

Título: Bases fármaco – toxicológicas que sustentan el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico a partir de la especie *Rhizophora mangle* L, en el tratamiento de las úlceras gastroduodenales.

Autores: Luz María Sánchez Perera¹luzmaria@censa.edu.cu, Dulce María Soler¹, Gema Fleitas¹, Yasmín Batista¹, Carlos Bulnes¹, Reina Durán¹, Ivis Fraga¹, Rafael Lorenzo¹, Deisy Mayet González¹, Deyanira Carnesoltas²

Colaboradores: Eva Marrero¹, Octavio Fernández¹, Pastor Alfonso¹, Rafael Ramírez¹, María Antonia Remigio (CIDEM), Caridad García (CIDEM), Betty Mancebo¹, Roberto Faure¹, María del Carmen Travieso¹, Raimundo Lazo¹, Miriam Camargo¹.

1. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Apdo. 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
2. Instituto de Oncología (INOR)

Introducción

En Cuba la obtención de fitomedicamentos tiene carácter multidisciplinario y multisectorial desde que fue organizado el Programa Nacional de Investigaciones de Plantas Medicinales que comenzó en 1991 y que ha tenido continuidad en el Programa Ramal de Medicina Tradicional y Natural (MTN) del MINSAP a partir de 1997 donde la meta del programa es probar la eficacia de los medicamentos herbarios e introducirlos en el sistema de salud.

La corteza de *Rhizophora mangle*, especie que presenta una alta distribución y disponibilidad en todo el archipiélago cubano, presenta un alto contenido de taninos (>15%) y se ha empleado tradicionalmente en los procesos de curtir pieles, además posee propiedades etnofarmacológicas expresadas como astringente, hemostático, febrífugo, antifúngico, antidiarreico, tratamiento de hemoptisis, mordedura o picadura de animales marinos venenosos, contra las anginas de pecho, tuberculosis pulmonar, lepra, hemorragias, disentería, elefantiasis (INIREB. 1977). Este conocimiento etnomédico y algunas propiedades descritas para compuestos polifenólicos procedentes de otras especies botánicas, hicieron pensar que el extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* L presente propiedades sobre las úlceras gastroduodenales, considerando la importancia y actualidad de esta enfermedad con una alta incidencia en Cuba y en el mundo propiciada por hábitos

alimentarios, consumo de cigarrillos y alcohol, consumo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos y la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori*.

El objetivo del presente trabajo fue establecer las bases farmacológicas, químicas, químico - farmacéuticas y toxicológicas del extracto acuoso de las cortezas de *Rhizophora mangle* L. para sustentar la potencialidad de su uso en el desarrollo de productos farmacéuticos de indicación para la medicina humana.

Diseño metodológico:

1. Evaluación de efectividad farmacológica del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle*.

1.1 Modelos de úlceras experimentales.

Se emplearon ratas, SD, albinos machos, de 200-220 g masa corporal, clínicamente sanos, suministrados por CENPALAB, sometidos a condiciones ambientales y de manejo convencionales.

Los animales fueron privados del alimento 24 horas antes del experimento, con libre acceso al agua, colocando a cada jaula un material aislante de la cama, para evitar el consumo de heces fecales.

Dosis y modo de administración: En los diferentes modelos empleados se empleó dosis de *Rhizophora mangle* L. (liofilizado en suspensión) en los rangos de 50- 500 mg/Kg m.c por vía oral.

Efecto antiulceroso (citoprotector) del extracto de *R mangle* en ratas

Se empleó el modelo de ulceración provocado por la acción de ácido clorhídrico/Etanol (Sánchez y col, 2001)

Úlceras gástricas inducidas por indometacina.

En este modelo se emplea la indometacina como agente ulcerogénico según lo descrito por Sánchez y col. 2004

Ligadura del píloro en ratas.

El estómago “in situ” con ligadura del pylori es un modelo que permite estudiar el efecto de drogas sobre la secreción ácida gástrica y sobre los eventos involucrados en la gastroprotección. El modelo se describe por Sánchez y col. 2004.

Úlceras inducidas por stress e hipotermia.

Una hora posterior de recibir los tratamientos, los animales se inmovilizaron y mantuvieron a una temperatura de 4°C durante 2 horas, posterior de lo cual se sacrificaron por dislocación cervical, realizando la extracción de los estómagos por la curvatura menor y la medición de las lesiones se realizó según la escala de valores empleada en el método de indometacina.

Efecto protector y antioxidante de *R. mangle* frente a úlceras inducidas por NSAID (diclofenaco).

Se evaluó el efecto del extracto de mangle en un modelo de úlcera gástrica producida por diclofenaco en ratas comparando con omeprazol como control positivo y se predijo el mecanismo de acción. Con esta finalidad se estudió el rol del extracto sobre el stress oxidativo por la medición de los cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) y superóxido dismutasa (SOD). Además se ensayó la inhibición de la peroxidación lipídica *in vitro* en membranas de hígado de ratas. Se evaluó los niveles de PGE2 y la actividad de mieloperoxidasa (MPO) como un marcador de la infiltración neutrofílica. (Berenguer y col., 2006)

Úlceras duodenal inducidas por cisteamina.

En este modelo los animales no se privan del alimento durante el tiempo de experimentación. Las úlceras duodenales fueron inducidas por dos administraciones de cisteamina hidrocloreto, 400 mg/Kg *i.g.*, en solución acuosa a intervalos de 4 h. (Sánchez y col. 2004)

Úlceras crónicas inducidas por la acción tópica de ácido acético.

