



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

VERÍSSIMO VIEIRA NETO

**ESTUDO DO EFEITO GASTROPROTETOR E MECANISMO DE AÇÃO DO
EXTRATO ETANÓLICO DE SEMENTES DE *Triplaris gardneriana* WEDD.**

FORTALEZA

2021

VERÍSSIMO VIEIRA NETO

ESTUDO DO EFEITO GASTROPROTETOR E MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO
ETANÓLICO DE SEMENTES DE *Triplaris gardneriana* WEDD.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.

Coorientador: Dr. Thiago Silva de Almeida.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V719e Vieira Neto, Veríssimo.
Estudo do efeito gastroprotetor e mecanismo de ação do extrato etanólico de sementes de
Triplaris gardneriana Wedd. / Veríssimo Vieira Neto. – 2021.
47 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.
Coorientação: Dr. Thiago Silva de Almeida.

1. Pageú. 2. Antioxidantes. 3. Dano gástrico. 4. Gastroproteção. I. Título.

CDD 572

VERÍSSIMO VIEIRA NETO

ESTUDO DO EFEITO GASTROPROTETOR E MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO
ETANÓLICO DE SEMENTES DE *Triplaris gardneriana* WEDD.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Thiago Silva de Almeida (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rogerio de Aquino Saraiva
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Dr.^a Ayrles Fernanda Brandão da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a energia divina que eu chamo de Deus por me ajudar muito na minha caminhada aqui na Terra. Agradeço imensamente ao meu coorientador Thiago Silva de Almeida que foi quase um pai na minha vida acadêmica, sem o apoio dele acredito que eu não teria concretizado este trabalho. Thiago é um ser humano incrível e estou torcendo para ele ter muita prosperidade na vida, ele me ensinou muito sobre ciência, eu o ensinei a pensar sempre positivo, tenho quase certeza que um dia Thiago terá uma brilhante carreira.

A meu pai Moises Vieira e minha mãe Maria Valdisa por acreditar no meu potencial e me apoiar nos momentos difíceis.

A minha orientadora Profa Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho pela paciência de sempre, pelos ensinamentos. Percebi que a experiência é uma dádiva da vida e que quem passou por uma longa jornada tem muito a ensinar e estimular o aprendizado de quem está começando.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica na pessoa do coordenador Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas, representando todos os docentes e colaboradores que contribuíram para o fechamento deste ciclo acadêmico.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais: Profa. Dra. Érika Mota, Joanna Freitas, Leticia Viana, Gabrielle de Paula, Luiz Carlos, Thaís Borges, Pedro Matheus, Joaquim Lopes e Thiago Almeida. Aqui eu aprendi a diferença que uma equipe faz na vida das pessoas, muito grato por tudo.

Aos meus colegas do curso de mestrado Patrícia Gomes, Lucas de Sousa, Francisco Everton, Lara Dias, Yandra, Iris Flávia, Mateus Farias e Lucas Pacheco, onde compartilhamos momentos bons e ruins durante toda nossa trajetória. Desde já, obrigado a todos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Além disso, com a ajuda do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará; Laboratório de Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul e do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza Ceará.

RESUMO

A espécie botânica *Triplaris gardneriana* Wedd (Poligonaceae), conhecida como Pajeú, pertencente ao bioma caatinga, apresenta em suas sementes compostos fenólicos com capacidade antioxidante comprovada. Os antioxidantes podem auxiliar no tratamento de diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como por exemplo as doenças neurodegenerativas e processos inflamatórios. O presente estudo tem como objetivo a obtenção de um extrato etanólico a partir das sementes de *T. gardneriana* (EETg), avaliação de sua composição química, atividade antioxidante, efeito gastroprotetor e o estudo dos mecanismos de ação gastroprotetora em modelos *in vivo*. Os dados quantitativos foram descritos como médias, e foi realizada análise de variância (ANOVA) na comparação dos resultados. Os resultados quantitativos de fenóis totais e flavonoides das amostras de EETg apresentaram valores de 82,17 e 35,92 µg/mg, respectivamente. No estudo de gastroproteção, o EETg nas doses orais de 25, 50 e 100 mg/kg preveniu lesões em 43,3; 60,3 e 75,4%, respectivamente em relação ao controle positivo. A menor concentração que conseguiu reduzir a área da lesão e os níveis de MDA, ao mesmo tempo, foi a dose de 50 mg/kg, sendo estabelecida como a mais adequada para ser utilizada para os testes de esclarecimento do mecanismo de ação da gastroproteção. Esses mostraram que o efeito protetor do EETg foi, significativamente, reduzido na presença de indometacina e L-NAME, utilizados como antagonistas das prostaglandinas e do óxido nítrico, respectivamente. As simulações de docking sugeriram, de acordo com as energias livres de ligação e interações moleculares, que os compostos fenólicos poderiam interagir com as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e com a óxido nítrico sintase (iNOS), ratificando, assim, o envolvimento das prostaglandinas e do óxido nítrico no mecanismo de ação. Portanto, o EETg pode atuar como substância gastroprotetora, visto que seu potencial frente às úlceras gástricas foi bastante promissor.

Palavras-chave: pajeú; antioxidantes; dano gástrico; gastroproteção.

ABSTRACT

The botanical species *Triplaris gardneriana* Wedd (Poligonaceae), known in Portuguese as Pajeú, belonging to the caatinga biome and presents in its seeds phenolic compounds with proven antioxidant capacity. Antioxidants can help in the treatment of several diseases related to oxidative stress, such as neurodegenerative diseases and inflammatory processes. This study aims to obtain an ethanol extract from the seeds of *T. gardneriana* (EETg), evaluate its chemical composition, antioxidant activity, gastroprotective effect and study the mechanisms of gastroprotective action in *in vivo* models. Quantitative data were described as means, and analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the results. The results of total phenols and flavonoids in the samples showed values of 82.17 and 35.92 µg/mg, respectively. In the gastroprotection study, EETg at oral doses of 25, 50 and 100 mg/kg prevented lesions in 43.3; 60.3 and 75.4%, respectively, compared to the positive control. The lowest concentration that managed to reduce the lesion area and MDA levels at the same time was the dose of 50 mg / kg, which was established as the most suitable to be used for tests to clarify the mechanism of action of gastroprotection. These tests showed that the protective effect of EETg was significantly reduced in the presence of indomethacin and L-NAME, used as antagonists of prostaglandins and nitric oxide, respectively. The docking simulations suggested, according to the free energies of binding and molecular interactions, that the phenolic compounds could interact with the cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS), which confirms the involvement of prostaglandins and nitric oxide in the mechanism of action. Therefore, EETg may act as a gastroprotective substance, as its potential against gastric ulcers was very promising.

Keywords: pajeú; antioxidants; gastric damage; gastroprotection.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Úlcera Gástrica	11
2.2	Mecanismos Envolvidos no Efeito Gastroprotetor	12
2.2.1	<i>Mecanismo de Ação do L-NAME</i>	12
2.2.2	<i>Mecanismo de Ação da Indometacina</i>	13
2.2.3	<i>Mecanismo de Ação do Pantoprazol</i>	15
2.3	Espécies reativas de oxigênio	15
2.4	Controle de radicais livres em sistemas biológicos	16
2.5	Antioxidantes e Compostos Fenólicos	17
2.6	<i>Triplaris gardneriana Wedd</i>	18
3	HIPÓTESE	20
4	OBJETIVOS	20
4.1	Objetivo Geral	20
4.2	Objetivos Específicos	20
5	GASTROPROTECTIVE EFFECT AND MECHANISM OF ACTION OF THE ETHANOLIC EXTRACT FROM SEEDS OF <i>TRIPLARIS GARDNERIANA WEDD</i>	20
5.1	Introduction	21
5.2	Materials and methods	22
5.2.2	<i>Chemical and drugs</i>	22
5.2.3	<i>Plant extract preparation</i>	23
5.2.4	<i>Chemical characterization</i>	23
5.2.5	<i>In vitro assessment of antioxidant activity</i>	23
5.2.6	<i>Animals</i>	24
5.2.7	<i>Gastroprotective activity and mechanism of action</i>	24
5.2.8	<i>Biochemical profile of mice stomach homogenates</i>	25
5.2.8.1	<i>Determination of reduced levels of glutathione (GSH)</i>	25
5.2.8.2	<i>Measurement of malondialdehyde (MDA) levels</i>	25
5.2.8.3	<i>Measurement of catalase activity (CAT)</i>	25

5.2.9	<i>Molecular docking using COX-1, COX-2 and iNOS as macromolecular targets</i>	26
5.2.10	<i>Statistical analysis</i>	27
5.3	Results and discussion	27
5.3.1	<i>Extract yield</i>	27
5.3.2	<i>Concentration of total phenols and flavonoids</i>	27
5.3.3	<i>Antioxidant capacity</i>	28
5.3.4	<i>In vivo gastroprotective activity and biochemical profile of stomach tissue samples</i>	29
5.3.5	<i>Mechanism of gastroprotective action of EETg and biochemical profile</i>	30
5.3.6	<i>Molecular docking</i>	34
5.4	Conclusion	38
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Os hábitos da sociedade moderna como o tabagismo, a ingestão de álcool, utilização crescente de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES) para combater osteoartrite e artrite reumatoide, doenças vasculares e estresses em geral têm contribuído para o aumento da incidência de úlceras gástricas nos seres humanos (MENDONÇA *et al.*, 2013; SOUSA, 2015). Essas lesões são reguladas, principalmente, por mediadores inflamatórios, devido ao aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que induzem vasoconstrição, estresse oxidativo, peroxidação de lipídeos e até mesmo a morte celular (PARK, 2011).

Existem vários medicamentos disponíveis para o tratamento de úlceras, como por exemplo, os antiácidos bloqueadores dos receptores H₂ ou as drogas inibidoras da bomba de prótons, porém a avaliação clínica desses medicamentos indica alta incidência de efeitos colaterais e interações medicamentosas desfavoráveis para o organismo (CHOUDHARY *et al.*, 2013). Considerando que a ocorrência dessa doença vem aumentando com o tempo, e que o tratamento medicamentoso atualmente disponível produz reações adversas, como hipersensibilidade, arritmia, impotência, ginecomastia e alterações hematopoiéticas, torna-se necessário a busca de novas alternativas para o tratamento de úlceras gástricas (SOUSA *et al.*, 2018).

Pesquisas utilizando plantas medicinais têm provado que essas podem ser uma fonte promissora de novos compostos com potencial clínico e terapêutico com atividade gastroprotetora (BENTO *et al.*, 2018). Estudos realizados com produtos naturais revelam que, apesar do crescente aumento de pesquisas nessa área, apenas de 15 a 17% das plantas estudadas foram avaliadas quanto ao seu potencial medicinal (FERNANDES, 2012).

Compostos fenólicos de origem vegetal, tais como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis podem reverter os danos gástricos acometidos pelo estresse oxidativo (MACÊDO, 2015). De acordo com Silva *et al.* (2010), a procura por antioxidantes naturais para a produção de alimentos, cosméticos e fármacos vem representando um desafio relevante para a pesquisa nas últimas décadas. Nesse sentido, a espécie vegetal *Triplaris gardneriana* Wedd, presente na região semiárida nordestina, pode vir a contribuir com potenciais benefícios medicinais, dentre os quais, já são relatadas nas práticas populares, ação contra hemorroidas sangrentas e inflamação dos órgãos internos (MACÊDO, 2015). Na literatura científica, alguns estudos relatam que o extrato etanólico das sementes dessa espécie

vegetal, exerce ações antibacteriana, anticolinesterásica e antioxidante (FARIAS *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2016). Porém, ainda não há trabalhos abordando sua utilização como gastroprotetor. Nesse viés, é provável que o extrato etanólico das sementes da espécie vegetal *T. gardneriana* possa oferecer compostos ativos para o tratamento das úlceras gástricas, ratificando a importância da bioprospecção e da utilização sustentável de recursos naturais da Caatinga.

