



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

SANDRELLI MERIDIANA DE FÁTIMA RAMOS DOS SANTOS MEDEIROS

**ESTUDO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIULCEROGÊNICA DO
ÁCIDO GÁLICO E SEU POSSÍVEL SINERGISMO COM O ÁCIDO ÚSNICO**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

SANDRELLI MERIDIANA DE FÁTIMA RAMOS DOS SANTOS MEDEIROS

ESTUDO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIULCEROGÊNICA DO
ÁCIDO GÁLICO E SEU POSSÍVEL SINERGISMO COM O ÁCIDO ÚSNICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Área de Concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente

Orientadora: Prof.^a Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2018

Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Fernanda Bernardo Ferreira, CRB4-2165

- M488e Medeiros, Sandrelli Meridiana de Fátima Ramos dos Santos.
Estudo da atividade gastroprotetora e antiulcerogênica do ácido gálico e seu possível sinergismo com o ácido úsnico / Sandrelli Meridiana de Fátima Ramos dos Santos Medeiros. - Vitória de Santo Antão, 2019.
76 folhas; il.: color.
- Orientadora: Noemia Pereira da Silva Santos.
Coorientador: Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2019.
Inclui referências.
1. Úlcera Gástrica. 2. Ácido Gálico. 3. Ácido Úsnico 4. Sinergismo. I. Santos, Noemia Pereira da Silva (Orientadora). II. Aguiar Júnior, Francisco Carlos Amanajás de (Coorientador). III. Título.

616.334 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE- 024/2019

SANDRELLI MERIDIANA DE FÁTIMA RAMOS DOS SANTOS MEDEIROS

**ESTUDO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIULCEROGÊNICA DO ÁCIDO
GÁLICO E SEU POSSÍVEL SINERGISMO COM O ÁCIDO ÚSNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Saúde Humana e Meio
Ambiente da Universidade Federal de
Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovada em: 11/06/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Erilane de Castro Lima Machado
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Cristina de Oliveira Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico essa dissertação a minha família, em especial a minha avó Maria e minha mãe Sandra (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por sua presença em minha vida, pelo seu amor, por cuidar de cada milésimo de segundo dos meus dias, sem Ele eu nada seria. “Bendito seja o nome do Senhor!”

Aos meus avós Maria Ramos dos Santos e Severino Simplicio dos Santos pelas sementes de amor, princípios e valores que plantaram em minha vida.

A minha mãe Sandra Maria dos Santos, por superar grandes vendavais sendo mãe e pai, pelo seu amor, dedicação, honestidade, simplicidade, generosidade, por me ensinar tanto com suas virtudes.

A minha irmã Alessandra Medeiros por tudo que nós já passamos juntas.

Aos meus tios Nininha Barbosa e Bernado Barbosa pelos ensinamentos de amor, paciência e fraternidade.

Ao meu esposo André Pereira dos Santos pelo amor, companheirismo e compreensão, sendo fundamental na confecção desse trabalho.

As minhas amigas irmãs Laís Silva e Tamires Pontes por todos os sorrisos e dores, vitórias e derrotas compartilhados, desde a graduação, por se fazerem presentes em minha vida.

Aos colegas de mestrado Roselia Odete, Marcela Albuquerque, Monique Paixão, Leonildo Nogueira, Leandro Luiz, Samuel Lima, Carlos Campos, Allyson Lopes e Vanessa Karla pelas experiências compartilhadas e por tornar nossos encontros de aulas mais alegres.

A doutoranda Marllyn Marques por todo apoio, paciência e ensinamentos.

A minha orientadora Profa Dra. Noemia Pereira da Silva Santos pela oportunidade, confiança e orientações para realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior pela oportunidade, orientação, tranquilidade e por ter sido peça fundamental neste trabalho.

A minha amiga e orientadora de tantos projetos e trabalhos Prof.^a Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti por todas as orientações e apoio durante minha vida científica, sendo pra mim, um exemplo de profissional.

A Prof.^a Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira pelos ensinamentos acadêmicos e suas contribuições para realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório e amigos Silvio Assis, Sidcleia Bezerra e Edmária Kelly Silva por todo o apoio durante esse trabalho, sempre dispostos a ajudar.

Aos alunos de Iniciação científica Isla Lima, Gabriela Sena, Ricardo Pedro, Leandro Santos, Wesllen Mneclisis, Berilany Sena, Karina Pontes e Henrique Silva que estiveram comigo ao longo das diversas etapas da pesquisa, por suas contribuições que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos do Centro Acadêmico de Vitória pelo apoio sempre que necessário.

Ao veterinário Vinícius Vasconcelos e a técnica Juliete Lira pela paciência e apoio na manutenção dos animais de experimentação no Biotério.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio através do financiamento concedido como bolsa de pós-graduação durante a elaboração desse trabalho.

Por fim, quero ressaltar meu respeito aos animais que foram utilizados em experimentação, sem eles este trabalho não teria acontecido.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Os tratamentos utilizados para úlcera gástrica apresentam diversos efeitos colaterais além de não conseguir evitar a recorrência das lesões. Dessa maneira há uma necessidade de se investigar novos compostos bioativos que ofereçam uma terapêutica mais segura, eficaz e que ajudem a diminuir a quantidade de efeitos indesejáveis. O ácido gálico (AG), composto fenólico, é reconhecido por apresentar atividades terapêuticas benéficas, como atividade anti-inflamatória, antioxidante e gastroprotetora. O ácido úsnico (AU), um metabólito secundário de líquens, também apresenta relevante ação anti-inflamatória, antiproliferativa e gastroprotetora. A interação entre duas moléculas bioativas podem resultar em uma ação sinérgica, além de permitir o aparecimento de um novo efeito antes não conhecido. Assim, esse trabalho teve como objetivo estudar a propriedade gastroprotetora e antiúlcera do AG em modelo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol e avaliar o potencial efeito sinérgico com o AU. A citotoxicidade foi avaliada frente às linhagens de macrófagos (J774) e células embrionárias de rim (HEK-293). A atividade antiulcerogênica foi avaliada; o AG (50 e 100 mg/kg) e AU (25 e 50 mg/kg) foram administrados de forma isolada ou simultaneamente (AG:AU – 50:25 mg/kg). Foram analisados parâmetros bioquímicos de secreção gástrica (pH e concentração de H^+). A atividade gastroprotetora foi avaliada através da quantificação do muco aderido à mucosa gástrica. Através das análises dos resultados, foi possível observar que o AG possui baixa citotoxicidade com viabilidade maior que 100% frente às duas linhagens, enquanto o AU apresentou viabilidade baixa ($24,22 \pm 2,21\%$) frente a J774 na concentração ($240 \mu\text{g/mL}$). Em associação, (AG:AU) apresentaram alta viabilidade de ($95,96 \pm 12,96\%$) na concentração citada anteriormente. Os parâmetros bioquímicos demonstraram que o AG e/ou AU mantêm a medida do pH de forma basal sem diminuição significativa da acidez. Através da determinação do Índice de Lesão Ulcerativo e Histológico, foi comprovada a inibição da úlcera gástrica induzida, que sugere o alto poder de reparo tecidual dos dois compostos, o AG:AU conseguiu inibir em 98,14% e 99,41% após 3 e 7 dias de tratamento, respectivamente, enquanto o Lansoprazol, usado como fármaco de referência, inibiu cerca de 68% nos dois tempos de tratamento. O AG:AU mostrou aumento significativo na produção de muco ($557,33 \pm 54,44 \mu\text{g/g}$), com valor maior que a soma dos resultados dos grupos dos animais que receberam o AG ($136,5 \pm 17,32 \mu\text{g/g}$) e AU ($314 \pm 43,78 \mu\text{g/g}$) separadamente, mostrando que existe efeito sinérgico de ação desses dois compostos. Dessa forma, conclui-se que AG e AU apresentaram efeitos gastroprotetor, antiulcerogênico e sinérgico, quando associados.

Palavras-chave: Úlcera Gástrica. Ácido Gálico. Ácido Úsnico. Sinergismo. Gastroprotetor.

ABSTRACT

The conventional treatment of gastric ulcer has several side effects besides not being able to avoid the recurrence of the lesions. In this way there is a need to investigate new bioactive compounds that offer safer, more effective therapy and that help reduce the amount of undesirable effects. Gallic acid (GA), a phenolic compound, is recognized for its beneficial therapeutic activities, such as anti-inflammatory, antioxidant and gastroprotective activity. Usnic acid (UA), a secondary metabolite of lichens, also has a relevant anti-inflammatory, antiproliferative and gastroprotective action. The interaction between two active molecules can result in a synergetic action, in addition to allowing the appearance of a new effect previously unknown. Thus, this study aimed to study the gastroprotective and antiulcer properties of GA in an experimental model of gastric lesion induced by ethanol and to evaluate the potential synergetic effect with UA. Cytotoxicity was evaluated against macrophages (J774) and embryonic kidney cells (HEK-293). The antiulcerogenic activity was evaluated through the model of gastric injury induced by ethanol; GA (50 and 100 mg/kg) and UA (25 and 50 mg/kg) were administered alone or simultaneously (GA:UA - 50:25 mg/kg). Biochemical parameters of gastric secretion (pH and H^+ concentration) were analyzed. The gastroprotective activity was evaluated by quantification of mucus adhered to the gastric mucosa by standard curve interpolation of alcian blue. Through the analysis of the results, it was possible to observe that the GA has low cytotoxicity with viability greater than 100% in relation to the two lines, while the UA presented low viability ($24.22 \pm 2.21\%$) compared to J774 in the concentration (240 $\mu\text{g/mL}$). In association (GA:UA) they presented high viability of ($95.96 \pm 12.96\%$) in the aforementioned concentration. The biochemical parameters demonstrated that the GA and/or UA maintain the pH measurement at baseline without significant decrease in acidity. Inhibition of induced gastric lesions was demonstrated by the determination of the Ulcerative and Histological Injury Index, suggesting the high tissue repair power of the two compounds, the GA:UA was able to inhibit in 98.14% and 99.41% after 3 and 7 days of treatment, respectively, while Lansoprazole used as the reference drug inhibited about 68% at both treatment times. The GA:UA showed a significant increase in mucus production ($557.33 \pm 54.44 \mu\text{g/g}$), with a value greater than the sum of the results of the groups of animals that received the GA ($136.5 \pm 17.32 \mu\text{g/g}$) and UA ($314 \pm 43.78 \mu\text{g/g}$) separately, showing that there is a potential synergistic action effect of these two compounds. Thus, we conclude that AG and AU presented gastroprotective, antiulcerogenic and synergic effects when associated.

Keywords: Gastric Ulcer. Gallic Acid. Usnic Acid. Synergism. Gastroprotective.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Avaliação da atividade antiulcerogênica do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) de acordo com os respectivos grupos e tratamentos.....	54
Tabela 1.2	Avaliação da ação gastroprotetora do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) de acordo com os respectivos grupos e tratamentos.....	55
Tabela 1.3	Efeito da administração oral do Lansoprazol e dos ácidos gálico (AG) e úsnico (AU) em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos.....	56
Tabela 1.4	Efeito da administração oral do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) sobre parâmetros bioquímicos de acidez no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Anatomia do estômago.....	19
Figura 1.2	Esquema das camadas do estômago.....	20
Figura 1.3	Anatomia funcional da mucosa gástrica.....	21
Figura 1.4	Fatores protetores da mucosa.....	24
Figura 1.5	Estrutura química do ácido gálico.....	30
Figura 1.6	Estrutura química do ácido úsnico.....	34
Figura 2.1	Citotoxicidade do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) frente a células indiferenciadas de macrófagos (J774) e células embrionárias de rim (HEK-293).....	59
Figura 2.2	Imagens dos estômagos dos ratos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol após 3 dias de tratamento.....	60
Figura 2.3	Imagens dos estômagos dos ratos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol após 7 dias de tratamento.....	61
Figura 2.4	Efeitos do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) sobre a área ulcerada no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol durante 3 e 7 dias de tratamento: índice de lesão ulcerativo.....	62
Figura 2.5	Efeitos do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) sobre a área ulcerada no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol durante 3 e 7 dias de tratamento: índice de lesão histológico.....	63
Figura 2.6	Curva de calibração do corante <i>alcian blue</i> , utilizado para quantificação da produção de muco aderido à mucosa gástrica no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol.....	64
Figura 2.7	Efeito da administração oral do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) sobre a produção de muco na mucosa gástrica de ratos no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol.....	65