En este modelo los animales no se privan del alimento durante el tiempo de experimentación. Los animales se anestesian con éter, realizándose una incisión en el abdomen y sobre la superficie serosa del estómago se pone en contacto con ácido acético (100%, 70 μ l) durante 60 segundos, la solución se retira y se lava con agua destilada, el abdomen se sutura y los animales se mantienen en condiciones convencionales. Los tratamientos se administran por vía oral 24 horas posteriores a la cirugía, durante 5 días. 16 horas después de la última administración, los animales se sacrifican con éter. Se remueven los estómagos y se miden las lesiones (Sánchez y col. 2004)

Análisis estadístico.

Las diferencias entre los grupos se comparó por t-Student, considerándose significativo si $P < 0.05$. En el modelo de úlceras crónicas se empleó Wilcoxon para datos no paramétricos.

2. Efecto sobre la presión arterial del extracto liofilizado de *R. mangle*:

Se determinó la acción de *R. mangle* sobre la presión arterial en ratas, Wistar de 200-220 g de masa corporal. Se administró dosis de mangle de 25, 50 y 100 mg Kg/m.c. vía intraarterial, recogiendo la señal con la ayuda de un manómetro electrónico Stand MP-250 acoplado a un polígrafo multipropósito Nihon Kohden.

3. Actividad sobre el tracto intestinal.

Para la determinación del tránsito intestinal de Productos Naturales y en particular de un extracto liofilizado de *Rhizophora mangle L.*, se trabajaron grupos de 5 ratones, de peso 25 ± 2 g, machos, clínicamente sanos. Los animales se mantuvieron en ayunas durante 6 horas, después de lo cual se administró por vía oral los tratamientos. 30 minutos posteriores se administró carbón activado (10%, 0.1 mL/10 g) vía oral a todos los animales. Transcurridos 35 minutos se sacrificaron los animales por anestesia etérea profunda y se removieron los estómagos y el intestino delgado, se cortó desde el cardias hasta la válvula ileoceal). Se midió el píloro hasta el sitio más alejado del carbón (100% largo total del intestino delgado). La distancia recorrida por el carbón se midió desde el píloro a la última porción del intestino que contiene por lo menos 1 cm continuo de carbón. Si hay varias manchas de carbón en la zona más alejada se toma la mayor.

4. Determinación de la actividad colinérgica y anticolinérgica de *R. mangle* en yeyuno aislado.

Se utilizan ratas de ambos sexos con un peso comprendido entre 150 y 250g. Se les somete a un ayuno 24 horas antes del comienzo del experimento.

Se sacrifica el animal, por tracción violenta de la cabeza. Posteriormente se le abre el abdomen siguiendo la línea media para que queden expuestas las asas intestinales. Se realiza un corte transversal para la extracción de una porción del yeyuno íleo, de aproximadamente 20- 30 cm de longitud, teniendo cuidado de no dañar las fibras musculares, se pone en un baño que contiene solución tiorde a 37° C dejándolo unos minutos para que se relaje por completo, lo que facilita el posterior lavado de la luz

intestinal, esto se realiza con solución tiorde a 37° C y con un mínimo de presión hidrostática para no dañar el órgano. Se introduce una pipeta por uno de los extremos. Después se cortan segmentos de 2 a 3 cm de longitud, despojándolos con cuidado de su envoltura mesentérica mediante unas tijeras finas. Se intercalan adiciones de la sustancia patrón (Ej. Oxitocina 5 ó 10 UI/mL y la muestra que se quiere conocer cual es su actividad uterotónica.

Para aumentar la sensibilidad del útero que se trabaja se pudiera suministrar Acetilcolina o Serotonina si fuera necesario.

5. Evaluación toxicológica

Evaluación de la toxicidad aguda y sub- aguda en ratas del extracto de *R. mangle*.

En esta evaluación se procedió según lo descrito por Sánchez y col. , 2008.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.

Las dosis ensayadas del extracto acuoso fueron 500, 1000 y 2000 mg/Kg de masa corporal. El modelo empleado es el convencional (CIDEM).

Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide.

Las dosis ensayadas del extracto acuoso fueron 500, 1000 y 2000 mg/Kg de masa corporal. El modelo empleado es el convencional (INOR).

6. Estabilidad del producto intermedio:

Se estudió la estabilidad del extracto seco envasado en bolsas de polietileno por spray – drier durante 1 año, resultando estable, tanto en parámetros químicos como microbiológicos.

7. Absorción del extracto total y de las tabletas:

Se realizaron estudios de absorción in situ e in vivo, en varios modelos experimentales en ratas

8. Estandarización y validación del método de CLAR para la determinación del marcador catequina en las tabletas.

Se realizó la validación del método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la determinación cuantitativa de catequina como sustancia marcador en las tabletas obtenidas a partir del extracto seco de las cortezas de *Rhizophora mangle* L (Sánchez y col. 2010)

9. Caracterización químico – física del extracto y de las fracciones de polifenoles.

Se procedió a un exhaustivo estudio de caracterización químico física de los grupos químicos funcionales presentes en el extracto activo, con la aplicación de técnicas convencionales y actuales en el campo de la química estructural.

10. Formulación de tabletas por el método de compresión directa.

Se realizó el estudio de preformulación y formulación de tabletas con la definición de los parámetros tecnológicos de las mismas.

11. Estabilidad de las tabletas antiulcerogénicas:

Se evaluaron parámetros químicos, tecnológicos y biológicos durante 12 meses.

Resultados y Discusión

Evaluación de efectividad farmacológica del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* en modelos de úlceras experimentales.

