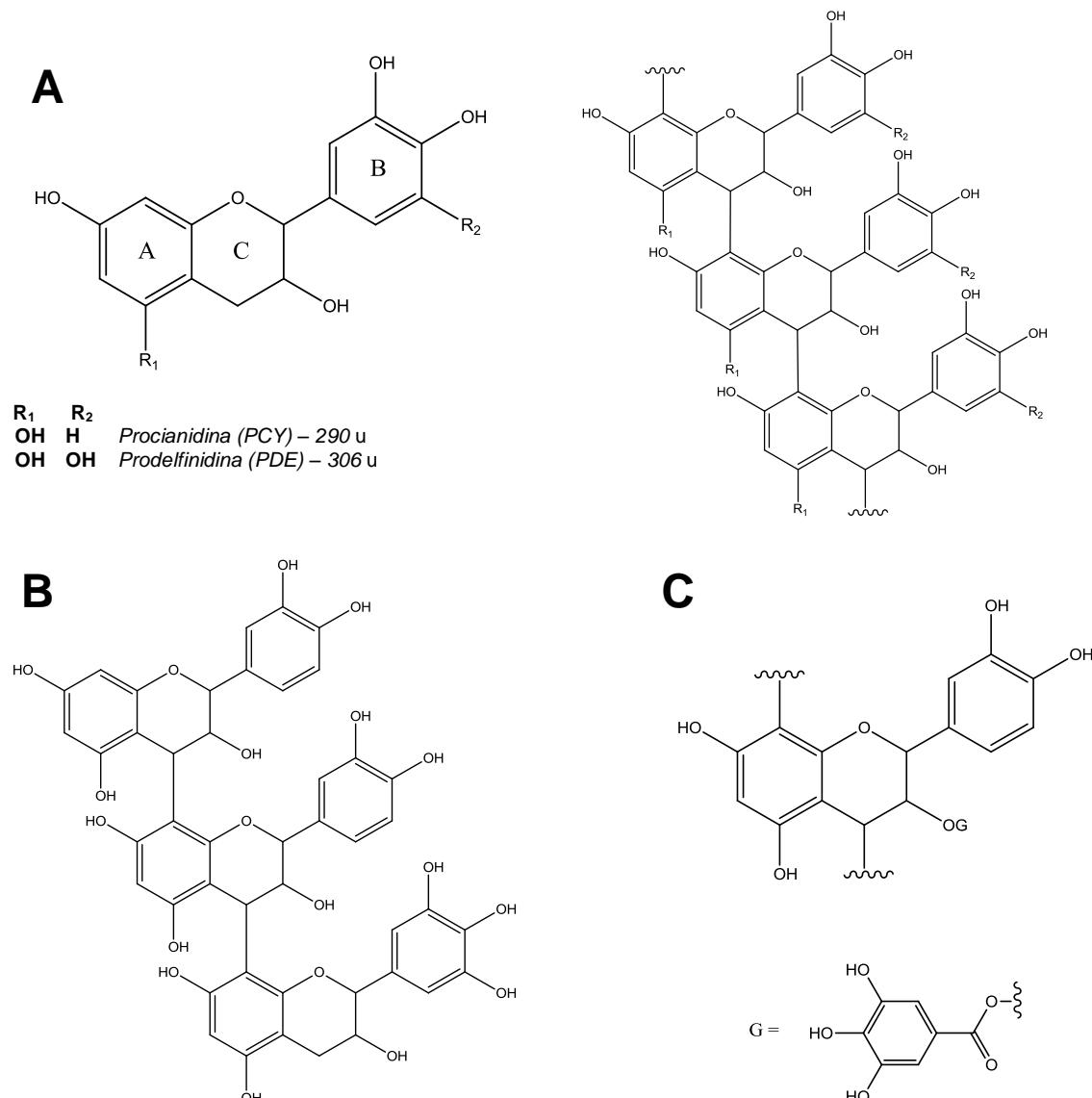
A análise pela espectrometria de massas identificou diversos constituintes no extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica*. Uma grande variedade de espécies de taninos condensados foi caracterizada (Tabela 5) e a estrutura molecular de seus monômeros, bem como o trímero da série 2 estão apresentadas na Figura 21. Os espectros obtidos nas análises de MALDI para as séries de taninos condensados estão apresentados no Apêndice B.

Tabela 5. Taninos condensados identificados no extrato aquoso liofilizado das folhas de *Eugenia dysenterica* por MALDI-MS/MS.

	[M+Na] ⁺	FM	Taninos Condensados
Series 1	889	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	3 PCY
	1177	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	4 PCY
	1465	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₀	5 PCY
	1753	C ₉₀ H ₇₄ O ₃₆	6 PCY
	2041	C ₁₀₅ H ₈₆ O ₄₂	7 PCY
	2329	C ₁₂₀ H ₉₈ O ₄₈	8 PCY
	2617	C ₁₃₅ H ₁₁₀ O ₅₄	9 PCY
	2905	C ₁₅₀ H ₁₂₂ O ₆₀	10 PCY
	3193	C ₁₆₅ H ₁₃₄ O ₆₆	11 PCY
	905	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₉	2 PCY – 1 PDE
Series 2	1193	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₅	2 PCY – 1 PDE – 1 PCY
	1481	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₁	2 PCY – 1 PDE – 2 PCY
	1769	C ₉₀ H ₇₄ O ₃₇	2 PCY – 1 PDE – 3 PCY
	2057	C ₁₀₅ H ₈₆ O ₄₃	2 PCY – 1 PDE – 4 PCY
	2345	C ₁₂₀ H ₉₈ O ₄₉	2 PCY – 1 PDE – 5 PCY
	2633	C ₁₃₅ H ₁₁₀ O ₅₅	2 PCY – 1 PDE – 6 PCY
	2921	C ₁₅₀ H ₁₂₂ O ₆₁	2 PCY – 1 PDE – 7 PCY
	3209	C ₁₆₅ H ₁₃₄ O ₆₇	2 PCY – 1 PDE – 8 PCY
	889	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	3 PCY
	1193	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₅	3 PCY – 1 PDE
Series 3	1481	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₁	3 PCY – 1 PDE – 1 PCY
	1769	C ₉₀ H ₇₄ O ₃₇	3 PCY – 1 PDE – 2 PCY
	2057	C ₁₀₅ H ₈₆ O ₄₃	3 PCY – 1 PDE – 3 PCY
	2345	C ₁₂₀ H ₉₈ O ₄₉	3 PCY – 1 PDE – 4 PCY
	2633	C ₁₃₅ H ₁₁₀ O ₅₅	3 PCY – 1 PDE – 5 PCY
	2921	C ₁₅₀ H ₁₂₂ O ₆₁	3 PCY – 1 PDE – 6 PCY
	3209	C ₁₆₅ H ₁₃₄ O ₆₇	3 PCY – 1 PDE – 7 PCY
	753	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	PCYG – PCY
	1041	C ₅₂ H ₄₂ O ₂₂	PCYG – 2 PCY
	1329	C ₆₇ H ₅₄ O ₂₈	PCYG – 3 PCY
Series 4	1617	C ₈₂ H ₆₆ O ₃₄	PCYG – 4 PCY
	1905	C ₉₇ H ₇₈ O ₄₀	PCYG – 5 PCY
	2193	C ₁₁₂ H ₉₀ O ₄₆	PCYG – 6 PCY
	2481	C ₁₂₇ H ₁₀₂ O ₅₂	PCYG – 7 PCY
	2769	C ₁₄₂ H ₁₁₄ O ₅₈	PCYG – 8 PCY
	3057	C ₁₅₇ H ₁₂₆ O ₆₄	PCYG – 9 PCY
	3345	C ₁₇₂ H ₁₃₈ O ₇₀	PCYG – 10 PCY

FM: fórmula molecular, PCY: Procianidina, PDE: Prodelfinidina, PCYG: procianidina O-galato.

Figura 21. Estrutura típica dos taninos condensados



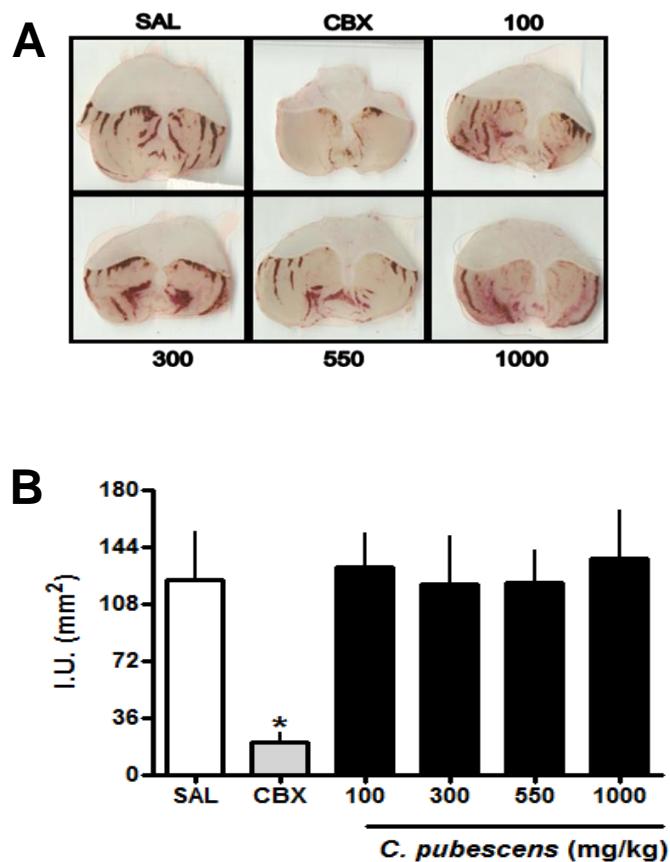
(A) Estrutura básica de monômeros de taninos condensados, os quais se diferenciam, de acordo com o padrão de hidroxilação de seus radicais (R_1 e R_2) em procianidina ou prodelfinidina; durante a formação de oligômeros, as ligações entre tais monômeros ocorrem entre o carbono 4 de um das unidades e o carbono 8 da outra. (B) Trímero da série 2 (Tabela 5) e (C) unidade procianidina-O-galato. Unidades monoméricas: procianidina (PCY), prodelfinidina (PDE).

5.2. *Campomanesia pubescens*

5.2.1. Avaliação do efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *C. pubescens*

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *C. pubescens* não apresentou atividade gastroprotetora sobre lesões induzidas por solução hidroalcoólica acidificada em nenhuma das doses testadas (Figura 22A e 22B).

Figura 22. Efeitos do extrato aquoso liofilizado das folhas de *C. pubescens* sobre as lesões induzidas pela administração de HCl/etanol.