2. REVISÃO DE LITERATURA

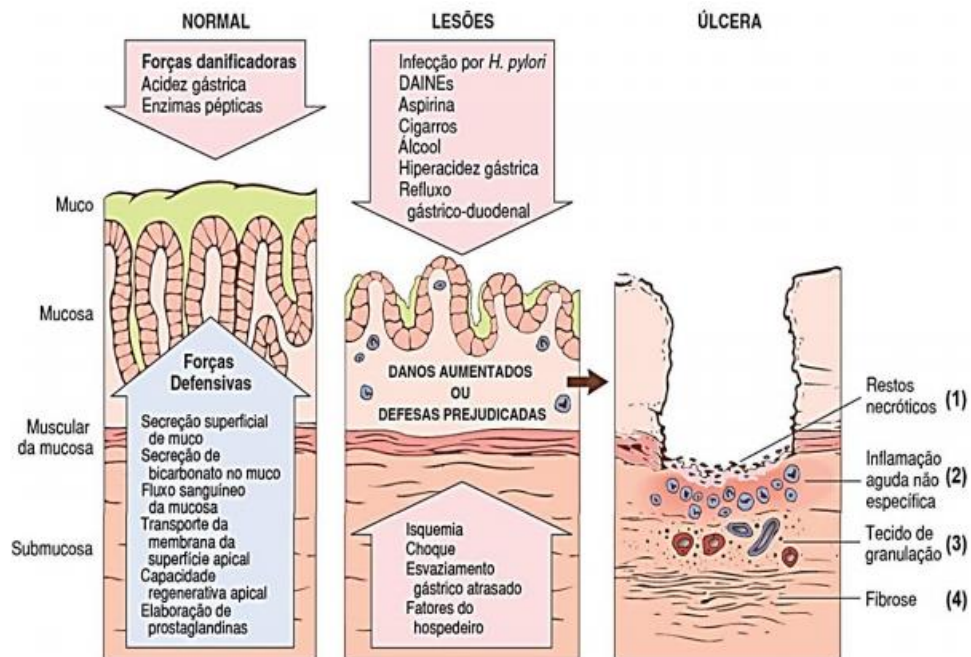
2.1 Úlcera Gástrica

A úlcera gástrica é um tipo de lesão que ocorre no estômago e que afeta cerca de 10% da população mundial (ADEFISAYO *et al.*, 2017). As úlceras podem ocorrer devido a um desequilíbrio entre os mecanismos construtivos e destrutivos do sistema gástrico. Os fatores construtivos compreendem secreções de mucina, peptídeos e prostaglandina, enquanto que os fatores danosos incluem aumento do ácido gástrico, secreção de pepsina e a presença da bactéria *Helicobacter pylori*. A lesão de qualquer camada do estômago causa distúrbios nos processos fisiológicos normais, levando à liberação excessiva de ácido gástrico, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), síntese de óxido nítrico e a peroxidação lipídica (AZIZ *et al.*, 2019). Além disso, a úlcera gástrica pode ser classificada como uma doença pré-cancerosa de preocupação global pela organização mundial de saúde (OMS), uma vez que 10% das pessoas com essa condição desenvolvem câncer (LIU *et al.*, 2017).

Embora a infecção por *H. pylori* e o uso de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais constituam fatores predominantes para o desenvolvimento da úlcera gástrica, outras situações como a carência do suprimento de sangue para um órgão, doença pulmonar crônica, tabagismo, a ingestão de bebidas alcoólicas ou com alto teor de cafeína e o estresse diário também influenciam para o agravamento dessa condição (AHMAD *et al.*, 2019).

Na Figura 1 é possível observar o mecanismo de proteção e progressão da injúria gástrica. Com a progressão da lesão, pode-se verificar a ruptura das quatro principais camadas do estômago (muco, mucosa, músculos e submucosa), com a predominância de tecido necrótico presente logo abaixo da lesão, seguido da produção e acúmulo de neutrófilos e tecido de granulação e por fim, de tecido fibroso cicatricial (TURNER, 2010).

Figura 1 – Mecanismo de proteção e progressão da injúria gástrica



Fonte: Turner, 2010

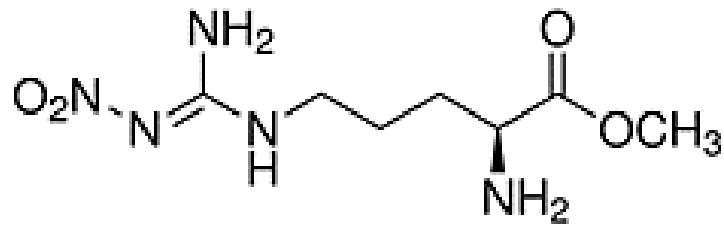
Como mencionado, há uma geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na mucosa gástrica devido à exposição a agentes estressores. Em condições normais, são produtos essenciais do metabolismo celular, sendo controladas por enzimas antioxidantes, destacando-se a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), que atuam como sequestradoras de radicais livres, evitando assim danos no organismo. No entanto, quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e o sistema de defesa antioxidante, desencadeia-se uma condição biológica conhecida como estresse oxidativo (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014), que pode estar relacionada a processos patogênicos, como inflamações, diabetes melitus, câncer, doenças cardiovasculares, úlceras gástricas, entre outras (PARK, 2011; NELSON; COX, 2019).

2.2 Mecanismos Envolvidos no Efeito Gastroprotetor

2.2.1 Mecanismo de Ação do L-NAME

O NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) mostrado na Figura 2, é um inibidor constitutivo das diferentes isoformas de óxido nítrico sintetases (ONS), enzimas produtoras de óxido nítrico (ON). L-NAME é uma droga inativa no sangue e no plasma. Ao entrar nas células, torna-se um composto ativo e inibe a ONS (PFEIFFER *et al.*, 1996).

Figura 2 - Estrutura química do L- NAME



Fonte: Pinto *et al.*, 2010.

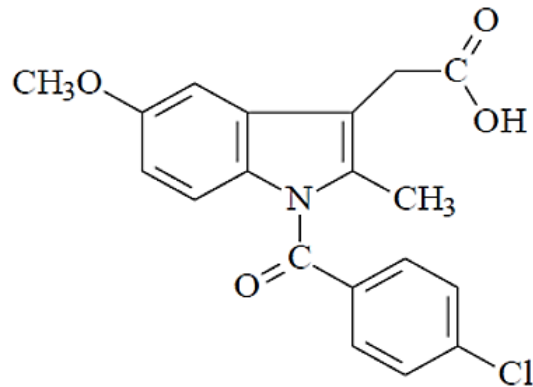
O ON participa de vários processos celulares, como a vasodilatação, inibição da adesão plaquetária, prevenção da trombose, participa também da proliferação endotelial, reepitelização e produção de colágeno no processo de cicatrização (MAJOR *et al.*, 2010; ZHU; KA; MURAD, 2007) .

No estômago, o ON possui um importante papel na prevenção e reparo de injúrias, pois participa no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato no trato gastrointestinal (TGI), na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrintestinal, além de atuar como agente citoprotetor, anti-inflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (MUSCARÁ; WALLACE, 1999).

2.2.2 Mecanismo de Ação da Indometacina

O ácido [1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-il] acético, conhecido como indometacina (Figura 3), faz parte da classe dos AINES. Por apresentar importantes propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antitérmicas, já foi utilizada no tratamento de artrite reumatoide, espondilite anquilosante, osteoartrite, artrite gotosa aguda, distúrbios musculoesqueléticos agudos entre outras (ROBERTS; MORROW, 2001). A absorção do medicamento pode variar de 30 min a 2 h após a ingestão da dose recomendada, sendo o tempo médio para início da ação de 30 min (REYNOLDS, 1993).

Figura 3 - Estrutura química da Indometacina



Fonte: Roberts; Morrow, 2001.

O principal mecanismo de ação da indometacina se dá através da inibição da síntese de todas as prostaglandinas (PGs), por bloqueio reversível da via mediada pelas enzimas ciclooxigenases (COXs) (BARST, GERSONY, 1989). As prostaglandinas são formadas quando um ácido graxo insaturado de 20 carbonos (ácido araquidônico) é liberado pela fosfolipase A2 da membrana plasmática, atuando em resposta a uma variedade de estímulos celulares. Logo após a sua liberação, acontece a metabolização pela ação das COXs. As COXs existem em duas formas distintas, denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 tem sua expressão de maneira constitutiva pela maioria das células, já a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento (KAWABATA, 2011; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

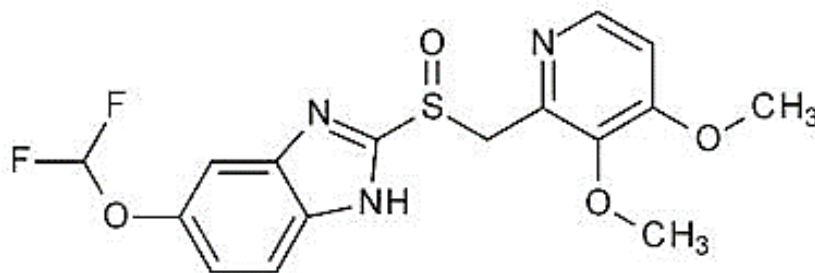
A COX-1 é uma isoforma amplamente distribuída na maioria dos tecidos, onde desempenha funções fisiológicas como a proteção da mucosa gástrica, manutenção e proteção da função renal ou regulação da agregação plaquetária através da estimulação do tromboxano A2 (TXA2). Por outro lado, a isoforma COX-2 é vista principalmente como responsável pela iniciação e manutenção do processo de inflamação, com papéis fisiológicos menores, como na estimulação da produção de prostacilinas (PGI2) e, assim, prevenir a agregação plaquetária (HOXHA, 2018)

Sabe-se que os efeitos colaterais, provocados pelos AINES no trato gastrointestinal, estão principalmente associados à inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1), enquanto que os efeitos colaterais cardiovasculares estão diretamente ligados à inibição da COX-2 (MINERS *et al.*, 2010).

2.2.3 Mecanismo de Ação do Pantoprazol

O pantoprazol [5- (difluorometoxi)-2-[[3,4-dimetoxi-2-piridinil) metil] sulfinil] – 1h- benzimidazol] (Figura 4) é uma droga farmacêutica, derivado benzoimidazólico, utilizado no tratamento de distúrbios de acidez gástrica, como refluxo esofágico, úlcera duodenal e síndrome de Zollinger-Ellison (RAFFIN *et al.*, 2006).

Figura 4 - Estrutura química do Pantoprazol



Fonte: Marques *et al.*, 2012.

O mecanismo de ação do pantoprazol começa com sua ativação em ambiente ácido das células parietais gástricas. Após a absorção intestinal, o fármaco começa a circular na corrente sanguínea. Sua ativação leva à formação de uma sulfonamida catiônica cíclica, que por sua vez, se liga a uma ou mais subunidades catalíticas da bomba de prótons, alterando sua configuração e, com isso, provocando uma inibição irreversível no transporte de ácido (RAFFIN, 2007).

2.3 Espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas instáveis, altamente capazes de reagir com outras moléculas, transformando-as. Como exemplos, pode-se citar o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical peroxila (RO_2^{\bullet}), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o óxido nítrico (NO^{\bullet}), o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}), o peroxil (ROO^{\bullet}) e o peróxido lipídico (LOO^{\bullet}) (DAIBER, 2010; VENDITTI *et al.*, 2013; OZSUREKCI; AYKAC, 2016). Ademais, são produzidas em quase todas as células eucarióticas e estão envolvidas em diversos processos biológicos, como a respiração celular, proliferação, migração, diferenciação, dinâmica do citoesqueleto, metabolismo celular e processos de defesa do organismo como o processo inflamatório (GRIENGLING *et al.* 2019).

As espécies reativas nas células de animais, em sua maioria, são fisiologicamente originadas na mitocôndria através da produção de adenosina trifosfato (ATP) na cadeia transportadora de elétrons (CTE), considerada a maior fonte energética dos seres vivos (NELSON; COX, 2019). Sob condições aeróbias, a enzima citocromo oxidase presente na CTE catalisa a reação do oxigênio consumido (O₂) em água (H₂O) com eficiência superior a 90%. Todavia, menos de 10% desse O₂ consumido é convertido em EROs (DAIBER, 2010; VENDITTI *et al.*, 2013; OZSUREKCI; AYKAC, 2016).

2.4 Controle de radicais livres em sistemas biológicos

O radical hidroxila (OH•) é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos, possui reação rápida, até mesmo com outros radicais e também com metais dispersos. Dentre seus malefícios ao organismo se destacam a inativação ou mutação do DNA, inativação de proteínas devido à oxidação dos grupos sulfidrilas e pontes dissulfeto e ainda são responsáveis por iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (ALMEIDA, 2016).

Os radicais livres superproduzidos *in vivo* são considerados como iniciadores de vários danos de espécies biológicas e como desativadores de enzimas e, portanto, tornam-se a patogenia de muitas doenças (LIU, 2020). No sistema imunológico, a primeira linha de defesa do organismo, conhecida como defesa inata, utiliza como principal mecanismo a explosão oxidativa ocorrendo quando um microrganismo ou outro corpo estranho é identificado, e, posteriormente, fagocitado. Com isso, uma grande carga de radicais livres é liberada dentro do fagossomo na tentativa de eliminar esse agente (HALLIWELL,13). Ainda no sistema imunológico, os radicais livres podem atuar na secreção de citocinas pró-inflamatórias, agindo como estimuladores para a migração de macrófagos e outras células brancas na tentativa de conter focos de infecção por patógenos (ALMEIDA, 2016). Citocinas pró-inflamatórias superproduzidas, podem não apenas levar à inflamação, mas também promover a deterioração do coração e disfunções renais (MAO *et al.*, 2011).