Los resultados obtenidos en la ulcerogénesis producida por la acción de Etanol/HCL se muestran en las Tablas 1 y 2 en las que se aprecia que el tratamiento con el extracto de mangle ofrece una protección estadísticamente significativa frente a la acción necrozante del agente ulcerogénico en todas las dosis estudiadas; siendo este efecto dosis dependiente con un porcentaje de inhibición del 94.56% en las dosis de 500 mg/Kg m.c. La acción citoprotectora del mangle en la dosis de 125 mg/Kg m.c. es similar a la cimetidina en la dosis de 250 mg/Kg m.c, por lo que el extracto de mangle ejerce un efecto citoprotector, además del efecto antisecretor reportado por Cuevas y col. (1976).

Las diferencias encontradas entre las respuestas del mangle rojo y la cimetidina se deben en lo fundamental, a que el mecanismo de acción de la cimetidina en el tratamiento de úlceras gastroduodenales, aunque ejerce algún efecto citoprotector descrito por algunos autores (Hung y Lee, 1991; Lozeva y col., 1994), actúa principalmente sobre los receptores H₂ histamínicos (Bishayee y Chatterjee, 1994) y pose efectos antisecretorios (Hung y Lee, 1991).

La cantidad de mucus y su calidad expresada a través de la síntesis y naturaleza de sus componentes: proteínas totales (sumatoria de proteínas sulfatadas, glicoproteínas y

hexosaminas) esta estrechamente vinculada con efectos citoprotectores en la mucosa gástrica, constituyendo una barrera contra agentes agresivos (Clamp y Ene, 1989).

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos al evaluar la cantidad y calidad de mucus gástrico en la ulcerogénesis experimental en ratas provocadas por la acción necrosante de la mezcla Etanol/HCL; como puede apreciarse en los animales controles tratados con esta mezcla se produce un incremento del contenido de mucus y de proteínas respecto a un grupo control sin úlceras ($p < 0.05$), respuesta del organismo al daño provocado, este resultado coincide con Bishayee y Chatterjee (1994); Al-Harbi y col. (1997) en la ulcerogénesis provocada por la acción del Etanol al 80% y difiere de lo encontrado en lesiones inducidas por estrés donde existe una gran destrucción del mucus gástrico (Alarcón de la Lastra y col., 1994); el extracto liofilizado de mangle provoca un incremento en el contenido de mucus y de proteínas totales de manera dosis dependiente con diferencias significativas respecto al control no tratado con un contenido de mucus de 0.5084 ± 0.0524 y 1.4101 ± 0.445 de proteínas en la dosis superior de 500 mg/Kg m.c., influyendo sobre los indicadores bioquímicos de la mucosa gástrica, en lo que se considera al mucus gástrico de gran importancia en la prevención del daño del epitelio así como facilita su reparación (Al-Harbi y col., 1997).

La cimetidina en la dosis ensayada (250 mg/Kg m.c.) no posee efecto sobre el contenido y la calidad del mucus existiendo una tendencia a su disminución, este resultado confirma lo anterior en cuanto a la acción antiulcerosa de la cimetidina por un efecto antisecretor y no como citoprotector en el modelo de ulcerogénesis evaluado.

Los resultados obtenidos en el montaje del resto de los modelos biológicos de úlceras agudas y crónicas se suman en las tablas 3-6. Mediante los modelos evaluados se describe la capacidad del mangle rojo de inhibir significativamente la formación de lesiones gástricas y duodenales en ratas en los diversos modelos empleados.

El índice de lesiones en el modelo experimental de úlceras gástricas agudas inducido por la indometacina se consideró la severidad de las lesiones desde pérdida de los pliegues de la mucosa gástrica hasta formación de úlceras perforadas. El tratamiento con mangle rojo liofilizado disminuye significativamente la intensidad del daño de la mucosa inducido por la acción de esta droga. En la dosis de 250 mg/ Kg m.c. existe diferencia significativa ($P < 0.01$) respecto al grupo control negativo (Tabla 3).

Este efecto es dosis- dependiente. El mangle rojo mostró un índice de la lesión de 1.6 ± 1.95 en la dosis de 500 mg/Kg m.c. en la misma proporción que la ranitidina (100

mg/Kg); considerando que la dosis empleada de ranitidina es superior que la empleada por otros autores (Sanago et al., 1996). El mangle rojo disminuye significativamente el daño de la mucosa inducido por la indometacina, esto confirma su actividad antiulcerogénica. Este resultado pone en evidencia que el *R. mangle* actúa sobre la estimulación de la síntesis de prostaglandina mediante la inhibición de la lipooxigenasa (Rafatullaf et al., 1995) lo que puede estar vinculado a los grupos funcionales presentes en este extracto.

La ligadura del píloro durante 4 horas resultó en la acumulación del volumen de secreción gástrica y un incremento en la valoración acídica. El extracto liofilizado de mangle produce una disminución significativa del volumen gástrico en las dosis de 250 y 500 mg/ Kg m.c comparación con el control negativo, aunque la ranitidina produce una disminución menor (Tabla 4).

El mangle una disminución significativa dosis- dependiente en la acidez total en comparación con el control negativo e igual que la ranitidina en la dosis superior. A diferencia, el mangle no causa una alteración significativa en el pH.

La actividad péptica aumenta significativamente en el grupo tratado con mangle en la dosis de 500 mg/ Kg; el tratamiento con ranitidina como control positivo no posee efecto en la actividad péptica en este modelo de úlcera. El contenido de mucus disminuye considerablemente en el grupo tratado con mangle.

La acidez total expresada en mmol/L/4 h no siempre corresponde con el pH debido a la secreción de proteínas que pueden tamponear una parte de la acidez (CYTED, 1990).