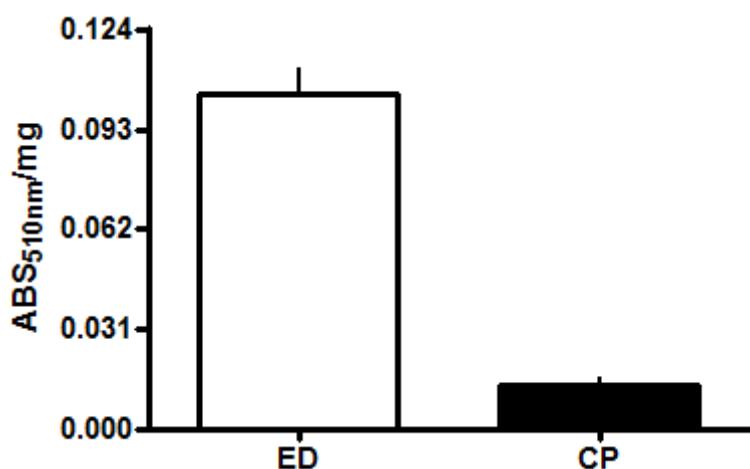


(A) Imagens representativas das lesões induzidas na mucosa gástrica após administração de HCl/etanol em animais controles (SAL), tratados com carbenoxolona (CBX, 250 mg/kg, v.o.) ou com extrato aquoso liofilizado das folhas de *C. pubescens* (100-1000 mg/kg, v.o.). (B) Índice de úlcera (I.U.) em mm² obtidos nos diferentes grupos. Os resultados representam a média±EPM, de 8-10 experimentos. *P<0,05 vs. controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

5.2.2. Comparação da capacidade de complexação de soluções de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens* com Fe³⁺

A absorbância das soluções de extrato aquoso liofilizado das folhas de *C. pubescens*, na presença de FeCl₃, foi aproximadamente 7,5 vezes menor do que aquela observada com o extrato de *E. dysenterica* (Figura 23).

Figura 23. Comparação da capacidade de complexação de soluções de extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* e *C. pubescens* com Fe³⁺.



Absorbância do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* (ED) e de *C. pubescens* (CP) após adição de FeCl₃ (0,01%). Os resultados representam a média±EPM dos valores de absorbância em 510 nm por miligrama de extrato. Os experimentos foram realizados em duplicata. Note que a absorbância do extrato de CP é aproximadamente 7,5 vezes menor do que aquela observada com ED.

6. DISCUSSÃO

Nossos dados demonstraram que o extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* protegeu, de forma dose-dependente, a mucosa gástrica de camundongos das lesões induzidas pela administração de solução de HCl/etanol. O efeito inibitório do extrato sobre a formação das lesões gástricas foi menos potente do que aquele apresentado pelo tratamento padrão (carbenoxolona, 250 mg/mL), já que a gastroproteção foi detectada apenas nas doses de 550 e 1000 mg/kg; entretanto, a maior dose do extrato utilizada foi tão efetiva quanto à carbenoxolona, o que evidencia a poderosa ação citoprotetora desse extrato.

Compostos polifenólicos, incluindo flavonoides e taninos, representam um importante grupo de metabólitos secundários envolvidos na atividade gastroprotetora de diversas plantas, incluindo aquelas da família Myrtaceae (MARKMAN, BACCHI e KATO, 2004; LEWIS e HANSON, 1991; MADALOSSO *et al.*, 2012). Nossas análises fitoquímicas preliminares sugeriram a presença de compostos polifenólicos no extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*; de fato, soluções do extrato desenvolveram coloração azul-escura na presença de FeCl₃, uma reação característica dessa classe de substâncias (COSTA, 2000). Além disso, o extrato foi capaz de precipitar gelatina, o que sugere fortemente a presença de taninos entre os compostos polifenólicos presentes no extrato das folhas de *E. dysenterica* (COSTA, 2000). Baseando-nos nessas observações, aventamos a hipótese de que os taninos do extrato das folhas de *E. dysenterica* poderiam ser os responsáveis pela atividade citoprotetora. Para testar tal hipótese, tratamos os animais com o extrato parcialmente purificado, onde o conteúdo de taninos foi grandemente reduzido através da reação de precipitação com gelatina. A efetividade desse método em remover os taninos foi confirmada espectrofotometricamente; observamos que a absorbância em 510 nm de amostras tratadas com gelatina foi diminuída para aproximadamente ¼ daquela observada em amostras não tratadas, após adição de FeCl₃. Essa constatação evidencia a diminuição significativa do conteúdo de compostos polifenólicos do extrato após o tratamento com gelatina (Figura 17B). A observação de que o extrato perdeu a atividade gastroprotetora após a reação de precipitação, sugere que os taninos sejam realmente os responsáveis pela citoproteção da mucosa gástrica produzida pelo extrato.

Além de precipitar proteínas solúveis, os taninos também se ligam a mucinas, incluindo aquelas da superfície de células epiteliais gástricas (PIZZOLATO e LILLIE, 1973). Assim, baseado nas nossas análises histológicas que revelaram que os taninos presentes no extrato das folhas de *E. dysenterica* se ligam às mucinas no tecido gástrico (Figura 18), detectados através do tratamento com FeCl₃ (formando um complexo cinza-escuro) podemos sugerir que

esse complexo tanino-mucina formado poderia produzir uma camada protetora sobre esse tecido, prevenindo o mesmo de danos causados por enzimas proteolíticas e H⁺, bem como por aqueles causados pelo etanol, o qual solubiliza a barreira de muco (SAITO *et al.*, 1999; MADALOSSO *et al.*, 2012).

Considerando que os taninos parecem ser extremamente importantes para o estabelecimento do efeito gastroprotetor do extrato, análises fitoquímicas mais elaboradas foram realizadas na tentativa de identificá-los. Assim, as análises por cromatografia de ultraeficiência (UPLC-DAD-MS/MS) possibilitou a identificação dos compostos: procianidina B1, catequina e procianidina-O-galato. Ainda, as análises por MALDI identificaram taninos condensados com ligação do tipo-B no extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*. Os dados de MS mostraram que as séries de taninos condensados são compostas principalmente por unidades de procianidina e os oligômeros são constituídos por até 11 unidades; por fim, prodelfinidina e o grupo galoil também estavam presentes em alguns dos taninos identificados (Tabela 5; Figuras 20 e 21). O presente estudo é o primeiro a relatar a presença de taninos condensados nas folhas de *E. dysenterica* e um dos primeiros a elucidar as estruturas dessa classe de compostos no gênero *Eugenia*. De fato, taninos hidrolisáveis já foram identificados no referido taxa (OMAR *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 1997), mas não taninos condensados. Cabe ressaltar que, as análises fitoquímicas de partes da *E. dysenterica* realizadas até o momento são limitadas e descrevem a caracterização e/ou identificação de poucos compostos, tais como: um peptídeo (LIMA *et al.*, 2010), monoterpenos e sesquiterpenos (COSTA *et al.*, 2000), vitaminas e carotenoides (CARDOSO *et al.*, 2011).

A literatura relata que a catequina e a procianidina B1 protegem a mucosa gástrica de lesões induzidas por diferentes estímulos, entretanto, esse efeito é observado somente com a administração de altas doses desses compostos. Ainda, essas substâncias tem baixa ou nenhuma capacidade de precipitar proteínas (HAGERMAN e BUTLER, 1978; CALA *et al.*, 2010). Essas observações, associadas ao fato de que o extrato das folhas de *E. dysenterica* tratados com gelatina perdeu significativamente a capacidade gastroprotetora, sugerem fortemente que a catequina e a procianidina B1 não contribuem para esse efeito. Além disso, existem evidências de que as ações gastroprotetoras de compostos tânicos estejam relacionadas com o tamanho molecular dos mesmos. De fato, Saito *et al.*, (1998) relataram que a catequina e procianidinas, na forma de dímeros e trimeros, não são capazes de proteger a mucosa de lesões induzidas pela administração de HCl/etanol em ratos. Por outro lado, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros de procianidinas exibiram efeito gastroprotetor, cuja

magnitude foi proporcional ao tamanho da cadeia oligomérica, sendo que os hexâmeros causaram o maior efeito gastroprotetor (SAITO *et al.*, 1998). A interação entre taninos e proteínas também parece estar relacionada com o tamanho da molécula; dessa forma, hexâmeros e pentâmeros de procianidinas mostraram altos níveis de ligação a proteínas e elevada capacidade de precipitação, enquanto tetrâmeros e trimers demonstraram baixa capacidade de precipitação; por fim, como descrito anteriormente, dímeros e monômeros de procianidina (como a catequina) não são capazes de precipitar proteínas (SAITO *et al.*, 1998). Todas essas observações, aliadas ao fato de que vários taninos condensados foram identificados no extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica*, sugerem que essa classe de metabólitos secundários seja a responsável pelo poderoso efeito gastroprotetor do extrato.

A indução de úlceras por HCl/etanol envolve a formação de radicais livres (MUTOH *et al.*, 1990), os quais podem induzir peroxidação lipídica e gerar dano celular (MIZUI e DOTEUCHI, 1986; NISHIDA, OHTA e ISHIGURO, 1998). Ainda, o etanol diminui os níveis gástricos de glutationa, um importante composto antioxidant (KIDD, 1997). Portanto, com base na observação de que o extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* possui atividade antioxidante, uma propriedade comum a plantas que contêm compostos polifenólicos (REPETTO e LLESUY, 2002), é possível sugerir que o referido efeito seja parte do mecanismo pelo qual o extrato protege a mucosa gástrica contra injúrias. Para investigar essa possibilidade, avaliamos se o bloqueio de grupos -SH endógenos, com o agente alquilante NEM (SZABO, NAGY e PLEBANI, 1992), poderia diminuir a gastroproteção do extrato das folhas de *E. dysenterica*. Essa estratégia está baseada no fato de que os grupos -SH podem doar elétrons, e assim, se ligar a radicais livres (KIDD, 1997). A administração de NEM reduziu profundamente a ação protetora do extrato, evidenciando a participação dos grupos -SH endógenos no efeito gastroprotetor do mesmo. Essa observação sugere que a atividade antioxidante do extrato sozinha não é suficiente para proteger o estômago dos danos induzidos pelo HCl/etanol. Assim, pode ser que exista uma relação cooperativa entre a atividade do extrato e o sequestro de radicais livres por grupos -SH endógenos; outra possibilidade seria a de que o extrato pudesse aumentar a biodisponibilidade desses grupamentos.

Várias linhas de evidências apontam o NO como um importante mediador gastroprotetor endógeno e os mecanismos propostos incluem: a manutenção da integridade da mucosa, a inibição da aderência leucocitária e plaquetária e o aumento do fluxo sanguíneo (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008). O L-NAME, um inibidor não seletivo das

sintases do óxido nítrico, enzimas que sintetizam NO, não comprometeu significativamente o efeito gastroprotetor do extrato, sugerindo que tal mediador não participa dos mecanismos citoprotetores do mesmo.

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* inibiu a secreção de HCl de maneira similar ao tratamento padrão (cimetidina, 100 mg/kg); tal efeito pode contribuir para a diminuição das lesões da mucosa gástrica induzida pela administração de HCl/etanol. Apesar de não termos investigado os mecanismos pelos quais o extrato das folhas de *E. dysenterica* inibiu a secreção de HCl, relatos de literatura sugerem que taninos condensados (compostos por 2-15 unidades de procianidinas), mas não procianidinas monoméricas, são capazes de inibir a liberação de histamina por mastócitos peritoneais (KANDA *et al.*, 1998). Portanto, é possível que os taninos condensados identificados no presente estudo possam inibir a liberação de histamina por células ECL presentes no tecido gástrico, uma hipótese que ainda permanece por ser investigada.