Para se proteger dessas ações deletérias ocasionadas pelos radicais livres e outros oxidantes em excesso, as células passaram a desenvolver mecanismos de defesa antioxidante bem integrado, que inclui componentes enzimáticos e não-enzimáticos (LOPES NETO, 2017). As principais enzimas de eliminação das EROs envolvem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e peroxirredoxinas (Prxs) (RAMÍREZ-DUARTE *et al.*, 2016; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA;

WITKOWSKA; ZUJKO, 2018). Dentre os compostos não-enzimáticos de ação protetora estão as moléculas de baixa massa molecular como a glutatona (GSH), ácido úrico, ascorbato, tocoferóis e carotenoides (LOPES NETO, 2017). O sistema não-enzimático ainda tem a participação de proteínas transportadoras de metais de transição, como a transferrina (transporte de ferro) e ceruloplasmina (transporte de cobre) e de componentes xenobióticos adquiridos via dieta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

De maneira geral, o sistema antioxidante enzimático e a glutatona estão presentes, predominantemente, em meio intracelular, já o sistema não-enzimático encontra-se, principalmente, no meio extracelular. Algumas disfunções celulares, geradas por desequilíbrios no sistema antioxidante, geralmente estão associadas ao aumento intracelular das espécies reativas, ocasionando mudanças no balanço redox (redução-oxidação) em sistemas biológicos, com isso, o organismo é direcionado a um estado conhecido como estresse oxidativo (LOPES NETO, 2017).

2.5 Antioxidantes e Compostos Fenólicos

Antioxidantes podem ser definidos como compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de moléculas (ALTEMIMI *et al.*, 2017). De acordo com Cotinguiba *et al.* (2015), os antioxidantes são classificados em diversos tipos: antioxidantes primários, secundários, mistos, agentes quelantes/sequestrantes, removedores de oxigênio, sinergistas e antioxidantes biológicos.

Em relação ao mecanismo de ação, os antioxidantes primários promovem a remoção ou inativação de forma direta dos radicais livres. Os secundários são capazes de decompor substâncias como os hidroperóxidos que provocam danos em biomoléculas. Já os mistos possuem mais de um mecanismo de ação, tendo como destaque os flavonoides e os ácidos fenólicos. Os agentes quelantes têm a capacidade de se complexar com íons metálicos a partir de um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular, e com isso impede que esses íons participem da formação de radicais livres. Os removedores de oxigênio atuam na captura do oxigênio no meio reacional, impedindo que estes estejam disponíveis para a formação de EROS. Os sinergistas são substâncias que têm pouca ou nenhuma atividade antioxidante, porém podem ajudar a aumentar o potencial dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com eles. Os antioxidantes biológicos correspondem às enzimas que têm o propósito de neutralizar os radicais livres (WANG *et al.*, 2013; ALMEIDA, 2016; SANTOS *et al.*, 2016).

Do ponto de vista biológico, esses compostos ajudam a proteger o organismo contra a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (SOUSA, 2018). No que se refere à constituição química, os antioxidantes de origem fenólica, pertencentes ao grupo de metabólitos secundários das plantas, possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (ROLEIRA *et al.*, 2015).

Estudos mostram que existem mais de cinco mil fenóis de origem vegetal. Dentre esses, os que mais se destacam são os flavonoides, fenóis simples, taninos, tocoferóis e ácidos fenólicos (SOUSA, 2018). Dados apresentados na literatura sugerem que a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos pode estar associada aos grupos hidroxila, que desempenham um papel importante na atividade antioxidante (OLSZOWY, 2019). O ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxi-cinâmico), por exemplo, apresenta dois grupos hidroxila e exibe propriedades antioxidantes melhores do que o p-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico), que tem apenas um grupo hidroxila ligado ao anel aromático (OLSZOWY, 2019).

Os compostos fenólicos nos alimentos são responsáveis pela cor, odor, aroma, amargor, adstringência e estabilidade oxidativa (MACHADO *et al.*, 2013). Na natureza, esses compostos se encontram em uma gama de alimentos, como as frutas cítricas (laranja, limão, tangerina, dentre outras) e nas plantas medicinais (SOUSA, 2018).

2.6 *Triplaris gardneriana* Wedd

A família Polygonaceae abrange 51 gêneros, com aproximadamente 1.100 espécies vegetais espalhadas nas regiões temperadas e tropicais. No Brasil, dentre os sete gêneros de ocorrência natural, destaca-se a espécie arbórea *Triplaris gardneriana* Wedd (*Figura 5*), conhecida popularmente na Região Nordeste como pajeú, novateiro, coaçu ou pau-formiga. Sua ocorrência se destaca nos biomas Pantanal e Caatinga. No primeiro é encontrada, principalmente, nas várzeas inundáveis e encostas úmidas mato-grossenses, enquanto que na Caatinga sua prevalência ocorre no Estado do Ceará e nas proximidades do vale do Rio São Francisco, que se estende de Minas Gerais até Pernambuco (MACÊDO, 2015).

Figura 5 – *Triplaris gardneriana* Wedd.



Fonte: Lorenzi, 2002.

Na medicina popular a espécie é utilizada para alguns fins: o cozimento da casca ou da raiz é utilizado no tratamento da blenorragia e leucorreia; suas folhas nos banhos de assento e embebidas para tratar hemorroidas sangrentas e inflamação dos órgãos internos, respectivamente. Também é utilizada para tratar tosse e bronquite (MACÊDO, 2015).

Em relação à composição química, a espécie *T. gardneriana* possui como principais constituintes químicos das folhas; ligninas, flavonoides glicosilados e derivados terpenoides. Além disso, foram identificados glicosídeos de quercetina e miricetina no extrato etanólico das folhas por LC-MS (MACÊDO *et al.*, 2015). A caracterização química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) de óleos fixos das folhas e sementes de *T. gardneriana* destacou como constituintes majoritários os ésteres palmitato de metila e 10-octadecenoato de metila, respectivamente (MACÊDO *et al.*, 2016). Seus constituintes também

podem atuar como sequestrantes de radicais livres, redutores de metais de transição e inibidores da peroxidação lipídica (LOPES NETO, 2017).

Testes em condições gastrointestinais simuladas mostraram que o extrato etanólico das sementes pode atuar como uma fonte significativa de flavonoides bioacessíveis (LOPES NETO, 2017). Desta forma, pode-se considerar que o extrato etanólico desta espécie vegetal possa contribuir como um promissor agente gastroprotetor por meio de sua ação antioxidante, fomentando ainda mais a relevância das propriedades medicinais deste produto fitoquímico.

3 HIPÓTESE

Devido ao elevado teor e diversidade de compostos fenólicos do extrato etanólico de sementes de *T. gardneriana*, e suas comprovadas atividades antioxidante e anti-inflamatória, foi hipotetizado que esse extrato possui atividade gastroprotetora por meio de diversos mecanismos de ação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial gastroprotetor e os possíveis mecanismos de ação do extrato etanólico de sementes de *Triplaris gardneriana* WEDD.

4.2 Objetivos Específicos

- Obter o extrato etanólico de sementes de *T. gardneriana* (EETg);
- Caracterizar quimicamente EETg através de diferentes métodos quantitativos;
- Verificar o potencial antioxidante in vitro do EETg;
- Avaliar a capacidade gastroprotetora in vivo do EETg;
- Verificar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pela atividade gastroprotetora do EETg.

5 GASTROPROTECTIVE EFFECT AND MECHANISM OF ACTION OF THE ETHANOLIC EXTRACT FROM SEEDS OF *TRIPLARIS GARDNERIANA* WEDD.

O seguinte manuscrito foi submetido para apreciação na revista *Fitoterapia - Elsevier*. As variações estilísticas deveram-se às exigências da revista.

Veríssimo Vieira Neto^a, Thiago S. Almeida^{b,*}, José J. Lopes Neto^a, Luiz Carlos P. Almeida Filho^c, Pedro M. S. Tabosa^a, Joanna F. Rocha^c, Letícia de Castro Viana^c, Pablo Andrei Nogara^d, Karise Fernanda Nogara^e, João Batista Teixeira da Rocha^d Ana F. U. Carvalho^{a,c},

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, 60020-181, Fortaleza, CE, Brazil.

^bLaboratory of Phytochemistry and Process Integration, Northeast Strategic Technologies Center – CETENE, 50740-545, Recife, PE, Brazil.

^cDepartment of Biology, Federal University of Ceará, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil.

^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^eDepartment of Animal Science, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brazil.

Address for correspondence:

Thiago Silva de Almeida, PhD. Laboratory of Phytochemistry and Process Integration, Northeast Strategic Technologies Center – CETENE, 50740-545, Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 3334-7200. E-mail: thiago.urca@gmail.com

5.1 Introduction

Gastric ulcer is one of the diseases that affects the gastrointestinal system with increasing incidence and prevalence worldwide. Exogenous factors, such as stress, excessive alcohol drinking habits, smoking and prolonged intake of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) has a great relevance for the formation of gastric ulcers (BRUCKER; FAUCHER, 1997).

Patients with this disease usually suffer from abdominal discomfort, nausea, severe pain and a burning sensation in the stomach. This disease is caused by an imbalance of aggressive factors and defensive factors that in normal conditions are kept in a homeostatic state. When imbalance of these factors occurs, it can trigger inflammatory processes (BEHRMAN, 2005; CHEN et al., 2016).

Excessive alcohol intake can cause injury to the gastric mucosa by producing disturbances in the integrity of the gastric barrier through exfoliation of cells, increasing the permeability of the mucosa and, in some cases, causing bleeding. Since ethanol is an injurious agent, it has been given orally to experimental animals to cause ulcers and gastric lesions (SOFI et al., 2020).

Typically, drugs that have the ability to effectively protect the gastric mucosa have the ability to reduce oxidative and inflammatory stress. Currently, treatments for gastric ulcer include proton pump inhibitors and H₂ receptor antagonists; however, problems with gastric ulcer recurrence after treatment, as well as undesirable side effects, have a certain association with the use of these drugs (KANGWAN et al., 2014). The search for an ideal and safe anti-ulcer treatment that provides better protection is still necessary in our current context. Recently, there is a growing attention on the use of traditional medicine with emphasis on phytochemicals, which are used as treatment options for various diseases (SHEN et al., 2017).

In a previous study by our research group, it was observed *in vitro* that the ethanol extract from *Triplaris gardneriana* seeds (EETg) has anti-inflammatory properties (LOPES NETO et al., 2020). However, no studies addressing its gastroprotective effect and likely mechanisms have been performed. Based on the above, the present study was designed to investigate the gastroprotective effect of EETg in mice with ethanol-induced gastric injury, as well as to clarify its mechanism of action.

5.2 Materials and methods

5.2.2 Chemical and drugs

Gallic acid, quercetin, Folin-Ciocalteu reagent, Ethylene Diaminetetraacetic Acid (EDTA), trichloroacetic acid, aluminum chloride, absolute ethanol, hydrogen peroxide, thiobarbituric acid, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, indomethacin, Hexadecyltrimethylammonium bromide, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), O-dianisidine dihydrochloride, ketamine, tetramethylbenzidine, xylazine, 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl and all other reagents were of analytical grade.

5.2.3 Plant extract preparation

Wild seed samples of *T. gardneriana* were harvested in the first three months of 2013 in the semiarid region of Ceará State, Northeastern Brazil, at 322 m elevation (04° 49' 56" S, 40° 19' 14" W). The present study had the following registrations: 47978-1 for Authorization and Information System on Biodiversity – SISBIO and AF21C1 for National System for Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge – SISGen. The plant material was identified and voucher specimen was deposited at Herbarium Prisco Bezerra (EAC39600) at the Federal University of Ceará (Fortaleza, Brazil). Then, 525 g of seeds were pulverized and used for extraction with 99% ethanol (1:2 w/v) at room temperature (25–27 °C) for 72 h (FARIAS et al., 2013). The supernatant was removed and filtered through Whatman N.1 paper. Subsequently, the initial flour sample was subjected to two further extractions. The extractive solution was concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator, at 40 – 50 °C (TE-210 Tecnal, Piracicaba, Brazil) until complete solvent elimination. The ethanolic extract from *T. gardneriana* seeds (EETg) was placed in an airtight sealed flask and stored in a freezer at -20 °C until analyzes. The yield was calculated as follows: Yield (%) = (extract mass/pulverized seeds mass) x 100.

5.2.4 Chemical characterization

For chemical characterization of the extract, the total phenol content (mg gallic acid/mg sample) and the total flavonoid content (mg equivalent to quercetin/g sample) were determined using the Folin-Ciocalteu method, with modifications, and that of aluminum chloride, respectively. All methods as previously described by Pessoa et al., (2016). For all methodologies, the assays were performed in triplicate.

5.2.5 In vitro assessment of antioxidant activity

The sample was evaluated for antioxidant activity by means of two classic photolorimetric tests: the free radical neutralization method using 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH) as free radical and the lipid peroxidation test with thiobarbituric acid (TBA), as previously described (PESSOA et al., 2016). For all methodologies, the assays were performed in triplicate.

5.2.6 Animals

Female Swiss albino mice (21–28 g) were obtained from the Central Animal House of Federal University of Ceara (BIOCEN-UFC). The room temperature was kept at 24 ± 2 °C and humidity at $50 \pm 10\%$. The lighting was artificial, with a 12 h light/dark cycle. All animals had free access to tap water and balanced feed (Biobase, Biotécnicas, São Paulo, Brazil). Animals were kept in cages with raised floors to prevent coprophagy. They were fasted over a period of 8 h. The experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the Federal University of Ceara (CEUA registration: 7137011019 and 5198011220) in accordance with the ethical guidelines of National Institute of Health, Bethesda, U.S.A.