LISTA DE ABREVIACES

AG	cido gálico
AG:AU	cido gálico testado em associação ao ácido úsnico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AU	cido úsnico
C	Controle
Ca ²⁺	íon cálcio
CAT	Enzima Catalase
CEUA	Comit de tica para o uso de animais
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
DL ₅₀	Dose letal 50%
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EP ₃ , EP ₄	Receptores de Prostaglandinas
g	Grama
GCs	Guanilil ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Guanilil trifosfato
GPx	Glutathione peroxidase

GST	Glutathione S-transferase
h	Hora
H ⁺ /K ⁺ -ATPase	Bomba de Prótons
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
IL-6, IL-8	Interleucinas tipo 6, 8 respectivamente
ILU	Índice de lesões ulcerativas
i.p.	Intraperitoneal
H ⁺	Íons cátion de hidrogênio
H ₂	Receptor histaminérgico subtipo 2
HCIO	Ácido hipocloroso
HCT-116	Carcinoma do cólon
H.E.	Corante hematoxilina-eosina
HEK-293	Linhagem de células embrionárias de rim
HeLa	Adenocarcinoma do colo do útero
J774	Linhagem de células indiferenciadas de macrófagos
Kg	Quilograma
LogP	Coeficiente de partição
LPS	Lipopolissacarídeo
Mg	Miligramma
Min	Minuto
mL	Mililitro
mEq	Miliequivalente
mol/L	Molaridade por litro

M ₃	Receptores Muscarínicos do tipo 3
MCF-7	Adenocarcinoma da mama
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MIP-2	proteína inflamatória-2 do macrófago
MPO	Mieloperoxidase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
Nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O ₂	Oxigênio
OH	Radical hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E subtipo 2
PGI ₂	Prostaglandina I subtipo 2
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rpm	Rotação por minuto
S.D.	Desvio padrão
SNE	Sistema nervoso entérico
SOD	Enzima superóxido dismutase

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGI	Trato gastrointestinal
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
v.o.	Via oral
VRE	Enterococcus resistente à vancomicina
μg	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais/menos
®	Produto Referência
°C	Graus Celsius
<	Menor que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Anatomia e Fisiologia do estômago	19
3.2 Fisiologia da secreção ácida gástrica	22
3.3 Fatores de proteção da mucosa gástrica	23
3.4 Fatores agressores da mucosa gástrica	26
3.5 Úlcera Gástrica	27
3.6 Lesão gástrica induzida por etanol	29
3.7 Ácido Gálico	30
<i>3.7.1 Propriedades físico-químicas do ácido gálico</i>	30
<i>3.7.2 Atividades biológicas do ácido gálico</i>	31
3.8 Ácido Úsnico	33
<i>3.8.1 Propriedades físico-químicas do ácido úsnico</i>	33
<i>3.8.2 Atividades Biológicas do ácido úsnico</i>	34
3.9 Interação entre fármacos	36
4 Artigo: Estudo da interação do ácido gálico com ácido úsnico na gastroproteção e cicatrização de lesões gástricas induzidas em ratos wistar	37
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS DA UFPE	76

1 INTRODUÇÃO

As doenças do trato gastrointestinal (TGI), principalmente as úlceras gástricas e as complicações ocasionadas são exemplos de agravos à saúde pública, que apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, além de custos elevados no tratamento de suas complicações. A prevalência das úlceras gástricas é de 8 a 10% na população dos países industrializados, acreditando-se que a incidência desta patologia ocorra devido a fatores relacionados ao cotidiano dos indivíduos, como jornadas de trabalho estressantes, maus hábitos alimentares, infecção bacteriana por *Helicobacter pylori* e o uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), além do uso contínuo de agentes irritantes como álcool e tabaco, os quais são fatores que influenciam na redução da defesa da mucosa gástrica (NASCIMENTO, 2013; LIU *et al.*, 2015).

O tratamento e a cura das úlceras gástricas ainda são discutíveis. Sabe-se que pode haver completa cicatrização ou não da lesão além da regeneração do epitélio, assim permanecendo por períodos variáveis. Apesar da grande quantidade de fármacos disponíveis para o tratamento da úlcera gástrica, ainda não foi encontrado um fármaco com capacidade de promover um tratamento com total cicatrização das lesões, havendo dessa forma, a recidiva da patologia e o reaparecimento das reações adversas causadas pela continuidade do tratamento com esses fármacos (LALOO *et al.*, 2014; BOLIGON *et al.*, 2014).

Vale ressaltar que com os casos da doença em ascensão, há uma grande necessidade de desenvolver novos estudos para a descoberta de novas moléculas que previnam o aparecimento de lesões e promovam uma aceleração no reparo das úlceras, diminuindo o tempo de tratamento (LALOO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015). O ácido gálico (AG), ácido 3,4,5-triidróxi-benzóico, é uma substância fenólica, intermediária do metabolismo secundário de plantas. É conhecido por apresentar diversas funções biológicas, como atividade antioxidante (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015), antitumoral, anti-inflamatória e gastroprotetora apresentando citotoxicidade seletiva para células cancerígenas, fazendo deste fármaco uma biomolécula fundamental para uso terapêutico (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Outro composto importante de origem natural que podemos destacar é o ácido úsnico (AU), [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9β/αH)-dibenzofurandiona; C₁₈H₁₆O₇], resultante do metabolismo secundário de várias

espécies de líquens, tais como *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae) e *Parmelia* (Parmeliaceae) (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Este composto é bem conhecido e estudado pelas diversas propriedades biológicas já descritas como atividade antitumoral, antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, anti-inflamatória. Além disso, apresenta ação gastroprotetora, mostrando-se um composto promissor para o estudo e tratamento de diversas patologias (FRANCOLINI *et al.*, 2004; BAZIN *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2015).

A associação de substâncias com propriedades gastroprotetora e antiulcerativa pode ser uma ferramenta importante para a prevenção e tratamento das úlceras gástricas, uma vez que a terapia combinada pode ajudar a prevenir o aparecimento das lesões, minimizar os efeitos adversos causados pelo tratamento contínuo, além de diminuir as recidivas comuns a esta patologia, promovendo assim uma potencialização nos efeitos dessas substâncias.

Vários estudos descrevem que, a interação entre duas moléculas ativas podem resultar em uma ação sinérgica. Essa interação potencial pode alterar os efeitos farmacológicos, que pode resultar na potencialização das atividades biológicas conhecidas, além de permitir o aparecimento de um novo efeito antes não visto quando administrada isoladamente (CASCORBI, 2012; SEGATORE *et al.*, 2012). Dessa forma, surge à necessidade e o interesse de se avaliar o efeito da combinação de moléculas bioativas, como o ácido gálico e ácido úsnico para possível uso na prevenção e tratamento de doenças como a úlcera gástrica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a propriedade gastroprotetora e antiulcerogênica do ácido gálico em modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol e avaliar o possível efeito sinérgico com o ácido úsnico.

2.2 Objetivos específicos

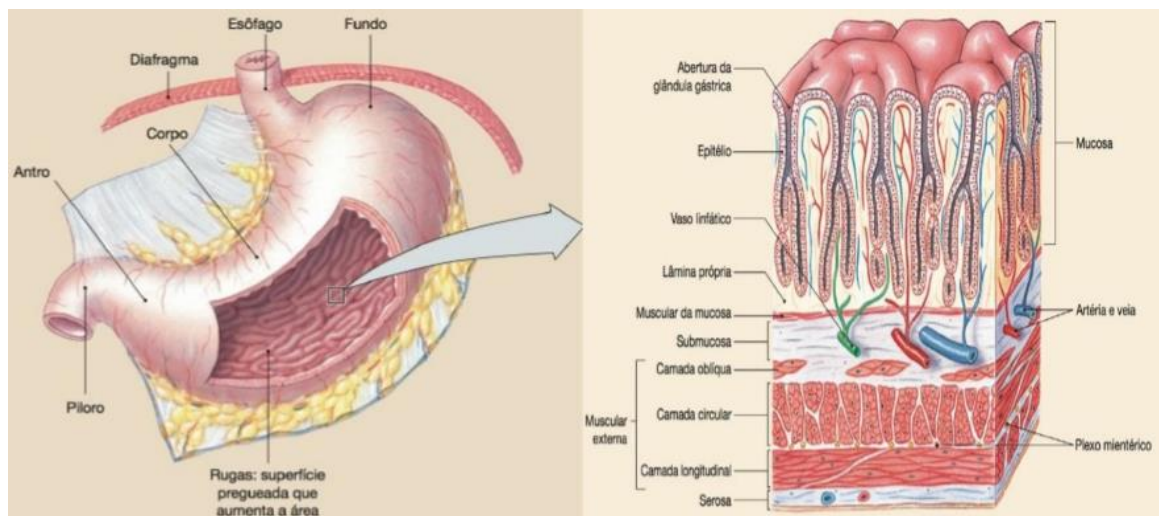
- Avaliar a citotoxicidade do ácido gálico isolado e associado ao ácido úsnico frente a linhagens de células indiferenciadas avaliando o possível efeito sinérgico *in vitro*;
- Avaliar os efeitos do ácido gálico isolado e associado ao ácido úsnico na proteção da mucosa e na cicatrização das lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos;
- Investigar a ação do ácido gálico isolado e associado ao ácido úsnico sobre os parâmetros bioquímicos de acidez da secreção gástrica (pH e concentração de H^+).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Anatomia e Fisiologia do Estômago

O estômago é um órgão do sistema digestivo localizado na parte superior esquerda da cavidade abdominal. É um órgão notável que auxilia na digestão sendo responsável por receber o bolo alimentar do esôfago após o processo de deglutição, possuindo três funções básicas gerais: armazenamento, digestão e proteção (SILVERTHORN, 2010; BRUNEAU, 2017). De acordo com a anatomia (Figura 1.1) é dividido em quatro regiões: cárdia, fundo, corpo e piloro ou antro. O fundo está situado na região superior e se relaciona à região gastroesofágica, o corpo é a maior região do estômago e o antro está situado na porção proximal ao canal pilórico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BRUNEAU, 2017).

Figura 1.1 – Anatomia do estômago

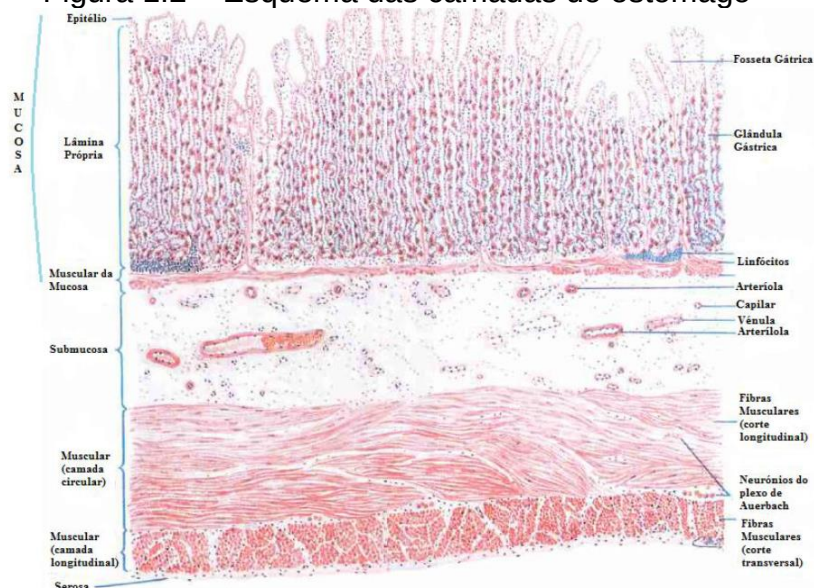


Fonte: SILVERTHORN, 2010.

O estômago possui formas e diversos tamanhos que dependem da anatomia de cada indivíduo. Possui uma túnica mucosa com uma única camada de células superficiais epiteliais. Em análises microscópicas são considerados apenas três regiões histológicas, pois o fundo e corpo possuem estruturas idênticas. Possui também duas curvaturas, dois esfíncteres denominados de cárdia e piloro, vaso e artérias que irrigam o trato gastrointestinal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O estômago é constituído por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa. A mucosa é a camada interna e possui um grande número de glândulas gástricas. A submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo. A camada serosa recobre grande parte do órgão, exceto uma região pequena da cárdia (DANGELO; FANTTINI, 2007; BRUNEAU, 2017). Nessas camadas estão presentes diversas células, responsáveis por produzirem o suco gástrico e são denominadas de acordo com o tipo de secreção, podendo ser péptica ou parietal, a secreção péptica possui em sua composição muco, bicarbonato, sódio, potássio e pepsinogênio enquanto a secreção parietal é composta por ácido clorídrico (REIS, 2003; GUYTON; HALL, 2011; BRUNEAU, 2017).