Por fim, o extrato aquoso liofilizado das folhas de *C. pubescens* não demonstrou efeito gastroprotetor sobre lesões induzidas pela administração de HCl/etanol em nenhuma das doses testadas (100-1000 mg/kg). Através de análises fitoquímicas preliminares, com adição de FeCl₃ às amostras do extrato de *C. pubescens*, observamos que a quantidade de compostos polifenólicos presentes no referido extrato é bem menor que aquela presente no extrato de *E. dysenterica* (7,5 vezes menor). Cabe salientar que, a análise visual da capacidade de precipitação de proteínas mostrou que o extrato de *C. pubescens* é muito menos potente do que o extrato de *E. dysenterica* nesse particular. Essa observação corrobora com os dados de espectrofotometria e sugere a presença de pequenas quantidades de compostos tânicos no extrato de *C. pubescens*. Desse modo, podemos sugerir que o referido extrato não apresentou efeito gastroprotetor devido ao seu baixo teor de compostos polifenólicos (em especial de taninos), os quais, como discutido no presente estudo, apresentam propriedades farmacológicas que levam à gastroproteção.

7. CONCLUSÃO

- O presente estudo demonstrou que o extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* protegeu a mucosa gástrica de lesões induzidas por HCl/etanol; tal efeito evidencia um potencial biofarmacêutico para essa espécie.
- O efeito gastroprotetor parece estar relacionado com a presença de taninos condensados no referido extrato, os quais são formados predominantemente por procianidinas, prodelfinidina, além da presença de grupos galool em alguns constituintes das séries poliméricas.
- O efeito gastroprotetor parece ocorrer através de vários mecanismos de ação, tais como: a inibição da produção de HCl, a atividade sequestradora de radicais livres do extrato (propriedade antioxidante), a ação de compostos sulfidrílicos endógenos, e, pela estabilização da barreira de muco promovida pelos taninos condensados.
- Ainda, esse trabalho evidenciou que o extrato aquoso liofilizado das folhas de *C. pubescens* não protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas pela solução de HCl/etanol.
- A ausência de efeito gastroprotetor pode estar relacionada à baixa concentração de compostos polifenólicos presentes nesse extrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBAJE, E.O. Gastrointestinal effects of *Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry (*Myrtaceae*) in animal models. **Nigerian Quarterly Journal Hospital Medicine**, v.18, p. 137-141, 2008.
- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1232p.
- ALBUQUERQUE, U.P., MONTEIRO, J.M., ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p.892–896, 2005.
- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M., RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. 1.ed. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.
- ARRIETA, J., BENITEZ, J., FLORES, E., CASTILLO, C., NAVARRETE, A., Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin sensitive neurons. **Planta Medica**, v.69, p.905–909, 2003.
- BARROSO, G.M.. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 2, 1991. 323p.
- BASSO, L.A, SILVA, L.H.P., FETT-NETO, A.G., AZEVEDO JUNIOR, W.F., MOREIRA, I.S., PALMA, M.S., CALIXTO, J.B., ASTOLFI FILHO, S.S., SANTOS, R.R., SOARES, M.B.P., SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, 2005.
- BORRELLI, F., IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v.14, p.581-591, 2000.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p.25-30, 1995.
- BRITO, M.A., PEREIRA, E.B.C., PEREIRA, A.V., RIBEIRO, J.F. **Cagaita: biologia e manejo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 80 p.
- CALA, O., PINAUD, N., SIMON, C., FOUQUET,E., LAGUERRE, M., DUFOURC, E.J., PIANET, I. NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. **The FASEB Journal**, v. 24, n.11, p.4281-90, 2010.
- CARDOSO,C.A.L., SALMAZZO, G.R., HONDA, N.K., PRATES, C.B., VIEIRA, M.C., COELHO, R.G. Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of

Campomanesia Species (Myrtaceae), **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n.5, p.1273–76, 2010.

CARDOSO, C.A.L., SILVA, J.R.M., KATAOKA, V .M.F., BRUM, C.S.1, POPPI, N.R., Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.**, v. 29, n.3, p. 297-301, 2008.

CARDOSO, L.M., MARTINO, H.S.D., MOREIRA, A.V. B., RIBEIRO, S.M.R., PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v.44, p.2151-2154, 2011.

CECÍLIO, A.B., DE FARIA, D.B., OLIVEIRA, P.C., CALDAS, S., OLIVEIRA, D.A., SOBRAL, M.E., DUARTE, M.G., MOREIRA, C.P., SILVA, C.G. ALMEIDA, V.L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p.975-81, 2012.

CHATURVEDI, A., BHAWANI, G., AGARWAL, P.K., GOEL, S., SINGH, A., GOEL, R.K. Ulcer healing properties of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seed in diabetic rats: study on gastric mucosal defensive factors. **Indian Journal Physiology Pharmacology**, v. 53, p. 16-24, 2009.

CHATURVEDI, A., KUMAR, M.M., BHAWANI, G., CHATURVEDI, H., KUMAR, M., GOEL, R.K. Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seeds on gastric ulceration and secretion in rats. **Indian Journal Physiology Pharmacology**, v. 51, p. 131-140, 2007.

CHAVES, L.J., TELLES, M.P.C. Cagaita. In: Vieira, R.F. (ed.) **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. cap.7, p.120-134.

CHAVEZ-PINÃ, A.E., TAPIA-ÁLVAREZ, G.R., REYES-RAMÍNREZ, A., NAVARRETE, A. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/cGMP/K_{ATP} pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v.5, p.717–722, 2011.

CORDELL, G.A., BEECHER, W.W., DOUGLAS KINGHORN, A., PEZZUTO, J.M., CONSTANT, H.L., CHAI, H., FANG, L., SEO, E. LONG, L., CUI,B., SLOWING-BARILLAS, K. The Dereplication of Plant-Derived natural Products. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 19, p. 749-791, 1996.

CORDELL, G.A. Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.

CORLETO, V.D. Somatostatin and the gastrointestinal tract. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, v. 17, p. 63-68, 2010.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil.** Rio de Janeiro: IBDF, 1984. v.1, 747 p.

COSTA, A.F. **Farmacognosia:** Farmacognosia Experimental. 6. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2000. 992p.

COSTA, T.A., FERNANDES, A.O.F.L., SANTOS, S.C.B., OLIVEIRA, C.M.A.B., LIAO, B.L.M., FERRI, P.H.B., PAULA, C.J.P., FERREIRA, D.H.D., BEATRIZ, H.N., SALES, B.H.N.E., SILVA, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p. 111-117, 2000.

CRUZ, A.V. M., KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CRYER, B.M.D. Mucosal defense and repair: role of prostaglandins in the stomach and duodenum. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 30, n.4, p. 877-94, 2001.

DeJESUS, N.Z.T., FALCÃO, H.S., GOMES, I.F., LEITE, T.J.A., LIMA, G.R.M., BARBOSA-FILHO, J.M., TAVARES, J.F., SILVA, M.S., ATHAYDE-FILHO, P.F., BATISTA, L.M. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences** , v. 13, n. 3, p. 3203-3228, 2012.

DU, X., MILSTEIN, O., MORESCO, E.M.Y., MURRAY, A., BEUTLER, B. **Mutagenetix (TM).** Phenotypic Mutation 'sublytic' (Department of Genetics, Scripps Research Institute). Disponível em: <http://mutagenetix.utsouthwestern.edu:80>. Acesso: 05 fevereiro 2013.

DHARMANI, P., SRIVASTAVA, V., KISSOON-SINGH, V., CHADEE, K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. **Journal of Innate Immunity**, v.1, n.2, p.123-35, 2009.

EL-SHENAWY, S.M. Evaluation of some pharmacological activities of ethanol extracts of seeds, pericarp and leaves of *Eugenia jambolana* in rats. **Inflammopharmacology**, v. 17, p. 85-92, 2009.

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA ONLINE. **Stomach: structure.** Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/media/68634/Structures-of-the-human-stomach-The-stomach-has-three-layers>> . Acessado em: 5 de fevereiro de 2013.

EROSCHENKO, V.P. **Di Fiore's:** Atlas of Histology With Functional Correlations. 11.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

FABRICANT, D.S., FARNSWORTH, N.R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n. 1, p. 69-75, 2001.

GANONG, W.F. **Fisiologia Médica**. 22.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. 653p.

GOLAN, D.E., TASHJIAN, A.H., ARMSTRONG, E.J., ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 914p.

GLAVIN, G.B., SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 825-83, 1992.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado De Fisiologia Médica** 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2006. 1115p.

HAGERMAN, A.E., BUTLER, L.G. J. Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p.809-12, 1978.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet London**, v. 10, n. 344, p. 721–724, 1994.

HARBORNE, J.B., BEXTER, H., MOSS, G.P. **Phytochemical dictionary**: Handbook of bioactive compounds from plants. 2.ed. London: Taylor and Francis, 1999. 976p.

HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure - activity relationships, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

HURST, W.J., KRAKE, S.H., BERGMEIER, S.C., PAYNE, M.J., MILLER, K.B., STUART, D.A. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. **Chemistry Central Journal**, v. 5, p.1-8, 2011.

ISHIKAWA, T., DONATINI, R. DOS S., DIAZ, I.E., YOSHIDA, M., BACCHI, E.M., KATO, E.T. Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 527-529, 2008.

JUNQUEIRA, V.M.S., SILVA, M.A., CANABRAVA, L.C.M.N., ROSSI, D.A., BELETTI, M.E., CANABRAVA, H.A.N. Avaliação antimicrobiana e antiulcerogênica da *Eugenia dysenterica*. **Horizonte Científico**, v. 1, p. 1-10, 2007.

KANDA, T., AKIYAMA, H., YANAGIDA, A., TANABE, M., GODA, Y., TOYODA, M., TESHIMA, R., SAITO, Y. Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.62, n.7, p.1284-9, 1998.

- KANWAR, S., WALLACE, J.L., BEFUS, D., KUBES, P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. **American Journal Physiology**, v.266, p.222-229, 1994.
- KARAMAĆ, M. Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p.5485-5497, 2009.
- KIDD, P.M. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Alternative Medicine Review**, v. 2, p. 155–176, 1997.
- KLINK, C. A., MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v.19, n.3, p.707-713, 2005.
- KONTUREK, S.J., KONTUREK, P.C., BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p.5-31, 2005.
- LAINE, L., TAKEUCHI, K., TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41-60, 2008.
- LEE, M.H., NISHIMOTO, S., YANG, L.L., YEN, K.Y., HATANO, T., YOSHIDA, T., OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343-1349, 1997.
- LEWIS, D.A., HANSON, P.J. Antiulcer drugs of plant origin. In: ELLIS, G.P. **Progress in Medicinal Chemistry**. New York: Elsevier Science Publishers, 1991. p. 201- 231.,
- LIMA, E.S., ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, 2001.
- LIMA, T.B., SILVA, O.N., OLIVEIRA, J.T.A., VASCONCELOS, I.M., SCALABRIN, F.B., ROCHA, T.L., GROSSI-DE-SÁ, M.F., SILVA, L.P., GUADAGNIN, R.V., QUIRINO, B.F., CASTRO, C.F.S., LEONARDECZ, E., FRANCO, O.L. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: a novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides**, v.31, n.8, p.1426–1433, 2010.
- LIMA, T.B., SILVA, O.N., SILVA, L.P., ROCHA, T.L., GROSSI-DE-SÁ, M.F., FRANCO, O.L., LEONARDECZ, E. *In Vivo* Effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) Leaf Extracts on Diarrhea Treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2011, p. 1-10, 2011.
- LOGUERCIO, C., TARANTO, D., BENEDUCE, F., Del VECCHIO BLANCO, C., DE VINCENTIIS, A., NARDI, G., ROMANO, M. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulphydryl compounds in humans. **Gut**, v. 34, n. 2, p. 161-165, 1993.

