

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional  
15 de Maio de 2014 (15.05.2014)

WIPO | PCT



(10) Número de Publicação Internacional  
**WO 2014/071480 A1**

- (51) Classificação Internacional de Patentes :  
**C07D 31/04** (2006.01)    **A61K 31/35** (2006.01)  
**C07D 31/40** (2006.01)    **A61P 1/04** (2006.01)  
**A61K 36/185** (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional : PCT/BR2013/000458
- (22) Data do Depósito Internacional : 1 de Novembro de 2013 (01.11.2013)
- (25) Língua de Depósito Internacional : Português
- (26) Língua de Publicação : Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade :  
 BR 10 2012 028815 0  
 9 de Novembro de 2012 (09.11.2012)    BR
- (71) Requerente : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP [BR/BR]; Rua Roxo Moreira 1831, Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6.131, CEP: 13083-970-Campinas -SP (BR).
- (72) Inventores; e
- (71) Requerentes (para US únicamente) : BRITO, Alba Regina Monteiro Souza [BR/BR]; Instituto de Biologia da UNICAMP, CEP: 13083-862 - Campinas - SP (BR).

FARIA, Felipe Meira de [BR/BR]; Rua José Martins, 299, Distrito de Barão Geraldo, CEP: 13084-183 - Campinas - SP (BR). SILVA, Marcelo Aparecido da [BR/BR]; Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP: 371130-000 - Alfenas - MG (BR). SANTOS, Lourdes Campaner dos [BR/BR]; Av. Santo Antonio, 200, Bl. 3B Apto. 406, Vila Xavier, CEP: 14810-115 - Araraquara - SP (BR). VILEGAS, Wagner [BR/BR]; Rua Pamplona, 444, Apto. 21, Jd. Paulista, CEP: 01405-030 - São Paulo - SP (BR).

- (74) Mandatário : SILVADO, Fernanda Lavras Costallat; Rua Roxo Moreira, 1831, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6131, CEP: 13083-970 Campinas - SP (BR).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,

(Continua na página seguinte)

- (54) Title : PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING A FRACTION OBTAINED FROM RHIZOPHORA MANGLE EXTRACT AND USE THEREOF
- (54) Título : COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO FRAÇÃO OBTIDA DO EXTRATO RHIZOPHORA MANGLE E SEU USO

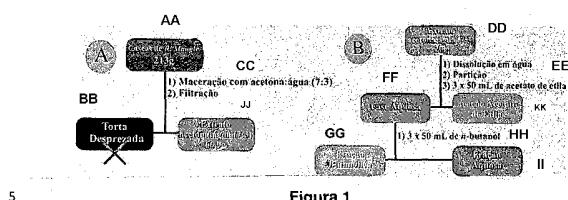


Figura 1

- AA *R. mangle* bark 213g  
 BB Rejected Cake  
 CC  
 1) Maceration with acetone:water (7:3)  
 2) Filtration  
 JJ Acetone:water (7:3) extract 66.9 g  
 DD Acetone:water (1:3) extract 20 g  
 EE  
 1) Dissolution in water  
 2) Partitioning  
 3) 3 x 50 mL ethyl acetate  
 FF Aqueous Phase  
 KK Ethyl Acetate Fraction  
 GG Butanol Fraction  
 HH 1) 3 x 50 mL *n*-butanol  
 II Aqueous Fraction

medicamentosas ou farmacêuticas envolvendo a fração butanólica obtida, bem como a proposição dos compostos contido nessa fração.

(57) Abstract : The present invention describes a method for fractionating an *R. mangle* extract, by means of which it is possible to efficiently concentrate a significant quantity of complex tannins. The fraction obtained by means of the proposed method has a surprising effect in the treatment of ulcers and gastrointestinal injuries, compared to the drug that is currently used for this purpose, since a dose up to 60 times lower than that of the currently used drug can be used and is as effective. Therefore, pharmaceutical or medicinal compositions involving the butanol fraction obtained are described in the present invention, as well as the proposal of the compounds contained in said fraction.

(57) Resumo : A presente invenção descreve uma forma de fracionamento de extrato de *R. mangle* através da qual é possível concentrar-se de forma eficientemente quantidade significativa de taninos complexos. A fração obtida pelo método proposto apresenta efeito surpreendente no tratamento de úlceras e injúrias gastrointestinais, quando comparadas com o medicamento que é atualmente utilizado para essa finalidade, por utilizar dose até 60 vezes menor do que esse e com a mesma eficiência. Dessa forma, são descritas na presente invenção composições



TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,

IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicado:**

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

**“COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO FRAÇÃO OBTIDA DO EXTRATO *Rhizophora mangle* E SEU USO”**

**Campo da invenção**

5 A presente invenção descreve uma forma de fracionamento de extrato de *Rhizophora mangle* através da qual é possível concentrar eficientemente quantidade significativa de taninos complexos. Dessa forma, a fração obtida pelo método proposto apresenta efeito surpreendente no tratamento de úlceras e injúrias gastrointestinais, quando comparadas com o  
10 medicamento que é atualmente utilizado para essa finalidade, por utilizar dose até 60 vezes menor do que esse e com a mesma eficiência.

Portanto, a presente invenção descreve a utilização da fração butanólica obtida em composições farmacêuticas ou medicamentosas com excipientes aceitáveis.

15 **Fundamentos da Invenção**

**Proteção da mucosa gástrica**

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

**Prostaglandinas**

As prostaglandinas estão envolvidas numa série de processos fisiológicos no estômago, incluindo secreção ácida, produção de muco e fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (Robert & Ruwart, 1982). Foi

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

O efeito biológico das PGs, neste caso da PGE2, é mediado via receptores específicos de membrana, denominados EP (EP1, EP2, EP3 e EP4), que são acoplados a proteínas-G de membrana, ligadas a diferentes vias de transdução de sinal intracelular (Sugimoto *et al.*, 2000; Dey *et al.*, 2006). Ligantes de PGE2 a receptores EP1 resultam na liberação intracelular de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG); ligantes de EP2 e EP4 ativam o sistema adenilato ciclase-AMPc; por último, ligantes EP3 inibem esse sistema (Pawlick, 2002; Dey *et al.*, 2006).

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

#### Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico tem importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica, como: regulador na secreção de muco (Brown *et al.*, 1993), vasodilatador, produzindo aumento do fluxo sanguíneo local (Wallace, 2000), inibidor da migração de neutrófilos (Banick *et al.*, 1997) e auxiliar no processo de cicatrização da úlcera

gástrica (Jadeski & Lala, 1999). Nesta última, a ação do NO produz aumento da deposição de colágeno pelos fibroblastos além de estimular a angiogênese (Wallace, 2000). O NO exerce amplo espectro de atividades biológicas in vivo dependentes, em parte, da guanosina-3', 5'-monofosfato cíclica (cGMP) produzida após estimulação do guanilato ciclase solúvel (Moncada, et al., 1991). Nas células musculares lisas essa estimulação resulta em relaxamento. O NO pode atuar também diretamente em canais de potássio dependentes de cálcio, levando a uma hiperpolarização dependente do endotélio, resultando em vasodilatação (Bolotina et al., 10 1994).

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

Estímulos apropriados, tais como respostas inflamatórias (por exemplo, a presença de úlcera gástrica), aumentam a atividade da iNOS (Kristjansson et al., 2005). O bloqueio do NO aumenta o estresse oxidativo, 20 ativando mastócitos, que são células encontradas em grandes quantidades no trato gastrintestinal, e que liberam mediadores como histamina e fator ativador de plaquetas (PAF), causando aumento da permeabilidade epitelial (Kanwar et al., 1994).

#### Muco e bicarbonato

A primeira linha de defesa contra o ácido é a barreira de muco (Phillipson et al., 2002). O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco aderida à superfície mucosa. Esse muco, juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio, serve como barreira contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (Allen & Flemstrom, 30 2005). O muco se apresenta de forma viscosa, elástica e aderente na forma de um gel transparente composto por 95% de água e 5% de

glicoproteína, que recobre a superfície da mucosa gastrintestinal (Repetto & Lleusly, 2002). O muco gástrico possui também atividade antioxidante devido às glicoproteínas, sendo os açúcares potentes seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mojzis *et al.*, 2000).

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

#### Fluxo sanguíneo

Um dos papéis do fluxo sanguíneo é suprir a mucosa com oxigênio, nutrientes e hormônios, além de participar na regulação da saída de ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato e remoção dos produtos 15 do tecido, incluindo a retro-difusão de íons hidrogênio, assim, o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa. A redução deste está envolvida na formação das lesões na mucosa gástrica causadas por estresse, etanol e DAINES (Kawano & Tsuji, 2000).

20 A micro-circulação é modulada pelo sistema nervoso e mediadores como NO, bradicinina e PGs. Difusão de ácido ou toxinas na mucosa resulta em elevação crítica do fluxo sanguíneo mediada por neurônio sensorial aferente, limitando danos a facilitando a reparação. O sangue dilui e/ou neutraliza o ácido/toxina e previne o acúmulo de altas 25 concentrações na mucosa (Wallace & Ma, 2001).

#### Grupamentos sulfidrílicos (GSH)

O papel gastroprotetor dos grupamentos sulfidrílicos endógenos (compostos sulfidrílicos), presentes no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema xantina-oxidase, já foi demonstrado em 30 diversos modelos de indução de úlcera (etanol, DAINES, e estresse), nos quais ocorre depleção destes compostos (Hernandez-Munoz *et al.*, 2000

e Bayir *et al.*, 2006). O pré-tratamento com bloqueadores de grupamentos sulfidrílicos como o N-ethylmaleimide (NEM) demonstrou potencializar significativamente a indução de úlceras gástricas (Hiraishi *et al.*, 1994), enquanto que aumentos significativos desses grupamentos promovem 5 gastroproteção (Sener-Muratoglu *et al.*, 2001).

No processo inflamatório, EROs são geradas e iniciam uma reação em cadeia que culmina na peroxidação lipídica e morte celular (Tariq *et al.*, 2006). Os compostos sulfidrílicos ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou produzidos após exposição a agentes 10 nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (Avilla *et al.*, 1996).

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

#### 15 Reconstituição e renovação do epitélio gástrico

O estômago possui várias formas de se proteger quando exposto continuamente a altas concentrações de ácido; uma das estruturas mais importantes é o epitélio gástrico. Ele é freqüentemente renovado, sendo 20 as células “velhas” deslocadas em direção ao lúmen. O epitélio gástrico humano renova-se completamente a cada 2-4 dias. A habilidade em permitir que as células velhas sejam repostas por células mais jovens, sem quebra significante da barreira, é atribuída a um processo de extensão celular, ou seja, células vizinhas gradualmente “apertam” as células envelhecidas na base (Wallace & Granger, 1996).

25 O termo reconstituição refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa, que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida. As células gástricas estão ligadas à membrana basal da célula epitelial e este local é bastante sensível aos danos induzidos por ácido (Paimela *et al.*, 1995).

30 A cicatrização da mucosa na úlcera gástrica requer reconstituição da estrutura glandular epitelial (re-epitelização), restauração da

lâmina própria incluindo uma rede microvascular na mucosa, nervos e células de tecidos conjuntivos (Milani & Calabro, 2001). A cicatrização das úlceras é acompanhada de um aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera, de gastrina plasmática além de citocinas pró-inflamatórias como 5 TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

A hipergastrinemia que ocorre durante o período anterior à cicatrização da úlcera pode ser atribuída à supressão de acidez gástrica e expressão de fatores de crescimento (Brzozowski *et al.*, 2001).

A mucosa gástrica, situada na margem da úlcera, forma uma 10 “zona de cicatrização”, glândulas dessa região começam a dilatar e as células de revestimento dessas glândulas sofrem diferenciação. A ativação de fator de crescimento epidermal (EGF) e proliferação celular é iniciada 15 três dias após a implantação da úlcera e é essencial para a cicatrização. De modo geral, os fatores de crescimento promovem proliferação e migração 20 de células epiteliais para a cratera da úlcera, levando à re-epitelização dessa cratera e maturação das glândulas. Na base da úlcera ocorre granulação de tecido com remodelação contínua. A angiogênese (formação de microvasos) facilita essa remodelação por liberar oxigênio e nutrientes. Células inflamatórias são substituídas por fibroblastos e microvasos 25 na fase final da cicatrização (Chan & Sung, 2001). A angiogênese é importante então para o reparo, tanto de dano agudo quanto crônico, durante a cicatrização de úlceras gastroduodenais (Malara *et al.*, 2005).

#### Os radicais livres e a defesa antioxidante

A história dos radicais livres na biologia e medicina começou 25 de fato quando em McCord e Fridovich (1969) descobriram a superóxido dismutase (SOD), uma enzima capaz de destruir o radical ânion superóxido pela redução univalente do oxigênio. A partir daí observou-se crescimento exponencial dos artigos científicos que mostravam a excessiva produção 30 de “espécies reativas de oxigênio” (EROs) ou “radicais livres” implicada na patogênese de várias doenças em humanos.

EROs podem ser formadas pela ativação de células inflamatórias, durante o metabolismo de xenobióticos, ou a partir da xantina oxidase durante lesões formadas por isquemia-reperfusão (Blake et al., 1987; Cross et al., 1987; Grisham & Granger, 1988; Braganza, 1989).

5 Radicais livres estão envolvidos na patofisiologia de várias doenças gastrintestinais (úlceras e inflamações) e hepáticas (Arthur et al., 1988; Braganza, 1989; Rozga, 1989; Verspaget et al., 1991; Babbs, 1992; Harris et al., 1992; Stark & Szurszewski, 1992; Van der Vliet & Bast, 1992; Simmonds, 1995; Yoshida, 1995).

10 O metabolismo de ácido araquidônico, macrófagos e neutrófilos geram EROs que podem contribuir para danos causados na mucosa gástrica (Rosen et al., 1995). Os seqüestradores de EROs são utilizados para proteger a mucosa gástrica do dano oxidativo e acelerar a cicatrização de úlceras. O desequilíbrio entre a formação e a remoção  
15 dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (Gutteridge, 1993; Halliwell & Gutteridge,  
20 2005).

De acordo com Augusto (2006) as defesas antioxidantas do organismo podem ser enzimáticas e não enzimáticas endógenas, e também podem vir da dieta.

As enzimáticas são constituídas por superóxido dismutases, 25 catalases, GSH peroxidases, GSH redutases, peroxirredoxinas, tiorredoxinas, enzimas de reparo, que sintetizam GSH e que repõe NADPH, enquanto as não-enzimáticas são GSH, ácido úrico e albumina.

Dentre aquelas provenientes da dieta são encontrados: ácido ascórbico, α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno, polifenóis, flavonóides, etc.  
30 Em condições normais a concentração destas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantas que

as removem, ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelas enzimas superóxido dismutase, catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR) (McCord & Fridovich, 1969; Halliwell & Gutteridge, 2005).

5 Antioxidantes endógenos e derivados da dieta são indispensáveis para a manutenção da saúde frente ao ataque de radicais livres; dentre os derivados da dieta encontra-se grande variedade de antioxidantes, muito dos quais representados pelos potentes polifenóis. Esses compostos podem exercer seus efeitos benéficos no trato gastrintestinal, uma vez que este é possivelmente o principal local de ações pro e antioxidantas. Todas as 10 condições patológicas encontradas no trato gastrintestinal envolvem espécies reativas e danos oxidativos durante sua progressão e até mesmo antes de sua origem (Halliwell *et al.*, 2000; Halliwell & Gutteridge, 2005).

#### Polifenóis, os taninos vegetais

15 Taninos são uma classe de compostos, substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular de até 3000 Dalton, as quais apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas.

20 Os taninos são particularmente importantes como componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos ou cascas em produtos alimentícios vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (Santos & Mello, 2004)

25 O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado; acredita-se que os mesmos estejam envolvidos na defesa química das plantas contra herbivoria e microrganismos patogênicos. Na defesa contra herbivoria a diminuição da palatabilidade devido ao sabor adstringente, dificuldades na digestão por complexação dos taninos com 30 enzimas digestivas e/ou com proteínas da planta e, por último, formação de produtos tóxicos no trato digestório a partir da hidrólise dos taninos

seriam os modos de ação propostos como estratégia evolutiva das espécies que tem taninos como metabólitos secundários (Santos & Mello, 2004).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos  
5 são, ao menos em parte, devidas a três características gerais comuns, em maior ou menor grau a aqueles condensados e hidrolisáveis:

1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, dentre outros);

2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres;

10 3) habilidade de complexar-se com macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos.

Foi sugerido que os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estejam intimamente ligados a essas três propriedades. Os taninos ajudam no processo de cura de feridas, 15 queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, que favorece abaixo desta, a ocorrência do processo de cicatrização (reestruturação do epitélio e formação vasos).

Processo similar ocorre, provavelmente, em casos de úlcera 20 gástrica, onde uma camada tanino-proteína seria responsável por proteger a lesão e garantir melhor cicatrização (Haslam, 1996).

Taninos com diferentes estruturas químicas ocorrem em todo o planeta nas plantas medicinais e alimentares; apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas, as quais são, muitas vezes, 25 específicas para determinadas estruturas além de significativa para a saúde humana (Okuda, 2005). Os taninos são, portanto, merecedores de maior número de investigações, não só em fitoquímica, como também em farmacologia.

#### Rhizophora mangle e sua importância como fonte de taninos

Espécies do gênero *Rhizophora*, são conhecidas pelas 30 propriedades medicinais de seus taninos. Por exemplo, *R. apiculata* possui

atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres (Vijayavel et al., 2006; Rahim et al., 2008; Loo et al., 2007; Loo et al., 2008), e atividade antiviral (Premanathan et al., 1999); *R. stylosa* possui também atividade antioxidante (Li et al., 2007; Takara et al., 2008).