Figura 1.2 – Esquema das camadas do estômago

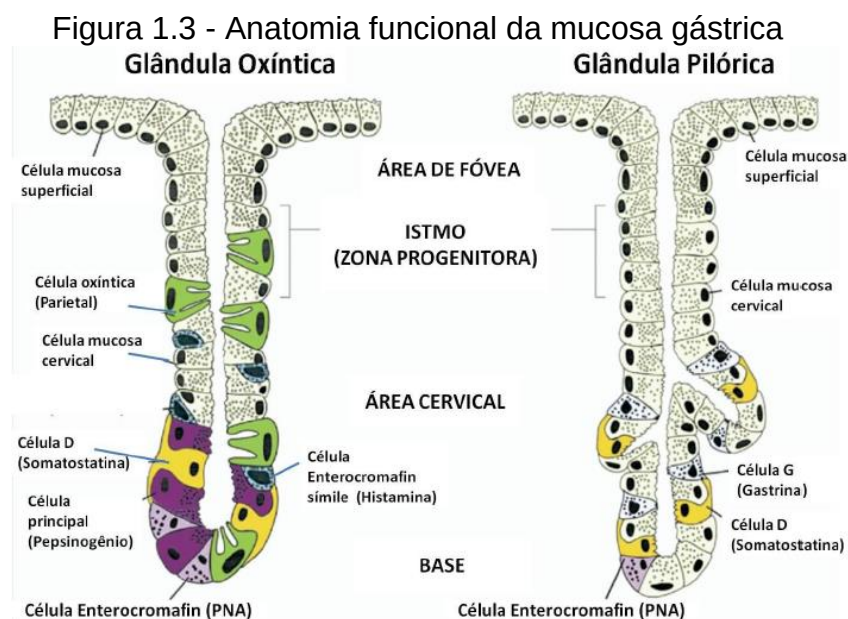


Fonte: HIB, 2003.

Na primeira camada do estômago, denominada mucosa, encontra-se as fossetas gástricas, nestas fossetas desembocam glândulas tubulares ramificadas, denominadas de glândulas gástricas (Figura 1.2), subdivididas em três regiões distintas, classificadas como istmo, com células mucosas superficiais em diferenciação; colo, com células-tronco, mucosas do colo e enteroendócrinas; e base, com células zimogênicas e enteroendócrinas. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SILVERTHORN, 2010).

Diariamente, uma grande quantidade de suco gástrico é secretada pelo estômago; além de uma quantidade considerável de muco e bicarbonato que contribuem para a proteção da mucosa gástrica (RANG *et al.*, 2012). O processo de digestão ocorre de acordo com diversos estímulos, por meio de fatores endógenos e exógenos. Durante esse processo, após a deglutição, o estômago repleto de alimento, diminui o tamanho do fundo gerando contrações do antro que resultam no esvaziamento gástrico. Em decorrência de fatores, como a distensão do duodeno ou jejuno, a ação da gastrina, a pressão do esfíncter do esôfago, a diminuição da motilidade gástrica e o esvaziamento do piloro, estímulos irritantes são produzidos o que resultam na acidificação do duodeno. Ocorre ainda, a ocorrência de fatores exógenos, que são de extrema relevância na relação da fisiologia das patologias gástricas (RAMSAY; CARR, 2011; BRUNEAU, 2017).

A mucosa gástrica possui dois tipos de glândulas: glândulas pilóricas e oxínticas, além de células secretoras que apresentam funções na manutenção da integridade gástrica (Figura 1.3). As glândulas pilóricas apresentam três tipos de células: as células G que secretam gastrina; as células D e células mucosas que liberam muco. As glândulas oxínticas são compostas por células mucosas; células do tipo parietais que secretam ácido clorídrico; células enterocromafins que secretam histamina; células principais ou pépticas que secretam pepsinogênio e células do tipo D que secretam somatostatina (GUYTON; HALL, 2011; SCHUBERT, 2015).



Fonte: Adaptada de SCHUBERT; PEURA, 2008.

3.2 Fisiologia da secreção ácida gástrica

As células parietais são as principais secretoras de ácido na mucosa gástrica. O ácido clorídrico (HCl), principal constituinte do ácido gástrico, também é secretado pelas células parietais. Além do HCl, existem outros constituintes da secreção gástrica como pepsinogênio, muco, bicarbonato e eletrólitos, fundamentais no processo digestório, assegurando equilíbrio no ambiente intragástrico (JAIN *et al.*, 2007; SCHUBERT *et al.*, 2011). A secreção gástrica cria um ambiente ácido que permite ativar a produção da pepsina e decompor proteínas em peptídeos que posteriormente serão absorvidos no intestino delgado (LANDA; DUMON; DEMPSEY, 2019).

A secreção gástrica apresenta três fases: a fase cefálica que é estimulada pela visão, sabor dos alimentos e cheiro; a fase gástrica estimulada pelo contato do alimento com o lúmen gástrico aumentando a secreção gástrica e a fase intestinal que é estimulada pela presença de aminoácidos e peptídeos que causa a distensão mecânica (RAMSAY; CARR, 2011; SCHUBERT, 2016).

Entre os hormônios que estimulam a secreção gástrica nas glândulas gástricas (Figura 1.4), há a acetilcolina (neurotransmissor), a gastrina (hormônio) e histamina (peptídeo parácrino). A acetilcolina se liga a receptores muscarínicos M_3 na membrana basolateral das células parietais; é liberada por fibras pós-ganglionares parassimpáticas que inervam a mucosa gástrica e por fibras do sistema nervoso entérico (SNE) estimulando as células secretoras à produção de ácido clorídrico, as células pépticas a liberarem no lúmen o pepsinogênio e células mucosas a secretarem muco (RAMSAY; CARR, 2011).

A gastrina é liberada pelas células G do antro gástrico e por células do duodeno, tem como função principal aumentar a secreção do pepsinogênio estimulando o fluxo sanguíneo e a motilidade gástrica. A histamina, por sua vez, é o principal mediador fisiológico na secreção de ácido clorídrico (GOO *et al.*, 2010; GUYTON; HALL, 2011).

A ativação das vias que dependem do Ca^{2+} intracelular pela gastrina e acetilcolina ou pela via de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) pela histamina, ativam a H^+/K^+ -ATPase nas células parietais, resultando na secreção ácida estomacal (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Dessa forma há uma

relação entre as vias, que garante a secreção ácida e sua regulação de maneira eficaz (GOO *et al.*, 2010; RAMSAY; CARR, 2011).

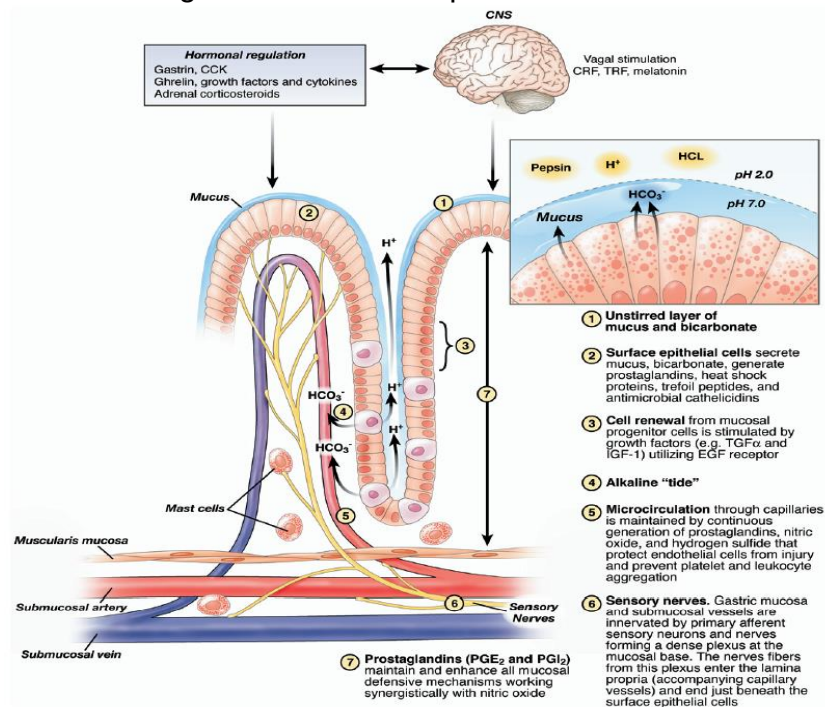
3.3 Fatores de proteção da mucosa gástrica

A mucosa gástrica é constantemente exposta a fatores maléficos como pH fortemente ácido, presença de enzimas proteolíticas ativas, infecções por *Helicobacter pylori*, além dos agentes irritantes como álcool, AINEs, alimentos em diferentes temperaturas que podem levar ao surgimento de lesões (WALLACE, 2008). Em contrapartida, a mucosa gastrointestinal pode manter-se íntegra e funcional, devido a mecanismos de defesa classificados como pré-epiteliais, epiteliais e subepiteliais que abrangem processos dinâmicos com atuação das ações locais e hormonais (DONG; KAUNITZ, 2006; LAINE *et al.*, 2008; TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

Entre os mecanismos defensores podemos citar os pré-epiteliais (muco, bicarbonato, fosfolipídios surfactantes e ácido gástrico), fatores epiteliais (defesas antioxidantes, prostaglandinas e óxido nítrico) e fatores de defesa subepitelial (fluxo sanguíneo e resposta inflamatória aguda). O muco é fundamental na proteção da mucosa gástrica (Figura 1.4), visto que reveste a superfície epitelial do trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon. É constituído por um gel transparente e viscoso, que adere à superfície, composto por 95% de água e 5% de mucina (glicoproteínas); a mucina é o principal componente estrutural presente no muco que promove uma barreira protetora contra agentes nocivos, enzimas e microrganismos (BOEGH; NIELSEN, 2015; CARLSON; LOCK; CARRIER, 2018).

A camada de muco atua como uma barreira física protetora impedindo o acesso da pepsina, presente no lúmen, à mucosa gástrica. A capacidade que o muco apresenta de proteger o estômago depende da estrutura e espessura do gel e aderência à superfície da mucosa, além disso, o muco mantém o gradiente de pH estável, impedindo danos por uma agressão enzimática causada pela pepsina. As enzimas proteolíticas degradam e solubilizam o gel mucoso (LIELEG; RIBBECK, 2011; SIGURDSSON; KIRCH; LEHR, 2013).

Figura 1.4 – Fatores protetores da mucosa



Fonte: LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008.

O muco fica armazenado em grânulos citoplasmáticos até que haja exocitose pela região apical das células epiteliais, quando estimulados por hormônios gastrointestinais (BOEGH; NIELSEN, 2015). As úlceras pépticas ocorrem quando a mucosa gástrica é comprometida. A barreira muco-bicarbonato secretada pelo epitélio, é um mecanismo de defesa e serve como barreira contra a autodigestão provocada pelo ácido e pepsina. No duodeno, as prostaglandinas sintetizadas pelas ciclooxigenases do tipo 1 (COX-1) ativam a secreção de bicarbonato através da interação com receptores EP $_3$ e EP $_4$ (NIV; BOLTIN, 2012; SIGURDSSON; KIRCH; LEHR, 2013; CARLSON; LOCK; CARRIER, 2018).

No momento que a barreira de proteção pré-epitelial é superada, ocorre a ativação de mecanismos de defesa epitelial e subepitelial. Um dos mecanismos mais importantes é a redução do estresse oxidativo. Vários fatores podem desencadear o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como um processo inflamatório que ativa e recruta neutrófilos por meio de citocinas pró-inflamatórias (DONG; KAUNITZ, 2006).

O estresse oxidativo pode ser impedido por defesas antioxidantes enzimáticas e químicas. As concentrações de ROS dentro das células são mínimas, em condições normais, devido à regulação das enzimas antioxidantes que bloqueiam a

formação desses radicais livres e promovem a primeira linha de defesa contra superóxido e peróxido de hidrogênio sendo elas: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST) (KWIECEN *et al.*, 2014; YANDRAPU; SAROSEIK, 2015).

Os compostos sulfidrílicos apresentam também um papel relevante na proteção da mucosa gástrica, pois eles se ligam aos radicais livres, liberados no processo inflamatório, evitando assim a lesão gástrica e consequentemente à morte celular (KATO *et al.*, 2000; SÁNCHEZ-MENDOZA *et al.*, 2019).