El mangle rojo no modifica el pH de la secreción en los modelos agudos, pero reduce el volumen de la secreción gástrica, probablemente debido a que este parámetro es más sensible que el pH. Se conoce que la digestión de proteínas comienza en el estómago, donde las pepsinas convierten a las proteínas en proteasas, peptonas, y polipéptidos. Sin embargo, esta importante enzima requiere un medio de digestión ácido. La pepsina es más activa en un pH de 1.6 a 3.2 pero se inactiva completamente a pH 5. La actividad enzimática digestiva de la pepsina disminuye como el pH aumenta (Bacchi and Sertié, 1994). La ausencia de cambios en el pH gástrico observado con el mangle rojo puede ser importante y no interfiere con el proceso de digestión y absorción de la proteína de la dieta.

Los animales sometidos a frío y stress resultaron en la producción de daños en la mucosa principalmente en el segmento glandular de los estómagos. La mayor parte de las lesiones fueron erosiones gástricas (Rafatullah et al., 1990). El Pretratamiento con

mangle administrado oralmente no fue efectivo en comparación con los grupos negativos y positivos (datos no presentados).

El tratamiento con cisteamina produce úlceras duodenales en el 90 % de todas las ratas. La úlcera fue alargada, extendida longitudinalmente a través del duodeno pudiéndose medir fácilmente (Rafatullah et al., 1990).

El tratamiento con mangle reduce el índice de la lesión (índice de la úlcera), de manera dosis- dependiente con algún grado de significativa estadística ($P < 0.05$)

En la dosis superior (500 mg/Kg) en comparación al control y similar a la ranitidina usada como droga de acción conocida (Tabla 5). Las úlceras duodenales inducidas por cisteamina se consideran que se deban a la hipersecreción de ácido gástrico (Rafatullah et al., 1995).

Los diferentes métodos empleados se basan en la producción de úlceras gástricas y duodenales agudas en ratas, sin embargo, en la enfermedad péptica humana, las úlceras gástricas se sitúan frecuentemente en la curvatura menor y persiste por grandes períodos de tiempo, De ahí, la importancia de usar un modelo para la producción de úlceras gástricas en ratas que simulen la úlcera humana en localización, cronicidad y severidad a favor de estudiar los procesos de cicatrización y tamizar los agentes terapéuticos (Okabe et al., 1971). La aplicación tópica de ácido acético sobre la pared gástrica produce úlceras de tamaño y profundidad reproducibles. En la tabla 6 se muestra el efecto antiulcerogénico del mangle rojo (dosis- dependiente), en el que 500 mg/ Kg m.c. del liofilizado produce una disminución significativa del índice de la lesión ($P < 0.05$) en comparación con el control negativo y la droga empleada como control positivo.

Estos hallazgos obtenidos en este modelo de úlceras crónicas revela las propiedades cicatrizantes de este liofilizado sobre la pared gástrica debido posiblemente al contenido de taninos condensados e hidrolizables como principios mayoritarios (Sánchez et al., 1998).

Efectos de diclofenaco, *R. mangle* y omeprazol sobre la mucosa gástrica, apariencia macro y microscópica.

Como se muestra en la figura 1, el diclofenaco causa importantes daños en la mucosa glandular ($15.42 \pm 2.74 \text{ mm}^2$). En contraste, el pretratamiento con *R. mangle* 62.5 y 125 mg/Kg disminuyó el área ulcerada a 3.21 ± 1.05 y $5.63 \pm 0.63 \text{ mm}^2$ respectivamente ($P < 0.01$), lo que fue comparable al efecto protector del omeprazol.

La evaluación histológica reveló que el diclofenaco provocó una profunda alteración del epitelio glandular y una pérdida de la estructura histológica casi hasta la submucosa. La

lesión se caracterizó por abundante tejido de granulación, reacción inflamatoria intensa e infiltración local de leucocitos. El pretratamiento con el extracto previno la profundidad de la ulceración y la necrosis inducida por el NSAID (Fig. 2).

Efecto del diclofenaco, *R. mangle* y omeprazol sobre la actividad de MPO

A la dosis ensayada, el diclofenaco no afecta la actividad de MPO en una forma significativa *ex vivo* ni *in vitro* (Fig. 3 and Tabla 7), solo a la mayor dosis de *R. mangle* (125 mg/Kg) indujo un incremento de esta actividad enzimática ($P < 0.05$ vs. sham).

Efecto del diclofenaco, *R. mangle* sobre el contenido de PG mucosal.

El contenido basal de PGE₂ en la mucosa gástrica fue de 613.84 pg/mg de proteína y el diclofenaco disminuye marcadamente este nivel (87.99 pg/mg, $p < 0.001$ vs. Sham). El pretratamiento con el extracto de *R. mangle* a ambos niveles aumenta el contenido de PG ($p < 0.05$), aunque no eleva los niveles de sham. (Fig. 4).

Efecto de diclofenaco, *R. mangle* y omeprazol sobre el metabolismo de glutatión y actividad de SOD.

El diclofenaco causó una importante depleción de GSH-Px, la que fue revertida por el pretratamiento con *R. mangle* de manera dosis – dependencia. El valor fue 0.19 ± 0.03 para diclofenaco, mientras que el extracto elevó la actividad enzimática hasta 3.98 ± 0.50 nmol/min/mg proteína ($P < 0.001$ vs. diclofenaco), lo que fue similar al dato obtenido con omeprazol (Fig. 5).

SOD activity in gastric mucosa of rats that received diclofenac was 8.40 ± 0.86 unit/mg protein. Pretreatment with the extract at the highest dose (125 mg/Kg) significantly increased the values in the same range as omeprazole ($P < 0.01$ vs. diclofenac) (Fig. 6).

Efecto de *R. mangle* sobre la peroxidación lipídica.