5 A *R. mangle* é conhecida popularmente como "Mangue-Vermelho", "Candapuva", "Guaraparaíba", "Mangue Garobeira", "Mangue de Espeto", "Mangue de Pendão", "Mangue Preto", "Mangue Sapateiro", "Paxiubarana" e "Mangue Verdadeiro", principalmente no nordeste do Brasil; é conhecida mundialmente como "Mangle Rojo", "Mangle Colorado" 10 e "Red Mangrove". É encontrada em todo litoral do Brasil, Antilhas, México, África e Ilhas do Pacífico; possui importância econômica como fornecedora de taninos (que compreendem 15 a 36% da massa seca) extraídos das cascas sendo a planta um dos mais importantes adstringentes de uso industrial (Pio-Corrêa, 1984; Chapman, 1976).

15 Segundo Pio-Corrêa (1984), a casca de *R. mangle* contendo tanino, é usada na forma de infuso contra diarréias, desinterias e hemorragias. Em vários países da América (Panamá, Costa Rica, Jamaica, Cuba) a espécie é empregada como lenha, além de ter sua decocção misturada com óleo de linhaça para encerar o assoalho das habitações, 20 inclusive palácios e grandes hotéis.

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

25 Alguns trabalhos recentes, especialmente de Cuba, relatando diversas propriedades medicinais de *R. mangle*, tais como antioxidante (Sánchez et al., 2006 e Berenguer et al., 2006), antibacteriana (Melchor et al., 2001), antiulcerogênica (Perera et al., 2001 e Berenguer et al., 2006), cicatrizante (Fernandez et al., 2001 e de Armas et al., 2005), 30 antinflamatória (Marrero et al., 2006) e anti-diabética (Alarcon-Aguilara et al., 1998).

Observando, portanto, as anterioridades apontadas, a presente invenção descreve uma forma de fracionamento de extrato de *R. mangle* através da qual é possível concentrar-se de forma eficientemente quantidade significativa de taninos de interesse.

5 Dessa forma, a fração obtida pelo método proposto apresenta efeito surpreendente no tratamento de úlceras e injúrias gastrointestinais, quando comparadas com o medicamento que é atualmente utilizado para essa finalidade, por utilizar dose até 60 vezes menor do que esse e com a mesma eficiencia.

10 **Breve descrição da invenção**

Refere-se o presente pedido de patente de invenção a compostos – e composições – obtidos por um processo, também objeto do presente pedido de patente de invenção, de forma a apresentar efeito surpreendente no tratamento de úlceras e injúrias gastrointestinais.

15 Os compostos são aqueles demonstrados na figura 32.

As composições são obtidas através da combinação de um ou mais composto descrito na figura 32 associados a um ou mais excipientes farmaceuticamente ativos.

O Processo de obtenção é compreendido basicamente por:

- 20 A) Maceração da casca de *Rhizophora mangle* em solução de água e acetona;
- B) Filtração do extrato obtido em (A)
- C) Dissolução do extrato obtido em (B) em água;
- D) Partição líquido-líquido da solução obtida em (C);
- E) Dissolução do extrato obtido em (D) em acetato de etila;
- F) Partição da fração obtida em (E) por 3 vezes;
- G) Partição da fase aquosa obtida em (F) com n-butanol por 3 vezes

30 Esses compostos apresentaram efeito surpreendente em relação ao estado da técnica sendo necessária uma quantidade 60 vezes menor, em relação ao principal similar encontrado, para obtenção do mesmo efeito farmacológico.

### Breve descrição das figuras

Na **Figura 1** é possível observarmos o fluxograma representativo dos métodos de extração (A), e, fracionamento (B) das cascas de *R. mangle*.

É possível verificar, na **Figura 2** a cromatografia em camada delgada, (A) revelação com anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (B) revelação com NP/PEG; (C) revelação com FeCl<sub>3</sub> 1%. CE: extrato bruto; AcF: fração acetato de etila; AqF: fração aquosa; BuF: fração butanólica; GA: ácido gálico; Ru: rutina; Ca: catequina; Ep: epicatequina. .

A **Figura 3** mostra chromatogramas obtidos por HPLC-DAD das 10 injeções de (A) extrato acetona:água (7:3); (B) fração aquosa; (C) fração acetato de etila; (D) fração butanólica.

Na **Figura 4** observamos o espectro de massas modo negativo do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*.

Verifica-se na **Figura 5** o espectro de massas modo negativo da 15 fração aquosa do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*.

A **Figura 6** mostra o espectro de massas modo negativo da fração acetato de etila do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*.

20 Observa-se na **Figura 7** o espectro de massas modo negativo da fração butanólica do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *Rhizophora mangle*.

A **Figura 8** mostra o potencial redutor do extrato bruto (CE) e frações de *R. mangle* sobre o radical DPPH.

25 A proteção gástrica promovida pela fração aquosa (fr-Aq) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pode ser observada na **Figura 9**. Dados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 comparados ao controle Salina.

30 A **Figura 10** mostra a proteção gástrica promovida pela fração acetato de etila (fr-EtOAc) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por

etanol em ratos. Dados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*P<0.05, \*\*P<0.01 e \*\*\*P<0.001 comparados ao controle Salina.

Na **Figura 11** vê-se a proteção gástrica promovida pela fração butanólica (fr-BuOH) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Dados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*P<0.05, \*\*P<0.01 e \*\*\*P<0.001 comparados ao controle Salina.

Observa-se na **Figura 12** a proteção gástrica promovida pela fração butanólica ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) de *R. mangle* no modelo de úlcera induzida por isquemia/reperfusão em ratos. Dados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*\*P<0.001 comparados ao controle Salina.

Na **Figura 13** verifica-se o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-ethyl maleimide (NEM). Dados expressos em média ± desvio padrão ( $n = 7$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Tuckey, \*\*\*P<0.001 comparados ao grupo Salina.

O efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}$ ) no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME é observado na **Figura 14**. Dados expressos em média ± desvio padrão ( $n = 7$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Tuckey, \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 comparados ao grupo Salina.

A **Figura 15** mostra o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) sobre a produção de muco aderido pela mucosa gástrica de ratos submetidos à ligadura do piloro. Dados expressos em média ± desvio padrão ( $n = 7$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett, \*\*P<0.01 comparados ao grupo Salina.

Na **Figura 16** vemos o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) na produção de prostaglandina E2 (PGE2) na mucosa gástrica de ratos. Dados expressos em média ± erro padrão ( $n = 6$ ), ANOVA seguida de

teste a posteriori de Dunnett, \*\*P<0.01, \*\*\*P>0.001 comparados ao grupo Indometacina.

Observa-se na **Figura 17** o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) durante a (A) evolução, (B) 4º, (C) 8º e (D) 14º dias sobre a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média ± desvio padrão ( $n = 4$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett, \*\*P<0.01 comparados ao grupo Salina.

A **Figura 18** mostra a avaliação da toxicidade da fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos. Efeito da fr-BuOH administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais. Dados expressos em média ± desvio padrão ( $n = 12$ ). ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett, P>0.05 comparados ao grupo Salina.

A **Figura 19** mostra, por sua vez, a avaliação da toxicidade da fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos. Efeito da fr-BuOH administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos dos animais. Dados expressos em média ± desvio padrão ( $n = 4$ ). ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett, \*\*P<0.01 comparados ao grupo Salina.

O efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) por 4 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético é visto na **Figura 20**. Dados expressos em média ± erro padrão ( $n = 4$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett, P>0.05 comparados ao grupo Salina.

Na **Figura 21** vemos o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) por 8 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média ± erro padrão ( $n = 4$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett, P>0.05 comparados ao grupo Salina.

A **Figura 22** mostra o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) por 14 dias sobre a expressão de cicloxigenase 1 (COX-1) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados

expressos em média ± erro padrão ( $n = 4$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett,  $P>0.05$  comparados ao grupo Salina.

A **Figura 23** mostra o efeito da administração oral de fr-BuOH por 4 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média ± erro padrão ( $n = 4$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett,  $P>0.05$  comparados ao grupo Salina.

Na **Figura 24** observa-se o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) por 8 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induziada em ratos por ácido acético. Dados expressos em média ± erro padrão ( $n = 4$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett,  $P>0.05$ .comparados ao grupo Salina.

A **Figura 25** mostra o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) por 14 dias sobre a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média ± erro padrão ( $n = 4$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  comparados ao grupo Salina.

Na **Figura 26** observa-se o efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) por 14 dias sobre expressão de fator de crescimento epidermal (EGF) durante a cicatrização da lesão induzida em ratos por ácido acético. Dados expressos em média ± erro padrão ( $n = 4$ ), ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  comparados ao grupo Salina.

A **Figura 27**.mostra fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ). Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise da organização morfológica da mucosa onde se observa os diferentes grupos experimentais. gl – glândulas; m – mucosa; mm – muscular da mucosa; SM – sub-mucosa.

A **Figura 28** mostra fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ). Cortes histológicos corados com ácido periódico de Schiff (PAS), marcador de

glicoproteínas, para visualização de muco gástrico produzido nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam compostos polissacarídicos.

Observa-se, na **Figura 29**, fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de Heat Shock Protein (HSP) 70 revelado com 3'3 diaminobenzidina (DAB), que promove a cor marrom como resposta positiva da reação. Foi verificada a participação da HSP-70 no processo de cicatrização nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização.

A **Figura 30** apresenta fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) revelado com complexo ABC 3'3 diaminobenzidina (DAB) e peroxidase, que promove a coloração marrom como resposta positiva da reação. Foi verificado o processo de divisão celular durante a cicatrização das lesões nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização.

Na **Figura 31** vemos fotomicrografias de estômagos de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com fr-BuOH (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>). Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de cicloxygenase 2 (COX-2) revelado com ABC 3'3 diaminobenzidina (DAB), que promove a coloração marrom como resposta positiva da reação. Foi verificada a participação da enzima COX-2 no processo de cicatrização das lesões nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam a imunolocalização.

Na **figura 32** as estruturas dos compostos polifenólicos propostos a partir do perfil (ESIMS) do extrato acetona:água (7:3) obtidos a partir das cascas de *R. mangle*. (1) catequina ou epicatequina, monômero de tanino condensado; (2) e (3) catequina (epi) heterosídeo; (4), (5), (6) e (7) derivados de elagitaninos, tanino hidrolisável; (8) e (9) derivados de galotaninos, tanino hidrolisável; (10) e (11) derivados de taninos complexos.

#### Descrição detalhada da invenção

A presente invenção descreve composições farmacêuticas envolvendo frações obtidas a partir de *Rhizophora mangle* cujo principal uso é no tratamento de injúrias do sistema digestório. Mais especificamente, são descritas composições medicamentosas envolvendo frações obtidas através de 5 diferentes solventes, bem como a proposição dos compostos contidos nessas frações.

As frações obtidas do extrato da casca de *R. mangle*, tem suas características químicas, farmacológica e resposta biológica aqui descritas, bem como a proposição dos compostos contidos nessas frações.

10 A Preparação dos extractos e das frações dá-se a partir da casca de *R. Mangle*. Ela foi seca durante sete dias a 40° C (213 g) e triturado até obter-se um pó (3 mm). Foi adicionado o pó em acetona:água (7:3), obteve um extracto preparado por maceração com um rendimento de 31,4% (66,9 g). O extracto de casca de *R. mangle* (CE) foi submetido a partição líquido-líquido 15 com solventes de polaridade crescente, com frações semi purificadas. Esta metodologia proporciona uma limpeza adequada dos extractos polares. Cerca de 20g do extracto foi parcionado entre 150 mL de água e 50 mL de acetato de etilo por intermédio de um funil de separação por 3 vezes. Em seguida, a fase aquosa foi particionada com 50 mL de n-butanol (3 vezes). Todas as fracções foram concentradas sob vácuo para se obter as fracções secas:: fração aquosa 20 (fr-Aq; 6,34 g, 31,7%), acetato de etilo fracção (fr-AcOEt; 4,82 g, 24,10%), e a fracção butanólica (Bu OH, 7 0,73 g, 38,65%).

### 1) Preparação do extracto e frações

25 A preparação do extracto aqui proposta descreve a forma preferencial de obter-se as frações de interesse, não devendo e presente invenção, entretanto, restringir-se a ela. Salienta-se que é importante, após o fracionamento do extracto, a obtenção de uma fração butanólica.

O preparo do extracto iniciou-se a partir da secagem das cascas de 30 *R. mangle* em estufa à 40°C durante sete dias e sua posterior moagem. A extração é realizada utilizando-se acetona:água (7:3) pelo método de maceração, que durou setes dias e obteve o rendimento de 31,4%. O extracto

acetona:água de *R. mangle* foi, então, submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, obtendo assim frações semi-purificadas. Esta metodologia proporciona um adequado *clean up* dos extratos polares (Calixto & Yunes, 2001).

5 Aproximadamente 20 g do extrato foi dissolvido em 150 mL de água em um funil de separação. 50 mL de acetato de etila foi adicionado ao funil de separação e particionado por 3 vezes. Em seguida, a fase aquosa foi particionada também com 50 mL de n-butanol (por 3 vezes), conforme pode ser observado na **figura 1**.

10 Após essa etapa, foram obtidas, portanto, três frações, a Fração Acetato de Etila (fr-EtOAc), a Fração Butanólica (fr-BuOH) e a Fração Aquosa (Aq-F). Todas elas serão consideradas na presente descrição para que se possa evidenciar a eficiência da Fração Butanólica sobre as outras.

15 Para determinação dos componentes das frações de interesse, bem como se obter indicações da eficiência no método de obtenção aqui apresentado, foram realizados testes de Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Espectrofotometria de massas com ionização por eletrospray (ESIMS), como descritos a seguir. As descrições das formas de realização dos testes encontram-se detalhadas nos 20 **exemplos 2, 3 e 4**, respectivamente.

## 2) Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD mostrou por meio das três revelações utilizadas informações importantes acerca dos compostos presentes nas amostras testadas através das colorações adquiridas pelos compostos após reação 25 com os respectivos reveladores, além da visualização da eficiência no processo de fracionamento proposto na presente invenção.

É possível verificar na **figura 2 (A)** que a revelação da placa cromatográfica com anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> permitiu observar a presença de catequina nas amostras de extrato e frações. A revelação com NP/PEG (natural products/polyethylene glycol), por sua vez, representada pela **figura 2 (B)**, aponta também para esta última observação. Já a **figura 2 (C)**, onde

se observa a placa cromatográfica revelada com FeCl<sub>3</sub> 1%, chama a atenção para a possível presença de taninos complexos, observação feita pela tonalidade acinzentada, provavelmente resultado da mistura de tanino complexo (esverdeada) com tanino hidrolisável (azulada).

5    **3) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

As análises por HPLC-DAD foram realizados para verificação do processo de fracionamento e da separação observada na CCD, assim o método não foi empregado visando identificação de substâncias, uma vez que não foram injetados padrões para esta finalidade. O perfil 10 cromatográfico obtido para cada amostra indica que cada uma das frações possui características químicas próprias, evidenciando a qualidade e sucesso dos procedimentos extractivos aqui proposto, como pode ser verificado na **figura 3**.

4) **Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESIMS)**

15       Os constituintes das frações de interesse foram identificadas através de testes de Espectrofotometria de massa com ionização por eletrospray. Os constituintes foram identificados por comparação dos pesos moleculares com dados da literatura.

Assim como na análise química inicial realizada através da 20 análise da CCD e HPLC, os espectros de massas obtidos pela ionização dos compostos por electrospray (**figuras 4, 5, 6 e 7**) permitiram corroborar a eficiência do processo de fracionamento aqui proposto do extrato acetona:água (7:3) das cascas de *R. mangle*.

Estes métodos de análise, um comum e qualitativo (CCD) e os 25 outros modernos e com maior resolução analítica (HPLC e ESIMS) permitiram levantar conjunto de dados que forneceu resultados necessários para à proposição de alternativas estruturais dentro da classe com maior eficiência.

A análise desses resultados indicou os perfis cromatográficos 30 (**figura 6**) e de massas – *fingerprints* – (**figuras 8 a 11**) obtidos para extrato e frações orgânicas indicaram que o método de fracionamento

descrito nesse processo é o mais eficiente, porém não é o único, para obter-se a fração com a qualidade e pureza necessária. Os testes CCD, HPLC e ESIMS ratificam a boa execução do fracionamento.

A análise dos espectros se deu por comparação do peso molecular e busca bibliográfica em bases de dados como SciFinder, PubMed, e ISI of Knowledge, enquanto a composição das moléculas propostas (mostradas em seguida) foi realizada utilizando-se para tal o software ACD/LabsChemSketch 12.0 free version.

As moléculas propostas com base na análise de sua massa molecular ( $m/z$ ) constituem a classe em estudo, sendo encontrados representantes das três classes de taninos hoje conhecidas, condensados, hidrolisáveis e complexos. Adicionalmente, foi possível observar que alguns monômeros de taninos condensados e hidrolisáveis heterosídeos, bem como o monômero isolado, neste caso a catequina ou epicatequina estão presentes nas frações obtidas.

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

**Tabela 1** - Descrição das moléculas propostas com sua massa real ( $m/z$ ) e a massa encontrada no ESIMS ( $m/z$  - H)

Composto	Classificação	m/z real	m/z - H
(1) C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	catequina ou epicatequina	290	289
(8) C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	derivado de galotanino	342	341
(2) C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	catequina (epi) heterosídeo	436	435
(3) C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	catequina (epi) heterosídeo	452	451
(4) C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>14</sub>	derivado de elagitanino	482	481
(5) C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	derivado de elagitanino	540	539
(6) C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	derivado de elagitano	598	597
(7) C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> O <sub>16</sub>	derivado de elagitanino	630	629
(11) C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	derivado de tanino complexo	724	723
(10) C <sub>35</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	derivado de tanino complexo	738	737
(9) C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	derivado de galotanino	942	941

A partir então da obtenção do perfil do extrato e frações, dois experimentos de atividade antioxidante *in vitro*, DPPH e Folin-Ciocalteu, foram realizados os testes de Determinação dos fenóis totais (Folin-Ciocalteu) e avaliação da redução do radical DPPH descritos a seguir e cujas formas de execução encontra-se detalhadas no exemplo 8, itens A e B.