5.2.7 Gastroprotective activity and mechanism of action

Acute gastric lesions were induced in mice (n=6/group) by oral administration of absolute ethanol (99.5%) in a volume of 0.2 mL using orogastric metal tube. EETg, dissolved in distilled water as a vehicle, was administered in oral doses of 25, 50 and 100 mg/kg, 60 min before the application of ethanol. The vehicle treated group (Saline 0.9 %) was included as a negative control. Thirty min after the administration of ethanol, the animals were euthanized with anesthetic overdose (300 mg/kg body weight of ketamine and 30 mg/kg of xylazine), the stomachs were removed, opened along the greater curvature and the area of gastric lesions was measured by planimetry, using a transparent grid. The stomachs were removed, opened along the greater curvature. The glandular area was treated with transparencies and digitized to allow the measurement of the ulcerated area, using the computerized planimetry technique (mm²) with Image J[®] software. Results were expressed as gastric lesion area (mm²) (LEITE et al., 2009).

In mechanistic studies, separate experiments were carried out to examine the role of either prostaglandins, nitric oxide and proton pump inhibitors in the most efficient gastroprotective effect of EETg (50 mg/kg), using appropriate antagonists, indomethacin (10 mg/kg, sc), L-NAME (10 mg/kg, ip) and pantoprazole (30 mg/kg, po), respectively. The dose selection for these antagonists was based on our pilot experiments and findings in the literature (LEITE et al., 2009). In each case, the animals were pretreated with the specific antagonist 30 min before the use of EETg.

5.2.8 Biochemical profile of mice stomach homogenates

5.2.8.1 Determination of reduced levels of glutathione (GSH)

The GSH concentrations in the tissue samples were estimated according to the method described by Sedlak and Lindsay (1968), with modifications. For this, the glandular region of the stomachs of the mice were weighed and homogenized in a solution of chilled ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA, 0.02 M), in 10% proportion (W/V), with the aid of a tissue homogenizer. Then, 120 μL of 10% homogenate was mixed with 150 μL of distilled water, plus 30 μL of trichloroacetic acid (TCA, 50%) and centrifuged at 5,000 rpm for 15 min, at 4 °C. An aliquot of 60 μL supernatant was pipetted into a 96-well plate with 102 μL of the solution composed of 25 mL of Tris-HCl buffer (0.4 M pH 8.9) with EDTA (0.02 M) and 650 μL of DTNB (0.01 M). The absorbance was measured in a microplate reader, within 5 min after the addition of DTNB, at a wavelength of 412 nm. The absorbance values were interpolated to the standard glutathione curve and the results were expressed as μmol of GSH per milligram of gastric tissue ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ of tissue).

5.2.8.2 Measurement of malondialdehyde (MDA) levels

The MDA level in gastric tissue was determined by the thiobarbituric acid method, as described by Ohkawa et al. (1979), with changes. Briefly, 1:10 (w/v) gastric tissue was macerated in 3 M acetic acid solution, the samples were centrifuged at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C. Then, 300 μL of the supernatant was added to a reaction mixture containing 200 μL of SDS 8.1% and 500 μL of TBA 0.8% (w/v) (0.1 M). The mixture was incubated in a water bath for 120 min to complete the reaction. After cooling, the reading was done at 532 nm using a 96-well microplate reader.

5.2.8.3 Measurement of catalase activity (CAT)

The tissues were weighed and homogenized following the recommendations of Beers; Sizer, (1952). Briefly the homogenates were prepared in a cold potassium phosphate buffer solution (0.05 M, pH 7.4), in the proportion of 10% w/v (100 mg of tissue/1 mL of buffer), using a tissue homogenizer. The obtained homogenate was centrifuged at 3,000 rpm for 15 min at 4 °C. A hydrogen peroxide solution (0.059 M) was prepared with the buffer, and

used as a substrate solution for the assay. In a quartz cuvette, 10 μ L of the sample supernatant was mixed with 2 mL of the buffer/hydrogen peroxide solution (0.059 M). The absorbance was read on a spectrophotometer at a wavelength of 240 nm for 6 min, and the variation in absorbance of the first and sixth minutes was considered. The results were expressed in mmol of catalase per time per milligram of tissue (mmol/min/mg of tissue).

5.2.9 Molecular docking using COX-1, COX-2 and iNOS as macromolecular targets

Phenolic compounds that have antioxidant and anti-inflammatory activity may exhibit some degree of binding affinity to cyclooxygenases and nitric oxide synthase (iNOS), and a tool that can be used to verify the viability of this interaction is the *in silico* simulation by molecular docking (GARCIN et al., 2008; HONMORE et al., 2016). Molecular docking simulations were done using as a basis the nine major phenolic compounds present in EETg previously described by our group (Almeida et al., 2017), namely caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, ellagic acid, epicatechin, gallic acid, kaempferol, quercetin and quercitrin.

For docking simulation the AutoDock Vina 1.1.1 program was used, according to a previous study (Moraes et al., 2020). The grid box (size: 40 x 40 x 40 Å) of COX-1 (PDB 3KK6) (Rimon et al., 2010) was centred on the coordinates $x = -32.01$, $y = 42.30$, $z = -3.67$, and for COX-2 (PDB 3LN1) (Wang et al., 2010) the grid box (size: 40 x 40 x 40 Å) center was $x = 32.37$, $y = -24.82$, $z = -15.24$. The grid box of iNOS (PDB 3E7G) (GARCIN *et al.*, 2008) was defined on the coordinates $x = 60.40$, $y = 20.04$, $z = 83.49$ (size= 66 x 66 x 80 Å). The enzymes were considered as homodimers, and the water, ions, and other molecules were removed before the docking procedure (except the heme groups, and the biopterin (H4B902) from iNOS, which are essential cofactors). The Fe(II) partial charge from the heme groups of COXs and iNOS (0.869 and 0.767, respectively) were obtained from PM6 optimization taking into account the molecules and residues at 5Å from the iron ion. The His and Cys residues were considered bound to the iron ion from COXs and iNOS, respectively. Only the hydrogens atoms were optimized while the heavy atoms were considered fixed. The Zn(II) partial charge (0.608) from iNOS was determined in a similar way, where the four Cys residues (Cys110 and Cys115 from chains A and B) were considered deprotonated. The ligands were built using the Avogadro software (Hanwell et al., 2012), followed by semi-empirical PM6 geometry optimization (MOPAC program) (STEWART, 2016, 2007). The ligands were considered flexible (with PM6 charges) while the COXs and iNOS were considered rigid (with Gasteiger charges). Twenty conformers of each ligand were analyzed in the Accelrys Discovery Studio Visualizer (DSV)

software (DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA, 2017), and the complex ligand-receptor with the most favorable binding free energy was selected as the model of interactions.

5.2.10 Statistical analysis

The data were expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M). To check the statistical differences among the groups, one-way analysis of variance (ANOVA) and Student-Newman-Keul test were performed. For all analyses, $p < 0.05$ showed significant difference.

5.3 Results and discussion

5.3.1 Extract yield

The ethanolic extract obtained from the seeds of *T. gardneriana* (EETg) showed a 19.1% yield. This value was shown to be somewhat lower than those described by Farias et al. (2013) and Lopes Neto et al. (2020) who obtained values of 26 and 22.25%, respectively. Nevertheless, these values are in the same magnitude as the ones we found. The use of ethanol as a solvent to obtain seed extracts is described as being highly efficient, having a good relationship between yield and concentration of biologically active compounds, especially phenolic compounds with antioxidant activity (ADNAN et al., 2020; BENJAKUL et al., 2012).

5.3.2 Concentration of total phenols and flavonoids

Previous studies showed values of total phenols and flavonoids in the EETg sample of 92.78 and 35.56 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively (Almeida et al., 2017), a result similar to that observed in the present study 82.17 and 35.92, sequentially (Table 1). Polyphenol-rich ethanol extracts have some anti-inflammatory and antibiotic properties and may play a key role in cellular protection from gastric damage (BALOGUN et al., 2018; HUSSAIN et al., 2016).

Table 1 - Determination of total phenolics and flavonoid content of seed *Triplaris gardneriana* Wedd extracts.

Sample	Chemical characterization	
	Total phenolics ¹	Flavonoids ²
EETg	82.17 ± 7.46	35.92 ± 2.51

EETg, ethanolic extracts of *T. gardneriana* seeds; Results are expressed as mean ± S.D. of three determinations.

¹ Gallic acid equivalent in mg per g of sample. ² Quercetin equivalent in mg per g of sample.

5.3.3 Antioxidant capacity

Results of the antioxidant activity assay by the DPPH free radical neutralization method (Table 2) presented an SC₅₀ value for the EETg of 28.26 µg/mL. Zwolan et al, (2020) working with the extract of the seeds of *Nigella sativa* L. found an SC₅₀ value of 28.68 µg/mL, similar to the EETg, and considered that extracts with this neutralizing capacity are good sources of antioxidants. Some works such as that by Lacerda Neto et al., (2017) have already established a strong connection between a promising antioxidant activity and an equally expressive anti-inflammatory activity. This is mainly due to the fact that many of the mediators of the inflammatory process are free radicals.

As for the results of the lipid peroxidation assay (TBARS method), EETg samples were shown to be able to prevent the formation of products from oxidative fatty acid decomposition, more effectively in the presence of iron, used as a stress inducer, than in baseline conditions (Table 2). This was probably due to the fact that EETg has iron chelation capacity considering its large amount of phenolic compounds (Almeida et al., 2017), thus preventing iron from initiating the oxidative process rather than simply inhibiting the peroxidation chain reaction of the phospholipids present in the reaction medium (PESSOA et al., 2016).

Table 2 - Antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd seed ethanolic extract. The scavenging activities expressed as the 50% scavenging concentration (SC₅₀) for DPPH assay, and 50% inhibiting concentration for TBARS assay.

Samples	DPPH assay SC ₅₀ (µg/mL)	TBARS assay IC ₅₀ (µg/mL)	
		Without iron stress	With iron stress
EETg	28.26 ± 0.73	166.01 ± 14.99	109.54 ± 3.09
Ascorbic Acid ¹	9.86 ± 0.46	-	-

Values are means ± SD of three measurements.

1. Used as positive control.

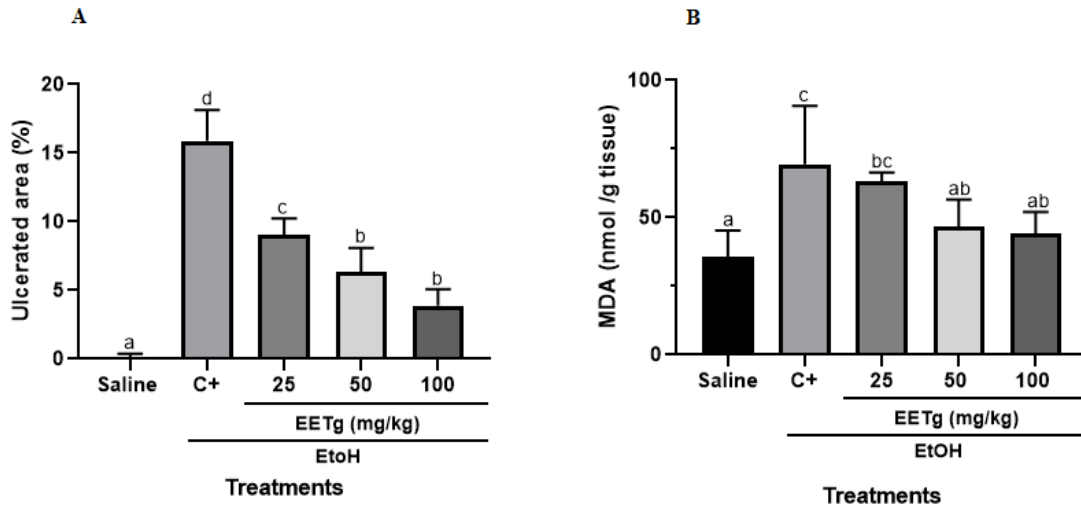
5.3.4 *In vivo* gastroprotective activity and biochemical profile of stomach tissue samples

The high content and diversity of phenolic compounds in the EETg, and its antioxidant and anti-inflammatory activities may be indicative of gastroprotective activity. In addition to the potent antioxidant capacity of EETg (seen in 3.3), our group has previously shown that EETg presents anti-inflammatory activity *in vitro* in a concentration of 20 µg/mL. At that concentration, EETg, was able to modulate the oxidative burst and restore the basal levels of myeloperoxidase in neutrophils. A result similar to that was observed with the non-steroidal anti-inflammatory indomethacin, at a concentration of 36 µg/mL in the same conditions (LOPES NETO et al., 2020).