El extracto seco de mangle rojo inhibe de manera concentración – dependencia, la peroxidación lipídica en membranas del hígado por FeAs, con un máximo efecto inhibitor de $74.5 \pm 5.2\%$ a la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ (Table 8).

Estos resultados pueden ser atribuidos a los compuestos polifenólicos encontrados en *R. mangle*, como se sugiere que los fenoles estimulan la formación de PGE₂ basado en su acción como co-sustratos para la reacción peroxidasa (Alanko et al., 1999).

La actividad de SOD disminuye con diclofenaco pero aumenta significativamente en los grupos tratados con *R. mangle* y omeprazol. Esta enzima, que posee sus propiedades antioxidantes debido a su elevada capacidad de secuestrar O₂^{·-} juega un importante rol en la protección de la mucosa gastroduodenal. Se ha demostrado que la administración

subcutánea de SOD y catalasa significativamente disminuyen el daño gástrico inducido por isquemia – reperusión (Yoshikawa et al., 1989) o tratamiento con indometacina (Yoshikawa et al., 1993; Naito et al., 1998). El efecto protector de algunas drogas, tal como los compuestos flavonoico, se han relacionado con su capacidad para modulara esta actividad enzimática frente a úlceras inducidas por etanol (La Casa et al., 2000).

La enzima GSH-Px juega un marcado rol en remover H_2O_2 y hidropéroxidos lipídicos en las células de la mucosa gástrica y su capacidad antioxidante es similar que SOD o vitamina E (Richard et al., 1997). La inhibición de GSH-Px resulta en la acumulación de H_2O_2 accumulation y subsiguiente oxidación lipídica y puede estar relacionada al daño gástrico inducido por indometacina (Yoshikawa et al., 1993; Naito et al., 1998).

El incremento en los niveles de SOD y GSH-Px observado en los grupos tratados con *R. mangle* claramente apuntan a mecanismos antioxidante en su acción gastroprotectora y por otro lado a la habilidad para prevenir la peroxidación lipídica *in vitro* refuerza su uso potencial como droga terapéutica para patologías de radicales libres. Los valores incrementados de SOD y GSH-Px en los animales tratados con omeprazol también apuntan a un mecanismo antioxidante de inhibidor de bomba de protones, lo que ha sido recientemente sustentado en estudios de úlceras inducidas por etanol en ratas (Natale et al., 2004).

Como se menciona con anterioridad, los principios activos mayoritarios del mangle rojo son polifenoles, y especial énfasis se le ha dado a la presencia de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácidos gálico y elágico, también como a galocatequinas, elagitaninos y taninos condensados (Sánchez et al., 1998). Estas sustancias caracterizadas por su naturaleza polifenólica, han mostrado propiedades citoprotectoras (González et al., 2000) y se han asociado con actividades antiulcerogénicas en otras plantas (Konig et al., 1994; Tebid et al 1996., Ramírez and Roa., 2003). Los taninos o polifenoles tienen un número de propiedades químicas en común, las que delimitan sus acciones fisiológicas y farmacológicas: sus actividades antioxidantes y secuestradoras de radicales libres y su habilidad de acomplejar con otras moléculas tales como proteínas y polisacáridos (Haslam, 1996). Los polifenoles vegetales se conocen que inhiben la peroxidación lipídica *in vitro* y hay evidencia acerca de su habilidad de secuestrar radicales tales como hidroxilo, superóxido y peróxido, los que son importante en estados prooxidantes de las células. Incidentalmente, se ha mostrado que el ácido clorogénico tiene un efecto antioxidante tan alto como DL-tocoferol (Fernandez et al., 2002).

Los taninos pueden prevenir el desarrollo de úlceras debido a sus efectos de

precipitación de proteínas y vasoconstrictor (Aguwa and Nwako, 1988). Su acción astringente puede ayudar a precipitar microproteínas de los sitios de la úlcera, formando una capa que impiden las secreciones gástricas del intestino y protegen la mucosa de toxinas u otros irritantes (Nwafor et al., 1996; Nwafor et al., 2000; Al-Rehaily et al., 2002). Esta propiedad de enlazar proteínas también explican el hecho que los polifenoles inhiben los ensayos de enzimas *in vitro*.

La acción tópica del extracto acuoso de *R. mangle* en la aceleración en la curación de heridas se han explicado por diversos mecanismos, tales como coaptación de la herida, formación de complejos con la proteínas de la pared celular, quelación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, estimulación a la contracción de la herida e incremento a la formación de nuevos capilares y fibroblastos (Fernandez et al., 2002).

En nuestro estudio, una fina coaptación del extracto de *R. mangle* se encontró microscópicamente adherente a la mucosa gástrica, lo que sugiere que en adicción a las propiedades antioxidantes, la formación de una barrera física con similar propiedades que las observadas en heridas tópicaspuden contribuir a la acción de la droga.

En resumen, los resultados presentes indican que el efecto gastroprotectivo de *R. mangle* en úlceras experimentales inducidas por diclofenaco pueden estar relacionados con sus propiedades antioxidantes, lo que incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes GSH-Px y SOD y por otro lado la peroxidación lipídica. Los mecanismos prostaglandinas – dependiente también están involucrados, mientras que no se observaron respuestas significativas en cambios inflamatorios. Por lo que se deriva que debido a ambos factores, antioxidante y gastroprotectivo, el extracto acuoso de las cortezas de *R. mangle* pueden ser útiles en la prevención de úlceras gástricas.