### 5) Determinação da Atividade Antioxidante “*in vitro*” através do teste de Folin-Ciocalteu e Redução do Radical DPPH

Na **tabela 1** são mostrados os resultados para estes dois modelos e a concentração de polifenóis, tanto no extrato quanto nas frações apresenta-se elevada.

Os dados obtidos estão de acordo com aqueles encontrados por Chapman (1976) nas cascas de *R. mangle*. Os valores de EC50 para a atividade antioxidante (DPPH), tanto do extrato bruto, quanto das frações são baixos, inclusive, o extrato bruto apresentou valor inferior ao do controle queracetina. A **figura 8** ilustra a curva de redução do DPPH para as diferentes concentrações de extrato e frações.

Há, portanto, indicação que extrato e frações foram eficientes em sequestrar radicais livres *in vitro* e apresentam concentração de polifenóis entre 20 e 27%.

**Tabela 2** - Potencial redutor (DPPH) e conteúdo de polifenóis totais (Folin-Ciocalteu) do extrato e frações de *R. mangle*.

Tratamentos	EC <sub>50</sub> (µg/mL) DPPH	mg de AGeq/g
		Folin-Ciocalteu
Quercetina	2.924 ± 1.666	
Extrato bruto (CE)	1,65 ± 0,1697	262,6
fr-Aq	4,465 ± 0,5756	257,2
fr-EtOAc	25,46 ± 4,591	207,3
fr-BuOH	8,065 ± 2,369	226,7

EC<sub>50</sub>: concentração mínima suficiente para produzir 50% do efeito representada pela média ± desvio padrão; AGeq: ácido gálico equivalente.

Em seguida, para confirmação do potencial antioxidante das frações, que já haviam sido indicados nos testes *in vitro*, foram realizados testes *in vivo*.

## 6) Determinação da atividade antioxidante “*in vivo*”

### 6A) Úlcera gástrica induzida por etanol

Lesões gástricas por etanol podem estar associadas à geração de EROs e essas lesões produzem desbalanço entre processos celulares oxidante e antioxidante (Repetto & Llesuy, 2002). A administração do etanol pode resultar ainda em alterações na permeabilidade da membrana com redução na resistência da mucosa e distúrbios na secreção de H<sup>+</sup> (Vasquez-Ramirez et al., 2006).

As úlceras aparecem devido à ação necrotizante do etanol na mucosa gástrica, com menor participação da secreção ácida (Lewis & Hanson, 1991).

Classicamente, na pesquisa de compostos antiulcerogênicos o modelo de úlceras experimentais induzidas por etanol em ratos representa a primeira etapa desta linha de pesquisa, pois fornece

informações básicas sobre esta atividade, além de ser útil para determinar as doses dos tratamentos. Neste modelo foi verificada a atividade antiulcerogênica das frações aquosa (fr-Aq), acetato de etila (fr-EtOAc) e butanólica (fr-BuOH) em doses variáveis de 0,5 a 100,0 mg.Kg<sup>-1</sup> para as duas últimas (**figuras 10 e 11**) e 6,5 a 100,0 mg.Kg<sup>-1</sup> para a primeira (**figura 9**).

Os efeitos do etanol na mucosa gástrica podem ser classificados em: 1) dano cáustico com altas concentrações de etanol (acima de 20%), que possibilitam que as lesões penetrem profundamente no plexo vascular ocasionando estase, ruptura da parede dos vasos sanguíneos, favorecendo hemorragia e necrose da mucosa;

10 2) dano por retrodifusão de íons H<sup>+</sup> com baixas concentrações de etanol (8 a 20%), que podem levar à esfoliação das células epiteliais e, na presença do suco gástrico, ao rompimento da barreira protetora da mucosa 15 gástrica;

20 3) aumento da resistência da mucosa, um efeito paradoxal, com concentrações que variam de 5 a 20%, que podem desencadear citoproteção adaptativa. Irritantes moderados, parcimoniosamente utilizados, estimulam a síntese de prostaglandina que, por sua vez, favorecem processos regenerativos da mucosa (Sikiric *et al*, 1999).

O método de indução da úlcera por administração do etanol, bem como os procedimentos para verificação das frações mais ativas, estão apresentado detalhadamente no **exemplo 7A**.

As **figuras 9, 10 e 11** demonstram atividade antiulcerogênica das 25 frações orgânicas, a dose mais eficaz em prevenir a geração de lesões gástricas pela administração do etanol e avaliam a atividade de enzimas antioxidantes a partir dos tecidos coletados. Após terem sido definidas frações mais ativas, as menores doses eficazes de cada uma delas foram selecionadas a partir das curvas dose-resposta obtidas para fr-Aq, 30 fr-EtOAc e fr-BuOH ainda no modelo de úlcera induzida por etanol.

A fr-Aq possui atividade antiulcerogênica nas doses de 12,5 e 100,0 mg.Kg<sup>-1</sup>, já a fr-EtOAc demonstra esta atividade em todas as doses testadas (de 0,5 a 100,0 mg.Kg<sup>-1</sup>), sendo 1,5 mg.Kg<sup>-1</sup> a melhor delas, uma vez que entre os dados mais significativos, não houve diferença; assim como na fração anterior, a fr-BuOH se mostrou eficaz em todas as doses testadas, e 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> mostrou-se mais interessante por ser a menor dose e ter a mesma significância dentre as mais significativas.

Os resultados mostraram que, embora o traçado da curva de fr-EtOAc seja mais compatível com aquele de uma curva dose-resposta, fr-BuOH mostrou-se bem mais efetiva do ponto de vista da significância estatística, além de terem sido usadas doses extremamente baixas. Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que taninos, especialmente os condensados, possuem atividade farmacológica em doses bastante baixas (Iwasaki *et al.*, 2004).

Dessa forma, é possível evidenciar que o fracionamento do extrato de *R. mangle* como descrita na presente invenção, de modo a obtermos a fração butanólica, nos permite concentrar taninos condensados suficientemente para que a fração apresente efeito surpreendente no tratamento de lesões ulcerativas, como evidenciado nos testes apresentados no presente documento.

C) Atividade antioxidante de grupamentos sulfídricos, peroxidação lipídica, e enzimas

#### 6B) Úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão

No modelo de lesões gástricas induzidas por isquemia-reperfusão, as lesões ocorrem sem utilização de agentes químicos (Cabeza *et al.*, 2001). A isquemia enfraquece a barreira da mucosa gástrica aumentando a difusão de ácido, o que causa danos à mucosa (Kawai *et al.*, 1994).

Durante a isquemia ocorre redução do fluxo sanguíneo no órgão levando a uma seqüência de reações químicas que resultam em disfunção, necrose celular e aparecimento de metabólitos tóxicos contribuindo para a

morte celular (De Groot, 2005). Com a reperfusão, EROs são geradas, especialmente no sistema xantina-oxidase e na ativação de neutrófilos, causando peroxidação lipídica no tecido; com isso, a combinação de EROs com secreção ácida promove danos na mucosa gástrica (Wada et al., 5 1996).

Lesões gástricas ocorridas na fase de reperfusão são consideradas mais severas do que aquelas que ocorrem durante a isquemia, já que há participação de EROs (incluindo biomoléculas como  $O_2^-$ ,  $OH^-$  e  $H_2O_2$  que atacam lipídeos de membrana, ácidos nucléicos, enzimas e 10 receptores), ocasionando alterações na estrutura, na atividade celular e no transporte de proteínas além de modificações, por exemplo, no influxo de cálcio nas células (Schoenberg & Berger, 1993; Cerqueira et al., 2005).

O modelo de isquemia-reperfusão foi utilizado para determinação da atividade antioxidante promovida pela fr-BuOH sem a participação de um 15 agente químico na indução das lesões.

De acordo com os resultados apresentados nos testes com úlcera gástrica, o pré-tratamento com lansoprazol ( $30\ mg.Kg^{-1}$ ) e fr-BuOH ( $0,5\ mg.kg^{-1}$ ) foi capaz de reduzir o surgimento de lesões induzidas por isquemia-reperfusão. O raspado da mucosa gástrica foi coletado para a 20 avaliação da atividade de enzimas antioxidantes, como detalhado no **exemplo 7B.**

Nesse modelo, fr-BuOH também foi eficaz em reduzir significativamente a formação de lesões (**figura 12**) apontando a proteção atribuída aos taninos de *R. mangle* e sendo confirmada *in vivo*, portanto, a 25 atividade antioxidante.

Adicionalmente, assim como realizado no modelo de etanol, os mecanismos de ação antioxidantes foram avaliados quanto aos níveis de compostos e atividade de enzimas antioxidantes.

Na **tabela 7** estão expressos os níveis de GSH e atividade da 30 SOD. Neste modelo, foi determinado que a administração de fr-BuOH manteve elevado o nível de GSH, e aumentou a atividade da SOD, a

qual foi também elevada por lansoprazol. A **tabela 8** mostra que fr-BuOH promoveu aumento da atividade das enzimas GPx e GR, enquanto a **tabela 9** exibe os valores de LPO e de atividade de MPO reduzidos pela fr-BuOH.

**Tabela 3 - Tabela 7.** Níveis de GSH e atividade enzimática da SOD de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.

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

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 comparados ao controle Salina.

**Tabela 4 - Atividade enzimática da GPx e GR de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.**

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

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. \*\*P<0,01 comparados ao controle Salina.

**Tabela 5 - Atividade enzimática da LPO e MPO de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia/reperfusão.**

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

ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 comparados ao controle Salina.

O conjunto de dados obtidos para atividade antioxidante *ex vivo* indica que fr-BuOH possui ação antioxidante e entre os mecanismos desta pode-se destacar a manutenção e aumento dos níveis de GSH, da atividade da SOD, GPx e GR, a redução da LPO e da atividade da MPO. Assim 5 a atividade anti-Úlcera de fr-BuOH pode ser atribuída em parte a essa ação antioxidante.

EROs são continuamente produzidas durante os eventos fisiológicos normais, sendo removidas pelo mecanismo de defesa antioxidante. Em condições patológicas, EROs resultam em peroxidação 10 lipídica e dano oxidativo. O desequilíbrio entre EROs e defesa antioxidante leva à modificação oxidativa na membrana celular, ou nas moléculas intracelulares (El-Habit *et al.*, 2000). A primeira enzima antioxidante da mucosa gástrica é a SOD, que cataliza a dismutação de  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  que é menos nocivo. O segundo passo do metabolismo do  $H_2O_2$  depende da 15 atividade da GPx. A redução do  $H_2O_2$  em água pela GPx é acompanhada pela conversão da glutationa na forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG), que depois é convertida em GSH pela GR (Kwiecién *et al.*, 2002).

Membranas celulares são alvos constantes de EROs por serem ricas em complexos enzimáticos pertencentes às cadeias redutoras de  $O_2$ . 20 Nelas, a grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados (AGP) favorece a formação de sítios geradores de EROs, fazendo com que ocorra lipoperoxidação, devido ao fácil acesso das EROs às insaturações dos ácidos graxos (Buege & Aust, 1978; McCord, 2000; Andreoli, 2000). Este processo degenerativo, envolvendo formação, propagação de radicais 25 lipídicos peroxil e alcoxil ( $ROO^-$ ,  $RO\cdot$ ), captação de  $O_2$  e rearranjo de duplas ligações dos AGP altera a integridade e fluidez das membranas (Buege e Aust, 1989).

A integridade da mucosa gástrica depende de fatores como manutenção da microcirculação, secreção de muco e atividade de 30 enzimas antioxidantes, como SOD e GPx; tais fatores também implicam na gastroproteção contra agentes irritantes exógenos e endógenos na

mucosa gástrica (Kwiecién *et al.*, 2004). Assim, substâncias capazes de garantir a integridade da mucosa são potencialmente úteis no tratamento e/ou prevenção de lesões gástricas, o que evidencia, mais uma vez que a fração butanólica do extrato de *R. mangle* concentra compostos de forma a causar efeito surpreendente devido à sua capacidade em manter elevado o nível de GSH.

### **7) Mecanismo de atividade antiulcerogênica**

#### 7A) Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção

Observa-se pela **figura 13** que fr-BuOH não é capaz de atenuar a lesão induzida por etanol em ratos pré-tratados com NEM (um bloqueador de GSH), indicando que sua atividade antiulcerogênica é dependente de grupamentos sulfidrílicos.

#### 7B) Envolvimento do NO na gastroproteção

O pré-tratamento de ratos com L-NAME mostrou, conforme a **figura 14** ilustra, que a atividade antiulcerogênica de fr-BuOH é perdida quando a síntese de NO é bloqueada, indicando que o NO participa da gastroproteção promovida pela fr-BuOH.

**Tabela 6** - Efeito da administração oral de fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) em ratos submetidos à ligadura do piloro, avaliação do volume secretado e seu pH.

Tratamentos	Dose ( $\text{mg.Kg}^{-1}$ )	Volume secreção gástrica ( $\text{mL/4h}$ )	pH (unidades)
Salina 0,9%	10 $\text{mL.Kg}^{-1}$	$1,784 \pm 0,1566$	$2,38 \pm 0,1310$
Lansoprazol	30	$1,518 \pm 0,3358$	$3,046 \pm 0,5326^*$
fr-BuOH	0,5	$1,418 \pm 3,090^*$	$3,090 \pm 0,2128^*$

Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 7$ ), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, \* $P < 0,05$  comparado ao grupo Salina.

A **tabela 6** traz os dados obtidos no modelo de ligadura do piloro, foi verificada uma ação anti-secretória de fr-BuOH onde o pH foi aumentado significativamente ao passo que houve redução no volume de secreção gástrica.

#### 7C) Produção do muco aderido à mucosa gástrica

Neste modelo foi avaliada a produção de muco aderido na mucosa gástrica em ratos submetidos à ligadura do piloro, na **figura 15** observa-se que a fr-BuOH foi capaz de aumentá-la em mais de 100%.

#### 7D) Produção de PGE2 na mucosa gástrica

5 A **figura 16** apresenta os resultados obtidos para a produção de prostaglandina na mucosa gástrica. O pré-tratamento com a fr-BuOH foi capaz de estimular a síntese de PGE2 na presença da indometacina, um inibidor de cicloxygenases.

#### 8) Avaliação da cicatrização de úlcera gástrica em modelo crônico

10 A **figura 17** mostra que a fr-BuOH acelera o processo de cicatrização da úlcera gástrica em modelo crônico. Nota-se que desde o início dos tratamentos a cicatrização promovida pela fr-BuOH ocorreu mais rapidamente.

#### 8A) Toxicidade sub-crônica

15 A monitoração do peso dos animais durante o tratamento crônico por 14 dias consecutivos é verificada na **figura 18**. Nota-se que os grupos que receberam lansoprazol e fr-BuOH apresentaram menor ganho de peso a partir do 8º dia de tratamento, entretanto essa diferença não foi significativa.

20 Dando continuidade à avaliação da toxicidade de fr-BuOH após 14 dias consecutivos de tratamento, foi analisada a relação entre peso dos órgãos sobre o peso dos animais, como mostra a **figura 19**. Foi encontrada diferença significativa nesta relação para o fígado de animais tratados com fr-BuOH; esta avaliação sugere possível hepatotoxicidade deste tratamento, entretanto aumento de massa hepática está mais associado á 25 toxicidade do que a perda..

#### 8B) Expressão de COX-1, COX-2 e EGF

30 Nas **figuras 20 a 26** estão representados os gráficos correspondentes às intensidades densitométricas obtidas nas revelações das membranas utilizadas para analisar a expressão de COX-1, COX-2 e EGF, utilizando como controle interno a proteína β-actina.

A densitometria foi calculada para cada membrana, e, para as análises foram divididos os valores densitométricos das proteínas de interesse pela densitometria de  $\beta$ -actina encontrada na mesma membrana.

As figuras 19, 20 e 21 demonstram a expressão da COX-1 5 após 4, 8 e 14 dias de tratamento respectivamente. Nenhuma diferença foi verificada, como esperado.

Em seguida, nas figuras 23 e 24, verificou-se a expressão da COX-2, após 4 e 8 dias de tratamento respectivamente, nenhuma diferença foi encontrada na expressão da mesma nos referidos dias. Entretanto na figura 10 29, onde a expressão de COX-2 foi verificada após 14 dias de tratamento foi encontrado aumento significativo, para a mesma, nos grupos tratados com lansoprazol e fr-BuOH.

Foi verificado aumento na expressão do fator de crescimento epidermal após 14 dias de tratamento com lansoprazol e fr-BuOH, como 15 nota-se na figura 26. O aumento na expressão do EGF é fundamental para a cicatrização mais rápida da úlcera neste modelo.

#### 8C) Análise histológica

As figuras 27 a 31 a seguir são demonstrativas dos resultados obtidos nos estudos histológicos (figuras 27 e 28) e imunohistoquímicos 20 (figuras 29, 30 e 1) dos estômagos dos animais submetidos ao modelo de úlcera crônica e tratados por 14 dias consecutivos.

A figura 27 mostra o melhor arranjo estrutural na borda (especialmente das glândulas) da lesão nos tratamentos com lansoprazol (30 mg.Kg<sup>-1</sup>) e fr-BuOH (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>), o mesmo observa-se na figura 28, 25 entretanto é destacado na mesma a presença de muco nas glândulas gástricas.

As figuras 29, 30 e 31 mostram a imunolocalização de HSP-70, PCNA e COX-2 respectivamente, verificou-se maior presença destes no grupo lansoprazol e fr-BuOH, sendo mais evidentes neste último; assim, 30 foi observado participação do HSP-70, PCNA e COX-2 no processo de

cicatrização, especialmente nos grupos onde este processo foi mais eficiente e rápido.

Após observar todos os testes e caracterizações realizadas com as frações obtidas do extrato de *R. mangle* é possível evidenciar a vantajosa 5 ação da fração butanólica no tratamento de injúrias gastrointestinais, incluindo a úlcera.