As prostaglandinas (PGs) são um grupo derivados de ácidos graxos compostos por 20 carbonos ligados ao átomo de oxigênio. São produzidas a partir do metabolismo do ácido araquidônico produzido pelo estômago e duodeno através de enzimas ciclooxigenases (COX). Na barreira gástrica é um facilitador e estimulante da maioria dos mecanismos protetores. As PGs mantêm a integridade da mucosa e melhoram os mecanismos de defesa, regulando a secreção de ácido gástrico, muco-bicarbonato, o fluxo sanguíneo da mucosa e a motilidade por meio de receptores do tipo E que contribuem para a citoproteção gástrica (FORNAI *et al.*, 2011; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). As principais PGs envolvidas na proteção da mucosa gástrica são as PGE₂ e PGI₂, que ativam receptores presentes nas células do epitélio, causando diminuição da liberação do ácido gástrico, aumentando consequentemente a produção de muco (DIAS *et al.*, 2011; FORNAI *et al.*, 2011).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, produzido e liberado pelo endotélio vascular e terminações nervosas sensoriais, codificado através de três genes (nNOS (sintase neuronal), eNOS (sintase endotelial) e iNOS (sintase induzida) que possuem a capacidade de produzir mecanismos regulatórios e complementares distintos. O NO reage com guanilil ciclase solúvel (GCs), induzindo um aumento celular do segundo mensageiro, catalisando a conversão de guanilil trifosfato (GTP) para guanilil monofosfato cíclico (GMPc) aumentando assim a concentração de GMPc intracelular (SZLACHCIC *et al.*, 2013; MAGIEROWSKI *et al.*, 2015).

A proteção feita pelo NO está relacionada com a sua capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa estabilizando a atividade dos mastócitos. O NO inibe a secreção de HCl nas células parietais, protegendo a barreira da mucosa e a integridade epitelial gástrica. No entanto, alguns estudos demonstram que a produção excessiva de NO associado à inflamação pode levar a perda da função da barreira gástrica pela produção de muco, isso comprova que o NO pode determinar

o aumento na permeabilidade epitelial através dos seus níveis de produção e sua isoforma geradora (MAGIEROWSKI *et al.*, 2015; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

A microcirculação é fundamental para garantir a demanda de oxigênio e o suprimento de nutrientes e hormônios às células da mucosa que contribuem para o reparo tecidual (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010). O fluxo sanguíneo é controlado pelo sistema nervoso e vários mediadores inflamatórios como o NO e PGs. Quando fatores agressivos penetram a camada subepitelial da mucosa, neurônios sensoriais medeiam um aumento do fluxo sanguíneo da mucosa, limitando a penetração em camadas mais profundas da mucosa, esses mecanismos são fundamentais para minimizar os danos e facilitar a reparação tecidual. Devido à presença da microcirculação sanguínea a mucosa pode ficar exposta a concentrações altas de ácido sem que ocorra lesão epitelial significativa (LAINE *et al.*, 2008; YANDRAPU; SAROSEIK, 2015).

3.4 Fatores agressores da mucosa gástrica

Dentre os fatores exógenos, um dos mais agressivos à mucosa gástrica é o etanol. A lesão por etanol afeta principalmente a porção glandular do estômago, infiltrando rapidamente a mucosa, que promove danos à membrana e erosão nas células, essa lesão pode está relacionada a alguns mecanismos como diminuição nos grupamentos sulfidrílicos no conteúdo da mucosa, aumento da secreção ácida gástrica, formação de radicais livres, danos à mucosa com lesões hemorrágicas e apoptose celular (SIDAHMED *et al.*, 2013). Outro fator exógeno prejudicial é o uso de AINEs, seu uso está associado a efeitos adversos que incluem úlceras e hemorragias gástricas. O uso de AINEs retarda a cicatrização das lesões gástricas por meio da diminuição da proliferação epitelial por interferência nas ações dos fatores de crescimento, redução da angiogênese e atraso na maturação e granulação tecidual (HATAZAWA *et al.*, 2007; MAITY *et al.*, 2009; TAKEUCHI *et al.*, 2014).

A bactéria *H. pylori* é um importante agente indutor de úlceras gástricas, um bacilo gram-negativo considerado um dos principais fatores etiológicos no desenvolvimento da doença (SALIMZADEH *et al.*, 2015). A infecção leva a perda da proteção da mucosa, pela diminuição das secreções protetoras de bicarbonato e muco e infiltração na mucosa, que desencadeia uma resposta inflamatória com

ativação de citocinas no epitélio e dificuldade na reparação tecidual (TAKEUCHI *et al.*, 2014; SALIMZADEH *et al.*, 2015).

O tabagismo é um fator de risco que contribui para o desenvolvimento da úlcera gástrica e dificulta o processo de cicatrização das lesões. As substâncias presentes no cigarro podem ocasionar a morte celular, inibem a renovação celular e estão diretamente relacionadas ao aparecimento de vários tipos de câncer do trato gastrointestinal (LI *et al.*, 2014; ASALI *et al.*, 2018).

O estresse também é considerado um fator que pode levar ao desenvolvimento de úlceras gástricas, denominadas de úlceras por estresse. Quando a adrenalina e o cortisol são liberados pela glândula suprarrenal excessivamente, geram o aumento de secreção de HCl e pepsinogênio, diminuindo a barreira protetora de muco-bicarbonato o que acarreta no aparecimento das lesões (SIEGMUND *et al.*, 2003; YANDRAPU; SAROSEIK, 2015).

3.5 Úlcera gástrica

A úlcera gástrica é uma lesão profunda da mucosa, onde os componentes dos tecidos epitelial e conjuntivo, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (MILANI; CALABRO, 2001). A sua patogênese é complexa e multifatorial, e tem sido estudada por várias décadas. Apesar da evolução do conhecimento sobre a úlcera péptica, o tratamento e a cura ainda são discutíveis, por haver vários mecanismos que desencadeiam o desequilíbrio entre os fatores protetores e agressivos da mucosa (KANGWAN *et al.*, 2014; SZABO, 2014).

Histologicamente a úlcera é dividida em duas estruturas: a margem da úlcera formada pela mucosa adjacente não necrosada (o componente epitelial) e o tecido de granulação na base da úlcera (tecido conectivo), que consiste em fibroblastos, macrófagos e a ocorrência da proliferação de células endoteliais formando microvasos (TARNAWSKI, 2010).

A cicatrização das úlceras gástricas é um mecanismo de reparo programado que inclui a resposta inflamatória, proliferação celular, formação de tecido de granulação, angiogênese, interações entre várias células e a matriz extracelular, e remodelação do tecido, finalizando com a formação de uma cicatriz. Citocinas, fatores de crescimento e fatores de transcrição ativados durante o dano tecidual promovem a cicatrização das úlceras (MARTIN; WALLACE *et al.*, 2006).

O tratamento para as úlceras gástricas inicialmente era baseado sempre na supressão da secreção ácida, entretanto, pesquisas vem sendo realizadas para o estudo e descoberta de novos compostos que apresentem mecanismos de regulação e cicatrização mais eficazes para lesões gástricas. Os fármacos mais utilizados atualmente no tratamento de gastrites e úlceras envolvem: inibidores da bomba de prótons, que agem na fase final da secreção, sendo o omeprazol um fármaco bastante utilizado pela população para esse grupo de inibidores (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; STRAND; KIM; PEURA, 2017).

Além desse fármaco o lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e esomeprazol são considerados atualmente fármacos altamente eficazes na supressão da secreção ácida melhorando a cicatrização das úlceras pépticas; fármacos de terapia antissecretória, que inibem ou neutralizam a secreção de ácido gástrico, como a cimetidina, famotidina, nizatidina, ranitidina que antagonizam receptores de H_2 da histamina, reduzindo o volume, a concentração de íons H^+ do suco gástrico e inibindo efeitos cronotrópicos, inotrópicos e vasodilatadores da histamina resultando no tratamento de doenças relacionadas com o ácido incluindo o refluxo gastroesofágico (SCHUBERT, 2016; STRAND; KIM; PEURA, 2017).

Antiácidos neutralizadores do ácido gástrico como o bicarbonato de sódio, fornecem alívio efetivo da dor através da neutralização do ácido, além de existirem outros agentes que podem aumentar os fatores protetores da mucosa como os citoprotetores sendo eles o sucralfato, misoprostol e a carbenoxolona capazes de promover efeitos citoprotetores ao funcionarem como barreira física na mucosa gástrica (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Um dos grandes problemas relacionados aos tratamentos das úlceras gástricas é que, apesar da taxa de cicatrização ser satisfatória (em torno de 80 a 100%), depois de uma terapia de 30 dias, a porcentagem da recidiva da úlcera após um ano do término do tratamento é considerada alta (40 a 80%) na maioria dos estudos. Acredita-se que essa recidiva das úlceras seja pelo fato de que as lesões cicatrizadas, após o uso de drogas, apresentam diminuição da densidade dos vasos sanguíneos, em relação a um tecido normal (SZABO; VINCZE, 2000; NIETO, 2012). Além disso, existem ainda, efeitos adversos relacionados ao uso dessas drogas, tais como: arritmias, cefaleia, fadiga, impotência, ginecomastia em homens, alterações hematopoiéticas, dor muscular, dores abdominais, constipação, flatulências e

galactorreia em mulheres (HOOGERWERF; PASRICHA, 2005; PARIKH; HOWDEN, 2010).

Dessa forma, apesar dos grandes avanços com o surgimento desses fármacos, a busca por terapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais se torna relevante sendo necessário o estudo de novos alvos terapêuticos, a fim de garantir produtos seguros de alta eficácia com ausência ou redução de efeitos adversos, diminuindo o risco de recidivas além de reduzir os mecanismos reflexos compensatórios dessa doença.

3.6 Lesão gástrica induzida por etanol

A lesão gástrica induzida por etanol é um modelo experimental bastante utilizado para avaliação de compostos com potencial antiulcerogênico. O etanol é considerado um agente ulcerogênico, por induzir constrição venosa seguida por dilatação arterial no local em que o etanol foi administrado (PANDIAN; ANURADHA; VISWANATHAN, 2002).

O mecanismo de ação envolvido na formação de lesões gástricas provocadas por etanol denota ser local e sistêmico e dependem de fatores como a formação e liberação de radicais livres, enzimas, mediadores vasoativos e produção de proteases que promovem a inflamação. Os radicais livres formados por meio da reperfusão e isquemia provocam mudanças celulares que podem levar à necrose celular. Além disso, o etanol provoca estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando o risco de hemorragia e ulceração, associado a lesões macroscópicas e microscópicas na mucosa (REPETTO; LLESUY, 2002; KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002).

O enfraquecimento na barreira da mucosa gástrica, leva ao aumento da permeabilidade da membrana, que associado a fatores como a diminuição de produtos vasoativos provoca danos vasculares, levando a formação da úlcera gástrica e à necrose (SIEGMUND *et al.*, 2003; BILICI *et al.*, 2008). A necrose celular é o resultado de uma cadeia de eventos que promovem a vasoconstrição, edema e hemorragia, havendo um comprometimento do fluxo sanguíneo na mucosa (CASTRO *et al.*, 2010).

A administração aguda do etanol em conjunto com o ácido presente no estômago torna a mucosa extremamente sensível gerando a resposta inflamatória

(BODE; BODE, 1997; ROCHA *et al.*, 2011). O etanol ingerido em concentrações em torno de 10% causa um processo inflamatório que compromete o epitélio. Concentrações acima de 90% produzem dano vascular, com fluxo sanguíneo reduzido na mucosa, isquemia e morte celular na região da lesão gástrica (TEYSSEN; SINGER, 2003; SIEGMUND *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2011).

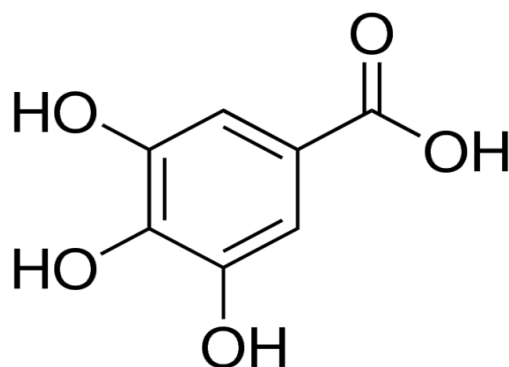
3.7 Ácido Gálico

3.7.1 Propriedades físico-químicas do ácido gálico

O ácido gálico (AG), ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (Figura 1.5), é um importante ácido fenólico bioativo, intermediário do metabolismo secundário de plantas. É derivado do ácido benzóico e pode ser extraído e purificado de diversas plantas, além de poder ser sintetizado. É frequentemente encontrado na natureza na forma de ácido elágico e ambos são constituintes de taninos hidrolisáveis e podem ser liberados por meio de hidrólise ácida (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004; BESERRA *et al.*, 2011).