LORENZI, H., BACHER, L.B.; LACERDA, M.T.C., SARTORI, S.F. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas.** Nova Odessa: Plantarum, 2006. 640p.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA, V.F., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADALOSSO, R.C., OLIVEIRA, G.C., MARTINS, M.T., VIEIRA, A.E.D., BARBOSA, J., CALIARI, M.V., CASTILHO, R.O., TAGLIATI, C.A. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 772-779, 2012.

MALFERTHEINER, P. CHAN, F.K., MCCOLL, K.E. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v.24, n.374, p.1449-1461. 2009.

MARKMAN, B.E.O., BACCHI, E.M., KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p. 55–57, 2004.

MARSHALL, B.J., WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, p. 1311-1314, 1984.

MIZUI, T., DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.33, n.5, p. 939-945, 1983.

MUTOH, H., HIRAISHI, H., OTA, S., IVEY, K.J., TERANO, A., SUGIMOTO, T. Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.258, p.603-609, 1990.

NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **FEBS Letters**, v. 586, p. 3767–3770, 2012.

NISHIDA, K., OHTA, Y., ISHIGURO, I., Relation of inducible nitric oxide synthase activity to lipid peroxidation and nonprotein sulfhydryl oxidation in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. **Nitric Oxide**, v. 2, p. 215–223, 1998.

NIV, Y., FRASER, G.M. The alkaline tide phenomenon. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 35, n. 1, p. 5-8, 2002.

OMAR, R., LI, L., YUAN, T., SEERAM, N.P. α -Glucosidase inhibitory hydrolyzable tannins from *Eugenia jambolana* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 75, n.8, p. 1505-9, 2012.

PIVA, M.G. **O Caminho das Plantas Medicinais:** estudo etnobotânico. Rio de Janeiro: Mondrian, 2002. 313p.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIZZOLATO, P., LILLIE, R.D. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. **Journal of Histochemical & Cytochemical**, v. 21, p. 56-64, 1973.

PLANTAS DO CERRADO. Disponível em:
<http://plantasdocerrado.wordpress.com/mudas/gabiroba-c-pubescens>. Acesso em: 5 fevereiro 2013.

RAMIREZ, R.O., ROA Jr., C.C. The gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini* Skeels) bark on HCl/ethanol induced gastric mucosal injury in Sprague-Dawley rats. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.29, p. 253-261, 2003.

RASTOGI, L., PATNAIK, G.K., DIKSHITU, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacological Research**, v. 38, n. 2, 1998.

RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REPETTO, M.G., LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal Medicinal Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

SAITO, M., HOSOYAMA, H., ARIGA, T., KATAOKA, S., YAMAJI, N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1460-1464, 1998.

SANDERS, M.J., AYALON, A., ROLL, M., SOLL, A.H. The apical surface of canine chief cell monolayers resists H⁺ back-diffusion. **Nature**, v. 313, p. 51–54, 1985.

SANTIN, J.R., LEMOS, M., KLEIN-JÚNIOR, L.C., MACHADO, I.D., COSTA, P., OLIVEIRA, A.P., TILIA, C., SOUZA, J.P., SOUSA, J.P., BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.383, n.2, p.149-58, 2011.

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

SHAY, H., KOMAROV, S.A., FELS, S.S., MERANZE, D., GRUENSTEIN, M., SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHOFIELD, P., MBUGUA, D.M., PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review, **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SILVA, J.R.M., CARDOSO, C.A.L., RE-POSSI, N. Essential oil composition of the leaves of *Campomanesia pubescens*. **Chemistry of Natural Compounds**, v 45, n. 4, 2009.

SOUZA, P.M., SALES, P.M., SIMEONI, L.A., SILVA, E.C., SILVEIRA, D., MAGALHÃES, P.O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Med**, v. 78, n. 4, p. 393-9, 2012a.

SOUZA, P.M., ELIAS, S.T. SIMEONI, L.A., PAULA, J.E., GOMES, S.M., GUERRA, N.S., FONSECA, Y.M., SILVA, E.C., SILVEIRA, D., MAGALHÃES, P.O. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. **PloS One**, v. 7, n. 1, 2012b.

SUMBUL, S., AHMAD, M.A., ASIF, M., SAUD, I., AKHTAR, M. Evaluation of *Myrtus communis* Linn. berries (common myrtle) in experimental ulcer models in rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, p. 935-944, 2010.

SZABO, S., NAGY, L., PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clinica Chimica Acta**, v. 206, p. 95 105, 1992.

SZABO, S., TRIER, J.S., FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, n. 4517, p. 200-2, 1981.

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

VIEIRA, P., VERONEZI, E., SILVA, C.R., CHEN-CHEN, L. Detection of Genotoxic, Cytotoxic, and Protective Activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 6, p. 563-7, 2012.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1547-65, 2008.

WARREN, J.R., MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v.321, p.1273–1275, 1983.

WEYDERT, C.J. CULLEN, J.J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 51-66, 2010.

YUAN, Y., PADOL, I.T., HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 80-89, 2006.

XIE, D.Y.Y., DIXON, R.A. Proanthocyanidin biosynthesis--still more questions than answers? **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2127-44, 2005.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -

Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceuaufu@yahoo.com.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 041/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 022/11

Projeto Pesquisa: "Avaliação da atividade Gastroprotetora de mirtáceas do cerrado: Eugenia dysenterica, campomanesia pubescens e campomanesia xanthocarpa".

Pesquisador Responsável: Luiz Borges Bispo da Silva

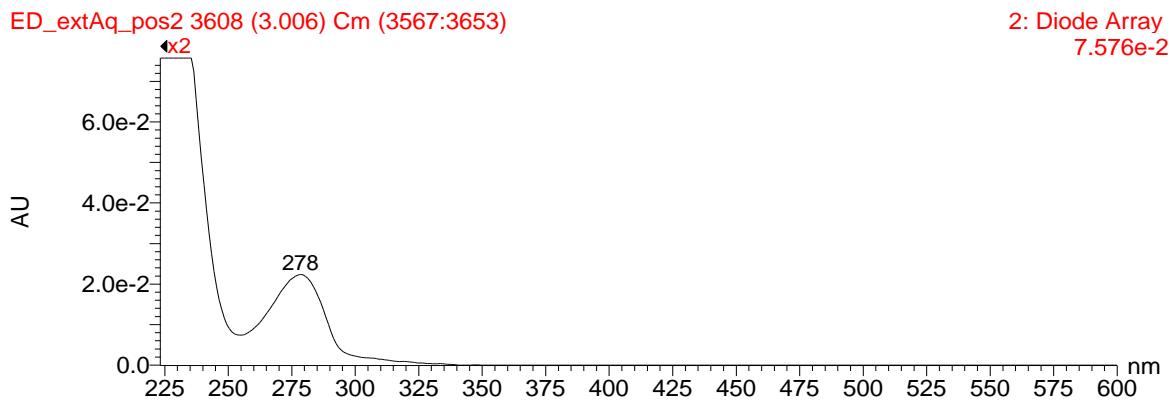
O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

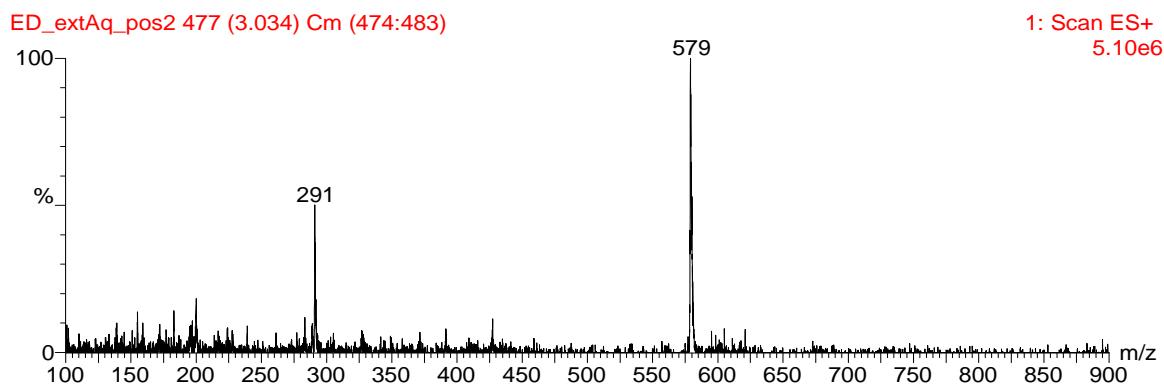
OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 28 de abril de 2011

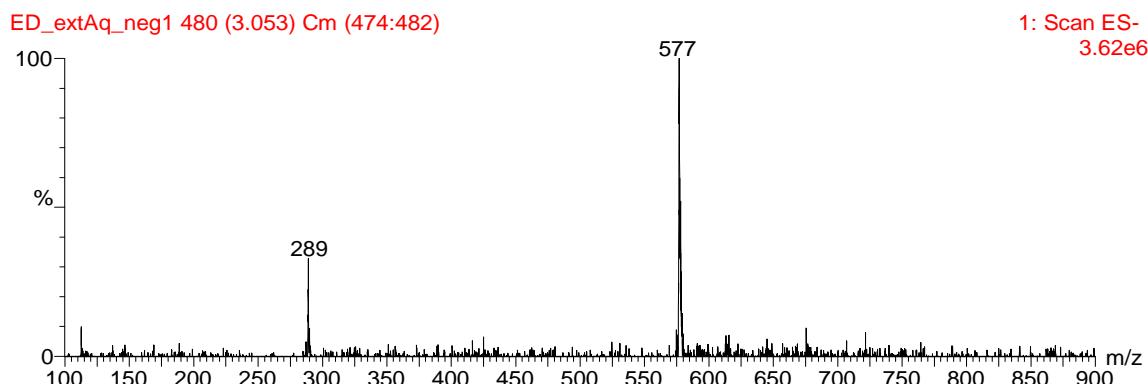
APÊNDICE A



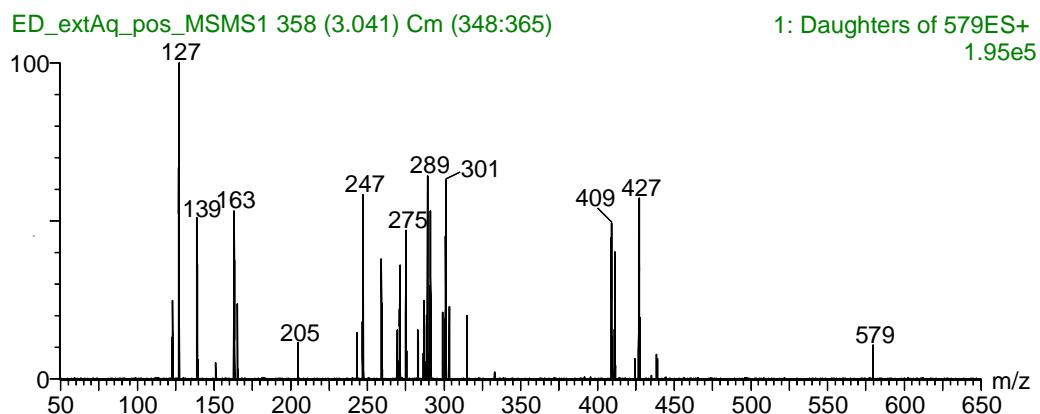
Espectro 1. Espectro de UV da substância com TR de 3,01 min.