Efecto sobre la presión arterial del extracto liofilizado de *R. mangle*:

Se observó un ligero aumento de la presión en la dosis de 100 mg/ Kg de masa corporal. En las dosis inferiores no hay ningún efecto sobre la misma. Es importante señalar que la vía de administración en este modelo es una vía superior a la aplicada en el medicamento, por lo que asegura que por la vía oral no debe encontrarse ningún efecto adverso sobre la presión arterial.

Actividad sobre el tracto intestinal.

R. mangle tiene un efecto inhibitorio sobre el tránsito intestinal comparable estadísticamente con la neostigmina. Este efecto es una respuesta que se corresponde o explica el efecto antidiarréico que se le adjudica a dicha especie vegetal; aunque también

el efecto antidiarreico esté vinculado con otros mecanismos de acción como es la precipitación de proteínas y la astringencia. El efecto inhibitorio encontrado en el mangle es superior al de otras especies vegetales reportados por Schapoval y col., 1994.

Determinación de la actividad colinérgica y anticolinérgica de *R. mangle* en yeyuno aislado.

Se observó el efecto de la atropina en la inhibición de la motilidad intestinal en una curva dosis efecto, dependiente la respuesta de la dosis de atropina empleada. La acetil colina estimula dicha motilidad en aplicación acumulativa.

La solución acuosa de mangle rojo aplicada al baño en la dosis de 1 mg/ml estimula la motilidad intestinal (aumenta la amplitud, el tono y disminuye ligeramente la frecuencia), aunque la amplitud obtenida es inferior a la acetil colina empelada como control positivo, pero a diferencia del mangle rojo, la acetilcolina necesita dosis acumulativa para ejercer su efecto.

Por lo que podemos considerar que el mangle rojo tiene un ligero efecto de ligera estimulación sobre la motilidad intestinal.

Toxicidad aguda:

De manera general, tras la administración de una dosis única del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L., en una dosis límite de 2000 mg/Kg de masa corporal, no se observaron signos clínicos. No se evidenció cambios macroscópicos que evidenciaran signos de toxicidad, sin embargo se procedió al muestreo de los órganos fundamentales: hígado, riñones y corazón para su estudio microscópicos. De manera general no se evidenciaron cambios microscópicos en estos órganos.

Al comparar el peso corporal de los animales en los días 1, 7 y 14 se verifica un comportamiento en el incremento del peso normal y no existir diferencias entre controles y tratados.

Al analizar el peso relativo de los órganos hígado, corazón y riñones no se evidenció diferencias significativas entre los grupos controles y tratados, tanto considerando tratamiento como sexo. Por lo que queda demostrado que el extracto acuoso de *R. mangle* L. no muestra signos tóxicos en un nivel de dosis límite de 2000 mg/Kg de masa corporal.

Toxicidad sub- aguda:

En el ensayo de toxicidad sub- aguda del extracto acuoso liofilizado de *R. mangle*, en un estudio de 14 días con administración de dosis repetida en un nivel de dosis de 500

mg/Kg de masa corporal, máxima dosis terapéutica (14 administraciones), se observaron los siguientes resultados:

No se evidenció de manera general signos clínicos relevantes en el desarrollo del experimento. En cuanto a ganancia de peso a los 7 días se mostró una ganancia de peso buena en ambos sexos en el grupo tratado, en el caso de las hembras resultó superior que en el grupo control. Sin embargo, no posee relevancia desde el punto de vista estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control.

No existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a los pesos relativos de hígado, corazón y riñones, ni por tratamiento ni considerando tratamiento por sexo, respecto al grupo control. En el estudio anatomopatológico no se evidenció efectos macroscópicos ni microscópicos atribuibles al tratamiento.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.

En este ensayo no se evidenció ni índice de toxicidad ni de genotoxicidad en los tres niveles de dosis empleados, por lo que el extracto no resulta genotóxico.

Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide.

En este modelo se encontró efectos citotóxicos en ningún nivel de dosis empleada ni efectos genotóxicos, solo en el caso de la dosis de 2000 mg/Kg se observó una ligera genotoxicidad a los 4 días, no así a los 34 días que son los regulados por este experimento, con espermatozoides en forma de bananas.

Estabilidad del producto intermedio:

El extracto acuoso seco, como producto intermedio se conserva en buenas condiciones en bolsas de polietileno durante 1 año, resultando estable, tanto en parámetros químicos como microbiológicos.

Absorción del extracto total y de las tabletas:

El extracto y las tabletas obtenidas poseen una elevada absorción, por encima del 94%. Se determinó la constante de absorción aparente de este extracto, dando como resultado el valor de 2. Esto garantiza una buena biodisponibilidad del medicamento.

Estandarización y validación del método de CLAR para la determinación del marcador catequina en las tabletas.

Considerando que el método se clasifica como método para la determinación cuantitativa del compuesto mayoritario o ingrediente activo en formulaciones o materia prima, se evaluaron los parámetros: especificidad, linealidad, exactitud, sensibilidad y precisión expresada en sus 2 formas: repetibilidad y precisión intermedia. Los resultados obtenidos demostraron que el método empleado es confiable, pues permitió la determinación del

compuesto en presencia de otras sustancias, incluyendo excipientes y sustancias auxiliares y detectan la presencia de productos de degradación. Además, el procesamiento estadístico de los resultados evidenció la linealidad, precisión, sensibilidad y exactitud del método.

Caracterización químico – física del extracto y de las fracciones de polifenoles.

El estudio de caracterización química de la corteza mostró la presencia de grupos fenólicos libres, proteínas, triterpenos/esteroides, alcaloides en cantidades trazas y como constituyente mayoritario los taninos (54.78%); donde se identificaron ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico, catequina y epicatequina. Además se identificaron ácidos grasos desde C10:0 - C24:0, carbohidratos; fitoesteroles y componentes volátiles o semivolátiles.