In the present study, with oral doses of 25, 50 and 100 mg/kg body weight, EETg prevented 43.3; 60.3 and 75.4%, respectively, of the hemorrhagic mucosal lesions induced by ethanol in the glandular region of the stomach in relation to the ethanol group (Figure 6A). In the work by Balogun et al., (2018) it was reported that the gastroprotective effect of the ethanol extract of seeds from *Vigna subterranea*, at doses of 200 and 400 mg/kg, protected 78.3 and 84.8%, respectively, from gastric mucosal ulceration induced by ethanol. The authors pointed out that the antiulcerogenic property of that extract, rich in phenolic compounds, could be attributed to its antioxidant potential that offers a first line of defense against any ulcerogenic agent, reinforcing the mucosal defense system. The EETg was able to protect the stomach at lower doses than those reported and similarly it is highly possible that EETg exhibits gastroprotective action related to its phenolic specific composition.

An increase in lipid peroxidation products, such as MDA, is generally indicative of occurrence of oxidative stress *in vivo* (Yoo et al., 2018). As seen for the *in vitro* assays, EETg was able to reduce lipid peroxidation and consequently MDA formation *in vivo*. In the stomach homogenates, significant difference was observed of MDA levels among the positive control (mice treated only with ethanol) and those from animals which received the doses of 50 and 100 mg/kg of EETg (Figure 6B). It is well known that usually substances that have the ability to effectively protect the gastric mucosa have the ability to reduce oxidative and inflammatory stress (LACERDA NETO et al., 2017). The lowest concentration that was able to reduce lesion area and MDA levels at the same time, was the dose of 50 mg/kg, being established as the most appropriate to be used in the tests for clarifying the mechanism of gastroprotection action.

Figure 6 - A: Effect of Ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* Wedd (EETg) on gastric mucosal injury induced by absolute ethanol in mice and B: Effect of oral administration of EETg on MDA levels in the ethanol-induced gastric ulcer model in mice. Results are presented as means \pm S.E.M. of 6 animals/group. Similar superscript letters on the column do not differ significantly ($p < 0.05$; ANOVA and Student - Newman - Keuls test).



5.3.5 Mechanism of gastroprotective action of EETg and biochemical profile

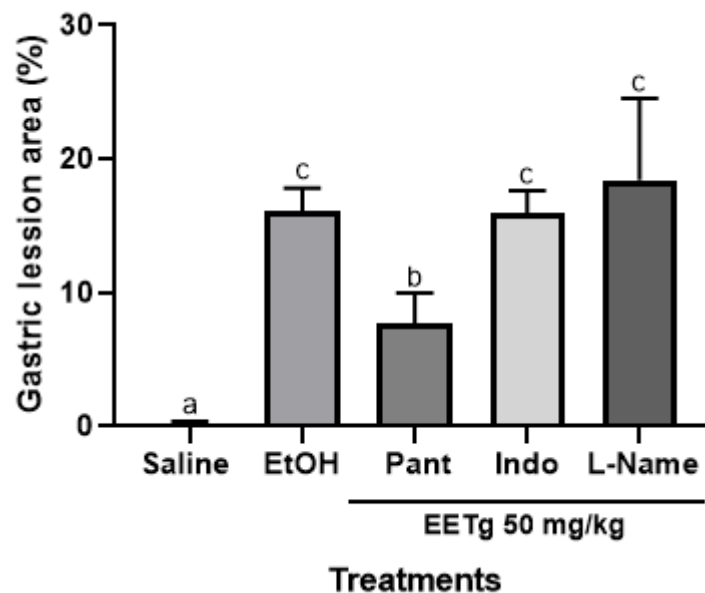
The protective effect of EETg was significantly affected in the presence of either indomethacin (10 mg/kg, sc) or L-NAME (10 mg/kg, ip), which are antagonists of prostaglandins and nitric oxide, respectively. The measured stomach lesion areas were, respectively, 16 and 18.4%, for these treatments (Figure 7). On the other hand, the pretreatment with pantoprazole (30 mg/kg, p.o.) did not result in signs of blockage of gastroprotection provided by EETg (Figure 7).

The results suggest that EETg action is partially blocked in the presence of antagonist of prostaglandins and nitric oxide pathways. It is well known that prostaglandins (PGE) play an important role in stimulating the generation of gastric mucosa (Szlachcic et al., 2013). For example, PGE₂ stimulates mucus and bicarbonate barrier secretion in the epithelium of gastric tissue; in addition, they assist in regulating mucosal blood flow and induce angiogenesis in gastric tissue (RUIZ-HURTADO et al., 2021). In turn, nitric oxide (NO) has a protective function against gastric erosion and ulcers and does this by improving microcirculation, which happens with the increased blood flow. Besides, NO modulates the healing process of gastric ulcers (DEJBAN et al., 2020).

According to Sudi et al., (2021), gallic acid exhibits protective effects against gastric ulcer models through stimuli of gastric nitric oxide and prostaglandin. Studies by Almeida et

al., (2017) have pointed out the presence of gallic acid, through HPLC-DAD analysis of EETg samples, in a concentration of 2.59 mg/g. This fact may help to explain the profile of action observed in the present research with EETg.

Figure 7 - Mechanism of action of EETg in gastric mucosal injury induced by absolute ethanol in mice. Results are presented as means \pm S.E.M. of 6 animals/group. Similar superscript letters on the column do not differ significantly. Statistical analysis was done using analysis of variance and two way ANOVA test with Student - Newman - Keul test where appropriate. Differences of $p < 0.05$ were considered significant.



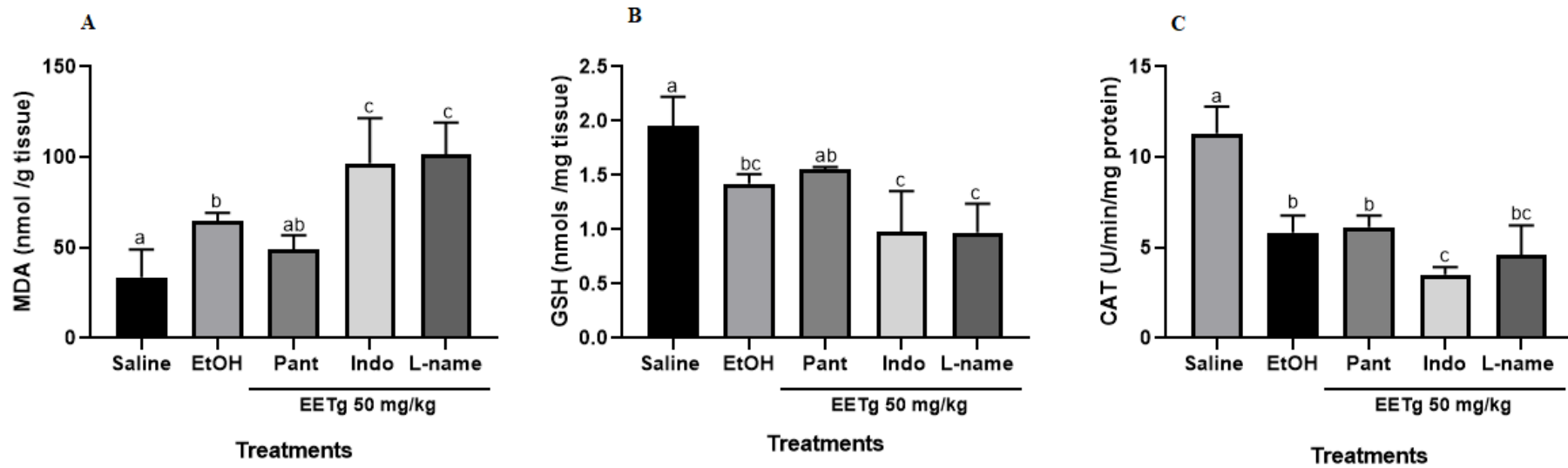
The MDA levels in the pantoprazole and saline pre-treated groups were significantly inferior when compared to those in the positive control group (ethanol only) (Figure 8A). On the other hand, EETg was not capable of keeping baseline levels of MDA in the presence of indomethacin (10 mg/kg, sc) and L-NAME (10 mg/kg, ip), which act as antagonists of prostaglandins and nitric oxide, respectively.

The decrease in GSH levels is used as a marker of oxidative stress (Silva et al., 2020). There was a significant decrease in the stomach levels of GSH in all groups when compared to those of negative control (saline group) (Figure 8B). Even though a reduction in the injured area and in lipid peroxidation levels was observed, no statistically relevant signs of reestablishment of GSH levels by EETg were identified. Thus, It is possible to suppose that the concentration of EETg was not sufficient enough to spare the consumption of GSH. Another

possibility is that the mechanisms of action of EETg, against oxidative stress, are not strongly related to those performed by GSH.

It was also found that the results observed for catalase activity are similar to those described for GSH levels, where the EETg did not show the ability to restore the basal levels. Thus, only the saline group showed a significant difference in relation to the positive control treated only with ethanol (Figure 8C). Catalase (CAT) acts on the breakdown of hydrogen peroxide, so it is considered an antioxidant enzyme which transforms hydrogen peroxide into water and oxygen, offering an effective antioxidant defense to prevent damage to the stomach (ALKREATHY et al., 2020).

Figure 8 - Effect of Pantoprazole, Indomethacin and L-NAME pretreatments on gastric mucosal injury; A: MDA levels; B: GSH levels and C: catalase activity (CAT) in the ethanol-induced gastric ulcer model in mice. Results are presented as means \pm S.E.M. of 6 animals / group. $p < 0.05$ vs. vehicle-treated control. Similar superscript letters on the column do not differ significantly (ANOVA and Student - Newman - Keuls test).

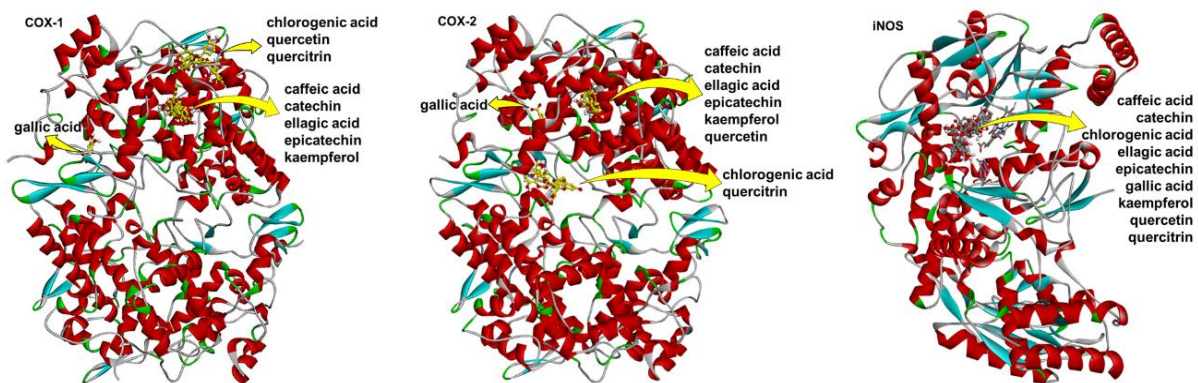


5.3.6 Molecular docking

Cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) are enzymes that are involved in the inflammation process and they are targets of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) including celecoxib, which selectively inhibits COX-2, thus being able to block inflammation, pain and fever, while reducing side effects (gastric erosions and ulcers) associated with COX-1 inhibition (RIMON et al., 2010; DEB ET AL., 2017).

According to docking simulations, the phenolic compounds previously identified in the composition of the EETg (caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, ellagic acid, epicatechin, gallic acid, kaempferol, quercetin, and quercitrin) are able to interact with the cyclooxygenases (COX) enzymes (Figure 9). To COX-1, caffeic acid, catechin, ellagic acid, epicatechin, and kaempferol bind in the same site that the anti-inflammatory drug celecoxib, while for COX-2, also the quercetin interacts in the celecoxib binding site.

Figure 9 - Binding sites of phenolic compounds (caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, ellagic acid, epicatechin, gallic acid, kaempferol, quercetin, and quercitrin) to the COX-1, COX-2 and iNOS.



Cyclooxygenase1 (COX-1) is considered a constitutive enzyme expressed in several tissues, including the gastrointestinal tract and is also responsible for maintaining the proper functioning of internal organs. COX-2 stimulates PGE biosynthesis in inflammatory cells and the nervous system (REDZICKA et al., 2019). Clinical and animal studies suggest that selective COX-2 inhibitors are safe and beneficial for the treatment of patients with inflammatory bowel disease (Tanaka et al., 2009). Therefore, there is a strong emphasis on

developing drugs that selectively attack COX-2. The inhibition of COX-1 is responsible for adverse effects of NSAIDs, such as peptic ulcers and gastrointestinal bleeding.

Docking simulations suggested, according to the binding free energies and molecular interactions, that the phenolic compounds could interact better with the COX-2 than the COX-1 (Figures 10 and 11). In addition, epicatechin, kaempferol, and quercetin could play an important role in the COX-2 inhibition due to its interactions with Val335, Leu338, and Val509 residues (similarly with the celecoxib) (Figure 11). Nevertheless, the ΔG of the phenolic compounds are higher than that of celecoxib, suggesting weaker interactions and, consequently, less inhibitory activity to both cyclooxygenases.

Figure 10 - Binding interactions of caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, ellagic acid, epicatechin, gallic acid, kaempferol, quercetin, quercitrin, and celecoxib with the COX-1 enzyme. The binding free energy ($\Delta G = \text{kcal/mol}$) is shown in parentheses.