O AG é encontrado em grande quantidade em folhas de chá como o chá verde, no cacau, em frutas como o morango, banana, uva, limão, abacaxi, manga e na casca de maçãs e carvalhos, em avelãs, vinho branco e vinho tinto, que em particular possui um alto teor de ácido gálico (YOU *et al.*, 2010; BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

Figura 1.5 – Estrutura química do ácido gálico



Fonte: PARK *et al.*, 2016.

Apresenta 3 grupos OH fenólicos e um grupo carboxílico, ligado ao anel aromático; a posição do grupo OH, a ordem de arranjo do número, a presença de outros grupos funcionais e sua posição, determinam a capacidade antiradical e antioxidante de compostos fenólicos como o AG (MELO *et al.*, 2009; BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

O AG apresenta-se na forma de cristais, com massa molecular de 170,12 g/mol, temperatura de fusão de 250 °C e solubilidade em água de 1.1 % a 20 °C (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013). Além de apresentar instabilidade em temperaturas extremas. Na presença de oxigênio ou luz, pode formar ligações de hidrogênio pelas OH polarizadas dos grupos fenólicos e carboxílicos presentes em sua estrutura (ROSA *et al.*, 2013). O AG é considerado uma substância relativamente solúvel em água por apresentar um LogP de 0,89 (BENNETT *et al.*, 2004; VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Compostos fenólicos apresentam alta reatividade e esta característica também pode ser inferida ao ácido gálico (GALLI, 2007; BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015). Outra característica relacionada ao ácido gálico é a capacidade de complexação com metais, tornando-o conhecido como um forte agente quelante que formam complexos com alta estabilidade com o ferro (POLEWSKI; KNIAT; SKA, 2002).

O AG é reconhecido por apresentar diversas atividades farmacológicas benéficas. Dentre elas podemos citar atividade antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antihiperglicêmico, antimutagênica, imunomodulatória, antialérgica e antiúlcera. Alguns estudos demonstram ainda o potencial cardioprotetor, neuroprotetor, hepatoprotetor e nefroprotetor desse ácido (YOU *et al.*, 2010; LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013; VERMA; SINGH; MISHRA, 2013; MANSOURI *et al.*, 2013; BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

3.7.2 Atividades biológicas do ácido gálico

O AG é bastante reconhecido principalmente por ser um antioxidante natural, atuando na prevenção da oxidação de biomoléculas, tais como, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios (GALLI, 2007; BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015). Como antioxidante é capaz de capturar ROS, como peróxido de

hidrogênio, radicais hidroxila, ânions superóxido e ácido hipocloroso (HClO) (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

O AG possui propriedade anti-inflamatória significativa evitando a expressão de produtos químicos inflamatórios. Os ácidos fenólicos, incluindo os galatos, exibem uma forte inibição da mieloperoxidase (MPO), uma enzima essencial que está presente nos processos de infecção e inflamação. O AG e seus derivados, demonstraram atividade anti-inflamatória a partir de mecanismos com potente inibição da atividade da MPO, inibindo diretamente a produção de HClO, e retirando espécies reativas nocivas produzidas por essas enzimas (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

O AG tem a capacidade de restaurar lesões da mucosa gástrica induzidas por indometacina, o mecanismo de ação se dá através da modulação da resposta inflamatória. O AG formar um complexo, através do Fe livre demonstrando assim um possível potencial para prevenir a lesão gástrica induzida por indometacina através da quelação do Fe (III) e bloqueando a apoptose das células da mucosa gástrica mediada pelo estresse oxidativo (MASOUD *et al.*, 2014).

Pal *et al.* (2010) descreveram em estudos *in vivo* que o AG conseguiu bloquear o estresse oxidativo mitocondrial mediado por AINEs. Além disso, foi capaz de atenuar a apoptose de células da mucosa gástrica *in vivo* e *in vitro*, prevenir a ativação da caspase 9 e restabelecer o potencial transmembrana mitocondrial além da atividade da dehidrogenase.

Um estudo realizado por Asokkumar *et al.* (2014), demonstrou o efeito sinérgico entre o AG e a famotidina na proteção da mucosa gástrica de ratos. O AG apresenta potencial terapêutico e consegue reparar lesões gástricas induzidas por AINEs, o que pode prevenir a ativação da via de apoptose mitocondrial em células da mucosa gástrica durante o tratamento com estes fármacos.

Alguns estudos demonstraram o efeito bactericida do AG contra *H. pylori*, uma bactéria associada com várias doenças gastrointestinais. Díaz-Goméz *et al.* (2013) verificaram uma diminuição do efeito dose-dependente do AG frente duas cepas de *H. pylori* (26695 e 43504). Nesse estudo foi possível observar um aumento dose-dependente na inibição de ambas as cepas bacterianas, sugerindo que o AG tem um efeito inibidor significativo sobre o crescimento de *H. pylori*.

A investigação da atividade do AG frente à *Escherichia coli* apontou um efeito inibitório evidente em doses acima de 2,5 mg/mL, com total inibição observada nas

doses a partir de 3,5 mg/mL. A concentração inibitória mínima (MIC) para produzir 99 % de inibição no crescimento de *E. coli* foi de 3,25 mg/mL do composto. A inibição foi significativamente maior que o controle em doses de AG iguais ou superiores a 1 mg (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2014).

O AG possui efeito nefroprotetor frente à toxicidade induzida por compostos como o lindano, o ácido nitriloacético férrico e fluoreto de sódio. A intoxicação através desses compostos resulta em dano celular por estresse oxidativo. Um estudo realizado por Peng (2012) demonstrou a ação protetora do AG no tratamento de doença renal crônica induzida por doxorrubicina. O tratamento com o AG aumentou significativamente a massa dos rins e o volume glomerular, contribuindo na manutenção da taxa de filtração glomerular em níveis normais (PENG, 2012).

3.8 Ácido Úsnico

3.8.1 Propriedades físico-químicas do ácido úsnico

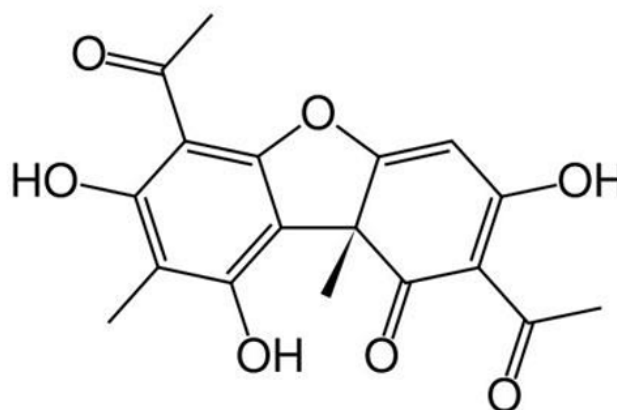
O ácido úsnico (AU), [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9β/αH)-dibenzofurandiona; C₁₈H₁₆O₇] (Figura 1.6), é um dos compostos de origem natural bastante conhecido e estudado atualmente, sendo particularmente abundante em gêneros como o *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* e *Evernia* (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). É uma substância de pigmentação amarelada e baixa solubilidade em água (10 mg/100 mL a 25 °C). Incide na natureza em duas formas enantioméricas (+)-ácido úsnico e (-)-ácido úsnico, sendo um dos poucos metabólitos liquênicos disponíveis comercialmente. (INGÓLFSDÓTTIR, 2002; COCCHIETTO *et al.*, 2002; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2015).

O AU apresenta três grupos cetônicos e um anel furano que liga aos anéis aromáticos e pontes de hidrogênio intramoleculares. A presença do anel fenólico, cuja estrutura é instável, confere ao AU acidez. Possui características hidrofóbicas, sendo solúveis em solventes orgânicos tais como o etanol, acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido, acetato de etila, diclorometano, benzeno e éter (TAKAI; UEHARA, 1979). Possui um ponto de fusão é em torno de 204 °C e peso molecular de 344,31 g/mol (BUDAVARI, 1996).

Diversas atividades biológicas desse ácido liquênico já foram comprovadas, sabe-se atualmente que o AU apresenta propriedades farmacológicas como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, gastroprotetora, antiviral,

antiparasitária, analgésica, antipirética, antioxidante e cicatrizante (INGÓLFSDÓTTIR, 2002; FRANCOLINI *et al.*, 2004; BAZIN *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2015).

Figura 1.6 – Estrutura química do ácido úsnico



Fonte: Adaptada de INGÓLFSDÓTTIR, 2002.

3.8.2 Atividades biológicas do ácido úsnico

Vijayakumar *et al.* (2000) estudaram a ação anti-inflamatória do AU em ratos Wistar com edema de pata, os resultados mostraram uma redução do edema, utilizando uma dose de ácido úsnico de 100mg/Kg de peso corpóreo, quando comparado com o ibuprofeno, fármaco padrão de referência, na mesma dose. Por meio dos resultados, foi sugerido que o mecanismo de ação do AU pode envolver uma inibição das prostaglandinas como outras drogas anti-inflamatórias.

Nunes *et al.* (2011) demonstraram que filmes a base de colágeno com lipossomas contendo AU são bastante úteis para melhorar a cicatrização de queimaduras. O AU mostrou estar diretamente relacionado com a modulação de eventos biológicos nesse processo, como a resposta inflamatória, epitelização e formação de colágeno.

Um estudo realizado por Brisdelli *et al.* (2012) voltado para avaliação da atividade citotóxica do AU em três linhagens celulares de câncer humano, o MCF-7 (adenocarcinoma da mama), HeLa (adenocarcinoma do colo do útero) e HCT-116 (carcinoma do cólon), demonstrou que o AU nas concentrações superiores a 25mM apresenta maior atividade citotóxica contra todas as linhagens de celulares analisadas quando comparadas com os outros metabólitos de líquens (BRISDELLI *et al.*, 2012). Outro estudo desenvolvido por Santos e colaboradores (2006) também

avaliou a atividade antitumoral *in vivo* do AU em sua forma livre e nanoencapsulado frente ao Sarcoma-180. Neste estudo, obteve-se aumento da inibição tumoral do AU em nanocápsulas (68%) quando comparado com o metabólito livre (43%).

De acordo com relatos disponíveis na literatura, a descoberta do AU aconteceu mediante a busca por novos antibióticos, sendo essa uma das principais atividades biológicas já descritas. A avaliação antimicrobiana do AU foi comprovada em vários estudos como o de Segatore e colaboradores (2012) que avaliou a atividade *in vitro* em combinação com cinco antibióticos contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA). Foi observada uma ação sinérgica em combinação à gentamicina e uma ação antagonista com levofloxacina. O AU vem sendo utilizado como alternativa, frente a cepas resistentes, como MRSA e *Enterococos* resistentes à vancomicina (VRE). Outros estudos além de comprovarem a atividade antimicrobiana, também identificaram sua ação antibiofilme (POMPILIO *et al.*, 2013).

O AU, isolado da espécie *Usnea longissima*, apresentou atividade gastroprotetora no tratamento da úlcera gástrica em ratos. Induzida pela indometacina, as lesões gástricas foram significativamente reduzidas após tratamentos com as doses utilizadas de AU (25 a 200 mg/kg de peso corporal), quando comparado ao grupo tratado com a ranitidina (fármaco referência). A dose de 25mg/Kg de AU apresentou maior inibição da lesão ulcerativa (92,9%). O efeito gastroprotetor do AU pode ser atribuído ao seu efeito redutor contra o dano oxidativo e inibitório na infiltração neutrofílica em estômago de ratos (ODABASOGLU *et al.*, 2006).

Outra atividade comprovada e atribuída foi a sua função antiparasitária. Estudos como o de Sussmann *et al.* (2011) descobriram que o AU possui ação contra o *Plasmodium falciparum*. A ação contra o parasita inibiu a biossíntese de vitamina E, uma molécula importante para o seu desenvolvimento. A avaliação da atividade *in vitro* do AU contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* apontou eficácia no uso desse composto na doença de Chagas, já que este metabólito foi significativamente efetivo em várias concentrações no combate das formas epimastigota e tripomastigota causando danos às mitocôndrias e ao cinetoplasto desse agente etiológico (CARVALHO *et al.*, 2005).

Su *et al.* (2014) observaram que o AU protege a lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos diminuindo as respostas

inflamatórias e o estresse oxidativo. Os resultados do estudo indicaram que o AU diminuiu a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e proteína inflamatória-2 do macrófago (MIP-2). A atividade do AU foi investigada por Pires; Lucarini e Mendes-Giannini (2012) frente à *Candida orthopsilosis* e *Candida parapsilosis* em condições planctônicas e de biofilme. Os resultados apresentados neste estudo foram o primeiro relato afirmando a atividade inibitória e fungicida do AU *in vitro* contra isolados ambientais de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* (PIRES; LUCARINI; MENDES-GIANNINI, 2012).