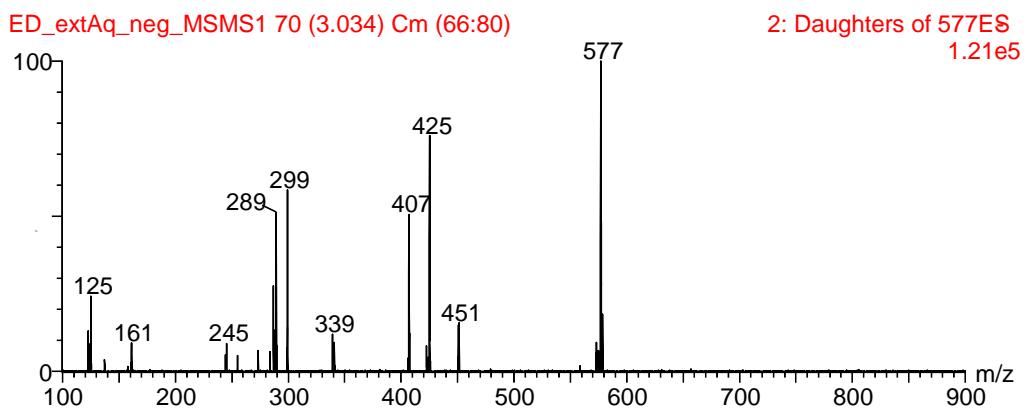
Espectro 2. Espectro de Massas da substância com TR de 3,01 min (Modo Positivo).



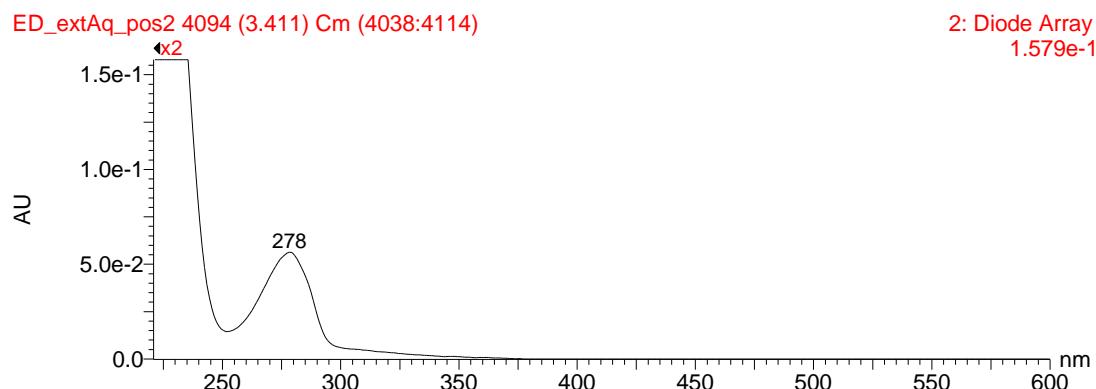
Espectro 3. Espectro de Massas da substância com TR de 3,01 min (Modo Negativo).



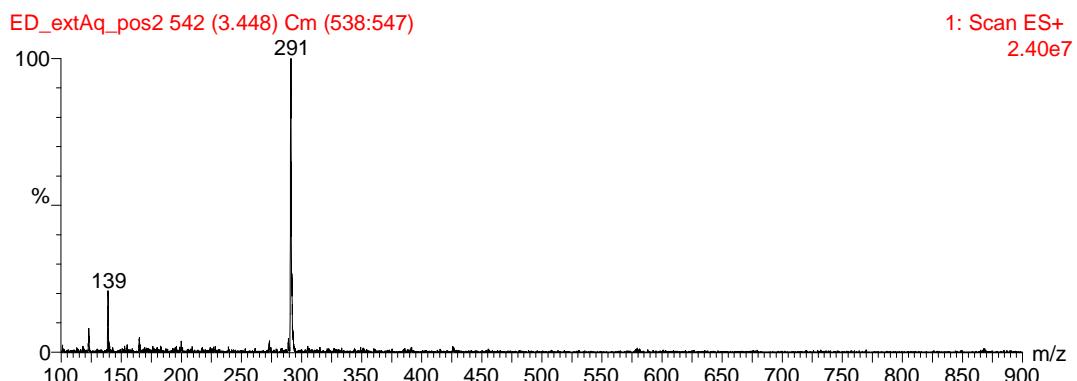
Espectro 4. MS/MS do íon de m/z 579 da substância com TR de 3,01 min (Modo Positivo).



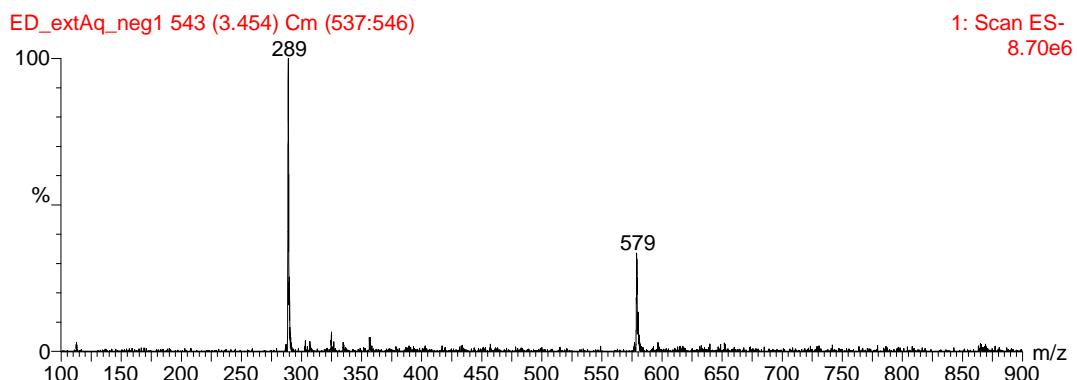
Espectro 5. MS/MS do íon de m/z 577 da substância com TR de 3,01 min (Modo Negativo).



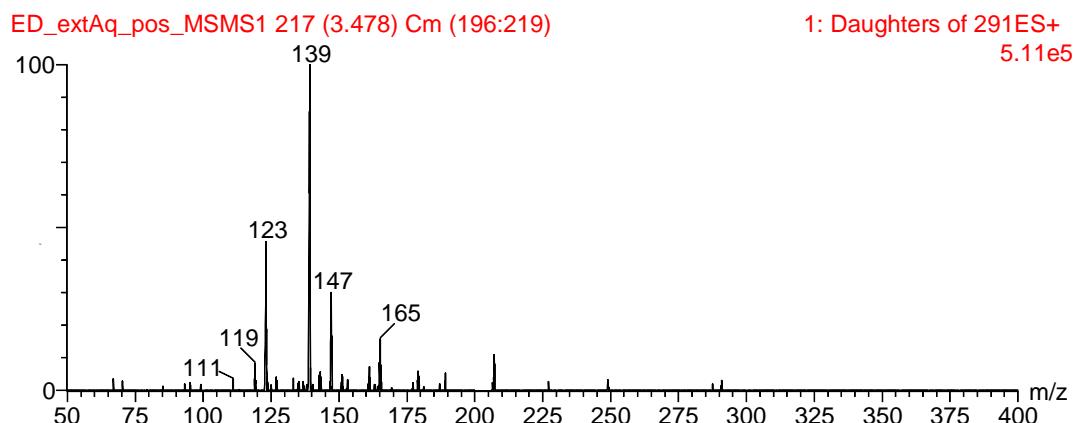
Espectro 6. Espectro de UV da substância com TR de 3,41 min.



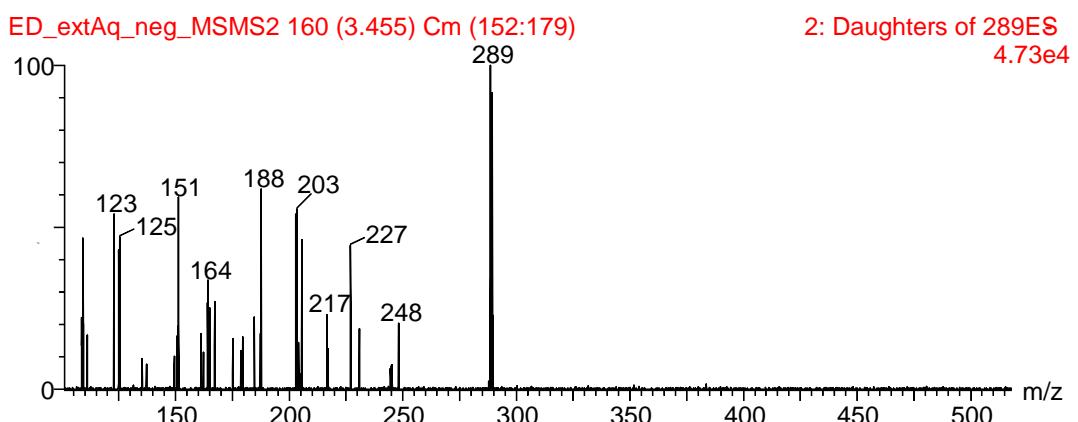
Espectro 7. Espectro de Massas da substância com TR de 3,41 min (Modo Positivo)



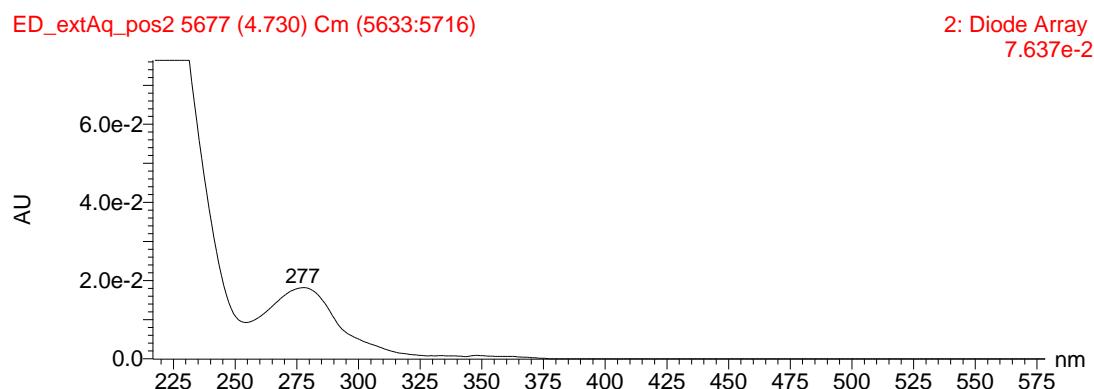
Espectro 8. Espectro de Massas da substância com TR de 3,41 min (Modo Negativo).