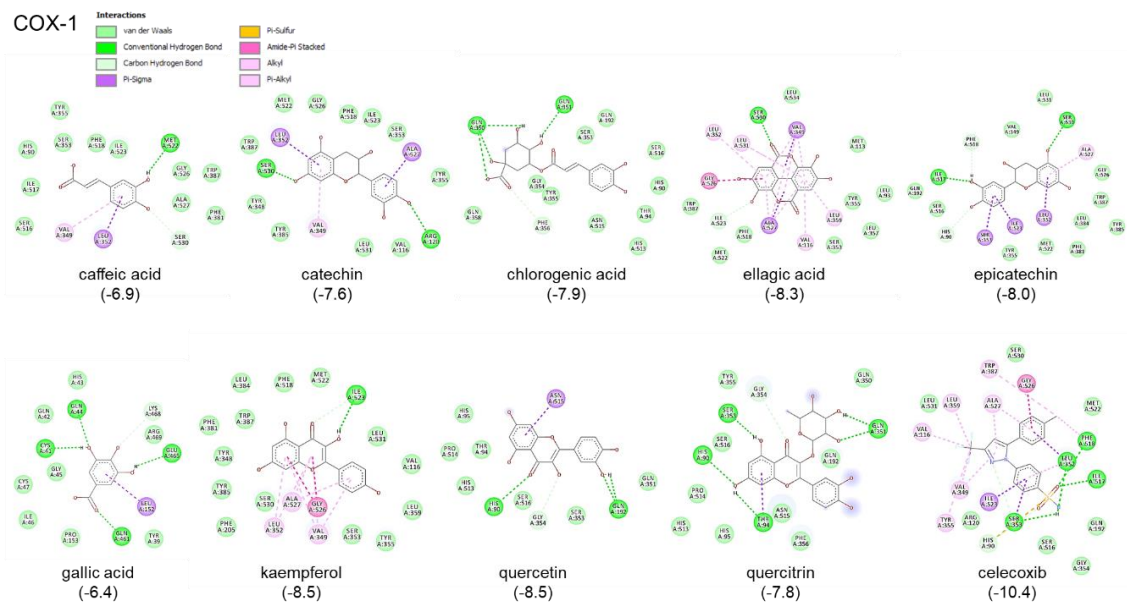
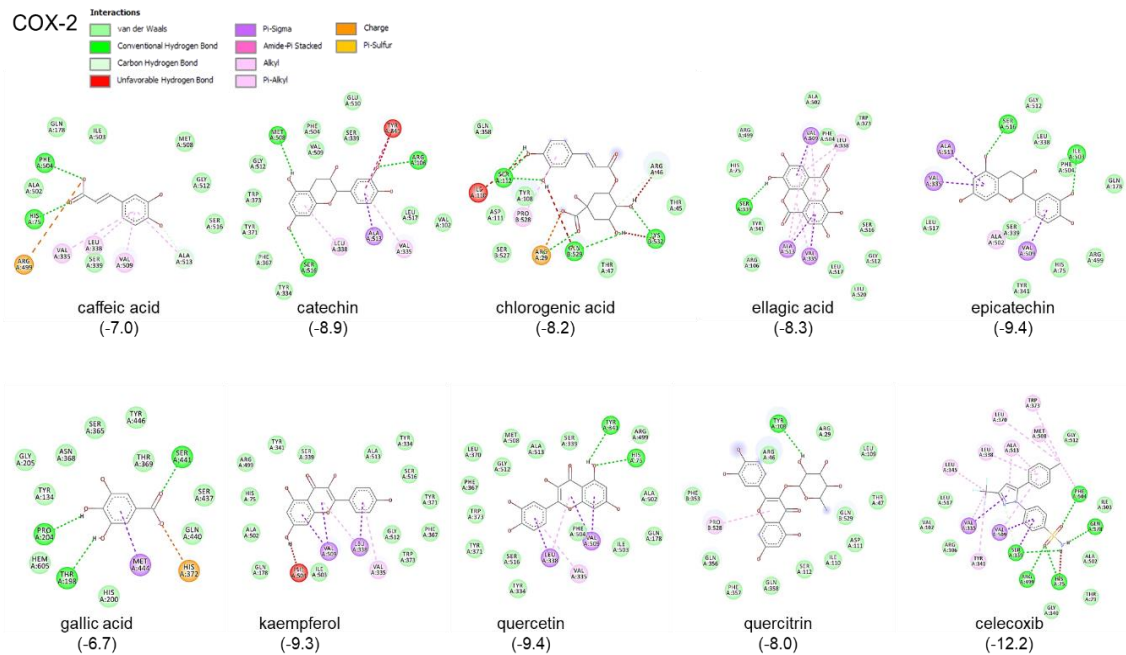


Figure 11 - Binding interactions of caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, ellagic acid, epicatechin, gallic acid, kaempferol, quercetin, quercitrin, and celecoxib with the COX-2 enzyme. The binding free energy ($\Delta G = \text{kcal/mol}$) is shown in parentheses.



COX-1 is normally expressed in the stomach, and it is involved in the production of PGs which act in mucosa protection. COX-2 is the inducible isoform involved in inflammation, responsible for the production of PGs involved in the healing of gastric ulcers (TAKEUCHI; AMAGASE, 2018). Considering the *in silico* simulation, the phenolic compounds present in EETg have a weaker interaction with the COX enzymes when compared with the NSAID celecoxib. However, it is important to point out that the extract contains all these compounds acting at the same time and it is possible that they can act synergistically, maximizing interactions with cyclooxygenases.

Quercetin, for example, blocks COX and LOX in various cell types such as rat peritoneal leukocyte, murine leukocytes and guinea pig epidermis. Besides, certain polyphenols show structural and functional similarities with specific anti-inflammatory drugs. A phenolic compound—oleocanthal—demonstrates a natural anti-inflammatory property and exhibits structural similarities to the ibuprofen (a well-known anti-inflammatory drug). Oleocanthal—like ibuprofen—inhibits COX-1 and COX-2 activities in a dose-dependent manner (YAHFOUFI et al., 2018).

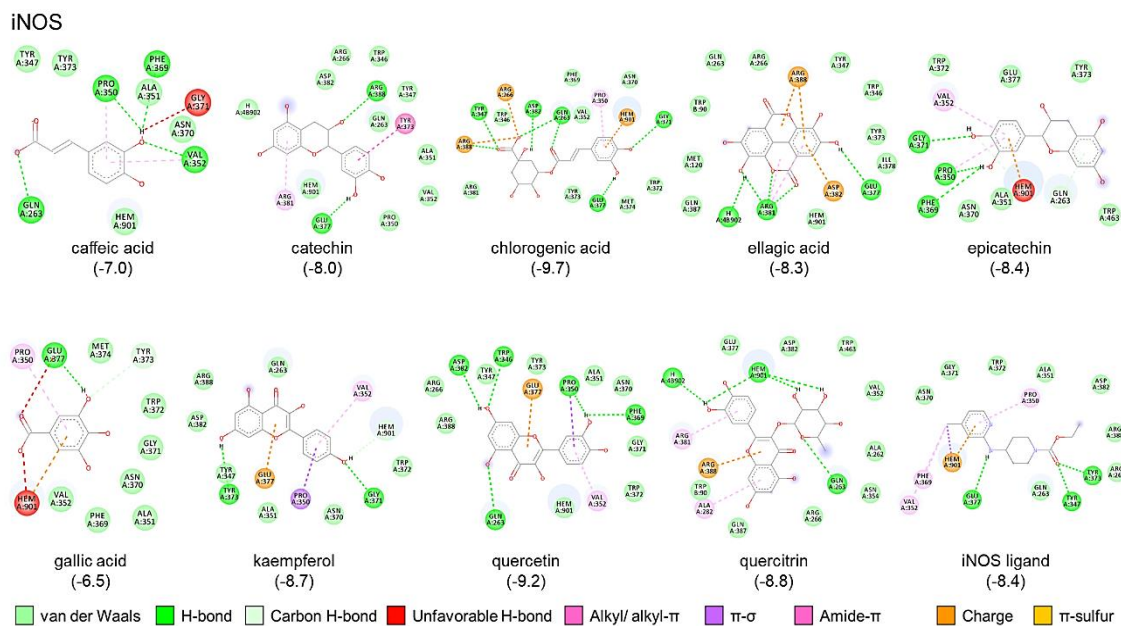
It has been described that samples of propolis and grape pomace show a lack of specificity towards the inhibition of COX-2 since they are able to inhibit both COX isoforms

to a similar extent. Even considering that the phenolic composition of the extracts is very complex, a similar behavior tendency as compared with that of pure phenols may be envisaged in terms of competitive inhibition (PAULINO et al., 2016).

The nitric oxide synthase enzymes produce nitric oxide (NO) from L-arginine, and also are involved in the inflammatory processes, among these enzymes, the inducible nitric oxide synthase (iNOS), expressed in response proinflammatory stimuli, has an important role in this process (MALDONADO-ROJAS AND OLIVERO-VERBEL, 2012).

The molecular docking simulations with iNOS demonstrated that the major phenolic compounds present in EETg are able to bind to its active site, in similar way as the inhibitor/ligand ethyl 4-[(4-methylpyridin-2-yl)amino]piperidine-1-carboxylate (Figure 12) (Garcin et al., 2008). In addition, the interactions with Pro350, Val352, and Glu377 residues and heme cofactor (hem901) are essential to stabilize the receptor-ligand complexes. Among the phenolic compounds here studied, chlorogenic acid appears to be a potential iNOS inhibitor due to its predicted binding energy, which was more favorable than that of the iNOS ligand. In fact, it has been already reported that iNOS could be a target for chlorogenic acid (OHNO et al., 2012).

Figure 12 - Binding interactions of caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, ellagic acid, epicatechin, gallic acid, kaempferol, quercetin, quercitrin, and iNOS ligand (from the x-ray) with the iNOS enzyme. The binding free energy ($\Delta G = \text{kcal/mol}$) is shown in parentheses.



Some works indicate that phenolic compounds such as the glycosylated phenol 4-[(2-O-acetyl- α -L-rhamnosyloxy)benzyl] isothiocyanate, rheosmin and curcumin, among others from different plant sources, act simultaneously on COX-2 and iNOS pathways, being suggested as a possible target of the anti-inflammatory action mechanisms of this class of compounds (Minhas et al., 2020). Furthermore, quercetin, a phenolic compound present in the EETg and the second in iNOS binding potential, is known to have anticancer properties and to inhibit the iNOS enzyme. Molecular analyses by Singh and Konwar (2012) showed that quercetin analogues anchored in the binding cavity may also have some type of anticancer property, as it is 95 % similar to quercetin retrieved from the NCBI PubChem Database.

This information supports the mechanism of action of EETg, which shows the involvement of prostaglandins and pointed involvement with inducible nitric oxide pathways. In addition to the results of *in vivo* gastroprotective action, the molecular interactions simulation via docking reinforced the anti-inflammatory potential previously indicated by Lopes-Neto et al. (2017) and points out the affinity of some of the major phenolic compounds present in this extract with enzymes linked to inflammatory processes such as cyclooxygenases and myeloperoxidase.

5.4 Conclusion

The ethanol extract of *T. gardneriana* seeds show promising amounts of phenolic compounds, exerting active free radical scavenging and lipid peroxidation inhibition. The antioxidant properties of EETg mediate the gastroprotective activity, whose mechanism of action appears to involve the nitric oxide and prostaglandin pathways, with some of EETg components showing potential interactions with cyclooxygenases and inducible nitric oxide synthase.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Authors' contribution

The contributions were as follows: Veríssimo Vieira Neto, Thiago S. Almeida and Ana F. U. Carvalho conceived and designed the experiments; Veríssimo Vieira Neto, José J. Lopes Neto, Luiz Carlos P. Almeida Filho, Pedro M. S. Tabosa, Joanna F. Rocha, Letícia de Castro Viana performed the *in vitro* and *in vivo* experiments; Pablo Andrei Nogara, Karise

Fernanda Nogara, João Batista Teixeira da Rocha performed *in silico* experiments; Veríssimo Vieira Neto, Thiago Silva de Almeida and Ana F.U. Carvalho analyzed the data and wrote the paper.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

Submission declaration and verification

The work described has not been previously published or submitted for publication elsewhere. The publication is approved by all authors.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi realizada a caracterização bioquímica, bem como determinada a atividade antioxidante do extrato etanólico elaborado a partir das sementes de *Triplaris gardneriana* (EETg). Embora não tenha um método universal para a determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais, esta foi avaliada por diferentes metodologias *in vitro*, os resultados encontrados foram coerentes com a literatura e passíveis de comparação com outros trabalhos da mesma espécie botânica.

Em seguida, avaliou-se a atividade gastroprotetora do EETg em camundongos Swiss, onde se obtiveram resultados satisfatórios, tendo em vista que o extrato conseguiu reverter as úlceras gástricas de forma evidente e dose-dependente. Na etapa de identificação de possíveis mecanismos de ação podemos perceber que as vias das prostaglandinas e do óxido nítrico estão intimamente ligadas ao efeito gastroprotetor proporcionado pelo EETg.