3.9 Interação entre fármacos

Uma alternativa promissora para o uso terapêutico de compostos naturais e/ou sintéticos com propriedades gastroprotetoras e antiulcerosas é a capacidade desses compostos em exibir o efeito combinado de drogas. A interação potencial entre moléculas onde o uso combinado produz efeito benéfico maior do que a soma dos seus efeitos separadamente possibilita a utilização dessas moléculas simultaneamente resultando numa maior eficácia das suas atividades. O resultado dessa interação pode ser a intensificação, com o aparecimento de efeitos tóxicos, ou a diminuição desses efeitos de uma ou de ambas as drogas. Além disso, pode surgir o aparecimento de um novo efeito que não era possível observar com nenhuma das drogas quando essas estavam sendo utilizadas isoladamente (HINES; MURPHY, 2011; CASCORBI, 2012).

4 ARTIGO

ESTUDO DA INTERAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO COM ÁCIDO ÚSNICO NA GASTROPROTEÇÃO E CICATRIZAÇÃO DE LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS EM RATOS WISTAR

Sandrelli Meridiana de Fátima Ramos dos Santos Medeiros¹, Marllyn Marques da Silva¹,
Silvio Assis de Oliveira Ferreira¹; Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior², Noêmia
Pereira da Silva Santos¹

¹Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (NanoBioCel) – Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil; ²Laboratório de Biotecnologia e Fármacos – Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil

* Autor para correspondência:

Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Centro Acadêmico de Vitória (CAV)

Laboratório de Nanotecnologia Biotecnologia e Cultura de Células

Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista,

55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax)

E-mail: noemia.santos@pq.cnpq.br

Resumo

Contexto e objetivo: Úlceras gástricas é um agravo à saúde pública associada a altas taxas de morbidade e mortalidade. O objetivo deste trabalho foi estudar a propriedade gastroprotetora e antiúlcero-gênica do ácido gálico (AG) e seu possível sinergismo com o ácido úsnico (AU). **Métodos:** A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos (J774) e células embrionárias de rim (HEK-293). A atividade antiúlcero-gênica foi avaliada pelo modelo de lesão gástrica induzida por etanol. O AG (50 e 100 mg/kg) e AU (25 e 50 mg/kg) foram administrados via oral de forma isolada ou em associação (AG:AU – 50:25 mg/kg). A ação gastroprotetora foi avaliada através da quantificação do muco aderido à mucosa gástrica por interpolação de curva padrão de *alcian blue*. **Resultados:** Evidenciou-se que o AG aumentou a proliferação das linhagens celulares (100%), enquanto o AU apresentou redução na viabilidade celular ($24,22 \pm 2,21\%$). Todavia quando associados os compostos (AG:AU), evidenciou-se aumento na viabilidade celular ($95,96 \pm 12,96\%$) nas mesmas concentrações estudadas. Na avaliação antiúlcera, os resultados demonstraram que o AG:AU conseguiu inibir as úlceras gástricas em 98,14% e 99,41% após 3 e 7 dias de tratamento, em comparação ao Lansoprazol (68%). O uso do AG:AU também foi efetivo na manutenção do pH gástrico de forma basal. Na avaliação gastroprotetora, observou-se um aumento significativo na produção de muco ($557,33 \pm 54,44 \mu\text{g/g}$) no grupo tratado com AG:AU. Este valor foi maior que a soma dos resultados dos grupos dos animais que receberam o AG ($136,5 \pm 17,32 \mu\text{g/g}$) e AU ($314 \pm 43,78 \mu\text{g/g}$) isoladamente, sugerindo o efeito sinérgico do uso dos respectivos compostos em associação. **Conclusão:** O efeito combinado dos compostos AG e AU demonstraram resultados gastroprotetores e antiúlcero-gênicos relevantes e apontam, portanto, para um efeito sinérgico.

Palavras-chave: Úlcera Gástrica. Ácido Gálico. Ácido Úsnico. Sinergismo. Gastroprotetor.

Introdução

Apesar da etiologia da úlcera gástrica ainda não ser completamente elucidada é uma patologia que possui taxas de incidência e prevalência relevantes além de ampla distribuição geográfica, possuindo assim, uma importância global econômica e de saúde [1,2].

Diversas alternativas terapêuticas encontram-se disponíveis na indústria farmacêutica para o tratamento de úlceras gástricas. O principal objetivo farmacológico no tratamento é restabelecer a integridade da mucosa gástrica, seja pela inativação dos fatores agressores ou pelo aumento dos fatores defensivos [3]. Apesar da grande efetividade apresentada, esses medicamentos podem ocasionar reações adversas indesejáveis quando utilizados por longos períodos. Dentre essas reações, podem-se citar riscos aumentados de infecções entéricas, trombocitopenia, nefrite intersticial aguda, metabolismo alterado para outros medicamentos, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, reações anafiláticas, ginecomastia, impotência e o desenvolvimento de pólipos gástricos que podem evoluir para câncer gástrico [4-5].

Tendo em vista a magnitude do problema causado pelas úlceras gástricas, os estudos que buscam a incorporação de novos fármacos para sua prevenção e/ou tratamento apresentam grande interesse. Com isso, a investigação de compostos bioativos que apresentem uma propriedade antiúlcera e gastroprotetora se tornou uma alternativa em potencial, tendo como objetivo a diminuição da incidência de lesões e aceleração no processo de reparo tecidual.

Vários estudos relatam que, no campo farmacêutico, a utilização de dois fármacos resulta em uma ação sinérgica das moléculas ativas, aumentando, portanto sua biodisponibilidade e efetivando uma maior atividade biológica [6-7]. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a propriedade gastroprotetora e antiulcerogênica do ácido gálico (AG) em modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol e avaliar o potencial efeito sinérgico com o ácido úsnico (AU) considerando que o ácido gálico e o ácido úsnico surgem como compostos promissores para o tratamento de lesões desta categoria, bem como atuando como agente protetor da mucosa gástrica.

Métodos

Ensaio *in vitro*

Ensaio de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado para assegurar a biocompatibilidade dos compostos testados e foram conduzidos com linhagens de células de macrófagos (J774) e células embrionárias de rim (HEK-293). As células foram conservadas em frascos estéreis em meio de cultura DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's médium*, suplementado com soro fetal bovino (10 %) em associação aos antibióticos: penicilina-estreptomicina (1 %). Estas linhagens foram armazenadas em incubadora de gás CO₂, a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. A suspensão de células foi preparada e inoculada em placas de 96 poços, a uma densidade de 1x10⁴ (HEK-293) e 1x10⁵ (J774) células viáveis por poço, decorridas 24h de incubação, as células foram expostas aos tratamentos durante 24 e 48 horas, nas concentrações finais de 15; 30; 60; 120; 240; 480 µg/mL.

Os compostos testes foram solubilizados em meio de cultura não suplementados e DMSO. Em todos os ensaios foram realizados o controle do solvente DMSO nas mesmas concentrações utilizadas, não ultrapassando de 5%, dessa forma o DMSO foi utilizado como controle positivo. Após o tempo de exposição ao tratamento, foi adicionado em cada poço, 25 µL de solução de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) (5mg/mL), as placas foram incubadas durante 3h. Após a incubação o sobrenadante foi removido e adicionado 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), para diluição dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca, utilizando *Software Gen 5*, versão 2.00.18, a 490 nm. A citotoxicidade foi expressa em percentualidade celular determinada pelo (percentual da população celular tratada x 100 / percentual da população celular não tratada), em comparação ao grupo controle.

Ensaios *in vivo*

Animais

Para avaliação das atividades gastroprotetora e antiulcerogênica do AG e AU isolados ou em associação, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, machos, 80 – 90 dias de idade, com peso corporal entre 250 e 300g. Os animais foram obtidos a partir de cruzamentos realizados no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória-CAV/UFPE. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (23°C ± 2°C) com ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, com água e alimentação “*ad libitum*” (exceto quando mencionado). Dezoito horas antes dos experimentos, a ração foi retirada, mas a água foi oferecida até 1 hora antes de iniciar os procedimentos. Durante o jejum, os animais foram acondicionados em gaiolas com piso elevado para evitar coprofagia. A ortotânasia foi

realizada com a administração intraperitoneal da combinação de anestésicos (75 mg/kg de quetamina associado a 10 mg/kg de xilazina) numa dose 3 vezes maior que a dose padrão citada. Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa estavam em concordância com os Princípios Internacionais para Pesquisa envolvendo Animais (Genebra), e com a legislação brasileira disposta na Lei nº 11.794/2008 (Procedimentos para uso científico de animais). Os protocolos experimentais realizados neste trabalho foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) sob o registro nº 23076.046268/2017-66.

Avaliação da atividade antiulcerogênica

A atividade antiulcerogênica foi avaliada através do modelo de indução aguda de úlcera gástrica induzida por etanol, que mimetiza a úlcera no homem, seguindo a metodologia de Morimoto et al. [8] com modificações. Inicialmente os animais foram colocados em jejum de sólidos e livres acessos à água por 18hs. Uma hora antes do início do experimento, a água foi retirada. Os animais foram randomizados em 7 grupos experimentais (Tabela 1.1) (n=56). Cada grupo experimental (n=8) foi dividido em 2 subgrupos (n=4), que receberam o tratamento em tempos pré-determinados (3 e 7 dias). Após o período de jejum, foram induzidas as úlceras nos animais através da administração de 0,5 mL / 100 g de peso corporal de etanol a 99,3%, via oral, por gavagem. Consecutivamente, 6h após indução da úlcera, os animais foram tratados de acordo com os respectivos grupos determinados: Grupo 1 - controle negativo (solução fisiológica 0,9% (10 mL / Kg)); Grupo 2 - controle positivo, (Lansoprazol (30 mg/kg)); Grupo 3 e 4 - ácido gálico (50 e 100 mg/kg, respectivamente); Grupo 5 e 6 - ácido úsnico (25 e 50 mg/kg, respectivamente); Grupo 7 (ácido gálico (50 mg/kg) + ácido úsnico (25 mg/kg)). Ao final do tratamento, os animais foram submetidos novamente ao jejum e sacrificados utilizando o método de ortotanásia por overdose de anestésicos. Os estômagos foram retirados, pesados, abertos ao longo da curvatura maior e conservados para posterior análise histopatológica. O percentual da face glandular gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*®). As lesões foram expressas em termos de percentagem como Índice de Lesão Ulcerativo (ILU), em relação à área total do corpo gástrico [9].

Determinação da acidez do suco gástrico

O conteúdo gástrico foi coletado para a determinação do pH e da concentração de H⁺ expressa em mEq/mL. Para tanto, todo o estômago foi lavado com 3 mL de água MiliQ (pH 7,12) e recolhido todo o conteúdo gástrico, foi centrifugado a 1500 rpm durante 20 min. Três

mililitros do sobrenadante foi titulado com NaOH 0,1N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base [10].

A concentração de íons de hidrogênio foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Avaliação da Atividade gastroprotetora

Este experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Shay et al. [11]. Neste ensaio foram utilizados 42 animais, randomizados em 7 grupos experimentais (n=6) (Tabela 1.2). Inicialmente os animais foram colocados em jejum de sólidos e livres acessos à água (até 1h antes) por 18h. Após o jejum, os animais foram tratados conforme descrito abaixo: Grupo I – controle positivo (solução fisiológica 0,9% (10 mL / Kg, v.o.)); Grupo II- controle negativo, (Lansoprazol (30 mg/kg, v.o.)); Grupo III e IV- ácido gálico (50 e 100 mg/kg respectivamente, v.o.); Grupo V e VI- ácido úsnico (25 e 50 mg/kg respectivamente, v.o.); Grupo VII (ácido gálico (50 mg/kg, v.o.) + ácido úsnico (25 mg/kg, v.o.)). Decorridos 1h da administração, os animais receberam 0,5 mL / 100g de peso corporal de etanol 99,3% v.o., por gavagem, para induzir a úlcera gástrica. Decorridos 1h destes respectivos tratamentos, os animais foram submetidos à ortotanásia por overdose de anestésico. Os estômagos e duodenos foram retirados, pesados, abertos ao longo da curvatura maior e conservados para posterior análise de quantificação do muco e análises histopatológicas.

Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica

A avaliação da presença de muco aderido à mucosa gástrica foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Raffatullah et al. [12] com modificações. Uma parte da mucosa gástrica (exatamente pesada) foi incubada em 10 ml de solução Alcian Blue 0,1%, onde permaneceu corando por 2 horas. O excesso do corante foi removido com sacarose 0,25 mol / L (duas vezes lavadas sucessivamente). O corante complexado ao muco da parede glandular foi extraído com 5 mL de cloreto de magnésio (0,5 mol / L), agitando-se intermitentemente, cada segmento, por 1 min a cada 30 min durante 2h. Foram misturados 3 mL da solução sobrenadante azul obtida com 3 mL de éter etílico, agitando vigorosamente até a formação de uma solução. A solução foi centrifugada a 3600 rpm durante 10 min para separar a fase aquosa, descartando-se o resíduo. A concentração de *Alcian blue* nas amostras foi determinada por leitura espectrofotométrica a 598 nm, por interpolação na curva padrão do corante e expressa em µg de *Alcian blue* / mL / g de tecido.

Análises histopatológicas da ação gastroprotetora e atividade antiulcerogênica

Os espécimes de tecidos dos estômagos e duodenos dos animais provenientes dos ensaios da atividade antiulcerogênica e ação gastroprotetora foram fixados com formol

neutro tamponado a 10% por no mínimo 24h. As peças foram desidratadas em graduação crescente de etanol, diafanizados pelo xilol, impregnadas e incluídas em parafinas histológicas. Posteriormente as peças foram cortadas em micrótomo ajustado para 4 µm de maneira seriada. Assim, os cortes obtidos foram colocados em lâminas, desparafinizados, desidratados, corados e montados com lamínula; posteriormente, foram mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, por 24h para secagem.

Avaliação Microscópica

Os cortes foram submetidos à técnica de coloração por Hematoxilina-Eosina (H.E.) para análise histopatológica. As imagens histológicas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Nikon-E200), sob o foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 20 campos por lâmina com aumento final de 400x. As fotomicrografias foram avaliadas através do *software ImageJ®* versão 1.44 (*Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*).

O dano na mucosa foi classificado pela atribuição do índice de lesão histológica definida como: (% de dano tipo 0) x 0 + (% de dano tipo I) x 1 + (% de dano tipo II) x 2 + (% de dano tipo III) x 3. Os tipos de danos foram definidos da seguinte forma: dano tipo 0: as células da mucosa pareciam intactas e tinham forma, localização, aparência e densidade normais; dano tipo I: as células epiteliais de superfície e células superiores que revestem as glândulas foram danificadas; dano do tipo II: dano maior que o tipo I mas envolvendo menos de 50% da espessura da mucosa gástrica; e dano tipo III: envolvendo mais de 50% da espessura da mucosa gástrica [13].

Análises estatísticas

Todos os valores foram expressos com a média ± desvio padrão (S.D.) e testes com análise de variância (ANOVA). Os dados foram determinados através de testes de Bonferroni e teste de Dunnet utilizados para o ensaio da citotoxicidade e avaliação do ILU das úlceras gástricas induzidas, respectivamente. Os dados da avaliação microscópica obtidos foram analisados estatisticamente através do teste t de *student* com o intuito de se verificar possíveis diferenças entre os grupos. Para todos, foram adotados o nível de significância de 5% ou $p < 0,05$. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, *GraphPad Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software, San Diego, EUA*).

Resultados

Ensaio de Citotoxicidade

Na avaliação da citotoxicidade, frente às células J774 e HEK-293, o AG, AU e o AG testado em associação com o AU (AG:AU) após 24 e 48 h, apresentaram diferenças significativas entre si, nas concentrações de 15; 30; 60; 120, 240 e 480 µg/mL como mostra a Figura 2.1. Quando as médias de cada grupo foram comparadas as do grupo controle houve diferença significativa nos dois tempos utilizados no tratamento. Foi observado um aumento significativo do número de células viáveis nos grupos AG, nas duas linhagens testadas, apresentando-se acima de 100%. Por outro lado, a viabilidade nos grupos AU foi consideravelmente menor, a linhagem J774 frente ao grupo AU apresentou nas maiores concentrações (240 e 480 µg/mL) viabilidade celular entre (20 a 35%). Em contrapartida, houve aumento significativo na viabilidade dos grupos AG:AU, apresentando-se acima de 100%. A viabilidade celular em todos os grupos foi maior frente à linhagem de células HEK-293, nos dois períodos de tratamento, 24 e 48 h, em relação à linhagem de J774; esse aumento foi significativo em todas as concentrações utilizadas.

Úlceras gástricas induzidas por etanol

As Figuras 2.2 e 2.3 demonstram através das fotografias, as lesões gástricas causadas, com a utilização do etanol como agente agressor, servindo para observação visual e análise das lesões. Em relação às áreas lesionadas dos estômagos dos animais que receberam o etanol, o Lansoprazol (30 mg/kg) usado como controle positivo, causou uma redução no dano gástrico de cerca de 31 % nos dois tempos de tratamento. Por sua vez, o AG após o 3º dia de tratamento, causou inibição de 61,37 % e 73,35 % nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Houve redução significativa nos animais tratados durante 7 dias em que o AG demonstrou inibir o dano gástrico causado pelo etanol em 91,31 % e 86,21 %, nas doses citadas anteriormente (Tabela 1.3). O AU apresentou percentual de inibição significativo em torno de 90 % nos grupos de animais tratados durante 3 dias, nas concentrações de 25 e 50 mg/kg, já os animais tratados durante 7 dias, apresentaram valores de redução ainda mais significativos de 95, 42 % e 97,53 % nas mesmas concentrações, respectivamente. Os grupos de animais que receberam os compostos concomitantemente (AG:AU – 50:25 mg/kg, respectivamente), apresentaram inibição de 98, 14 % ao 3º dia de tratamento e 99, 41 % no 7º dia de tratamento (Figura 2.4).

Avaliação histopatológica da mucosa gástrica

Os resultados referentes à análise histopatológica da mucosa gástrica dos animais estão demonstrados na Figura 2.5. Os grupos de animais que foram tratados durante 3 e 7

dias com o Lansoprazol apresentaram índice de lesão histológico de $194,69 \pm 81,85$ e $167,77 \pm 71,98$ nos respectivos tempos de tratamento. Não houve diferença significativa nos grupos tratados com AG durante 3 e 7 dias. Já nos grupos tratados com AU houve redução nos grupos que foram tratados durante 7 dias correspondendo a $71,70 \pm 18,58$ na dose de (25 mg/kg) e $61,69 \pm 29,14$ na dose de (50 mg/kg). A redução mais significativa apresentada nos resultados corresponde aos animais tratados com AG:AU nos dois tempos de tratamento, em que os valores do índice de lesão histológico correspondem a $66,16 \pm 22,69$ no grupo tratado durante 3 dias e $35,93 \pm 16,91$ no grupo de animais que receberam tratamento durante 7 dias.

Avaliação dos parâmetros bioquímicos da acidez do suco gástrico

A tabela 1.4 relaciona os dados obtidos na avaliação dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal, para determinação da acidez do suco gástrico dos animais experimentais que receberam tratamento após a indução da lesão gástrica provocada pelo etanol. Os resultados demonstram que não houve uma diferença significativa na concentração de H^+ bem como no pH da secreção ácida gástrica com a administração do AG e AU, isolados ou em associação, nos dois tempos de tratamento, 3 e 7 dias, utilizados nesse estudo.

Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica

A Figura 2.6 apresenta a quantificação do *alcian blue* (AB) utilizado como padrão para a construção da curva de calibração. Os dados do AB aderido na mucosa gástrica do estômago dos animais que receberam os tratamentos após a lesão provocada pelo etanol estão expressos na Figura 2.7. Quando comparamos os grupos tratados com o veículo (solução salina 0,9%), utilizado como controle negativo, os resultados mostraram que o Lansoprazol 30 mg/kg, como já era esperado, elevou significativamente a quantidade de muco aderido à mucosa ($390,83 \pm 56,09 \mu\text{g/g}$). O AG causou um aumento discreto na quantidade de muco ($136,5 \pm 17,32$ e $146,5 \pm 38,34 \mu\text{g/g}$) nas duas doses utilizadas (50 e 100 mg/kg), respectivamente. Os animais tratados com AU foram capazes de aumentar de maneira bem mais significativa a produção de muco gástrico secretado pelo estômago tanto na dose de 25 mg/kg com valor relativo de $314 \pm 43,78 \mu\text{g/g}$ quanto na dose de 50 mg/kg ($393,16 \pm 51,92 \mu\text{g/g}$ de tecido). Em comparação ao Lansoprazol, dos animais tratados com AU, apenas o grupo de maior dose (50 mg/kg) apresentou aumento significativo. Por sua vez, o grupo de animais que receberam o AG:AU, simultaneamente, teve um aumento de $557,33 \pm 54,44 \mu\text{g/g}$ em relação ao dois grupos controle citados.

Discussão

Através dos ensaios de citotoxicidade foi possível observar que a presença do AG na cultura de células causou um estímulo para a proliferação celular tanto da linhagem J774 quanto da HEK-293, uma vez que a viabilidade celular apresentou-se maior que 100%. Esse resultado mostra que o AG não apresenta evidência de citotoxicidade frente a linhagens de células testadas indicando uma boa biocompatibilidade nesses testes *in vitro*. Pode-se perceber que o AG auxiliou na proliferação dessas células, o que sugere uma potencial atividade proliferativa desse composto. Este auxílio na proliferação de macrófagos é importante, pois macrófagos ativados aumentam a capacidade de liberar mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos como intermediários de oxigênio e nitrogênio, enzimas hidrolíticas e citocinas que podem ajudar na destruição de antígenos [14]. Esses dados são relevantes, pois apresenta o AG como um possível agente terapêutico promissor no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, tal como as gastrites e úlceras gástricas.

Em contrapartida, os resultados mostram comportamentos diferentes entre o AG e AU, quando comparados separadamente. As diferenças entre as médias de ambos os grupos, nos dois tempos de tratamento foram estatisticamente significativas dentro de cada grupo. Na presença do AU as linhagens celulares, J774 e HEK-293, apresentaram-se com baixa viabilidade celular nas concentrações testadas. A baixa viabilidade do ácido úsnico encontrado nesses resultados corroboram com estudos como o de Lira et al. [15] que avaliou o AU frente a linhagem de J774 e demonstrou a sua baixa biocompatibilidade em concentrações bem menores que as utilizadas nesse estudo (10 a 15 µg/mL), apresentando viabilidade em torno de 50%, confirmando seu efeito tóxico em potencial.

Em relação às médias encontradas nos tratamentos feitos com o grupo AG:AU foi possível observar que, os dois compostos mantiveram uma alta porcentagem de viabilidade celular nas duas linhagens testadas, com mais de 100% em todas as concentrações utilizadas nas células HEK-293. Muitos compostos têm a capacidade de modular a proliferação celular, atuando como agentes citotóxicos, como o AU; por outro lado, podem atuar estimulando o crescimento celular, como é o caso do AG, apresentando potencial, por exemplo, na cicatrização de feridas [16]. Esses compostos utilizados simultaneamente demonstram possíveis efeitos benéficos em potencial do ácido gálico quando utilizado concomitantemente com o ácido úsnico, demonstrando que há uma interação do AG com o AU. Não foi encontrado, ao nosso conhecimento, nenhum estudo voltado para a avaliação da citotoxicidade do AG:AU, sendo este o primeiro trabalho realizado para esse fim.

As análises realizadas nas úlceras gastroduodenais induzidas demonstram que, como pode ser visualizado nas Figuras, nesse modelo de lesão gástrica, são verificadas extensas áreas hemorrágicas e de necrose na mucosa gástrica no grupo do controle

negativo (solução salina 0,9%), comprovando a gastrototoxicidade do etanol, que promove alterações na homeostase causando danos teciduais sobre a mucosa [17]. Os resultados mostraram que a administração do etanol nos animais produziu grande porcentagem de área ulcerada nos valores do índice de lesão ulcerativo (Figura 2.4) nos grupos tratados durante 3 dias em relação aos grupos de animais que receberam tratamento por um período de 7 dias.

Os resultados encontrados demonstram o potencial de reparo tecidual do AG em lesões gástricas corroborando com estudos como de Abdelwahab [18] que avaliou a atividade gastroprotetora do ácido gálico e um novo derivado em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol (5 ml/kg de peso corporal), a administração oral do etanol levou à formação de uma área ulcerada de $394 \pm 35,07 \text{ mm}^2$. O AG causou proteção no endotélio gástrico inibindo a lesão em 52,51 e 60,51 % nas doses de (25 e 50 mg/kg respectivamente) enquanto o seu derivado causou inibição de 61,04 e 75,34 % em doses semelhantes, mostrando redução ou ausência de edema e infiltração de leucócitos na camada submucosa. O ácido gálico e seu derivado exercem efeitos gastroprotetores de maneira dose-dependente.