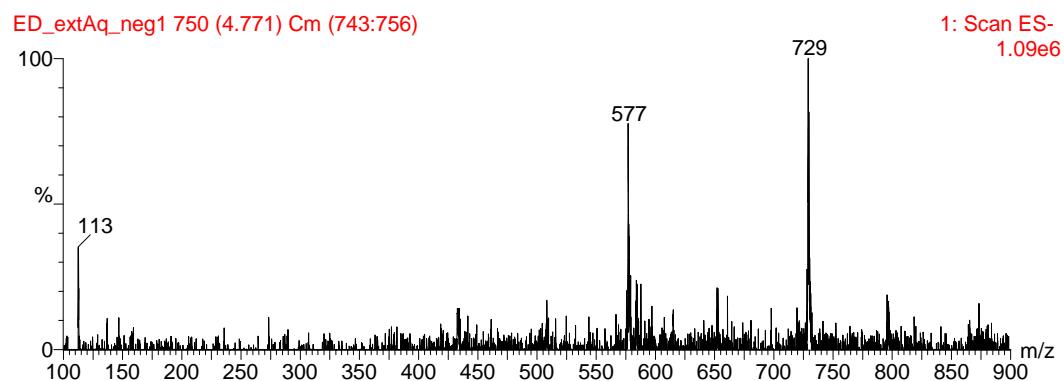
Espectro 9. MS/MS do íon de m/z 291 da substância com TR de 3,41 min (Modo Positivo).



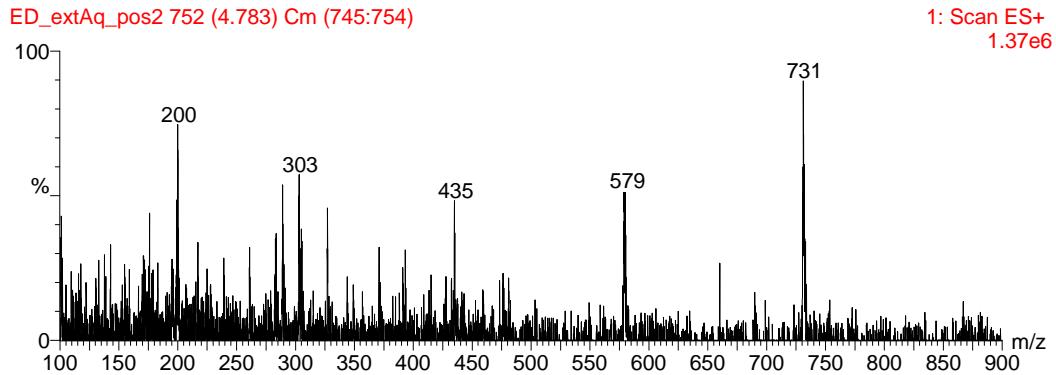
Espectro 10. MS/MS do íon de m/z 289 da substância com TR de 3,41 min (Modo Negativo).



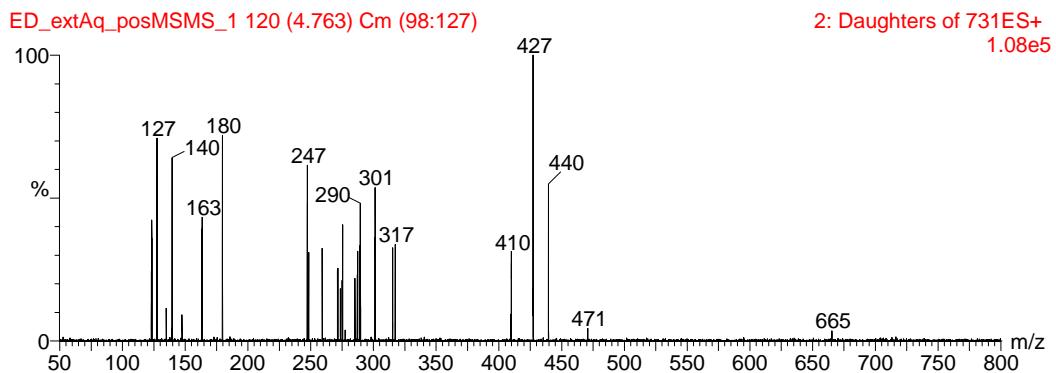
Espectro 11. Espectro de UV da substância com TR de 4,73 min.



Espectro 12. Espectro de Massas da substância com TR de 4,73 min (Modo Negativo).

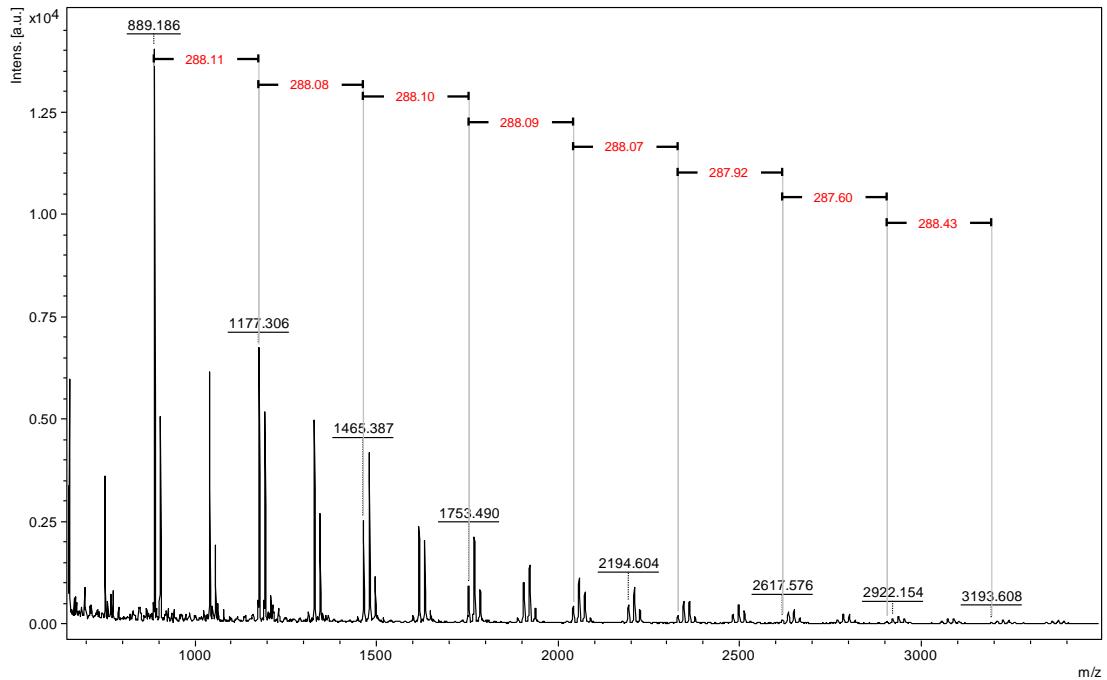


Espectro 13. Espectro de Massas da substância com TR de 4,73 min (Modo Positivo).

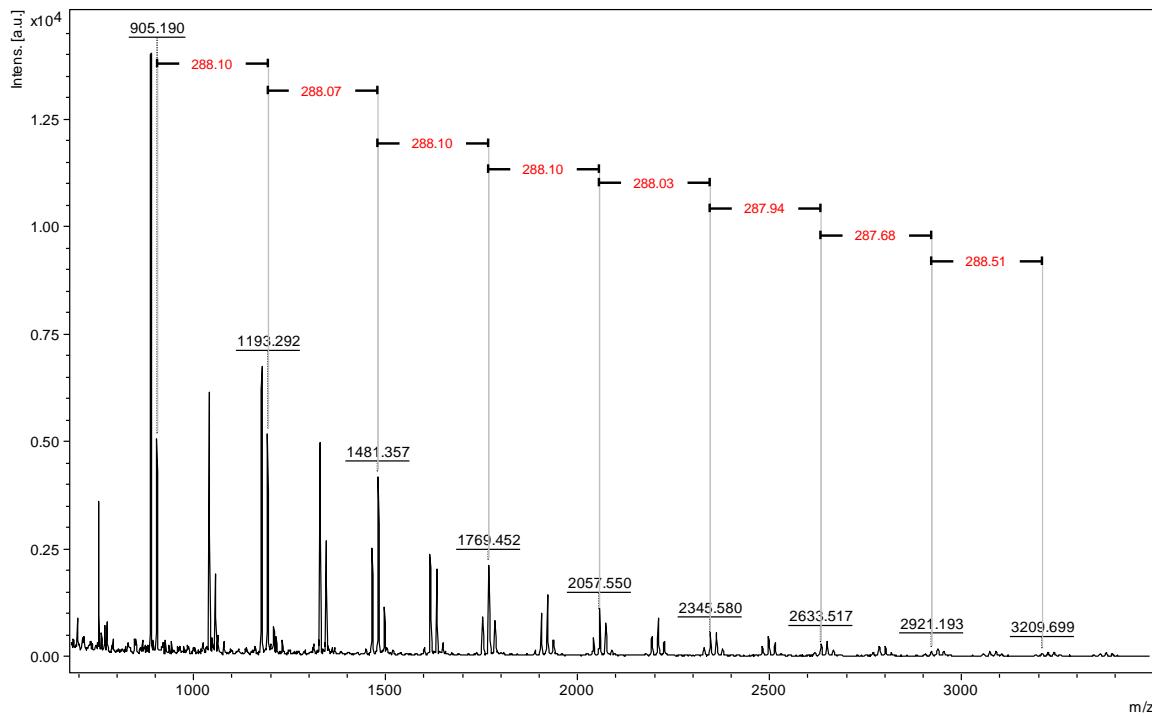


Espectro 14. MS/MS do íon de m/z 731 da substância com TR de 4,73 min (Modo Positivo).