As informações desse trabalho indicam que o EETg é uma fonte potencial de fitofármacos com ação gastroprotetora. Por fim, o trabalho foi capaz de fornecer uma sólida base de informações para o delineamento de eventuais novas pesquisas acerca de outras atividades biológicas relacionadas às aqui investigadas.

REFERÊNCIAS

- ADEFISAYO, M. A.; AKOMOLAFE, R. O.; AKINSOMISOYE, S. O.; ALABI, Q. K.; OGUNDIPE, O. L.; OMOLE, J. G.; OLAMILOSOYE, K. P. Gastro-protective effect of methanol extract of *Vernonia amygdalina* (del.) leaf on aspirin-induced gastric ulcer in Wistar rats. **Toxicology reports**, v. 4, p. 625-633, 2017.
- ADNAN, MD., OH, K.K., AZAD, M.O.K., SHIN, M.H., WANG, M.-H., CHO, D.H., 2020. Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Leaves and Seed as a Potential Source of the Bioactive Compounds: Effects of Various Extraction Solvents on Biological Properties. **Life** **10**, 223. <https://doi.org/10.3390/life10100223>
- AHMAD, A. A.; KASIM, K. F.; MA'RADZI, A. H.; GOPINATH, S. C. Peptic ulcer: Current prospects of diagnostic and nanobiotechnological trends on pathogenicity. **Process Biochemistry**, v. 85, p. 51-59, 2019.
- ALKREATHY, H. M., ALGHAMDI, M. K., ESMAT, A. (2020). Tetramethylpyrazine ameliorates indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Impact on oxidative, inflammatory, and angiogenic machineries. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 28(8), 916-926. Doi: 10.1016/j.jsps.2020.06.012.
- ALMEIDA, T. S. **Identificação, Atividade Antioxidante e Análise Toxicogenômica de Compostos Fenólicos de Sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd.** 2016. 215 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ALMEIDA, T. S., NETO, J. J. L., SOUSA, N. M., PESSOA, I. P., VIEIRA, L. R., MEDEIROS, J. L., BOLIGON, A. A., HAMERS, A. R. M., FARIAS, D. F., CARVALHO, A. F. U. (2017). Phenolic compounds of *Triplaris gardneriana* can protect cells against oxidative stress and restore oxidative balance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 93, 1261-1268. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.050.
- ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D. G.; LIGHTFOOT, D. A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017.
- AZIZ, R. S.; SIDDIQUA, A., SHAHZAD, M., SHABBIR, A.; NASEEM, N. Oxyresveratrol ameliorates ethanol-induced gastric ulcer via downregulation of IL-6, TNF- α , NF- κ B, and COX-2 levels, and upregulation of TFF-2 levels. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 554-560, 2019.
- BALOGUN, M. E., BESONG, E. E., OBIMMA, J. N., DJOBISSIE, S. F., MBAMALU, O. S. (2018). Gastroprotective Effect of Ethanolic Extract of *Vigna Subterranea* in Ethanol-induced Gastric Mucosal Ulceration in Rats. **Indian J Physiol Pharmacol**, 62(3), 347-358.
- BARST, R. J.; GERSONY, W. M. The pharmacological treatment of patent ductus arteriosus. **Drugs**, v. 38, n. 2, p. 249-266, 1989.
- BEERS, R. F., SIZER, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol chem**, 195(1), 133-140.

BEHRMAN, S. W. (2005). Management of complicated peptic ulcer disease. *Archives of surgery*, 140(2), 201-208. Doi: 10.1001/archsurg.140.2.201

BENJAKUL, S., KITTIPHATTANABAWON, P., SUMPAVAPOL, P., MAQSOOD, S., 2014. Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. *J Food Sci Technol* 51, 3026–3037. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0846-1>

BENTO, E. B.; BRITO JÚNIOR, F. E.; OLIVEIRA, D. R.; FERNANDES, C.N.; DELMONDES, G. A.; CESÁRIO, F. R. A. S.; RODRIGUES, C. K. S.; SALES, V. S.; FIGUEREDO, F. R. S. D. N.; LEMOS, I. C. S.; MONTEIRO, A. B.; MENEZES, I. R. L.; COSTA, J. G. M.; KERNTO, M. R. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Annona muricata* Linnaeus in mice. *Saudi journal of biological sciences*, v. 25, n. 4, p. 609-621, 2018.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014.

BRUCKER, M. C., FAUCHER, M. A. (1997). Pharmacologic management of common gastrointestinal health problems in women. *Journal of Nurse-Midwifery*, 42(3), 145-162. Doi: 10.1016/S0091-2182(97)00031-1.

CHEN, P., SHEN, Y., SHI, H., MA, X., LIN, B., XIAO, T., WU, F., ZHU, J., LI, Z., XIAO, J., LI, X., ZHANG, H., GENG, F. (2016). Gastroprotective effects of Kangfuxin-against ethanol-induced gastric ulcer via attenuating oxidative stress and ER stress in mice. *Chemico-biological interactions*, 260, 75-83. Doi: 10.1016/j.cbi.2016.10.021

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

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. *Journal of Health Sciences*, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2015.

DAIBER, A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1797, p. 897–906, 2010.

DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA (2017) **Accelrys Discovery Studio Visualizer**.
DEB, P. K., MAILABARAM, R. P., AL-JAIDI, B., SAADH, M. (2017) Molecular Basis of Binding Interactions of NSAIDs and Computer-Aided Drug Design Approaches in the Pursuit of the Development of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Selective Inhibitors. In, Al-kaf,A.G.A. (ed), *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. IntechOpen*, pp. 101–121. Doi: 10.5772/intechopen.68318.

DEJBAN, P., ESLAMI, F., RAHIMI, N., TAKZARE, N., JAHANSOUZ, M., DEHPOUR, A. R. (2020). Involvement of nitric oxide pathway in the anti-inflammatory effect of modafinil

on indomethacin-, stress-, and ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. *European Journal of Pharmacology*, 887, 173579. Doi: [10.1016/j.ejphar.2020.173579](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173579).

FARIAS, D. F., SOUZA, T. M.; VIANA, M. P., SOARES, B. M., CUNHA, A. P., VASCONCELOS, I. M., RICARDO, N. M. P. S., FERREIRA, P. M. P., MELO, V. M. M., CARVALHO, A. F. U. (2013). Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. *BioMed Research International*, 2013. Doi:10.1155/2013/510736.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. *BioMed Research International*, p.1-9, 2013.

FERNANDES, C. N. **Avaliação dos efeitos antiulcerogênico e antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *duguetia furfuracea* (a. st.-hil.)**. 116 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato, 2012.

GARCIN, E. D., ARVAI, A. S., ROSENFELD, R. J., KROEGER, M. D., CRANE, B. R., ANDERSSON, G., ANDREWS, G., HAMLEY, P. J., MALLINDER, P. R., NICHOLLS, D. J., ST-GALLAY, S. A., TINKER, A. C., GENSMANTEL, N. P., METE, A., CHESHIRE, D. R., CONNOLLY, S., STUEHR, D. J., ÅBERG, A., WALLACE, A. V., TAINER, J. A., GETZOFF, E. D. (2008). Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase. *Nature chemical biology*, 4(11), 700-707. Doi: [10.1038/nchembio.115](https://doi.org/10.1038/nchembio.115).

GONZAGA, M.L., MENEZES, T.M.F., SOUZA, J.R.R., RICARDO, N.M.P.S., SOARES, S.A., 2013. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* 2, 152–156. Doi: [10.1016/j.bcdf.2013.10.005](https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.10.005).

GRIENDLING, K. K. TOUYZ, R. M.; ZWEIER, J. L.; DIKALOV, S.; CHILIAN, W.; CHEN, Y. R.; HARRISON, D. G.; BHATNAGAR, A. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, v. 119, n. 5, p. e39-e75, 2016.

HALLIWELL, B., The antioxidant paradox: less paradoxical now? *British journal of clinical pharmacology*, v. 75, n. 3, p. 637-644, 2013.

HALLIWELL; GUTTERIDGE. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4ed. Estados Unidos: Oxford University Press, 851 p. 2007.

HANWELL, M. D., CURTIS, D. E., LONIE, D. C., VANDERMEERSCH, T., ZUREK, E., HUTCHISON, G. R. (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.*, 4, 1–17. Doi: [10.1186/1758-2946-4-17](https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17).

HONMORE, Varsha S. et al. Isolates of *Alpinia officinarum* Hance as COX-2 inhibitors: Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and molecular docking studies. **International Immunopharmacology**, v. 33, p. 8-17, 2016.

HOXHA, Malvina. A systematic review on the role of eicosanoid pathways in rheumatoid arthritis. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 22-29, 2018.

HUSSAIN, T., TAN, B., YIN, Y., BLACHIER, F., TOSSOU, M. C., RAHU, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016. Doi: 10.1155/2016/7432797.

JESUS, N. Z. T., FALCÃO, H. S., LIMA, G. R. M., CALDAS FILHO, M. R. D., SALES, I. R. P., GOMES, I. F., SANTOS, S. G., TAVARES, J. F., BARBOSA-FILHO, J. M., BATISTA, L. M. (2013). *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. **Journal of ethnopharmacology**, 150(3), 982-988. Doi: 10.1016/j.jep.2013.10.010.

KANGWAN, N., PARK, J. M., KIM, E. H., HAHM, K. B. (2014). Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, 5(1), 40. Doi: 10.4291/wjgp.v5.i1.40.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and Pain-Na Update. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 1170-1173, 2011.

KNIGHTS, K. M.; MANGONI, A. A.; MINERS, J. O. Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 3, n. 6, p. 769-776, 2010.

LACERDA NETO, L. J., RAMOS, A. G. B., SALES, V. S., DE SOUZA, S. D. G., DOS SANTOS, A. T. L., DE OLIVEIRA, L. R., KERNTOPF, M. R. ALBUQUERQUE, T. R., COUTINHO, H. D. M., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., WANDERLEY, A. G., DE MENEZES, I. R. A. (2017). Gastroprotective and ulcer healing effects of hydroethanolic extract of leaves of *Caryocar coriaceum*: Mechanisms involved in the gastroprotective activity. **Chemico-biological interactions**, 261, 56-62. Doi: 10.1016/j.cbi.2016.11.020.

LEITE, G. D. O., DA PENHA, A. R., FERNANDES, C. N., SOUZA, H. H. F., DA COSTA, J. G. M., CAMPOS, A. R. (2009). Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. **Fitoterapia**, 80(1), 77-80. Doi: 10.1016/j.fitote.2008.10.008

LIU, Y.; LIANG, J.; WU, J.; CHEN, H.; ZHANG, Z.; YANG, H.; CHEN, L.; CHEN, H.; SU, Z.; LI, Y. Transformation of patchouli alcohol to β -patchoulene by gastric juice: β -patchoulene is more effective in preventing ethanol-induced gastric injury. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

LIU, Z. Q. Bridging free radical chemistry with drug discovery: A promising way for finding novel drugs efficiently. **European journal of medicinal chemistry**, v. 189, p. 112020, 2020.

LOPES NETO, J. J. **Bioacessibilidade e Biodisponibilidade de Compostos Fenólicos de Sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd (Polygonaceae)**. 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

LOPES NETO, J. J., ALMEIDA, T. S., LIMA, R. C. G., NUNES, R. G. S., SILVA, J. R. L.; ALMEIDA L. L., KAMDEM, J. P., CARVALHO, A. F. U. (2020). Metabolic aspects of phenolic compounds from *Triplaris gardneriana* seeds in the management of oxidative stress. ***Drug development and industrial pharmacy***, 46(6), 1026-1033. Doi: 10.1080/03639045.2020.1767126

LOPES NETO, J. J., DE ALMEIDA, T. S., ALMEIDA FILHO, L. C. P., ROCHA, T. M., NOGARA, P. A., NOGARA, K. F., ROCHA, J. B. T., LEAL, L. K. A. M., CARVALHO, A. F. U. (2020). *Triplaris gardneriana* seeds extract exhibits *in vitro* anti-inflammatory properties in human neutrophils after oxidative treatment. ***Journal of ethnopharmacology***, 250, 112474. Doi: 10.1016/j.jep.2019.112474.

LOPES NETO, J. J., DE ALMEIDA, T. S., DE MEDEIROS, J. L., VIEIRA, L. R., MOREIRA, T. B., MAIA, A. I. V., RIBEIRO, P. R. V., BRITO, E. S., FARIAS, D. F., CARVALHO, A. F. U. (2017). Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***, 88, 999-1007. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.109.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 791 p., 2002.

MACÊDO, S. K. S. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica in vitro de *Triplaris gardneriana* Wedd (POLYGONACEAE)**. 213 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2015.

MACÊDO, S. K. S.; LAVOR, A. L.; SILVA, N. D. S.; ALMEIDA, T. S.; PAULO, I. M. M.; BEZERRA, G. S.; MACEDO, F. K. S.; ANJOS, V. H. A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; ALMEIDA, R. G. S.; NUNES, X. P. GC-MS analysis of esterified fatty acids obtained from leaves and seeds of *Triplaris gardneriana* Wedd. ***African Journal of Pharmacy and Pharmacology***, v. 10, p. 623-630, 2016.