A fração butanólica obtida concentra taninos complexos em quantidade surpreendente, o que permite que o efeito de seu uso promova resultados semelhantes e até melhores do que o medicamente que é utilizado 10 atualmente para tratamento dessas injúrias gástricas em dose consideravelmente inferior, chegando a ser até 60 vezes mais baixa.

A forma de ação da fração butanólica é, principalmente, como agente antioxidante e recuperador do epitélio por promover a manutenção e/ou elevação dos níveis de GSH, que por sua vez favoreceram a atividade de SOD, 15 GPx e GR, enquanto reduz os valores de LPO e MPO. Além disso, acelera o processo de cicatrização e também eleva a produção de muco aderido à mucosa gástrica, todos fatores que contribuem para a proteção contra injúrias gástricas.

Dessa forma, a presente invenção descreve a utilização da fração 20 butanólica em composições farmacêuticas ou medicamentosas com excipientes aceitáveis, como demonstrado acima.

### **EXEMPLOS**

#### **Exemplo 1 - Coleta da Espécie**

A coleta do material biológico foi realizada na área continental do 25 sistema estuarino de Santos/SP, aproveitando-se de uma supressão de vegetação autorizada pelo IBAMA (autorização número: 116/2006) e realizada pela EMBRAPORT sob os cuidados do taxonomista vegetal Msc. Paulo de Salles Penteado Sampaio, responsável também pela identificação da espécie.

#### **Exemplo 2 - Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Na análise por CCD comparativa, foram utilizadas placas prontas de sílica gel 60 (Merck) de diversos tamanhos. As frações obtidas nas partições foram analisadas por CCD, usando como fase móvel CHCl<sub>3</sub>:MeOH:PrOH:H<sub>2</sub>O (5:6:1:4 v/v/v/v, fase orgânica) e como padrões: rutina, ácido gálico, catequina, epicatequina, lupeol, reserpina, friedelina. Utilizou-se como revelador: luz UV (254 e 366 nm), anisaldeído/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NP/PEG e FeCl<sub>3</sub> 1% em metanol (Wagner *et al.*, 1984).

#### **Exemplo 3 - Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

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

#### **Exemplo 4 - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESIMS)**

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

#### **Exemplo 5 - Animais**

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

5 Os animais foram aclimatados às condições do laboratório por pelo menos sete (7) dias antes da manipulação experimental, com temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclos claro-escuro de 12 horas controlados, alimentados com ração nuvital (Nuvilab) e água ad libitum. Os animais foram distribuídos ao acaso nos diferentes grupos experimentais e submetidos a jejum (com 10 água ad libitum) de pelo menos 12 horas, dependendo do tipo de experimento.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA/IB/UNICAMP.

É importante lembrar que a possibilidade oferecida pelo 15 modelo animal só intensifica a qualidade da pesquisa e aumenta sua aplicabilidade a partir destes dados. No entanto é importante ressaltar que experimentos *in vivo* sofrem interferência de todo e qualquer tipo de novidade ou irritação ao animal experimental, toda manipulação, sons, cheiros, tudo isso interfere em pesquisas onde o substrato é um modelo 20 animal. Além de todo estresse natural aos quais os animais são submetidos, existe toda a questão que envolve determinado protocolo experimental, em particular neste trabalho, o jejum é fundamental para que as investigações possam ser realizadas, todavia, esse fato pode aumentar o estresse dos animais e desperta em alguns deles atitudes que 25 podem influenciar nos resultados obtidos. Na realidade, a maior influência pode ser percebida na redução da linearidade dos resultados de modelos agudos, por exemplo, e isso não ocorre com experimentos *in vitro* onde todas as condições e variáveis são determinadas e controladas pelo pesquisador.

#### **Exemplo 6 - Drogas utilizadas**

30 As drogas utilizadas para determinação da atividade antiulcerogênica e antioxidante e seus mecanismos de ação foram:

Lansoprazol (MEDLEY, Campinas, Brasil), Indometacina, Nω-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME), N-ethyl-maleimide (NEM), Quercetina, Ácido Gálico (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), ácido acético P.A. e cloreto de sódio P.A. ( (CHEMCO, Campinas, Brasil). Todas as drogas foram 5 preparadas imediatamente à sua utilização.

### **Exemplo 7 - Delineamento experimental**

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

Ratos foram mantidos em gaiola especial sem maravalha e 15 submetidos a jejum de no mínimo 12 h, dependendo do protocolo experimental. Em todos os modelos de indução de lesões, os estômagos foram abertos na região da maior curvatura, prensados em placas de vidro (exceto modelo de úlcera crônica) e fotografados. A área de lesão foi calculada com auxílio do programa AVSoft BioView 4.

#### **A) Úlcera gástrica induzida por etanol**

Após 24 horas de jejum, grupos de ratos foram tratados por via 20 oral com as frações orgânicas em doses variáveis (0,5; 1,5; 3,0; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 mg.Kg<sup>-1</sup>), com Lansoprazol (30 mg.Kg<sup>-1</sup>), e solução salina (10 mL.Kg<sup>-1</sup>), exceto grupo Sham (animais manipulados) uma hora antes da indução da lesão gástrica. A lesão gástrica foi induzida pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol 25 absoluto. Os animais foram sacrificados 1 hora após a administração do agente lesivo, e os estômagos retirados para contagem das lesões ulcerativas (Morimoto *et al.*, 1991).

#### **B) Úlcera induzida por isquemia-reperfusão**

Os ratos foram mantidos em jejum por 24 horas com livre 30 acesso à água. Os tratamentos com a fração butanólica - fr-BuOH (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>), Lansoprazol (30 mg.Kg<sup>-1</sup>) e Salina (10 mL.Kg<sup>-1</sup>) foram realizados

por via oral exceto grupo Sham (animais manipulados), 30 min antes de anestesiar os animais. Sob anestesia, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para colocação de um “clamp” na artéria celíaca.

Decorrida meia hora de isquemia o “clamp” foi retirado e, então, 5 os ratos foram submetidos à uma hora de reperfusão e, em seguida, sacrificados (Ueda, *et al.*, 1989).

#### **Exemplo 8 - Ensaios de atividade antioxidante “in vitro”**

##### **A) Folin-Ciocalteu**

O extrato e as frações foram analisados quanto ao seu conteúdo 10 de fenólicos totais solúveis utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Piccinelli *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). Para tanto, extrato e frações foram solubilizados em etanol, sendo preparadas diluições com concentrações entre 20 e 200 ppm. Para a substância de referência 15 (ácido gálico) foi elaborada curva analítica nas concentrações de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 ppm. A absorbância das amostras e amostra-padrão foi medida em leitor de elisa ( $\lambda=730$  nm) e os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalentes (AGeq) por grama de extrato ou fração em base seca (mg de AGeq/g). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo, ácido galico (200 ppm). Os experimentos foram realizados em triplicata.

##### **B) Avaliação da redução do radical DPPH**

O radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) é estável, de 25 coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade das amostras-teste e amostra-padrão de reduzir o radical DPPH. Para tanto, o extrato e as frações (2,6 mg) foram dissolvidos em etanol (1 mL), obtendo-se uma solução estoque. Várias diluições foram preparadas em etanol a fim de se obter concentrações finais no ensaio de 3,125 a 200 ppm (extrato e frações). Para cada amostra (10  $\mu$ L) foram adicionados 100 |  $\mu$ L de etanol, 100  $\mu$ L 30 de tampão fosfato (100mM) e 50  $\mu$ L de solução de DPPH (250  $\mu$ M). Decorridos 30min a absorbância foi medida em leitor de elisa ( $\lambda=517$  nm)

e a porcentagem de redução do radical foi calculada pela equação: %redução = 100 – [(Abs. Amostra – Abs. controle negativo)/Abs. controle DPPH – Abs. controle negativo] x 100] (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005; Cuendet *et al.*, 1997). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo o flavonóide quercetina.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **Exemplo 9 - Ensaios de atividade antioxidante “in vivo”**

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

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

##### **A) Níveis de grupamentos sulfidrílicos (GSH)**

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

##### **B) Atividade da glutationa redutase (GR)**

Para determinação da atividade da GR, a reação enzimática foi preparada com 100 µL da amostra (após centrifugação e diluição do

sobrenadante em tampão fosfato pH = 7,4, na relação 1:10) e 150 µL do cocktail formado por EDTA (0,20 mM), glutationa oxidada (1 mM) e NADPH (0,1 mM). A absorbância foi lida a 365 nm, entre 1 e 10 min (Carlberg & Mannervik, 1985).

5   C) Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, a 4°C, por 15 min e o sobrenadante diluído em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) na proporção 1:10. A uma alíquota de 100 µL do raspado, foram adicionados 150 µL de solução de glutationa reduzida (10 mM), NADPH (4 mM) e glutationa redutase (1U) e 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mM), de acordo com método de Yoshikawa *et al.*, (1993). A absorbância foi determinada a 365 nm, entre 1 e 10 min.

10   D) Atividade da superóxido dismutase (SOD)

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

20   As absorbâncias foram lidas a 560 nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

E) Atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO na mucosa gástrica foi mensurada de acordo com o método proposto por Krawisz *et al.*, (1984), como pequena modificações em Farias-Silva et al., (2007). Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas (6,7 µL) adicionadas a tampão fosfato 0,05M, pH 6,8 contendo 0,0005% de peróxido de hidrogênio e 1,25 mg/mL de dihidrocloreto de o-dianisidina, em seguida foi realizada leitura a 460 nm por 10 minutos em intervalos de 1 minuto.

F) Determinação do índice de peroxidação lipídica (LPO)

30   O homogenato da porção glandular do estômago foi diluído em KCl 0,15 M (relação 1:10). Em seguida, a 0,5 mL deste homogenato foram

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

#### **Exemplo 10 - Mecanismos de atividade antiulcerogênica**

##### **A) Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção**

15 Ratos Wistar machos em jejum de 24h foram divididos em grupos de acordo com os tratamentos (Salina + Salina, Salina + NEM, Lansoprazol + Salina, Lansoprazol + NEM, fr-BuOH + Salina e fr-BuOH + NEM). Os controles receberam injeção intraperitoneal de solução salina e os outros animais de NEM ( $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), um bloqueador do grupamento sulfidrílicos. 20 Após 30 minutos os grupos receberam por via oral os tratamentos Salina ( $10 \text{ mL.Kg}^{-1}$ ), Lansoprazol ( $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) e fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ). Depois de uma hora (1h), os animais receberam por via oral 1mL de etanol. Uma hora (1h) após o tratamento com etanol os animais foram sacrificados e os estômagos removidos para contagem das lesões (Matsuda, 1999).

##### **B) Envolvimento do NO na gastroproteção**

Ratos Wistar machos em jejum de 24h foram divididos em grupos de acordo com os tratamentos (Salina + Salina, Salina + L-NAME, Lansoprazol + Salina, Lansoprazol + L-NAME, fr-BuOH + Salina e fr-BuOH + L-NAME). Os controles receberam injeção intraperitoneal de solução salina e os outros animais de L-NAME ( $70 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), um bloqueador do grupamento sulfidrílicos. Após 30 minutos os grupos receberam

por via oral os tratamentos Salina ( $10 \text{ mL.Kg}^{-1}$ ), Lansoprazol ( $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) e fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ).

Depois de uma hora, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol. Uma hora após o tratamento com etanol os animais foram 5 sacrificados e os estômagos removidos para contagem das lesões (Matsuda, 1999).

#### C) Avaliação da secreção ácida pelo método de Shay

Após 24 horas de jejum, os animais sob anestesia (ketamina 30 mg.Kg $^{-1}$  e xilazina 0,3 mg.Kg $^{-1}$ ), sofreram uma incisão longitudinal logo 10 abaixo da apófise xifóide para a localização e amarradura do piloro. Os tratamentos Salina ( $10 \text{ mL.Kg}^{-1}$ ), Lansoprazol ( $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) e fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) foram administrados por via intraduodenal logo após a ligadura do piloro, e, em seguida, as incisões suturadas. Quatro horas após o 15 procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados, as incisões reabertas, e os estômagos retirados. O conteúdo estomacal foi coletado para determinação do volume e pH da secreção gástrica (Shay *et al.*, 1945).

#### D) Produção de muco aderido à mucosa gástrica

O muco da parede gástrica foi determinado em ratos submetidos à ligadura do piloro. Os diferentes grupos experimentais de ratos receberam 20 os tratamentos Salina ( $10 \text{ mL.Kg}^{-1}$ ), Lansoprazol ( $30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) e fr-BuOH ( $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) por via oral, uma hora depois, estes animais anestesiados foram submetidos à ligadura do piloro conforme o método descrito anteriormente.

Após o sacrifício dos animais, os estômagos foram removidos e 25 abertos no sentido da grande curvatura, os segmentos glandulares do estômago foram removidos e pesados.

Cada segmento foi transferido imediatamente para um tubo contendo 10 mL de Alcian blue 0,1% (em solução de sucrose 0.16 M tamponada com acetato de sódio 0.05 M, pH 5). Após imersão por 2 h nesta 30 solução, o excesso de tinta dos estômagos foi removido através de duas lavagens sucessivas com 10 mL de solução de sacarose 0.25 M, primeiro por

15 min e, em seguida, por 45 min. O Alcian Blue complexado com o muco da parede gástrica foi extraído com 10 mL MgCl<sub>2</sub> de 0.5 M com agitação intermitente por 1 min, em intervalos de 30 min, durante 2 h. Uma alíquota de 4 mL do extrato de Alcian Blue foi vigorosamente agitado com um volume igual de éter dietílico; a emulsão resultante foi centrifugada a 3600 rpm por 20 min e a absorbância da camada aquosa determinada a 580 nm. A quantidade de Alcian blue extraída por grama de tecido glandular foi então calculada, e, expressa como concentração do corante em µg por mL de solução por grama de porção glandular (Corne *et al.*, 1974).

10 **E) Produção de PGE2 na mucosa gástrica**

Os diferentes grupos experimentais foram tratados v.o. com Salina (10 mL.Kg<sup>-1</sup>) e fr-BuOH (0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>), exceto sham (animais manipulados). Trinta minutos após o tratamento, foi administrado aos animais 30 mg.Kg<sup>-1</sup> de indometacina s.c., e 30 minutos depois os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e, estes, abertos no sentido da maior curvatura. A mucosa foi raspada com o auxílio de duas lâminas de vidro, pesada e, então ressuspensa em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM; pH 7,4). O tecido foi homogeneizado com auxílio de um Polytron® e, então incubado a 37°C por 20 min. A PGE2 no tampão foi determinada por um kit de radioimunoensaio (R&D System KGE004) e todos os dados sobre a capacidade de síntese de PGE2 foram expressos em PG/mg de peso de tecido glandular (Curtis, *et al.*, 1995).

20 **F) Avaliação da cicatrização de úlcera gástrica em modelo crônico**

Ratos foram anestesiados com ketamina (30 mg.Kg<sup>-1</sup>) e xilazina (0,3 mg.Kg<sup>-1</sup>) para exposição do estômago através de uma incisão de aproximadamente 1 cm realizada abaixo da apófise xifóide. Em seguida foi depositado, com o auxílio de uma micro-pipeta, em uma área demarcada com um tubo plástico, 50 µL de ácido acético 40 % na camada serosa da junção do fundo com o antro do estômago. No dia seguinte um animal de cada grupo experimental foi sacrificado para determinar a área inicial da lesão. Dois dias após a indução, foram iniciados os tratamentos (Salina,

Lansoprazol e fr-BuOH), por via oral, os quais persistiram durante 14 dias consecutivos (Okabe & Amagase, 2005).

Após 4, 8 e 14 dias os animais foram sacrificados e seus estômagos removidos, abertos no sentido da maior curvatura e os estômagos 5 retirados para determinação da área de lesão, e, ensaios de imunohistoquímica e “western blot”.

#### F.1) Toxicidade subcrônica

O experimento de toxicidade sub-crônica é uma estimativa das propriedades tóxicas *in vivo* da substância teste em sua dose terapêutica (Lima 10 *et al.*, 2006). O peso dos animais do modelo descrito anteriormente foi registrado durante os 14 dias, no 15º dia os animais foram sacrificados e os órgãos (coração, fígado, rins, pulmões, testículos) removidos para pesagem. Os dados foram expressos pelo arcoseno do peso do órgão/peso do animal.

#### 15 F.2) Expressão de COX-1, COX-2 e EGF

O raspado estomacal foi centrifugado a 12000 rpm, a 4ºC, por 15 minutos. A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Valores determinados de proteína (50 µg) foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidos à eletroforese, com solução tampão (Trisma base 25 mM, glicina 1,92 mM, SDS 1%). O SDS-PAGE foi submetido a 40V, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento das proteínas (stacking), e, 120V até o final do gel de resolução (resolving). Em seguida, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em equipamento de eletrotransferência, com as membranas embebidas em solução tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), mantidas em voltagem constante de 90V por 2 horas. As membranas de nitrocelulose, contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (NaCl 150 mM, Trisma 25 base 10 mM, Tween 20 a 0,05%, leite em pó desnatado a 5%) por uma hora, a fim de diminuir a ligação inespecífica de proteínas. Em seguida, as

membranas serão submetidas a lavagens com tampão básico (NaCl 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 a 0.05%), em intervalos de 10 minutos. A membrana foi incubada a 4°C, durante uma noite, usando anticorpo específico para COX-1 e COX-2 (Cayman), e EGF (Santa Cruz).

- 5 Na manhã seguinte, a membrana de nitrocelulose foi lavada em tampão básico por 40 minutos e, em seguida, incubada à temperatura ambiente, por 1h, com anticorpo secundário Thermo Scientific Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 31460 para COX-1 e COX-2 e Zymed San Francisco, CA, USA ZyMax Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) HRP conjugate 81-1620 para EGF. Para detectar as 10 bandas imuno-reativas, os “blots” foram expostos à solução de quimioluminescência (ECL-plus-LumiGlo chemiluminescense substrate, Kirkegard and Perry Gaithersburg, MD. USA) por 1 minuto, seguido de exposição a um filme para detecção de quimioluminescência (HyperfilmTM ECLTM – AmerSham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, 15 Inglaterra).