Mediante la aplicación de métodos convencionales y actuales de aislamiento, caracterización e identificación de estructuras químicas, se purificaron e identificaron un amplio número de compuestos químicos, no descritos para esta especie hasta el momento, constituyendo el primer reporte nacional e internacional, en las dos fracciones fundamentales obtenidas del fraccionamiento preliminar del extracto total: fracción acetato de etilo y fracción n-butanólica. Tanto las fracciones de partida como compuestos puros y semipuros fueron evaluados desde el punto de vista de actividad farmacológica, corroborándose acciones novedosas en estos constituyentes.

Formulación de tabletas por el método de compresión directa.

Se obtuvieron tabletas de buena presencia y que cumplen con las características tecnológicas para este tipo de forma farmacéutica, como friabilidad, dureza, tiempo de desintegración, peso.

Estabilidad de las tabletas antiulcerogénicas:

Las tabletas resultaron estables por 12 meses en estudio desde el punto de vista de parámetros químicos, tecnológicos y biológicos.

Conclusiones

El extracto acuoso seco de las cortezas de *Rhizophora mangle* L. poseen una actividad promisorio para el tratamiento de las úlceras gastroduodenales con los mecanismos de acción, gastroprotector, antisecretor, inhibe la disminución de la síntesis de prostaglandinas, antioxidante y antibacteriana. Por lo que es un producto activo en la fabricación de tabletas y se muestra que existe una adecuada relación entre los efectos beneficiosos y la seguridad en la administración del medicamento al no poseer efectos

tóxicos. Se comprobó una amplitud de compuestos químicos en el extracto los que están asociados a sus efectos farmacológicos. Las tabletas antiulcerogénicas estables presentan una buena biodisponibilidad manifiesta en su elevada absorción intestinal. No se muestran efectos adversos sobre otros sistemas biológicos en los estudios realizados. Por lo que se concluye el estudio preclínico lo que posibilita el paso al Ensayo Clínico en humanos y posterior registro del nuevo medicamento.

Bibliografía

Aguwa, C.N., Nwako, S.O., 1988. Preliminary studies of the root extracts of *Nauclea latifolia* Smith, for anti-ulcer properties. Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences 4(1), 16-23.

Alanko, J., Riutta, A., Holm, P., Mucha, I., Vapatalo, H., Metsa-Ketela, T., 1999. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. Free Radical Biology and Medicine; 26(Suppl 1-2), 193-201.

Alanko, J., Riutta, A., Holm, P., Mucha, I., Vapatalo, H., Metsa-Ketela, T., 1999. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. Free Radical Biology and Medicine; 26(Suppl 1-2), 193-201.

Al-Rehaily, A.J., Al-Howiriny, T.A., Al-Sohaibani, M.O., Rafatullah, S., 2002. Gastroprotective effects of 'Amla' *Embllica officinalis* on *in vivo* test models in rats. Phytomedicine 9, 515-522.

Berenguer B, Sánchez LM, Quilez A, Lopez-Barreiro M, de Haro O, Galvez J and Martin MJ. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. **J Ethnopharmacol. 2006 Jan 16; 103(2):194-200.**

Bishayee, A. and Chatterjee, M. (1994). Protective effects of *Mikania cordata* root Extract against physical and Chemical factors- induced gastric erosions in experimental animals. *Planta Medica* 60: 110- 113.

Carnesoltas D., Y. Izquierdo, A.I. Frías, A. Domínguez, J.E. González, M.A. Ríos, LM Sánchez. Genotoxic evaluation of aqueous extract bark of *Rhizophora mangle* L by abnormal shape of spermatozoa test. **Veterinary and Human Toxicology (Enviada),**

Cuevas, Marina; Quintero, M. y Álvarez, Alicia.(1976). Influencia del mangle rojo en la ulcerogénesis experimental en ratas. Segunda jornada de las brigadas técnicas juveniles. Instituto de gastroenterología.

CYTED (1990). Subprograma X Química Fina Farmaceutica. RIVAPLAMED. Curso iberoamericano de validacao de Plantas Mediciniais utilizadas nos distúrbios grastointestinais.

De Armas, Elizabeth; Sarracent, Yamina; Marrero, Eva; Fernández, Octavio and Branford-White, Christopher. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract (R. mangle) in the treatment of sptous ulcers : a pilot study. **Current medical resaerch and opinion 2006 vol 21 no 11.**

Fernandez, O.; Capdevila, J. Z.; Dalla, G. and Melchor, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. **Fitoterapia 2002 Vol.73, No.7/8, pp.564-568.**

Gonzáles, E., Iglesias, I., Carretero, E., Villar, A., 2000. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 329-333.

Hung, C.R. and Lee, C.H. (1991). Protective effect of cimetidina on tannic acid – induced gastric damage in rats. . *Pharm. Pharmacol.* 43: 559- 563.

Konig, M., Scholz, E., Hartmann, R., Lehmann, W., Rimpler, H., 1994. Ellagitannins and complex tannins from *Quercus petraea* bark. *Journal of Natural Products* 57(10), 1411-1415.

La Casa, C., Villegas, I., Alarcón de la Lastra, C., Motilva, V., Martín, MJ., 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavonoid, against ethanol-induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 153-157.

Lozeva, V.; Marazova, K. and Belchea , A. (1994). 4. Histamine and the gastrointestinal tract. Gastric histamine content and ulcer formation in rats with ethanol- induced injury. Effects odf cinnarizine and flunarizine. *Agents Actions* 41, Special Conference Issue: C91- C92.