MACHADO, W. M.; PEREIRA, A. D.; MARCON, M. V. Efeito do processamento e armazenamento em compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças. ***Revista UEPG***, v. 19, n. 1, p. 17-30, 2013.

MAJOR, T. C.; BRANT, D. O.; REYNOLDS, M. M.; BARTLETT, R. H.; MEYERHOFF, M. E.; HANDA, H.; ANNICH, G. M. The attenuation of platelet and monocyte activation in a rabbit model of extracorporeal circulation by a nitric oxide releasing polymer. ***Biomaterials***, v. 31, n. 10, p. 2736-2745, 2010.

MALDONADO-ROJAS, W., OLIVERO-VERBEL, J. (2012). Food-related compounds that modulate expression of inducible nitric oxide synthase may act as its inhibitors. ***Molecules***, 17(7), 8118-8135. Doi: 10.3390/molecules17078118.

MAO, X. Y.; CHENG, X.; WANG, X.; WU, S. J. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 484-490, 2011.

MARQUES, F. D.; SOARES, C. D. V.; LAGES, G. P.; CAMPOS, L. M. M. Método por titulação ácido-base para o controle analítico da matéria-prima pantoprazol sódico sesquiidratado. **Rev. Bras. Farm**, v. 89, n. 1, p. 35-38, 2008.

MENDONÇA, N. M.; SILVEIRA, C.; OLIVEIRA, J. M.; SARTOR, C.F.P.; FELIPE, D.F.; AMARAL, V.; CORTEZ, L. E. R. Avaliação da atividade antiulcerogênica da Baccharis trimera (LESS) DC. em Ratos. **Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 1, p. 21-26, 2013.

MINHAS, R., BANSAL, Y., BANSAL, G., (2020). Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. **Medicinal Research Reviews**, 40, 823–855. Doi:10.1002/med.21636

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.

MORAES, P. A., BRUM, E. S., BRUSCO, I., MARANGONI, M. A., LOBO, M. M., CAMARGO, A. F., NOGARA, P. A., BONACORSO, H. G., MARTINS, M. A. P., ROCHA, J. B. T., OLIVEIRA, S. M., ZANATA, N. (2020) Pyrazole-Enaminones as Promising Prototypes for the Development of Analgesic Drugs. **ChemistrySelect**, 5, 14620–14625. Doi: 10.1002/slct.202004049.

MUSCARÁ, M.N.; WALLACE, J.L. Nitric oxide V: therapeutic potencial of nitric oxide donors and inhibitors. **Am J Physiol**, v.276, p. 1314 – 1316, 1999.
NELSON, D. L.; COX, M.M. Lehninger: **Princípios de bioquímica**. 7 ed. São Paulo: Artmed, 2019.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, 95(2), 351-358. Doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.

OHNO, N., YOSHIGAI, E., OKUYAMA, T., YAMAMOTO, Y., OKUMURA, T., SATO, K., IKEYA Y., NISHIZAWA, M. (2012). Chlorogenic acid from the Japanese herbal medicine Kinginka (Flos Lonicerae japonicae) suppresses the expression of inducible nitric oxide synthase in rat hepatocytes. **HOAJ Biol**, 1(2). Doi: 10.7243/2050-0874-1-2.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2019.

OZSUREKCI, Y.; AYKAC, K., Oxidative Stress Related Diseases in Newborns, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-9, 2016.
PARK, J. G. Invited Mini Review: The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. **Biochemistry and Molecular Biology Reports**, v. 44, n. 8, p. 497- 505, 2011.

- PAULINO, M., ALVAREDA, E., IRIBARNE, F., MIRANDA, P., ESPINOSA, V., AGUILERA, S., & PARDO, H. (2016). Toward the understanding of the molecular basis for the inhibition of COX-1 and COX-2 by phenolic compounds present in Uruguayan propolis and grape pomace. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34(12), 2643-2657. Doi: 10.1080/07391102.2015.1124808.
- PESSOA, I.P., LOPES NETO, J.J., ALMEIDA, T.S., FARIAS, D.F., VIEIRA, L.R., MEDEIROS, J.L., BOLIGON, A.A., PEIJNENBURG, A., CASTELAR, I., CARVALHO, A.F.U., 2016. Polyphenol composition, antioxidant activity and cytotoxicity of seeds from two underexploited wild *Licania* species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. *Molecules* 21, 1–16. Doi: 10.3390/molecules21121755.
- PFEIFFER, S.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F.; MAYER, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *British journal of pharmacology*, v. 118, n. 6, p. 1433-1440, 1996.
- PINTO, P. C., FÉLIX, T., RODRIGUES, L. M. Acerca do impacto da administração transdérmica de um inibidor da NO-sintetase (L-NAME)—uma abordagem preliminar. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, n. 2, 2010.
- RAFFIN, R. P.; COLOMÉ, L. M.; GUTERRES, S. S. Validation of analytical methodology by hplc for quantification and stability evaluation of sodium pantoprazole. *Quim. Nova*, v.30, n.4, 1001-1005, 2007.
- RAFFIN, R. P.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Preparation, characterization, and in vivo anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 63, n. 2, p. 198-204, 2006.
- RAMÍREZ-DUARTE, W. F. JIN, J.; KUROBE, T.; TEH, S. J. Effects of prolonged exposure to low pH on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Science of the Total Environment*, v. 568, p. 26-32, 2016.
- REDZICKA, A., SZCZUKOWSKI, Ł., KOCHÉL, A., WIATRAC, B., GĘBCZAK, K., CZYŻNIKOWSKA, Ż. (2019). COX-1/COX-2 inhibition activities and molecular docking study of newly designed and synthesized pyrrolo [3, 4-c] pyrrole Mannich bases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(17), 3918-3928. Doi: 10.1016/j.bmc.2019.07.033.
- REYNOLDS, J. E. F. Martindale the extra pharmacopeia. (Ed.) Londres, **Pharmaceutical Press**, 30. ed., 1993.
- RICCIOTTI, R.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 31, p.986-1000, 2011.
- RIMON, G., SIDHU, R. S., LAUVER, D. A., LEE, J. Y., SHARMA, N. P., YUAN, C., FRIELER, R. A., TRIEVEL, R. C., LUCCHESI, B. R., SMITH, W. L. (2010) Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 28-33. Doi: 10.1073/pnas.0909765106

ROBERTS I. I. L. J.; MORROW, J. D. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, p. 687–731, 2001.

ROLEIRA, F. M. F.; SILVA, E. J. T.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.

RUIZ-HURTADO, P. A., GARDUÑO-SICILIANO, L., DOMINGUEZ-VERANO, P., MARTINEZ-GALERO, E., CANALES-MARTINEZ, M. M., RODRIGUEZ-MONROY, M. A. (2021). Evaluation of the gastroprotective effects of Chihuahua propolis on indomethacin-induced gastric ulcers in mouse. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 137, 111345. Doi: 10.1016/j.biopha.2021.111345.

SANTOS, L. O.; REIS, M. R.; OGAVA, E. L.; LEÃO, V. K.; MACHADO, L. L.; POSSEDENTE, S. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Presentes na Amburana cearensis. **Orbital-The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 44-49, 2016.

SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, 25, 192-205. SHEN, Y., SUN, J., NIU, C., YU, D., CHEN, Z., CONG, W., GENG, F. (2017). Mechanistic evaluation of gastroprotective effects of Kangfuxin on ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Chemico-biological interactions**, 273, 115-124. Doi: 10.1016/j.cbi.2017.06.007.

SILVA, D. T., RODRIGUES, R. F., MACHADO, N. M., MAURER, L. H., FERREIRA, L. F., SOMACAL, S., VEIGA, M. L., ROCHA, M. I. U. M., VIZZOTTO, M., RODRIGUES, E., BARCIA, M. T., EMANUELLI, T. (2020). Natural deep eutectic solvent (NADES)-based blueberry extracts protect against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Food Research International**, 138, 109718. Doi: 10.1016/j.foodres.2020.109718.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.

SINGH, S. P., & KONWAR, B. K. (2012). Molecular docking studies of quercetin and its analogues against human inducible nitric oxide synthase. **SpringerPlus**, 1(1), 1-10. Doi: 10.1186/2193-1801-1-69#Sec5.

SOFI, S.H., NURADDIN, S.M., AMIN, Z.A., AL-BUSTANY, H.A., NADIR, M.Q. (2020). Gastroprotective activity of Hypericum perforatum extract in ethanol-induced gastric mucosal injury in Wistar rats: A possible involvement of H⁺/K⁺ ATPase α inhibition. **Heliyon** 6(10), e05249. Doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05249

SOUSA, G. A.; OLIVEIRA, I. S.; FREITAS, F. V. S.; VIANA, A. F. S. C.; NETO, B. P. S.; CUNHA, F. V. M.; GONÇALVES, R. L. G.; LIMA FILHO, A. C. M.; AMARAL, M. P. M.; OLIVEIRA, R. C. M.; FERNANDES, P. D.; MACIEL, J. K. S.; SILVA, T. M. S.; SOUSA, M. F. V.; OLIVEIRA, F. A. Gastroprotective effect of ethanol extracts of cladodes and roots of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl (Cactaceae) on experimental ulcer models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 218, p. 100-108, 2018.

SOUSA, J. B. G. **Atividade antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade do óleo essencial do gênero *Lippia* spp.** 2018. 41 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2018.

SOUSA, W. M. **Efeito antioxidante de uma fração polissacarídica sulfatada isolada da alga vermelha *Solieria filiformis*.** 86 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

STEWART, J.J.P. (2007) Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.*, 13, 1173–1213. Doi: 10.1007/s00894-007-0233-4.

STEWART, J.J.P. (2016) **MOPAC.**

SUDI, I. Y., AHMED, M. U., ADZU, B. (2021). Sphaeranthus senegalensis DC: Evaluation of chemical constituents, oral safety, gastroprotective activity, and mechanism of action of its hydroethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113597. Doi: 10.1016/j.jep.2020.113597.

SZLACHCIC, A., SLIWOWSKI, Z., KRZYSIEK-MACZKA, G., MAJKA, J., SURMIAK, M., PAJDO, R., DROZDOWICZ, D., KONTUREK, S. J., BRZOSOWSKI, T. (2013). New satiety hormone nesfatin-1 protects gastric mucosa against stress-induced injury: mechanistic roles of prostaglandins, nitric oxide, sensory nerves and vanilloid receptors. *Peptides*, 49, 9–20. Doi: 10.1016/j.peptides.2013.07.017.

TAKEUCHI, K., & AMAGASE, K. (2018). Roles of cyclooxygenase, prostaglandin E2 and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. *Current pharmaceutical design*, 24(18), 2002–2011. Doi: 10.2174/1381612824666180629111227.

TANAKA, K. I., SUEMASU, S., ISHIHARA, T., TASAKA, Y., ARAI, Y., MIZUSHIMA, T. (2009). Inhibition of both COX-1 and COX-2 and resulting decrease in the level of prostaglandins E2 is responsible for non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-dependent exacerbation of colitis. *European journal of pharmacology*, 603(1-3), 120–132. Doi: 10.1016/j.ejphar.2008.11.058.

TURNER, J. R. **O Trato Gastrointestinal.** In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran: Bases patológicas das doenças. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, v. 13, n. 2, p. 71–82, 2013.

WANG, J.L. LIMBURG, D., GRANETO, M. J., SPRINGER, J., HAMPER, J. R. B., LIAO, S., PAWLITZ, J. L., KURUMBAIL, R. G., MAZIASZ, T., TALLEY, J. J., KIEFER, J. R., CARTER, J. (2010) The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 7159–7163. Doi: 10.1016/j.bmcl.2010.07.054.

WANG, X.; XING, W.; TANG, G.; HONG, N.; HU, W.; ZHAN, J.; HU, Y. Synthesis of a novel sulfur-bearing secondary antioxidant with a high molecular weight and its comparative study on antioxidant behavior in polypropylene with two commercial sulfur-bearing

secondary antioxidants having relatively low molecular weight. **Polymer degradation and stability**, v. 98, n. 11, p. 2391-2398, 2013.

YAHFOUFI, N., ALSADI, N., JAMBI, M., & MATAR, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1618. Doi: 10.3390/nu10111618

YOO, J. H., LEE, J. S., LEE, Y. S., KU, S., LEE, H. J. (2018). Protective effect of bovine milk against HCl and ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Journal of dairy science*, 101(5), 3758-3770. Doi: 10.3168/jds.2017-13872.

ZHU, H.; KA, B.; MURAD, F. Nitric oxide accelerates the recovery from burn wounds. **World journal of surgery**, v. 31, n. 4, p. 624-631, 2007.

ZWOLAN, A., PIETRZAK, D., ADAMCZAK, L., CHMIEL, M., KALISZ, S.,

WIRKOWSKA-WOJDYŁA, M., FLOROWSKI, T., OSZMIAŃSKI, J. (2020). Effects of *Nigella sativa* L. seed extracts on lipid oxidation and color of chicken meatballs during refrigerated storage. *LWT*, 130, 109718. Doi: 10.1016/j.lwt.2020.109718.