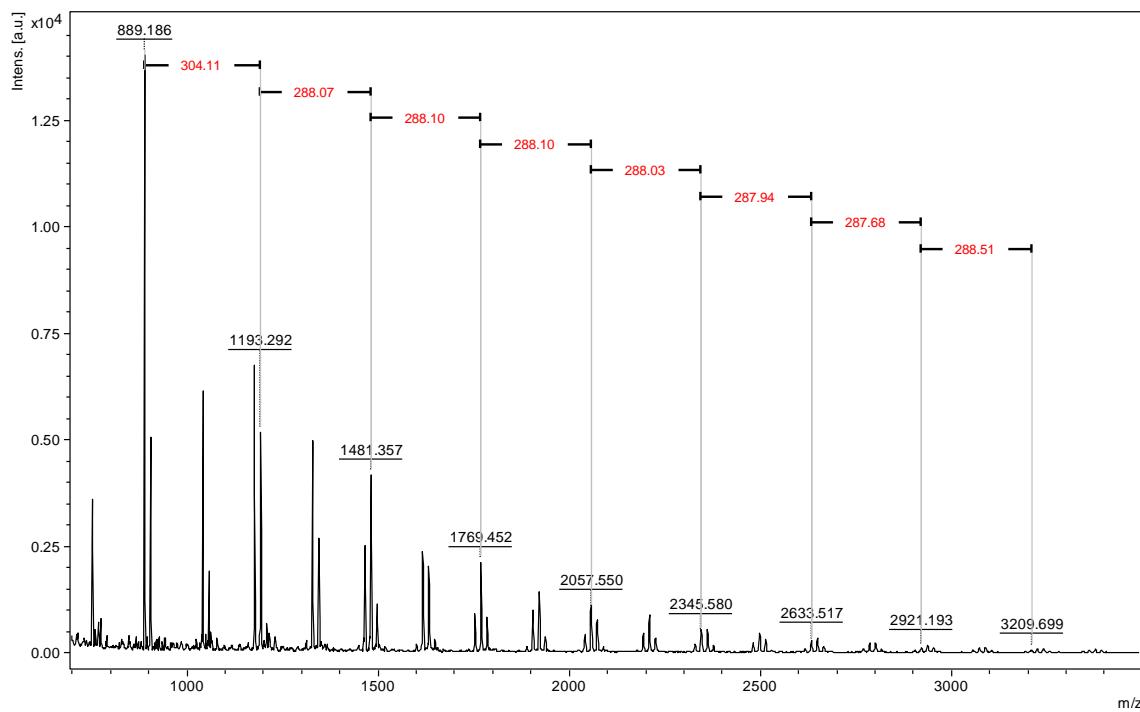
APÊNDICE B



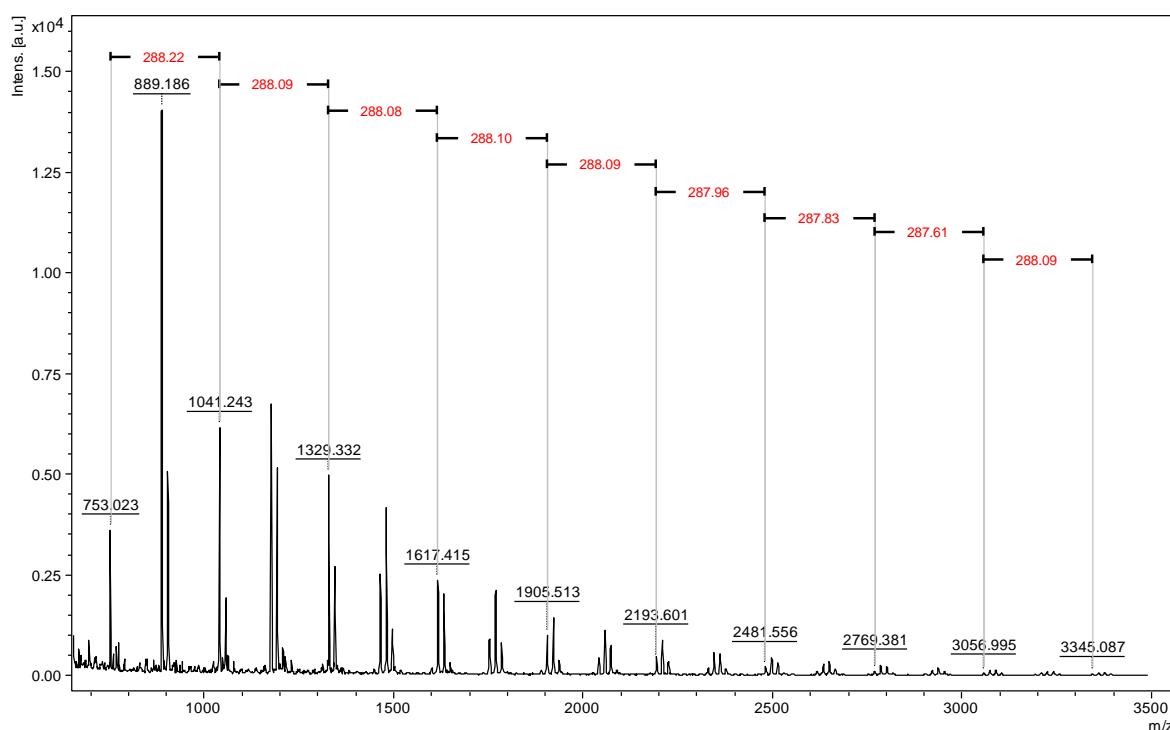
Espectro 1. Espectro de Massas obtido por MALDI do extrato aquoso de *E. dysenterica* – série 1(Modo Positivo).



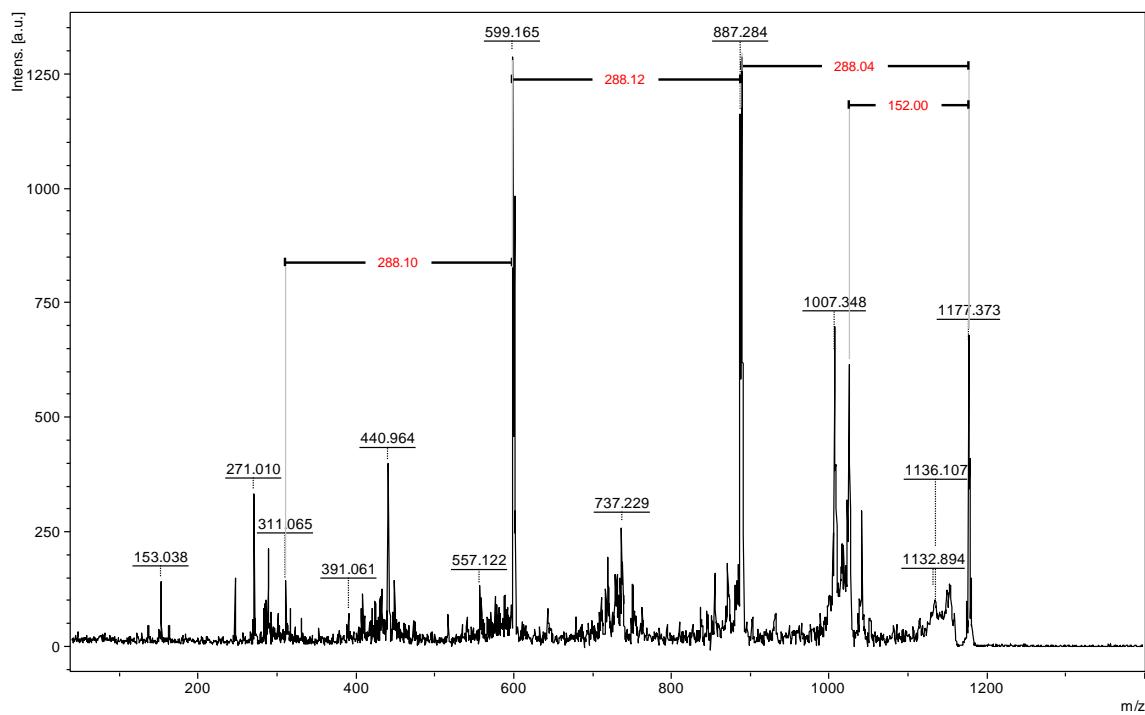
Espectro 2. Espectro de Massas obtido por MALDI do extrato aquoso de *E. dysenterica* – série 2 (Modo Positivo).



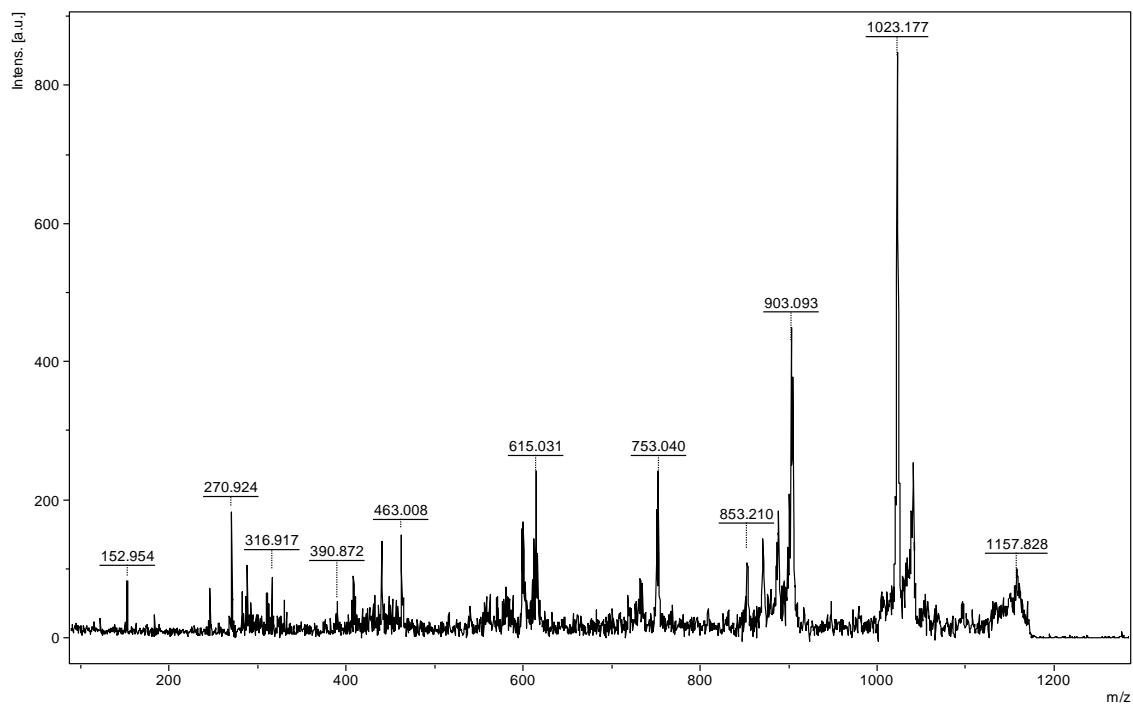
Espectro 3. Espectro de Massas obtido por MALDI do extrato aquoso de *E. dysenterica* – série 3 (Modo Positivo).



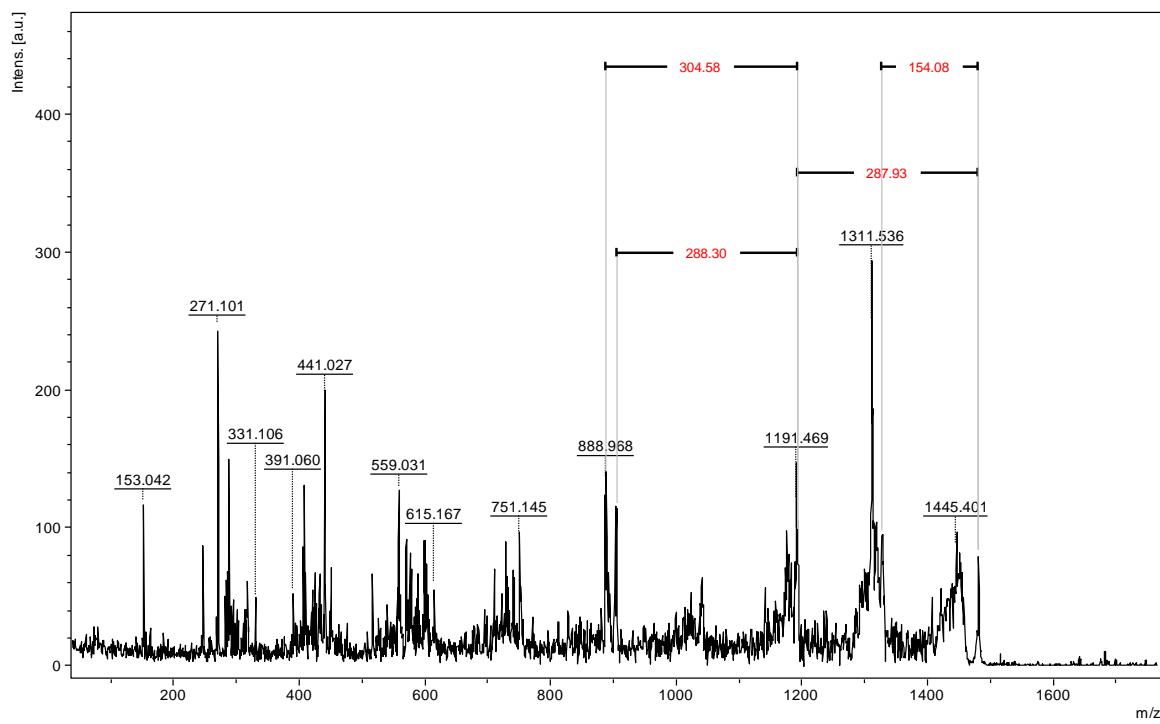
Espectro 4. Espectro de Massas obtido por MALDI do extrato aquoso de *E. dysenterica* – série 4 (Modo Positivo).