As densidades das bandas das amostras sobre filme foram capturadas para quantificação densitométrica ótica, usando o Software AVSoft Bioview 4.

#### F.3) Análise histológica

- 20 Após a fixação do material em ALFAC (formalina, álcool 80%, ácido acético) por 24 horas, as peças foram desidratadas em incluídas em paraplast.

Posteriormente, os blocos de paraplast foram cortados (7 µm de espessura) em micrótomo, de maneira seriada. As amostras foram 25 submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) (Behmer et al., 1976) para observação geral da estrutura e celularidade, e ácido periódico de Schiff (PAS) (Vacca, 1985) para análise de substâncias mucopolissacarícas em microscopia de luz.

#### F.4) Imunohistoquímica

- 30 Para análise imunohistoquímica foi utilizada uma lâmina representativa de cada tratamento dos animais submetidos à úlcera

induzida por ácido acético, que foi desparafinizada, re-hidratada, e, destinada a imunohistoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com solução de leite desnaturado, posteriormente à recuperação antigênica conforme a tabela abaixo, e as amostras foram incubadas com anticorpos específicos em solução de bloqueio "overnight". Posteriormente, amostras foram lavadas em tampão fosfato (0.01 mol/L, pH 7.4) e incubadas em anticorpo secundário (Kit ABC Vector) e revelado com Avidina-Biotina associado com 3-3'diaminobenzina tetrahydrochloride (DAB, Sigma), e analisadas posteriormente nomicroscópio Leica DM acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard, Reino Unido.

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

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

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

### **Exemplo 11 - Análise estatística**

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

### **Referências Bibliográficas**

Akerboom, T.P.; Sies, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77: 373-382, 1981.

- Araki, Y., Sugihara, H., Hattori, T. The free radical scavengers edaravone and tempol suppress experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Int. J. Mol. Med. 17: 331-334, 2006
- 5 Ardite, E., Sans, M., Panes, J., Romero, F.J., Pique, J.M., Fernandez-Checa, J.C. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. Lab. Invest. 80: 735-744, 2000.
- Babbs, C.F. Oxygen radicals in ulcerative colitis, Free Radic. Biol. Med. 13: pp. 169-181, 1992.
- 10 Bartsch, H. & Nair, J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. Langenbecks Arch. Surg. 391: 499-510, 2006.
- 15 Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding 4. Anal.Biochem. 72: 248-254, 1976.
- Carlberg, I., Mannervik, B. Glutathione reductase. Methods Enzymol. 113: 484-490, 1985.
- 20 Conner, E.M., Brand, S.J., Davis, J.M., Kang, D.Y., Grisham, M.B. Role of reactive oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: toxins, mediators, and modulators of gene expression. Inflamm. Bowel Dis. 2: 133-147, 1996.
- Cho, J.Y., Chang, H.J., Lee, S.K., Kim, H.J., Hwang, J.K., Chun, H. S. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of  $\beta$ -caryophyllene, a sesquiterpene Life Science 80: 932-939, 2007.
- 25 Chu, F.F., Esworthy, R.S., Doroshow, J.H. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. Free Radic. Biol. Med. 36:1481-1495, 2004.
- Esworthy, R.S., Chu, F.F., Geiger, P., Girotti, A.W., Doroshow, J.H. Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione. Arch. Biochem. Biophys. 307: 29-34, 1993

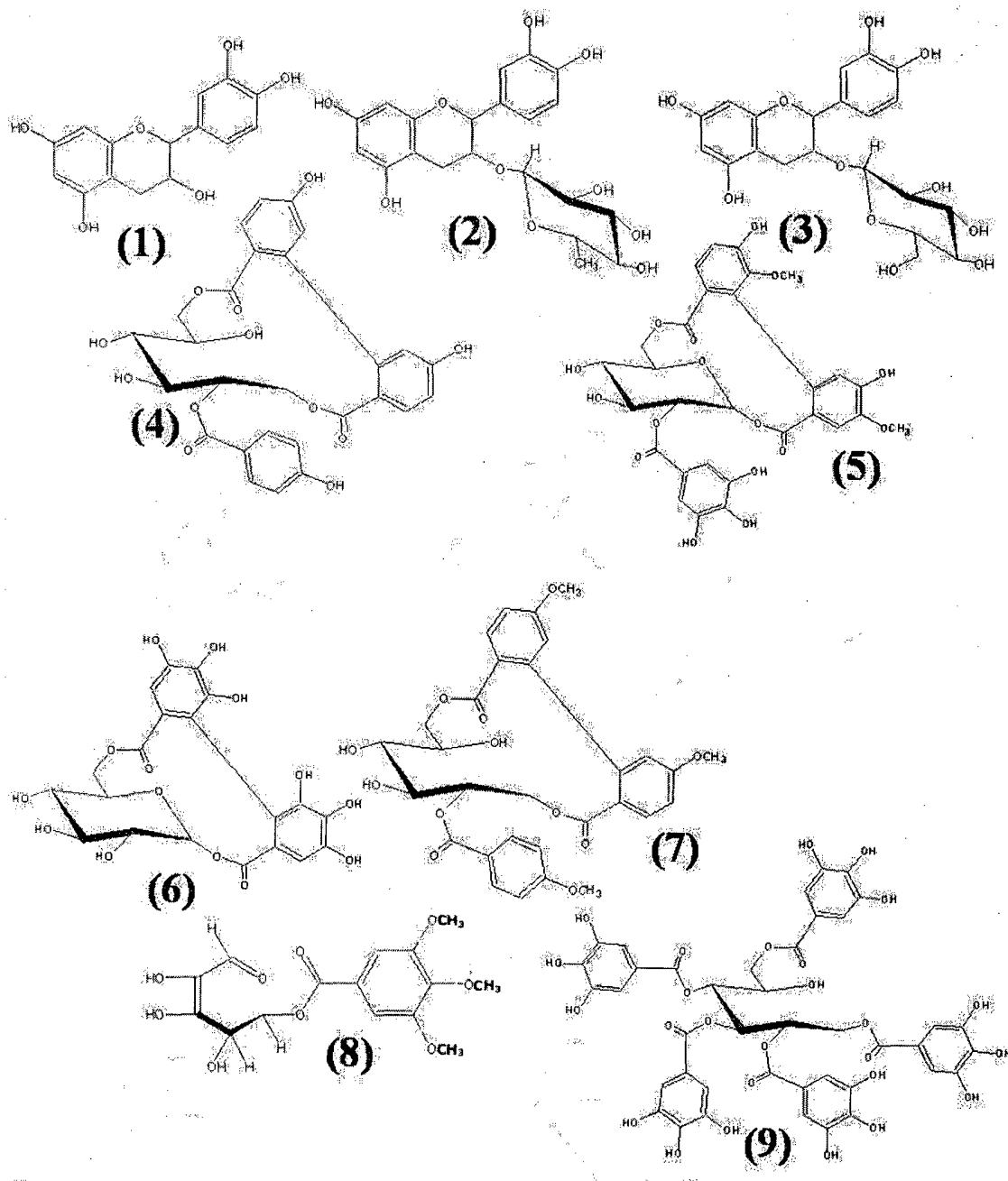
- Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. Gastroenterology 101: 540-547, 1991.
- 5 Grisham M.B., Granger, D.N. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites, Dig. Dis. Sci. 33: 6S-15S, 1988.
- Han, W., Mercenier, A., Ait-Belgnaoui, A., Pavan, S., Lamine, F., van Swam II, Kleerebezem, M., Salvador-Cartier, C., Hisbergues, M., Bueno, L., Theodorou, V., Fioramonti, J. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. Inflamm Bowel Dis. 12:1044-1052, 2006
- 10 Head, K.A.; Jurenka, J.S. Inflammatory bowel disease part I: Ulcerative colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. Alt. Med. Rev. 8: 247-279, 2003.
- Jackson, L.N. & Evers, B.M. Regulation of proliferation, apoptosis and cell cycle in gastrointestinal disorders. Curr. Opin. Pharmacol. 9(6): 708-714, 2009.
- 15 Krawisz, J. E., Sharon, P., Stenson, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. Gastroenterology 87: 1344-1350, 1984.
- 20 Kruidenier, L., Kuiper, I., van Duijn, W., et al. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. J. Pathol. 201: 7-16, 2003.
- Kunin, S., Gallily, R. Recognition and lysis of altered-self cells by macrophages. I. Modification of target cells by 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid. Immunology 48: 265-72, 1983.
- 25 Kwiecien, S., Brzozowski, T., Konturek, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. J.Physiol Pharmacol. 53: 39-50, 2002.
- Liu, S., Dong, W., Wu, D., Luo, H., Yu, J. Protective effect of angelica sinensis polysaccharide on experimental immunological colon injury in rats. W. J. Gastroenterol. 9(12): 2786-2790, 2003.

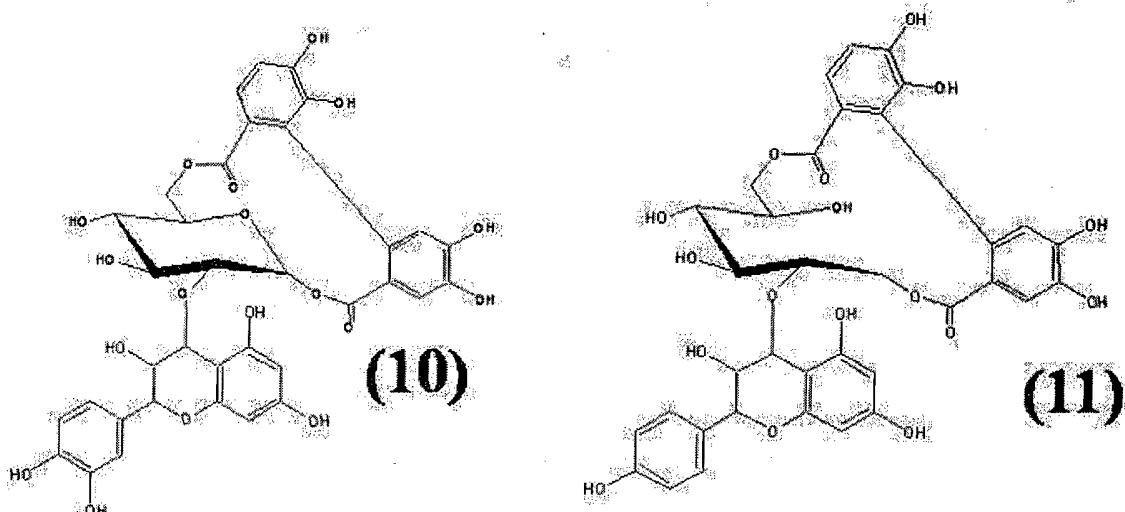
- Lu, J., Wang, A., Ansari, S., Hershberg, R.M., McKay, D.M. Colonic bacterial superantigens evoke an inflammatory response and exaggerate disease in mice recovering from colitis. *Gastroenterology* 125: 1785–1795, 2003.
- Lu, S.C. S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol.* 32: 391, 2000.
- 5 Martensson, J., Jain, A., Meister, A. Glutathione is required for intestinal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (5):1715-1759, 1990.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, W., Depew, W., Szewcuk, M.R., Wallace, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96: 795-803, 1989.
- 10 Nieto, N., Torres, M.I., Fernandez, M.I., Giron, M.D., Rios, A., Suarez, M.D., Gil, A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Dig. Dis. Sci.* 45:1820-1827, 2000.
- Oz, H.S., Chen, T.S., McClain, C.J., de Villiers, W.J. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J. Nutr. Biochem.* 16: 297-304, 2005.
- 15 Rodriguez-Cabezas, M.E., Galvez, J., Lorente, M.D., Concha, A., Camuesco, D.; Azzouz, S.; Osuna, A.; Redondo, L.; Zarzuelo, A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *J. Nutr.* 132: 3263-3271, 2002.
- 20 Segui J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, Coronel P, Pique JM, Panes J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J. Leukoc. Biol.* 76: 537-544, 2004.
- 25 Tham, D.M., Whitin, J.C., Cohen, H.J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatr. Res.* 51: 641–646, 2002.
- Thomas, A.G., Miller, V., Shenkin, A., Fell, G.S., Taylor, F. Selenium and 30 glutathione peroxidase status in paediatric health and gastrointestinal disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 19: 203-219, 1994.

- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M., Carrell, R.W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J.Lab Clin.Med. 85: 337-341, 1975.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. Nat. Protoc., 2: 541-6, 2007.
- 5 Yoshikawa, T., Naito, Y., Kishi, A., Tomii, T., Kaneko, T., Iinuma, S., Ichikawa, H., Yasuda, M., Takahashi, S., Kondo, M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. Gut 34: 732-737, 1993.
- Yoshikawa T, Takahashi S, Kondo M.Possible role of free radicals in the  
10 chronic inflammation of the gut. EXS. 1992, 62: 353-8.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a 567 comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic. Biol. Med. 33: 337-349, 2002.
- 15 Zhou, Y., Yu, J., Liu, Y., Teng, X., Ming, M., Lv, P., An, P., Liu, S., Yu, H. Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-, NF-Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. Mediators of Inflammation, 1-9, 2006.

## REIVINDICAÇÕES

### 1. Compostos caracterizado por terem as fórmulas estruturais





2. Compostos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** serem para tratar úlcera e injúrias gastrointestinais.
3. Medicamento **caracterizado por** conter um ou mais dos compostos descritos na reivindicação 1.
4. Composição farmacêutica **caracterizada por** conter fração de *Rhizophora mangle* associados a um ou mais excipientes farmaceuticamente ativos.
5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pela** fração ter sido obtida com a utilização de butanol.
6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** estimular a síntese de prostaglandina E2 na presença de indometacina.
7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** manter ou elevar o nível de grupamentos sulfídricos.
8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** manter ou elevar o nível da enzima superóxido dismutase.
9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** manter ou elevar o nível da enzima glutationa peroxidase.

10.Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5,  
5 **caracterizada por** manter ou elevar o nível da enzima glutationa  
redutase.

11.Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5,  
10 **caracterizada por** reduzir a peroxidação lipídica.

12.Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5,  
**caracterizada por** reduzir a atividade da enzima mielperoxidase.

13.Processo de obtenção dos compostos descritos na reivindicação 1,  
10 **caracterizada por** a fração butanólica ser obtida preferencialmente  
pelas seguintes etapas:

- a. Maceração da casca de *Rhizophora mangle* em solução de água  
e acetona;
- b. Filtração do extrato obtido em (A)
- c. Dissolução do extrato obtido em (B) em água;
- d. Partição líquido-líquido da solução obtida em (C);
- e. Dissolução do extrato obtido em (D) em acetato de etila;
- f. Partição da fração obtida em (E) por 3 vezes;
- g. Partição da fase aquosa obtida em (F) com n-butanol por 3 vezes