Luz María Sánchez Perera, Betty Mancebo Dorvigny, Roberto Faure García, María del Carmen Travieso4. Validación de la técnica para la determinación de catequina en tabletas de *Rhizophora mangle* L. por CLAR. **Revista Cubana de Farmacia, 2010, imprenta.**

Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., Kondo, M., 1998. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric injury. *Digestive Diseases and Sciences* 43(9), 30S-34S.

- Natale, G., Lazzeri, G., Lubrano, V., Colucci, R., Vassalle, C., Fornai, M., Blandizzi, C., Del Tacca, M., 2004. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(1), 62-72.
- Nwafor, P.A., Effraim, K.D., Jacks, T.W., 1996. Gastroprotective effects of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark on indomethacin-induced ulceration in rats. *West African Journal of Pharmacology and Drug Research* 12, 46-50.
- Nwafor, P.A., Okwuasaba, F.K., Binda, L.G., 2000. Antidiarrhoeal and antiulcerogenic effects of methanolic extract of *Asparagus pubescens* root in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 421-427.
- Okabe, S.; Roth, J.L.A.; Pfeffer, C.J. (1971). A method for Experimental, Penetrating Gastric and Duodenal Ulcers in Rats. Observation on Normal Healing. *Digestive Diseases*, 16, 3, 277- 285.
- Pino, J. A.; Marbot, R.; Agüero, J.; Sanchez, L. M. Volatile components of red mangrove bark (*Rhizophora mangle* L.) from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, 2001, Vol.13, No.2, pp.88- 89.
- Rafatullah, A.M.; Al-Yahya, M.A. y Al-Said, M.S. (1995). Gastric and duodenal antiulcer an cytoprotective effects of *Aframomum melegueta* in rats. *International Journal of Pharmacognosy*, 33,4, 311-316.
- Rafatullah, S.; Tariq, M.; Al- Yahya, M.A.; Mossa, J.S. and Ageel, A.M. (1990). Evaluation of Tumeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 29, 25- 34.
- Ramírez, R.O., Roa, C.C., 2003. The gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini* Skeels) bark on HCl/etanol induced gastric mucosal injury in Sprague-Dawley rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 29(3-4), 253-261.
- Sanago, R.; Pasquale, R.; Germanó; M.P.; Iauk, L.; De Tommasi, N. (1996). *Vernonia kotschyana* Sch. Bip.: Tolerability and gastroprotective activity. *Phytoterapy Research*, 10, S169- S 171.
- Sánchez J, Melchor G, Martínez G, Escobar A, Faure R. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark **Fitoterapia**. 2006 Feb;77(2):141-3.
- Sánchez Janet, Gleiby Melchor, Gregorio Martínez, Luz María Sánchez, Roberto Faure & Ma. Pilar Vinardell. Protective effect of *Rhizophora mangle* bark on lipid peroxidation and erythrocyte hemolysis **Pharmacognosy Magazine**, 2005, Issue 3, 101-105.
- Phcog.Net** www.phcog.net.

- Sánchez Luz Ma. 1998, **Tesis a opción al grado Científico de DrC Veterinaria.** Caracterización química y biológica de un extracto acuoso de las cortezas de *Rhizophora mangle* L.
- Sánchez Luz Ma., A. Escobar y L. Valcárcel. Caracterización preliminar de la materia prima de *Rhizophora mangle* L. en la obtención de productos farmacéuticos procedentes de tres zonas geográficas de Cuba. **Rev. Salud Anim. Vol. 27 No. 2 (2005).**
- Sánchez Luz Ma., Lino Varcárcel; Arturo Escobar; Mario Noa. Polyphenol and phytosterols Composition in an antibacterial extract from *Rhizophora mangle* L's bark. **Journal of Herbal Pharmacotherapy , 2006 6(5).**
- Sánchez Luz Ma., Mabelin Armenteros, y L. Valcárcel. Actividad antimicrobiana de los principales grupos químicos presentes en *Rhizophora mangle* L. **Rev Salud Animal, 2000, vol 22, No 3, 174-179.**
- Sánchez Luz Ma., Niurka Yasmin Batista, A. Rodríguez, F. Farrada and C. Bulnes. Gastric and Duodenal Antiulcer Effects of *Rhizophora mangle* L. **Pharmaceutical Biology 2004, Vol. 42, No. 3, pp.**
- Sánchez Luz Ma., Ruedas Dayami, B.C. Gómez. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology, 77 (2001), 1 -3.**
- Sánchez Luz, M.; Melchor Gleiby, Alvarez Silvia y Bulnes C. Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. **Rev Salud Animal Vol 20 No 2 ,1998 69-72.**
- Sánchez Perera Luz María, Ivis Fraga Chávez, Betty Macebo Dorveny, Rafael Lorenzo Miranda⁴. Toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L. en ratas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales 13 (3), 2008.**
- Sánchez Perera Luz maría, Ivis Fraga Chávez, Betty Macebo Dorveny, Rafael Lorenzo Miranda. Toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L. en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales 13 (3), 2008.*
- Tebid, K., Besancon, P., Rovagnet, J.M., 1996. Effects of dietary grape seed tannins on rat cecal fermentation and colonic bacterial enzymes. *Nutrition Research 16(1), 105-110.*
- Travieso, M. del C.; Hechavarria, O. L.; Betancourt, A.; Frontela, M.; Miranda, I. Validación del método de determinación de taninos totales en productos naturales vegetales. **Revista de Protección Vegetal, 1998, Vol.13, No.3, pp.189-194.**
- Yoshikawa, T., Naito, Y., Kishi, A., Kaneko, T., Linuma, S., Ichikawa, H., Yasuda, M., Takahashi, S., Kondo, M., 1993. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in

rats. Gut 34, 732-737.