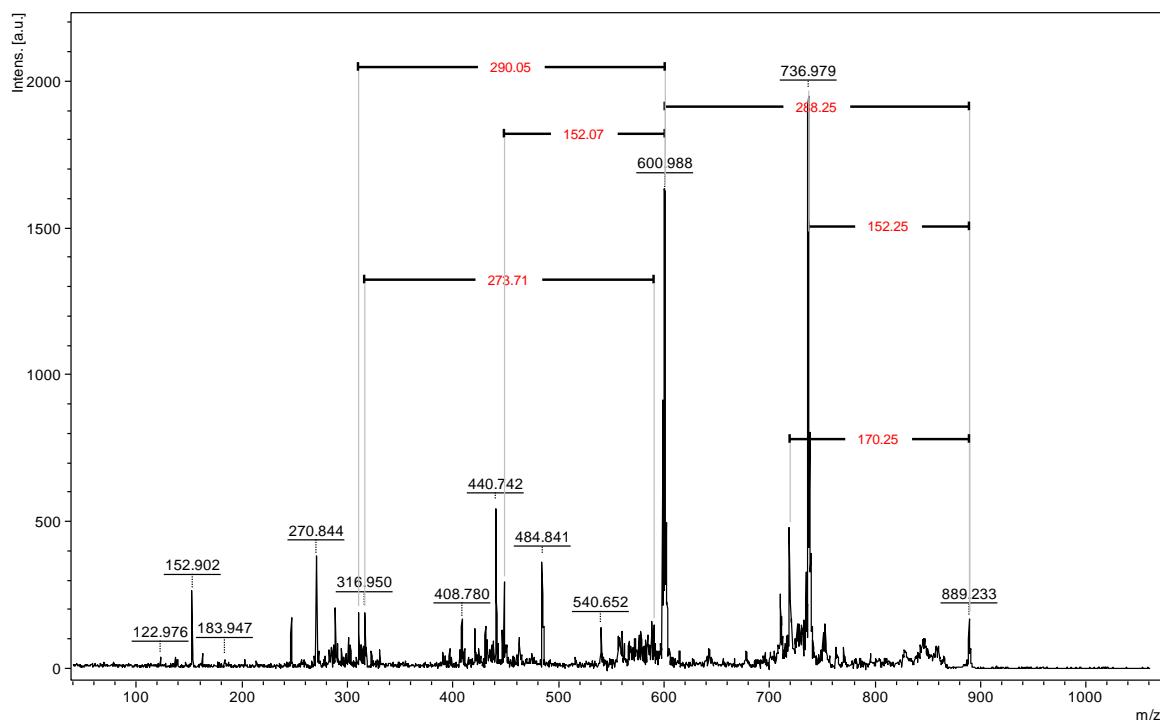
Espectro 5. MS/MS do íon 1177 (Modo Positivo).



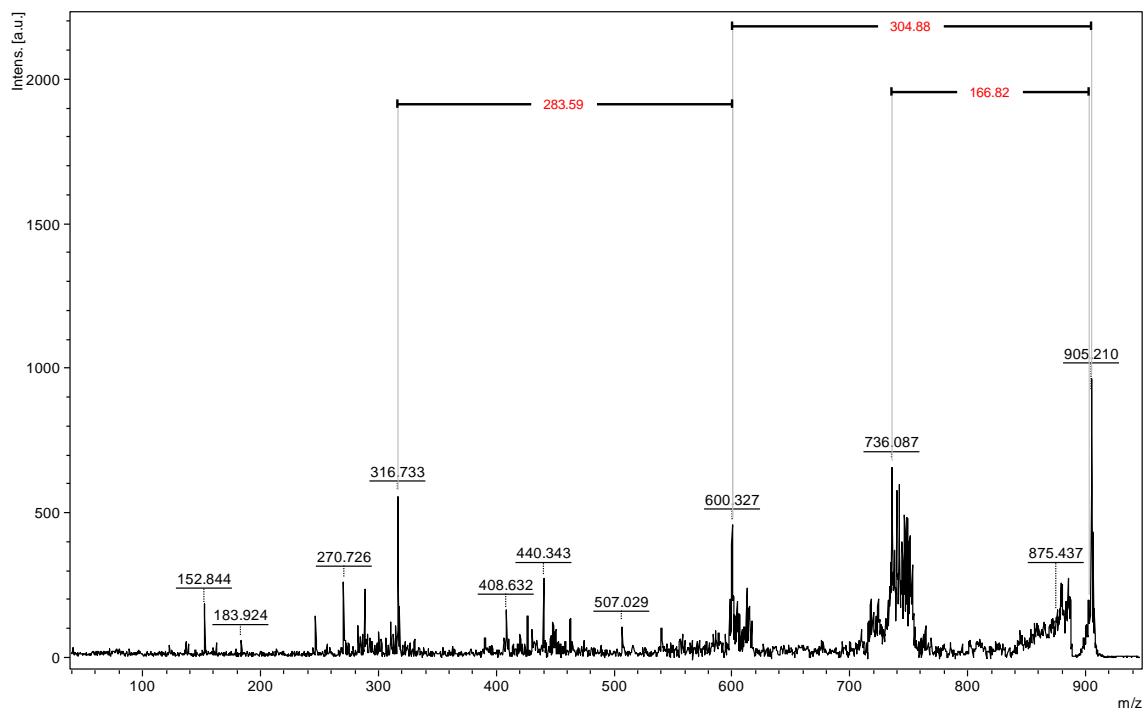
Espectro 6. MS/MS do íon 1193 (Modo Positivo).



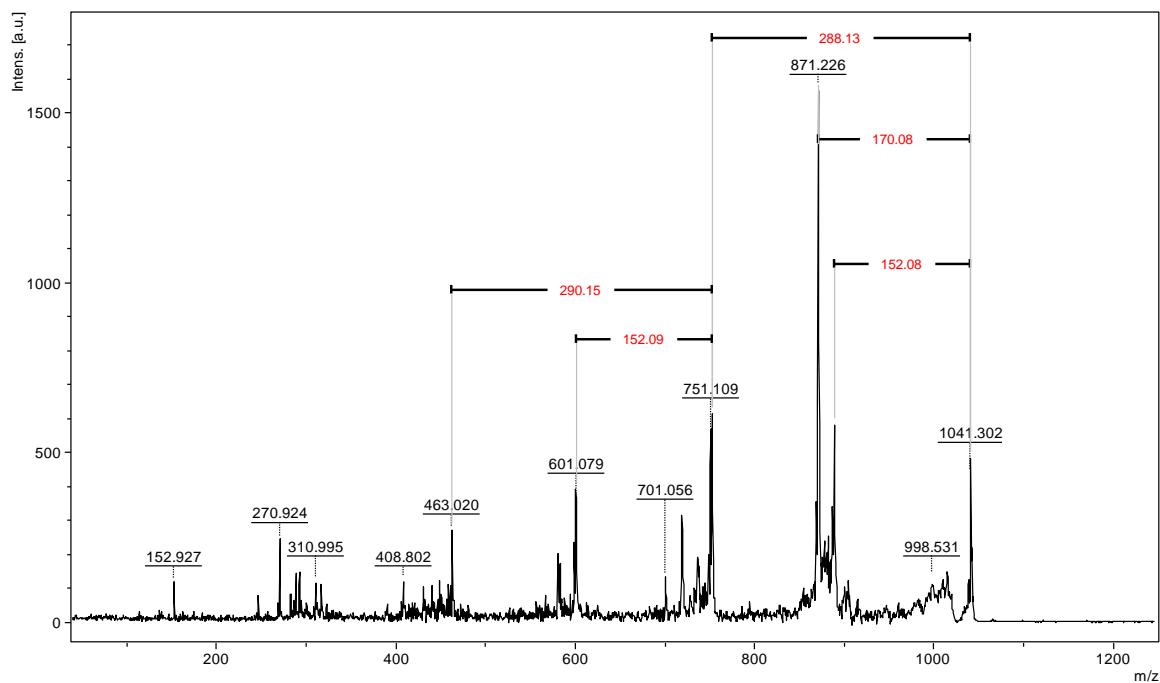
Espectro 7. MS/MS do íon 1481 (Modo Positivo).



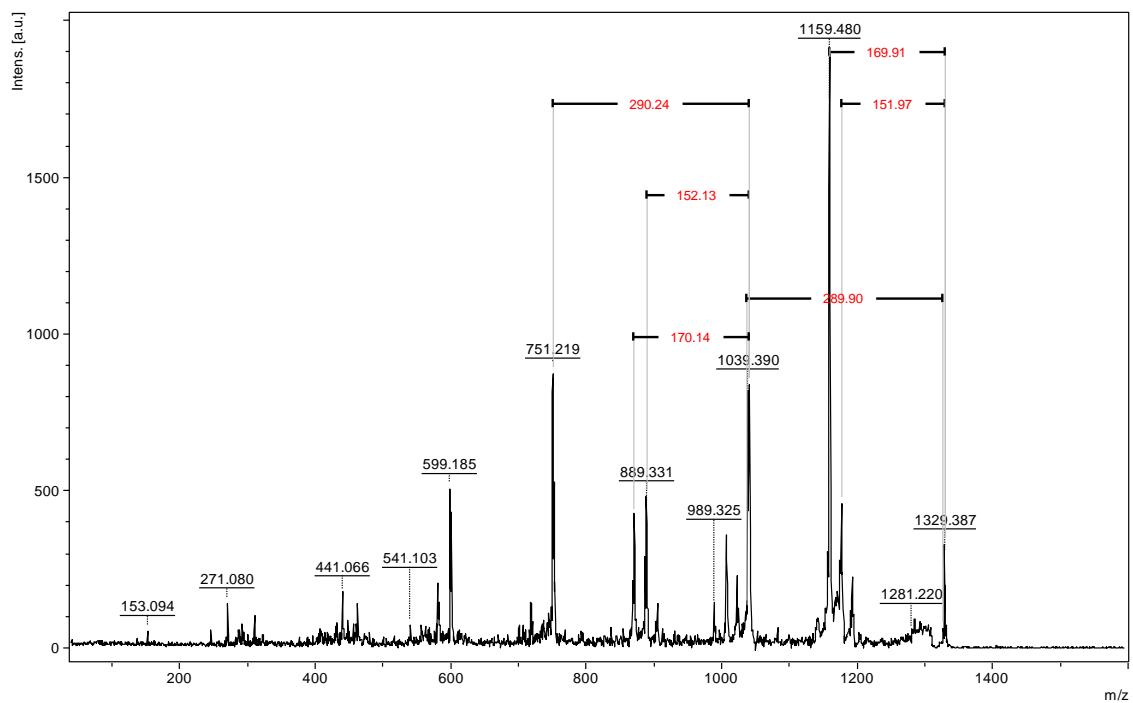
Espectro 8. MS/MS do íon 889 (Modo Positivo).



Espectro 9. MS/MS do íon 905 (Modo Positivo).



Espectro 10. MS/MS do íon 1041 (Modo Positivo).



Espectro 11. MS/MS do íon 1329 (Modo Positivo).