## FIGURAS

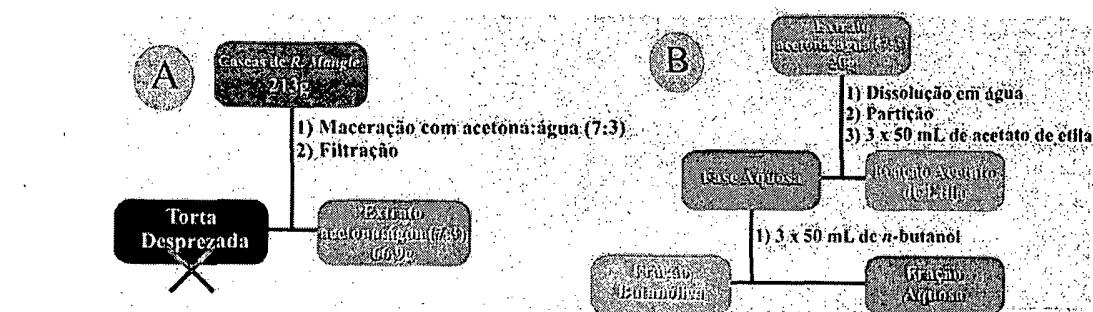


Figura 1

5

10

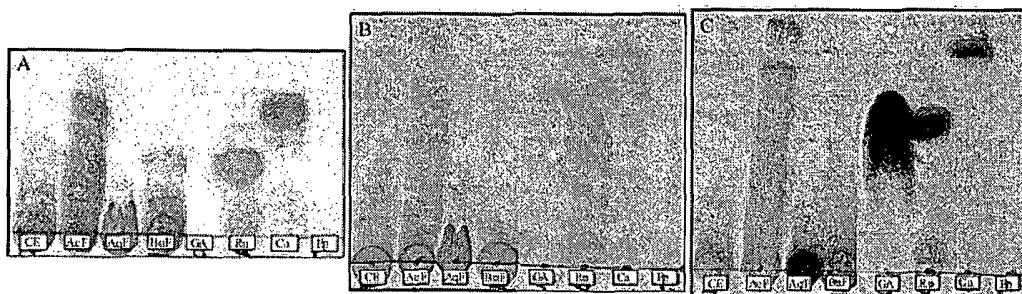
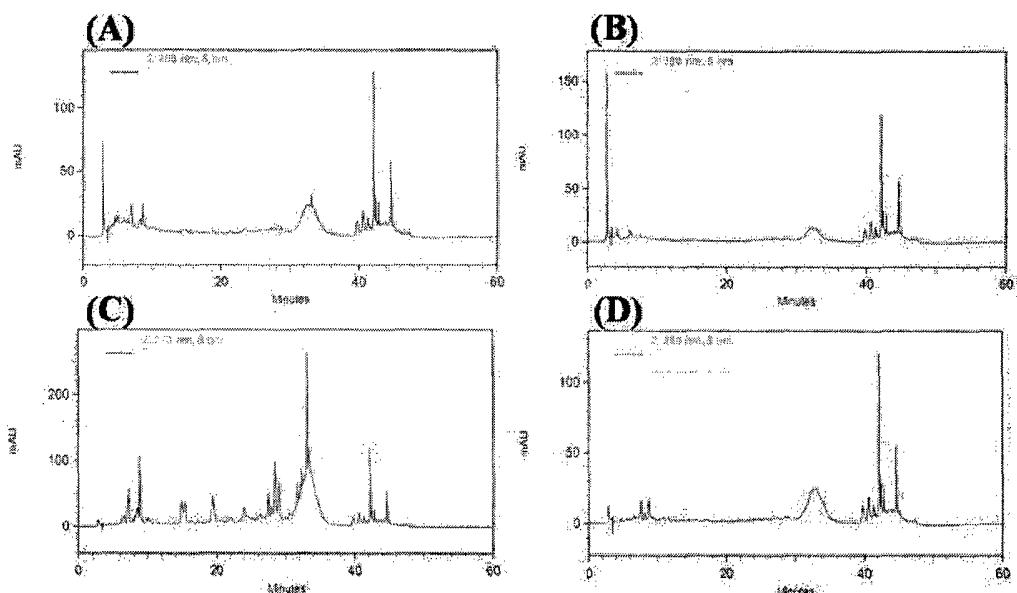
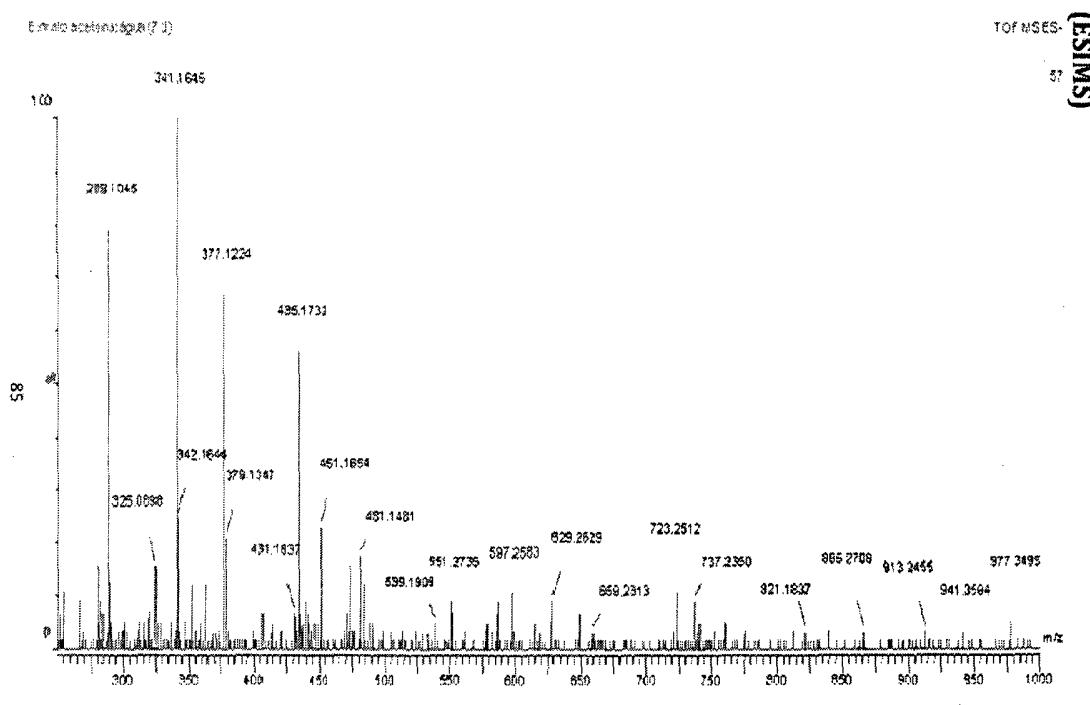
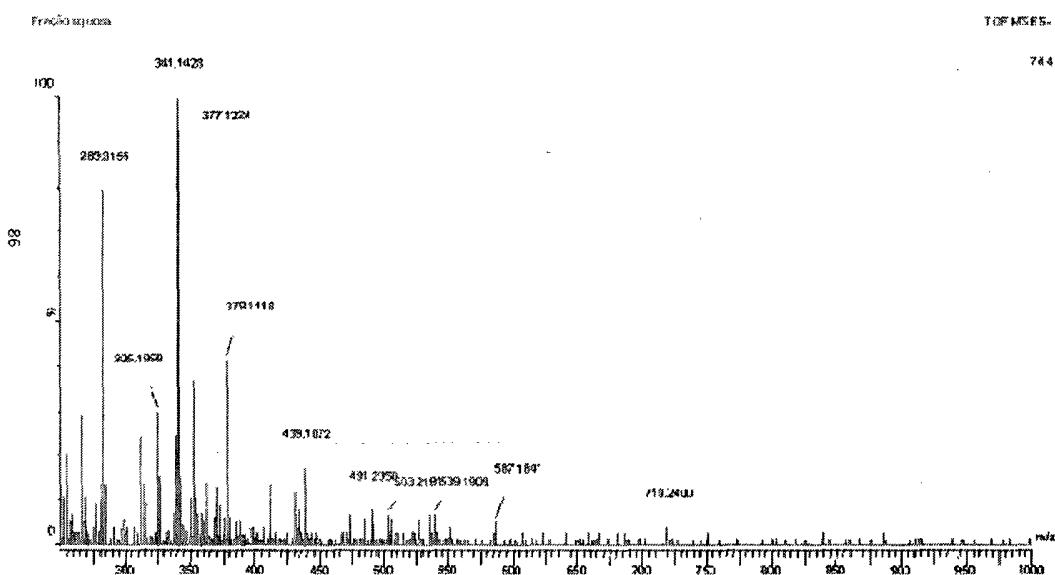
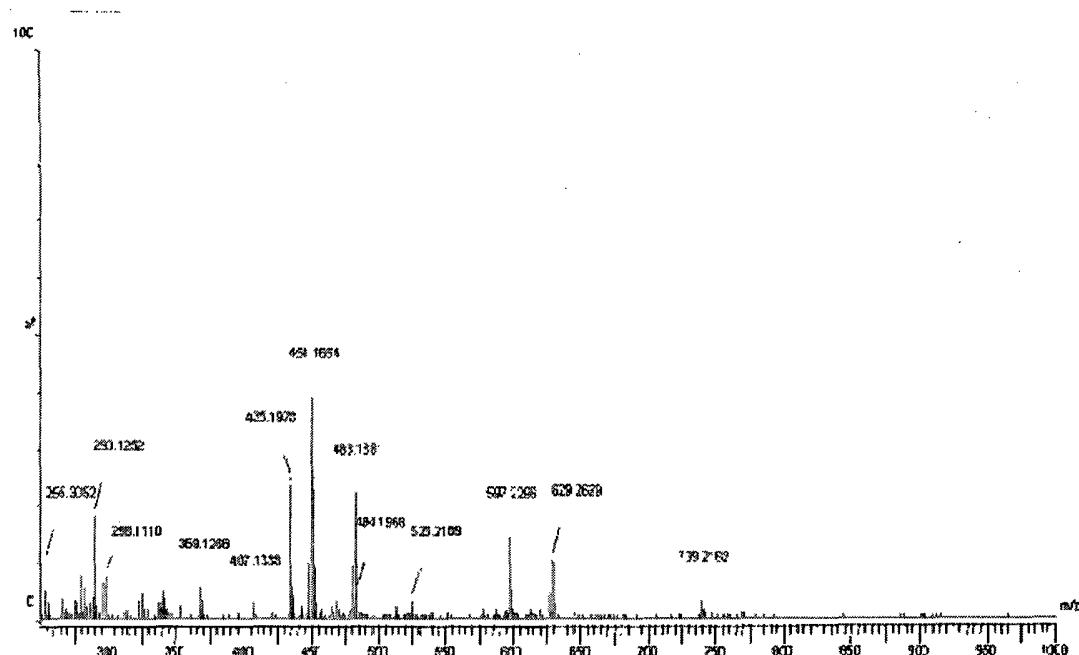
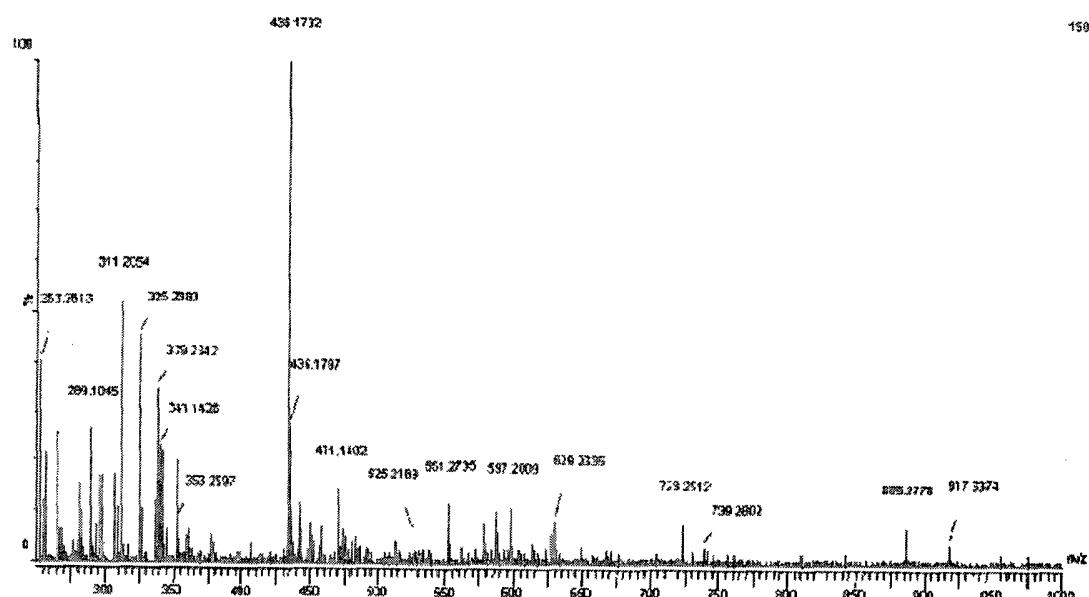


Figura 2

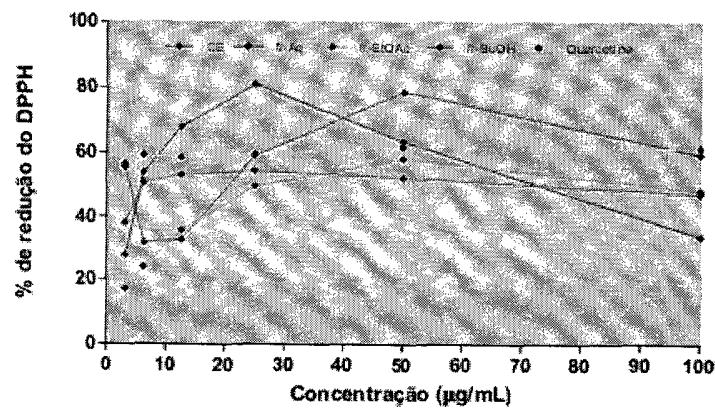
**Figura 3****Figura 4**

**Figura 5****Figura 6**

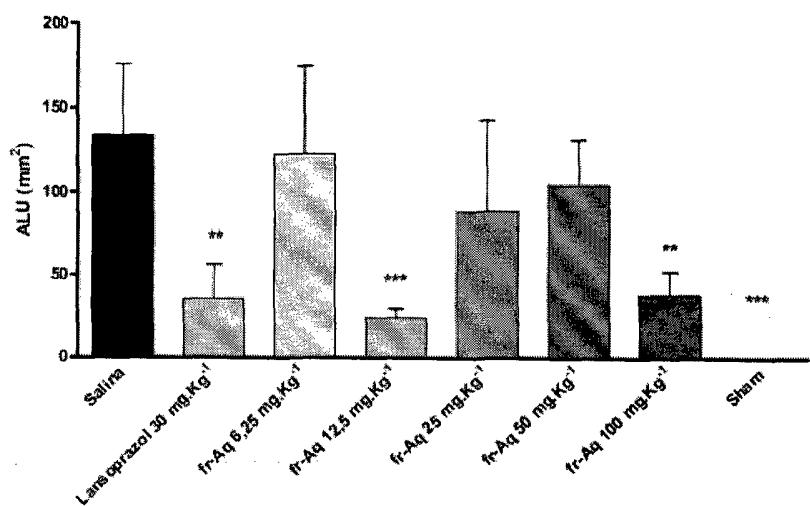


**Figura 7**

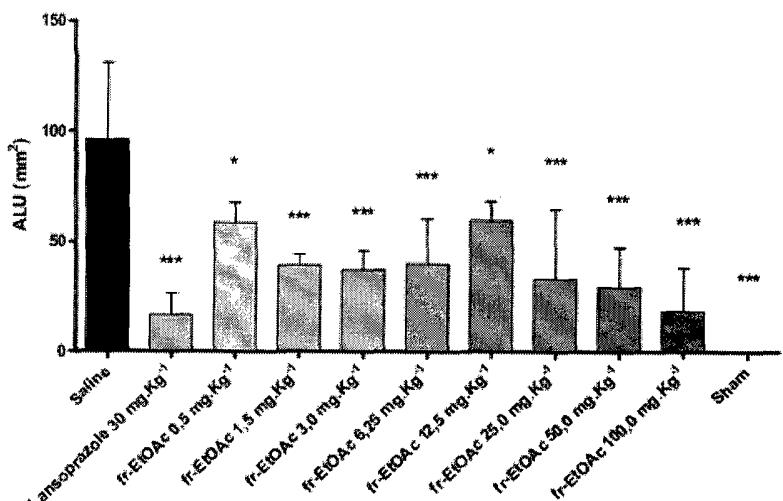
5



**Figura 8**

**Figura 9**

5

**Figura 10**

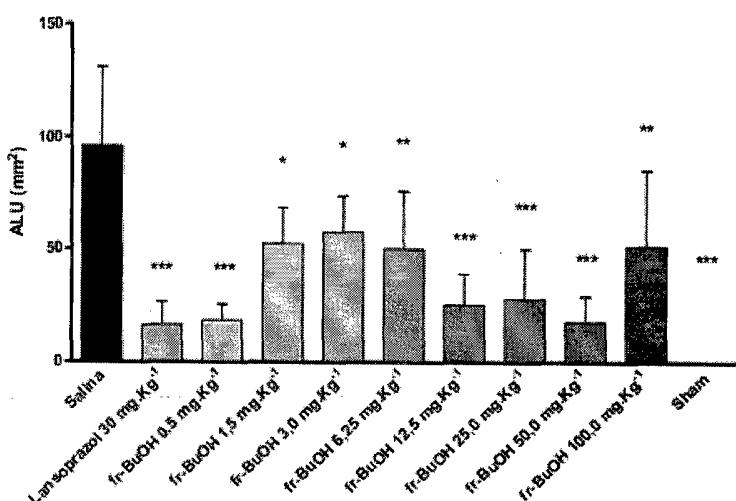


Figura 11

5

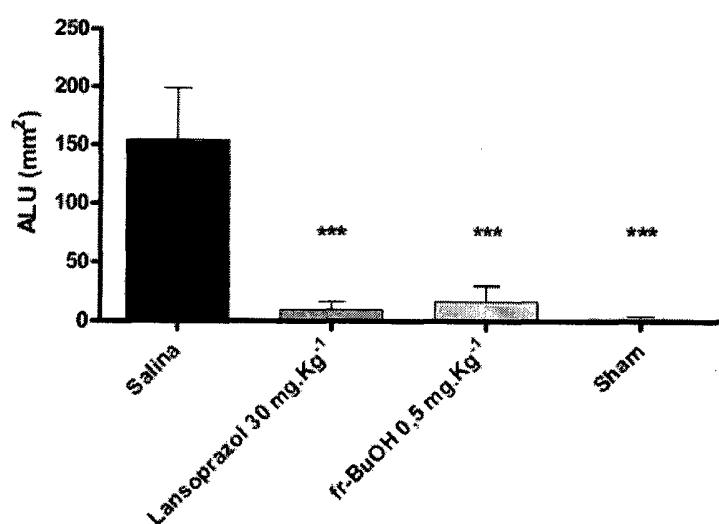
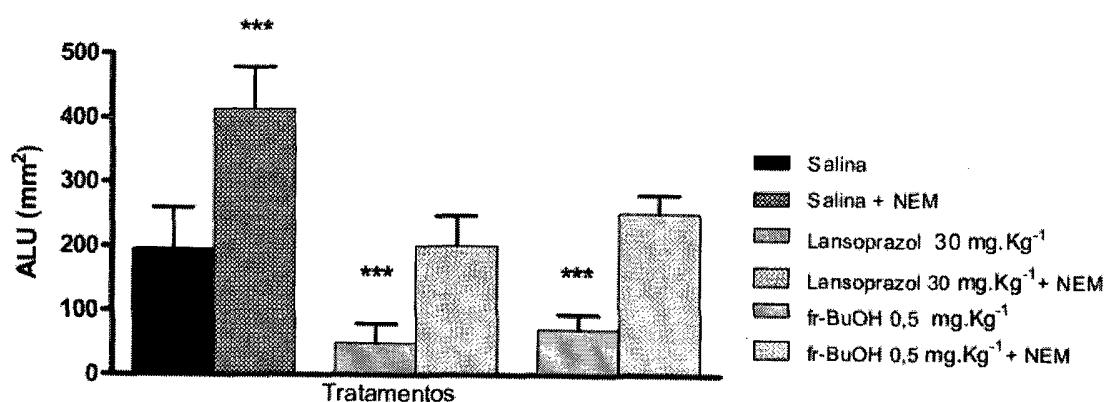
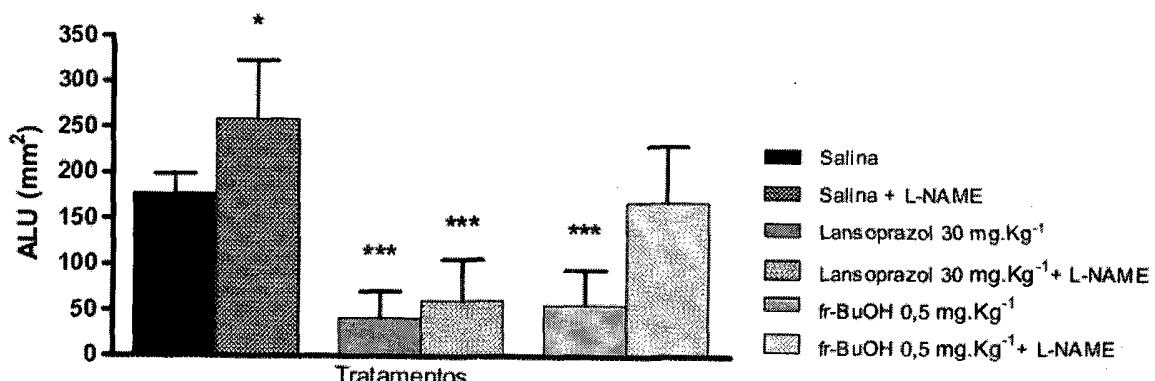


Figura 12

**Figura 13**

5

**Figura 14**

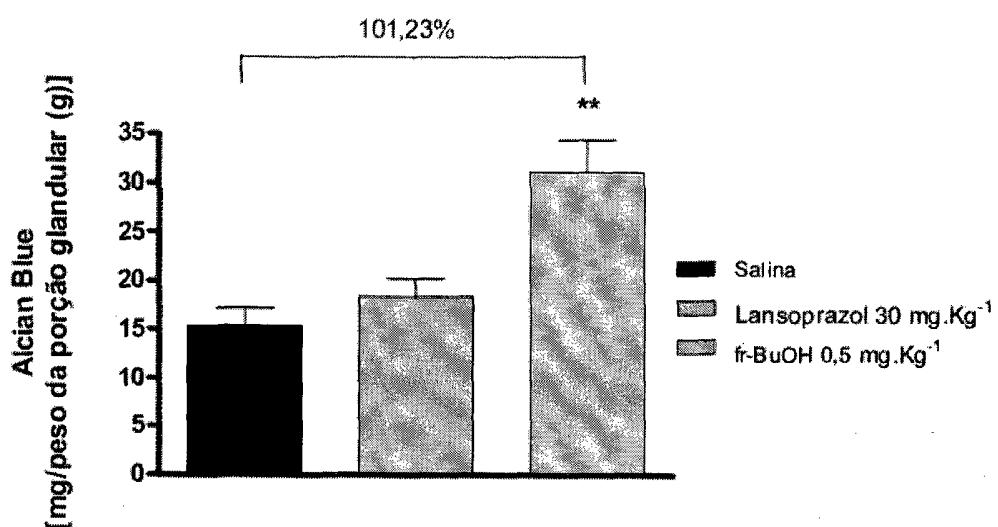


Figura 15

5

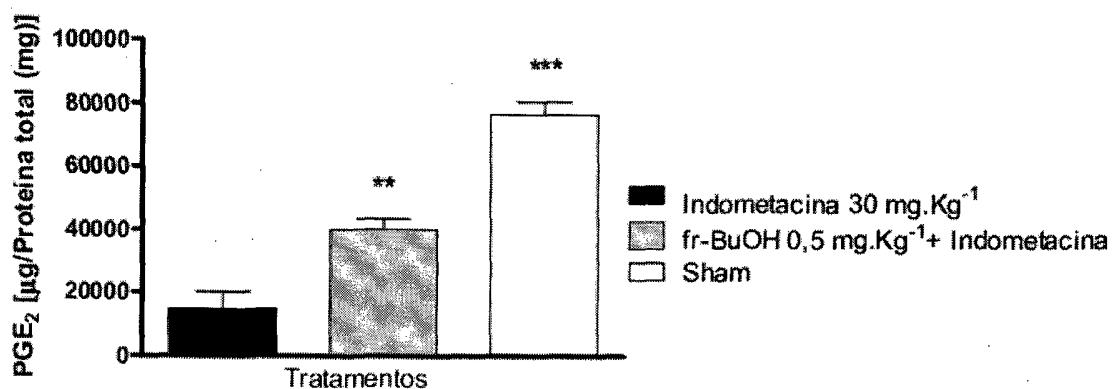


Figura 16

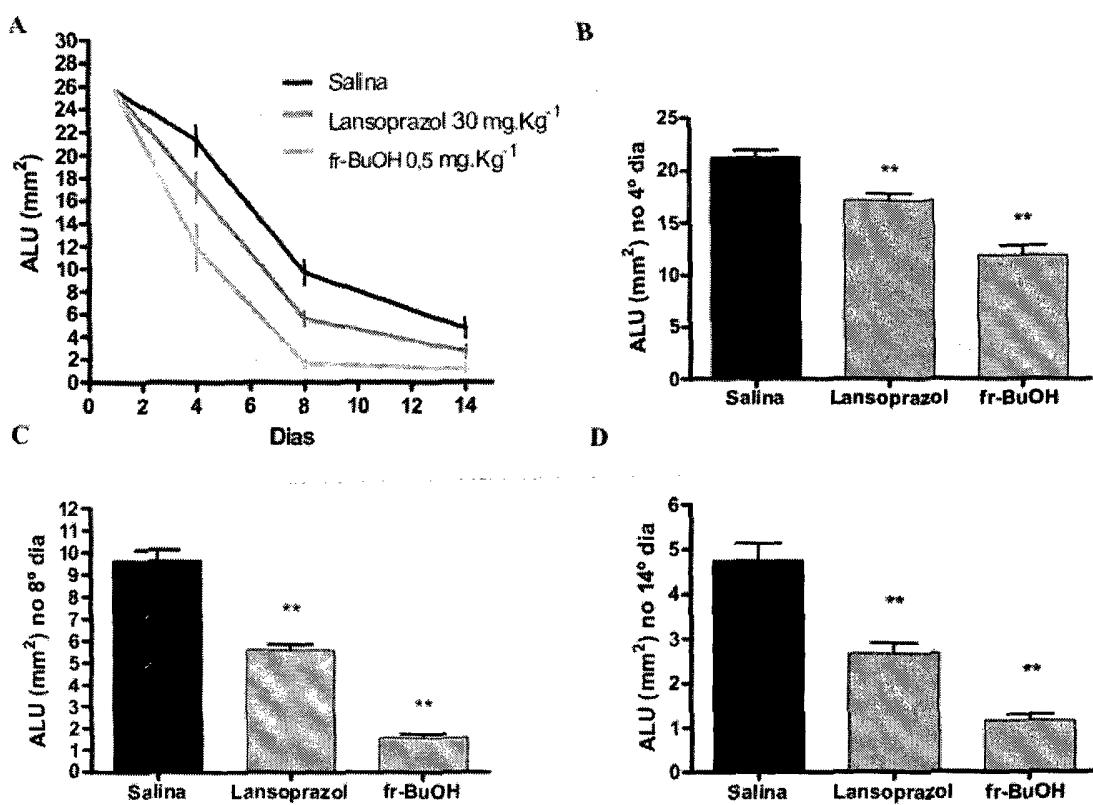


Figura 17

5

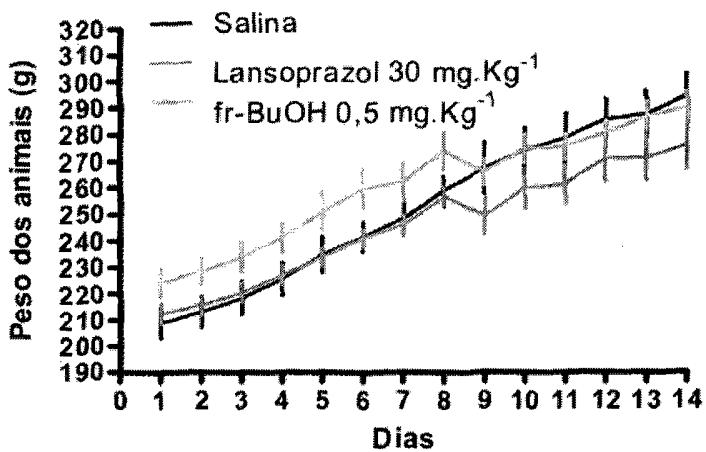
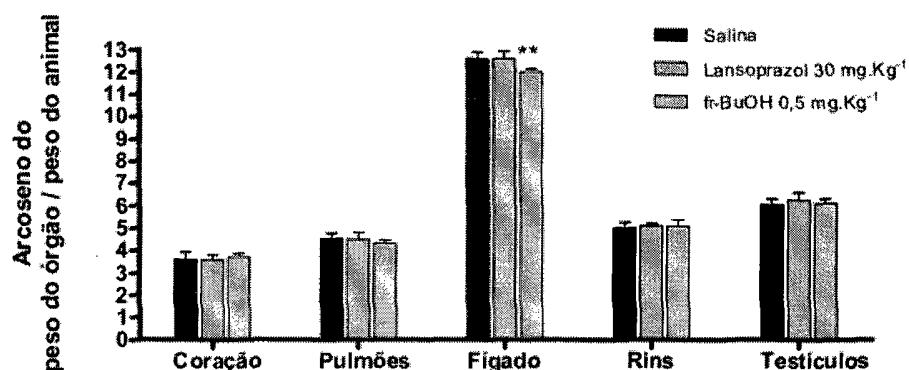
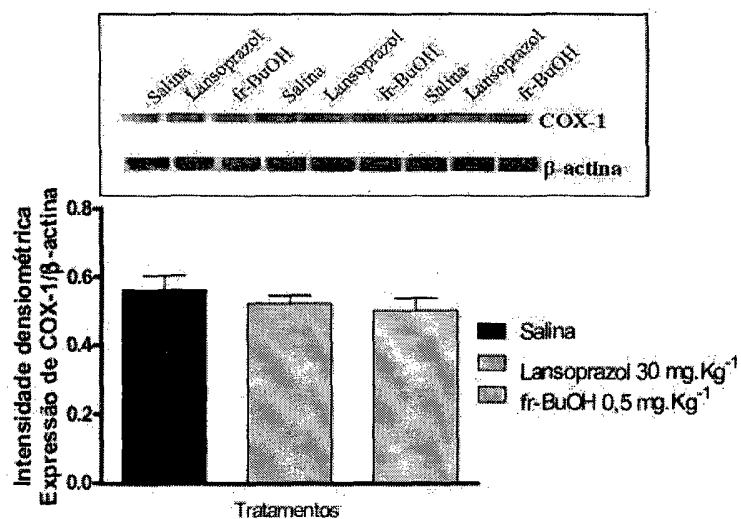
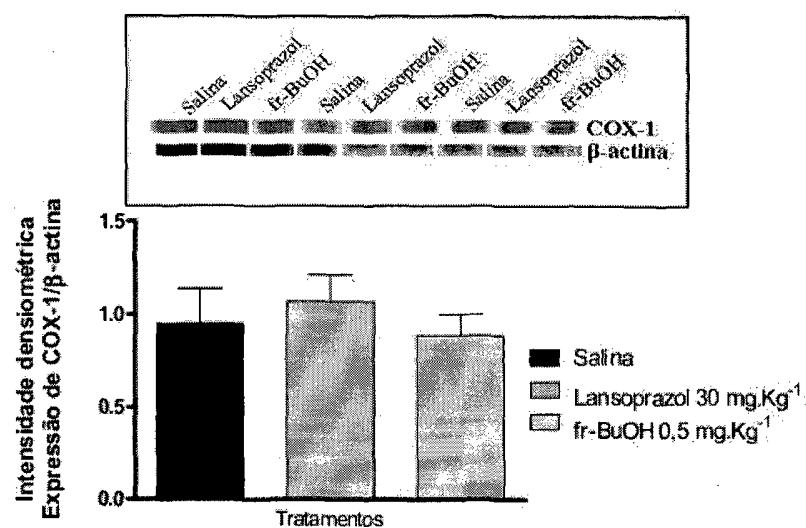


Figura 18

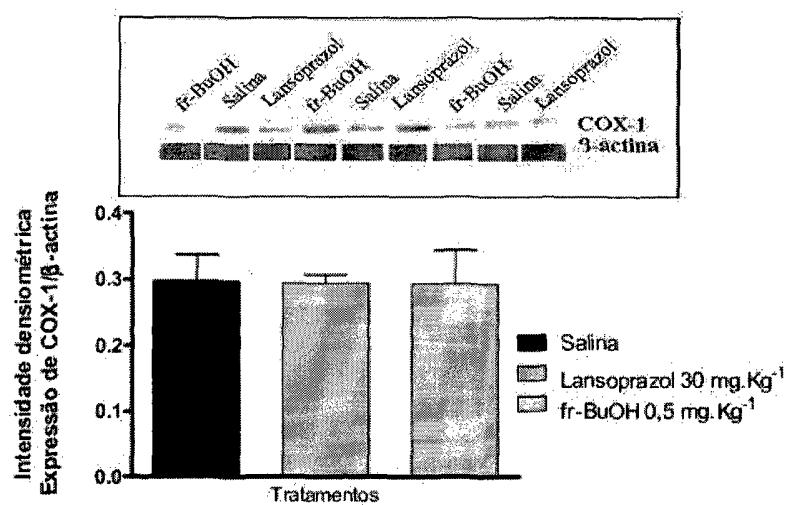
**Figura 19**

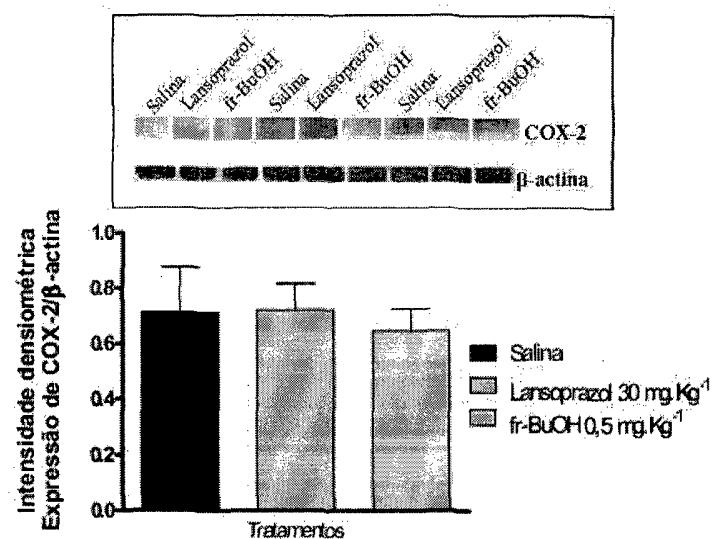
5

**Figura 20**

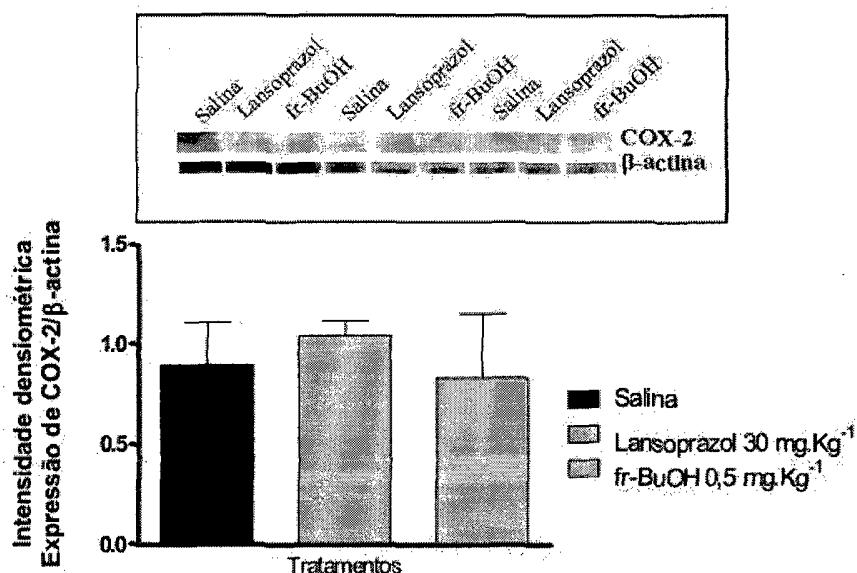
**Figura 21**

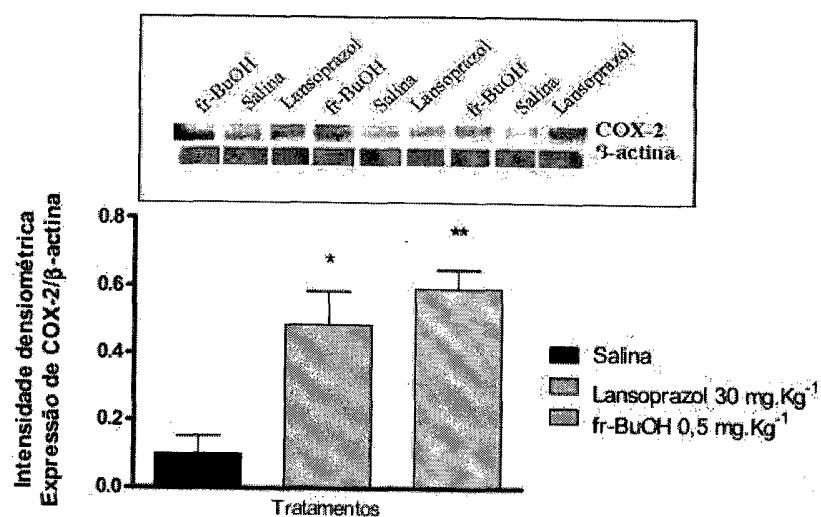
5

**Figura 22**

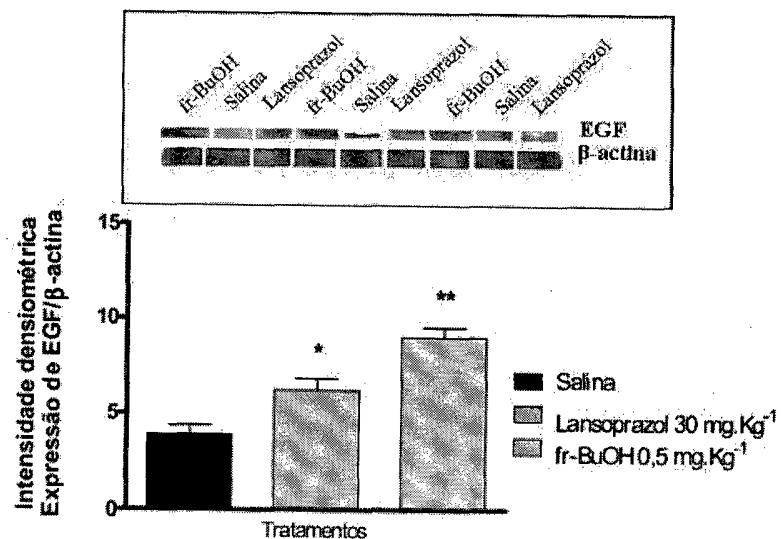
**Figura 23**

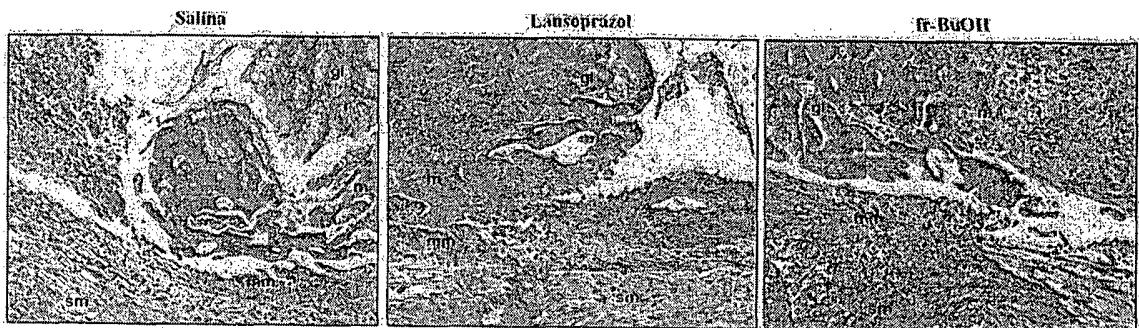
5

**Figura 24**

**Figura 25**

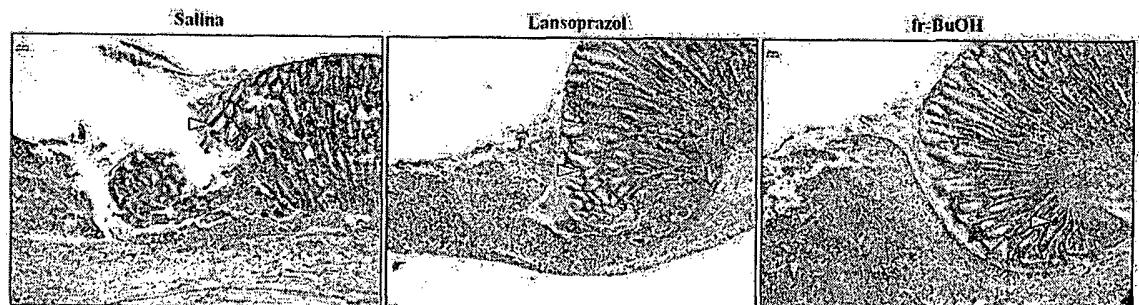
5

**Figura 26**



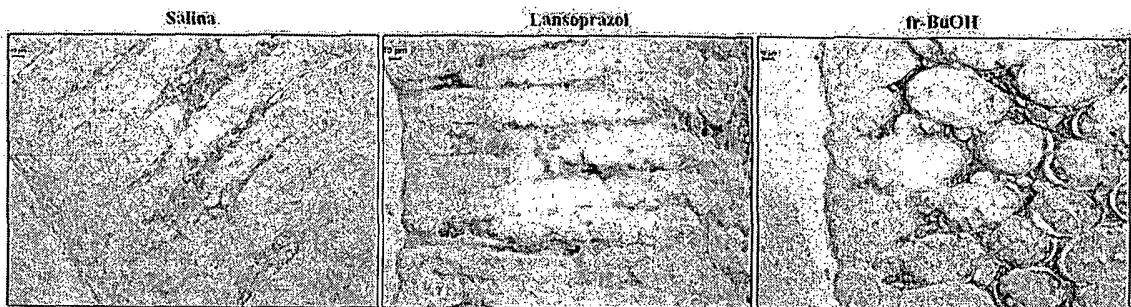
**Figura 27**

5



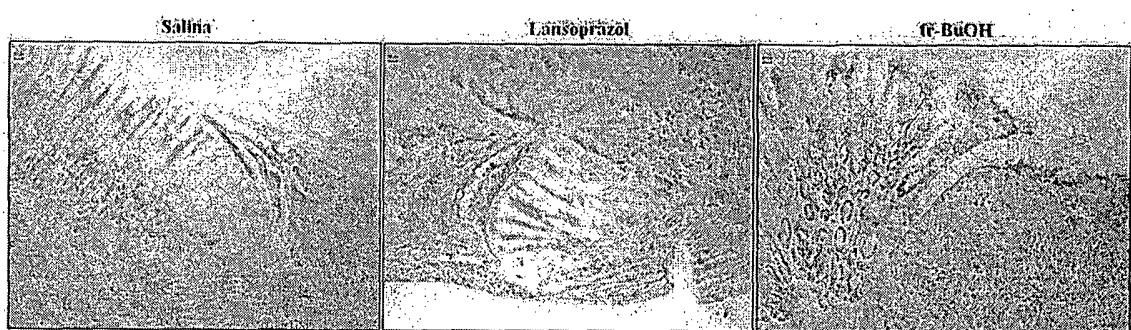
10

**Figura 28**



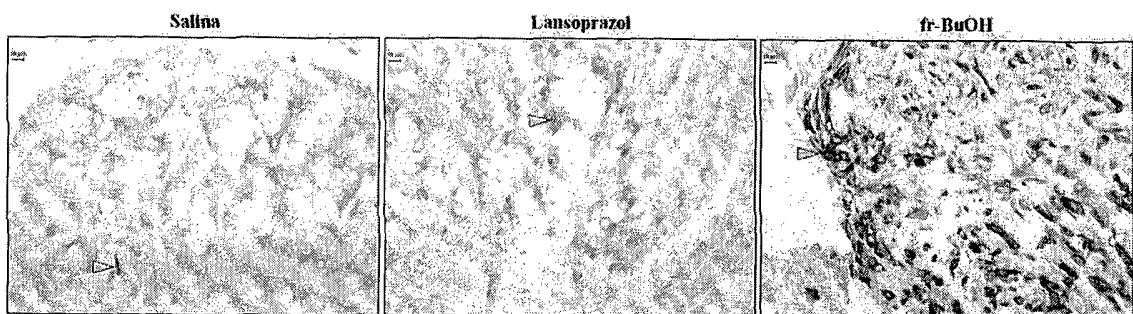
**Figura 29**

5



10

**Figura 30**



**Figura 31**

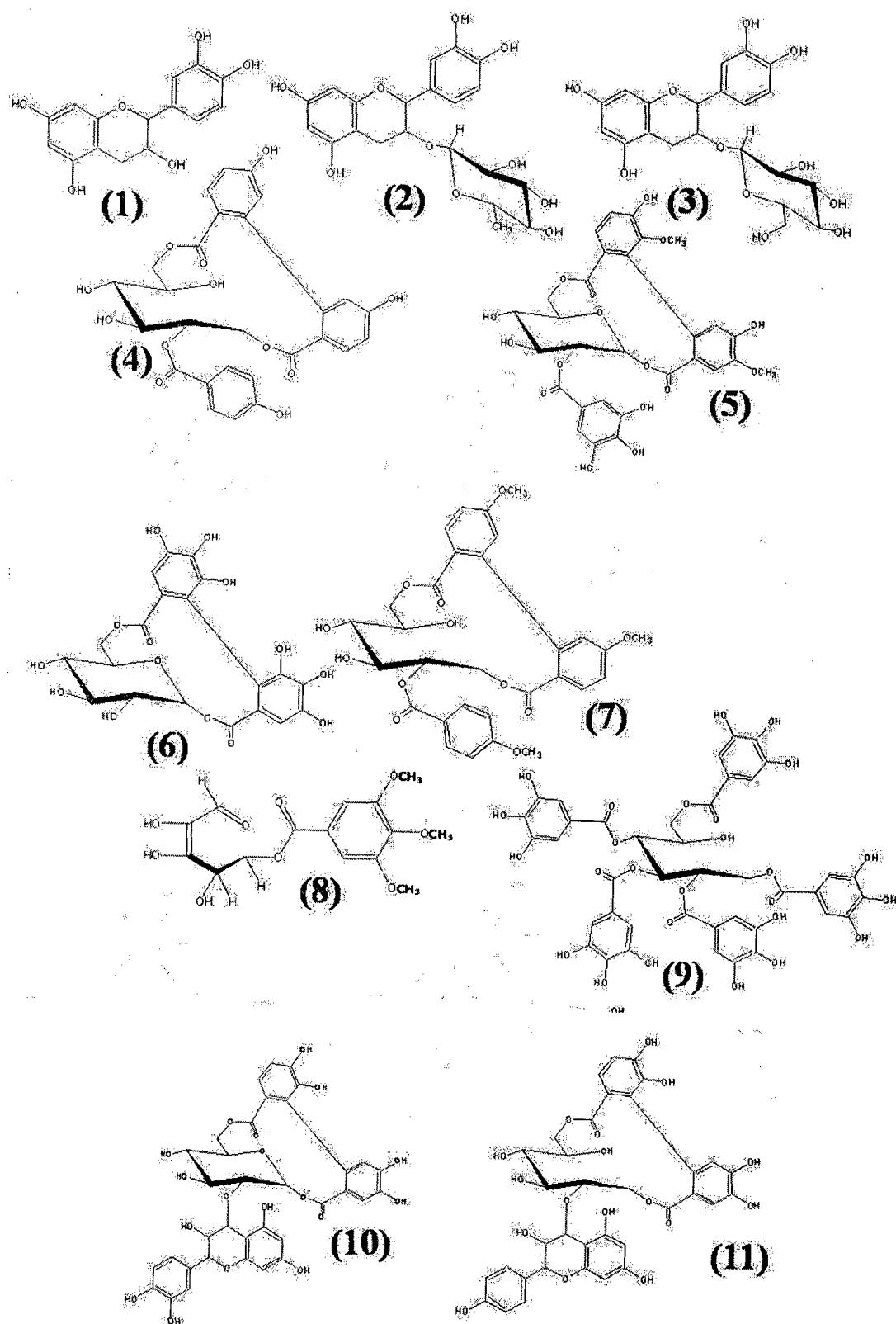


Figura 32

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2013/000458

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C07D311/04 (2006.01), C07D311/40 (2006.01), A61K36/185 (2006.01), A61K31/35 (2006.01), A61P1/04 (2006.01)**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

**SINPI- Base de dados do INPI-BR; Periódicos Capes**

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPODOC; ProQuest-Dialog (todas as bases de dados)**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	De Faria, F.M. Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante de <i>Rhizophora mangle</i> L. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. Disponível em: < <a href="http://www.bibliotecadigital.unicamp.br">http://www.bibliotecadigital.unicamp.br</a> >. Acesso em: 22 november 2013  the whole document	1 a 13
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> PROTECTIVE EFFECTS OF Rhizophora mangle L. ON TNBS-INDUCED COLITIS IN RATS. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011, Rio de Janeiro. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.(FeSBE), 2011  the whole document	1 a 12
Y	the whole document	13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&amp;” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**25-11-2013**

Date of mailing of the international search report

**20-12-2013**Name and mailing address: **INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**  
Rua São Bento nº 1, 17º andar  
cep: 20090-010 Centro - Rio de Janeiro/RJ  
Facsimile No. +55 21 3037-3663

Authorized officer

**Rodinelli Borges de Oliveira**

+55 21 3037-3493/3742

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2013/000458

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Red mangrove protects gastric mucosa through increase of COX-2 and EGF expression.. In: XIX Congresso Società Italo-Latinoamericana di Etnomedicina - SILAE, 2010, Cagliari. XIX Congresso Società Italo-Latinoamericana di Etnomedicina - SILAE. Cagliari, 2010. the whole document	
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Phytochemical and pharmacological evaluation of mangrove bark: assay in ulcer model. In: XVII CONGRESSO ITALO-LATINOAMERICANO DI ETNOMEDICINA, 2008, Palermo. XVII CONGRESSO ITALO-LATINOAMERICANO DI ETNOMEDICINA, 2008.	
Y	the whole document	
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Role of SOD in the protection of Rhizophora mangle on gastric injury induced by ethanol, ischaemia-reperfusion and acetic acid in rats. In: 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2009, Genebra. 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2009.	
Y	the whole document	
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Rhizophora mangle L. ameliorates TNBS-induced colitis in rats through the expression of NF-kappa B. In: XX Congresso Italo-Latino Americano de Etnomedicina "Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos" - SILAE, 2011, Fortaleza. XX Congresso Italo-Latino Americano de Etnomedicina "Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos" – SILAE.	
Y	the whole document	
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Atividade antioxidante de Rhizophora mangle L.. In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2010, Águas de Lindóia. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia, 2010.	
Y	the whole document	
X	WO 9737673 A1 ( GINORIO FERNANDEZ MARIA CARIDA [CU])	
Y	16 october 1997 (1997-10-16) 16 february 2012 (2012-02-16) amended 1 and 4 (page 8) amended 1 to 20	
X	WO 2011126537 A2 ( HALEY JEFFREY T)	
Y	13 october 2011 (2011-10-13) amended 1 to 20	
X	US 2012040033 A1 (Armstrong, E.T.)	
Y	16 february 2012 (2012-02-16) amended 1 to 20	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2013/000458

WO 9737673 A1

1997-10-16

AU 5263596 A

1997-10-29

WO 2011126537 A2

2011-10-13

WO 2011126537 A3

2012-01-19

US 2012040033 A1

2012-02-16

NONE

## RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2013/000458

## A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

**C07D311/04 (2006.01), C07D311/40 (2006.01), A61K36/185 (2006.01), A61K31/35 (2006.01), A61P1/04 (2006.01)**

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

## B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

**SINPI- Base de dados do INPI-BR; Periódicos Capes**

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

**EPODOC; ProQuest-Dialog (todas as bases de dados)**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	De Faria, F.M. Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante de <i>Rhizophora mangle</i> L. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. Disponível em: < <a href="http://www.bibliotecadigital.unicamp.br">http://www.bibliotecadigital.unicamp.br</a> >. Acesso em: 22 de noviembre de  Veja todo o documento	1 a 13
X	De FARIA, F. M. et al. PROTECTIVE EFFECTS OF Rhizophora mangle L. ON TNBS-INDUCED COLITIS IN RATS. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011, Rio de Janeiro. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011  Veja todo o documento	1 a 12
Y	De Faria, F.M. et al. Protective effects of Rhizophora mangle L. on TNBS-induced colitis in rats. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011, Rio de Janeiro. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011  Veja todo o documento	13

 Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C Ver o anexo de famílias das patentes

\* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se bascia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&amp;" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

**25 novembro 2013****201213**

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA  
PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Rua São Bento nº 1, 17º andar  
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ  
Nº de fax: +55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

**Rodinelli Borges de Oliveira**

Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**

Depósito internacional Nº

PCT/BR2013/000458

**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Red mangrove protects gastric mucosa through increase of COX-2 and EGF expression.. In: XIX Congresso Società Italo-Latinoamericana di Etnomedicina - SILAE, 2010, Cagliari. XIX Congresso Società Italo-Latinoamericana di Etnomedicina - SILAE. Cagliari, 2010. Veja todo o documento	1 a 12
Y		13
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Phytochemical and pharmacological evaluation of mangrove bark: assay in ulcer model. In: XVII CONGRESSO ITALO-LATINOAMERICANO DI ETNOMEDICINA, 2008, Palermo. XVII CONGRESSO ITALO-LATINOAMERICANO DI ETNOMEDICINA, 2008.	1 a 12
Y	Veja todo o documento	13
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Role of SOD in the protection of Rhizophora mangle on gastric injury induced by ethanol, ischaemia-reperfusion and acetic acid in rats. In: 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2009, Genebra. 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2009.	1 a 12
Y	Veja todo o documento	13
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Rhizophora mangle L. ameliorates TNBS-induced colitis in rats through the expression of NF-kappa B. In: XX Congresso Italo-Latino Americano de Etnomedicina "Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos" - SILAE, 2011, Fortaleza. XX Congresso Italo-Latino Americano de Etnomedicina "Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos" – SILAE.	1 a 12
Y	Veja todo o documento	13
X	De FARIA, F. M. <i>et al.</i> Atividade antioxidante de Rhizophora mangle L.. In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2010, Águas de Lindóia. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia, 2010.	1 a 12
Y	Veja todo o documento	13
X	WO 9737673 A1 ( GINORIO FERNANDEZ MARIA CARIDA [CU])	4
Y	16 outubro 1997 (1997-10-16) Reivindicações 1 e 4 (página 8)	1 a 3, 5 a 13
X	WO 2011126537 A2 ( HALEY JEFFREY T) 13 outubro 2011 (2011-10-13)	4
Y	Reivindicações 1 a 20	1 a 3, 5 a 13
X	US 2012040033 A1 (Armstrong, E.T.) 16 fevereiro 2012 (2012-02-16)	4
Y	Reivindicações 1 a 20	1 a 3, 5 a 13

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**

Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional N°

PCT/BR2013/000458

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 9737673 A1	1997-10-16	AU 5263596 A	1997-10-29
WO 2011126537 A2	2011-10-13	WO 2011126537 A3	2012-01-19
US 2012040033 A1	2012-02-16	Nenhum	