Por sua vez, estudos como o de Odabasoglu et al. [19] indicam o ácido úsnico, isolado da espécie *Usnea longissima*, capaz de inibir lesões ulcerativas em ratos. As lesões gástricas, induzidas por indometacina, foram reduzidas em todas as doses utilizadas de ácido úsnico (25, 50, 100 e 200 mg/kg), quando comparado ao grupo tratado com a ranitidina, usada como fármaco de referência (50 mg/kg). Nesse estudo, a dose de AU que mais apresentou inibição significativa da lesão ulcerativa foi de 25 mg/Kg correspondendo a 92,9% de inibição.

Os grupos de animais que receberam os compostos concomitantemente (AG:AU – 50:25 mg/kg, respectivamente), inibiu quase que totalmente a lesão gástrica. Com isso, pode-se perceber uma diferença significativa no percentual de inibição quando comparados aos grupos de animais que receberam o AG e o AU separadamente. A redução das lesões gástricas observada neste trabalho comprova o potencial de ambos os compostos (AG e AU) como agente antiulcerogênico e, demonstra que quando estes são administrados simultaneamente possivelmente há uma potencialização na capacidade de redução dessas lesões. O termo sinergia está relacionado à associação de duas ou mais substâncias que possuem efeito biológico maior que a soma dos seus efeitos individuais. Isso se dá pela capacidade de interação química entre essas substâncias o que facilita o seu transporte celular além da sua biodisponibilidade, contribuindo para uma boa ação farmacológica [20]. Dessa forma pode-se sugerir que o AG e AU agiram sobre um mecanismo de potencialização do efeito de forma a proteger a mucosa gástrica dos danos causados pela

administração do etanol. Esta proteção do AG e AU foi confirmada através da análise histológica que será descrita posteriormente (Figura 2.6).

O etanol é capaz de alcançar o epitélio da mucosa através do rompimento da barreira dos fatores pré-epiteliais, causando depleção do muco-bicarbonato, deixando a mucosa exposta à ação proteolítica do suco gástrico e isso reflete na ruptura da parede dos vasos sanguíneos que irrigam a mucosa, causando lesões hemorrágicas distribuídas predominantemente ao longo de toda a porção glandular do estômago, além de poder promover lesões necróticas de maneira multifatorial nesse modelo de indução [21].

Tendo em vista que a atividade do etanol no desenvolvimento das lesões gástricas está relacionada com a redução da barreira de muco, podemos sugerir também que a possível ação do AG e/ou AU possa estar relacionada com o aumento na produção de muco aderido à mucosa gástrica, o que poderia dificultar o contato da mucosa com o agente agressor permitindo assim sua proteção. Dessa forma, a quantificação do muco aderido à mucosa gástrica foi realizada a fim de responder essa hipótese. O aumento da secreção de ácido gástrico também é considerado um fator importante no desenvolvimento da úlcera gástrica. Por isso, a redução das lesões ulcerativas pelo AG e/ou AU poderia estar relacionada, além do aumento da produção do muco, com a diminuição da secreção ácida gástrica, por esse motivo os parâmetros bioquímicos do suco gástrico também foram avaliados.

Através da análise microscópica é possível perceber a capacidade do etanol em induzir alto grau de perda de células epiteliais, edema na superfície da mucosa, hemorragia e infiltração de células inflamatórias no tecido gástrico como já era esperado de acordo com trabalhos anteriores que também utilizaram esse agente agressor, considerado altamente corrosivo na mucosa gástrica [22]. Essa agressão foi confirmada pela evidência dos danos gástricos nos animais tratados com salina 0,9%.

Os animais que receberam tratamento com ácido gálico associado ao ácido úsnico apresentaram diferença microscópica da mucosa lesada, por meio da redução do índice de lesão histológico evidenciando a capacidade de citoproteção dos compostos, esses efeitos foram melhores que o tratamento com o Lansoprazol, usado nesse estudo como fármaco de referência. Através das fotomicrografias coradas em HE foi possível perceber que o tratamento com AG:AU foi capaz de causar reparo das lesões causadas pelo etanol na mucosa pela presença de regeneração das lesões, que foram usadas na análise morfométrica, nos dois tempos de tratamento (3 e 7 dias).

A secreção ácida do estômago é regulada de forma independente por algumas vias como a do sistema nervoso central e sistema nervoso entérico além de células neuroendócrinas e imunes, que atuam na modulação hormonal e parácrina [23]. A interação da histamina, gastrina e acetilcolina com seus receptores nas células parietais são

responsáveis pela ativação da bomba de prótons, enzima responsável pela secreção de H^+ que confere o pH ácido ao suco gástrico. Por esse motivo se avaliou o potencial inibitório do AG e AU que poderia estar causando a proteção gástrica por diminuir fatores agressores da mucosa, nesse caso a acidez.

Segundo Chari, Teyssen e Singer [24], dependendo da concentração alcoólica utilizada ocorrem processos fisiológicos diferentes quando o álcool entra em contato com o suco gástrico. Este agente ulcerogênico em baixas concentrações (5 a 20%) aumenta a motilidade e promove um rápido esvaziamento gástrico. Entretanto quando o etanol é utilizado em graduação alta (acima de 50%) atrasa o esvaziamento gástrico [25] e promove danos cáusticos possibilitando lesões profundas, ocasionando estase e ruptura da parede dos vasos sanguíneos.

Para abrandar os efeitos do agente ulcerogênico, o Lansoprazol desencadeia um processo de inativação da secreção do H^+ mantendo por mais tempo o conteúdo gástrico dentro do lúmen estomacal. Ichikawa et al. [26], mostraram que os fármacos que inibem a secreção ácida no estômago interagem e permeiam a ligação glicoproteica do muco, retardando o coeficiente de difusão. Dessa forma sugere-se que o Lansoprazol não só inibem a secreção de ácido, mas também promove ações de proteção da mucosa gástrica, através do aumento da biossíntese da mucina.

Os resultados encontrados nos parâmetros bioquímicos de acidez demonstram que a ação gastroprotetora de ambos os compostos, AG e AU, possivelmente está relacionada com mecanismos diferentes da etapa final da produção do ácido gástrico, ou seja, sobre um efeito inibitório direto na atividade da bomba da enzima $H^+/K^+/ATPase$, a bomba de prótons das células parietais.

Quando a barreira de muco é afetada pela administração do etanol, o epitélio gástrico torna-se altamente sensível a presença de ácido produzido pelo estômago [27] levando ao surgimento das úlceras gástricas. O *alcian blue* (AB) foi escolhido como padrão para a construção da curva de calibração, por ser um corante específico para mucinas ácidas, à proteção criada pelo muco ligado ao tecido pode ser observada pela formação de mucopolissacarídeos solúveis, os quais são quantificados de acordo com a ligação do *alcian blue* ao muco do estômago [28].

O grupo AG:AU apresentou o aumento de maior significância comparado aos dois grupos controles utilizados nesse estudo. Além disso, o resultado encontrado corresponde a um valor maior que a soma da produção de muco nos grupos AG e AU analisados isoladamente, podendo-se afirmar que houve um efeito sinérgico na ação gastroprotetora desses dois compostos. Isso revela que em associação esses compostos causam uma gastroproteção ao estômago sendo capazes de preservar a camada e o esgotamento de

muco contra a agressão causada pelo etanol, além de diminuir o grau de ulceração, com muito mais eficácia do que usados isoladamente.

A barreira mucoide gástrica desempenha um papel importante no mecanismo de defesa contra úlcera gástrica, pois forma um muco contínuo semelhante a um gel, essa superfície mucoide mantém um pH em torno de 6-7, protegendo a mucosa do meio ácido (pH 1-2) [29], contra a colonização bacteriana e as forças mecânicas da digestão proteolíticas, além de agir como um antioxidante reduzindo os danos causados pelos radicais livres. A qualidade (espessura) e quantidade da secreção do muco gástrico são os critérios mais importantes para a determinação do estado dessa barreira mucolítica na defesa das injúrias promovidas pelo ácido e por ação da pepsina, o que impede a retrodifusão de íons H^+ na mucosa gástrica e possibilita a neutralização da acidez luminal [30]. O muco tem a capacidade de sequestrar radicais livres, devido sua composição glicoproteica [27].

Através desses resultados podemos observar que de alguma forma estas vias envolvidas na secreção de muco gástrico podem estar sendo ativadas com a utilização dos ácidos gálico e úsnico. Dessa forma, pode-se sugerir que a ação citoprotetora do ácido gálico em associação com o ácido úsnico pode ser possivelmente pela interação com a camada aderente de muco gástrico sendo mediada através da estimulação da secreção de muco e bicarbonato. Nesse sentido, estudos voltados para avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção causado pelos ácidos gálico e úsnico se fazem necessários. Os efeitos em potencial do ácido gálico em associação com ácido úsnico se mostraram inovadores, pois se trata de compostos com atividade gastroprotetora já comprovada em outros estudos, mas que ainda não tinham sido avaliados em associação.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro, concedido como bolsa de Pós-graduação em nível de mestrado.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências Bibliográficas

1. Carvalho AST. Úlcera péptica. *J Ped.* 2000;76:127–134.
2. Arrais PSD, Coelho HLL, Batista MCDS, Carvalho ML, Righi RE, Arnau JM. Perfil da automedicação no Brasil. *Rev Sau Pub.* 1997;31:71–77.

3. Beserra AMSES, Calegari PI, Souza MDC, dos Santos RAN, Lima JCDS, Silva RM, ... & Martins DTDO. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. *J Agric Food Chem*. 2011;59:6957–6965.
4. Donatini RS, Ishikawa T, Barros SBM, Bacchi EM. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Rev Bras Farmacog*. 2009;19:89–94.
5. Chubineh S, Birk J. Proton pump inhibitors: the good, the bad, and the unwanted. *Sout Med J*. 2012;105:613–618.
6. Cascorbi I. Drug interactions-principles, examples and clinical consequences. *Deut Arzt Intern*. 2012;109:546–556.
7. Segatore B, Bellio P, Setacci D, et al. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. *Phytomed*. 2012;19:341–347.
8. Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Japan J Pharmacol*. 1991;57:495–505.
9. Szelenyi I, Thiemer K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Arch Toxicol*. 1978;41:99–105.
10. Domer FR, Springfiel CC. Animal Experiments in Pharmacological Analysis. *J Pharma Sci*. 1971;60:1279.
11. Shay H, Komarov AS, Fels SS, Marenze D, Grunstein M, Siple H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol*. 1945;5:43–61.
12. Raffatullah S, Tariq M, Al-Yahya MA, Mossa JS, Ageel AM. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *J Ethnopharmacol*. 1990;29:25–34.
13. Lacy ER, Ito S. Microscopic Analysis of Ethanol Damage to Rat Gastric mucosal After Treatment With a Prostaglandin. *Gastroenterol*. 1982;83:619–625.
14. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Euro J Clin Invest*. 1991;21:361–374.

15. Lira MCB, Siqueira-Moura MP, Rolim-Santos HML, et al. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Lipo Res.* 2009;19:49–58.
16. Biskup E, Gołębiowski M, Gniadecki M, Stepnowski P, Lojkowska E. Triterpenoid α -amyrin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. *Bioch Pol.* 2012;59:255–260.
17. Rozza AL, Moraes TM, Kushima H, et al. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, 106 nitric oxide and prostaglandina E₂. *Chem-Biol Inter.* 2011;189:82–89.
18. Abdelwahab, SI. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: Involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. *Inter Immunopharmacol.* 2013;16:296–305.
19. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* 2006;103:59–65.
20. Wagner H, Ulrich-Merzenich G, Sucher N, Wang ZJ, Awang DVC. Synergy research: natural products for rational comedication with chemotherapeutics and antibiotics. *Phytomed.* 2010;18:1-1.
21. Arawwawala LDAM, Thabrew MI, Arambewela LSR. Gastroprotective activity of *Trichosanthes cucumerina* in rats. *J Ethnopharmacol.* 2010;127:750–754.
22. Silva AAR, Bezerra MM, Chaves HV, et al. Protective effect of *Chresta martii* extract on ethanol-induced gastropathy depends on alpha-2 adrenoceptors pathways but not on nitric oxide, prostaglandins or opioids. *Journal of Ethnofarmacology.* 2012;142:206–212.
23. Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011;27:536–542.
24. Chari S, Teyssen S, Singer MV. Alcohol and gastric acid secretion in humans. *Gut.* 1993;34:843–847.
25. Pfeiffer A, Hogl B, Kaess H. Effect of ethanol and commonly ingested alcoholic beverages on gastric emptying and gastrointestinal transit. *J Mol Med.* 1992;70:487–491.
26. Ichikawa T, Ishihara K, Saigenji K, Hotta K. Stimulation of mucus glycoprotein biosynthesis in rat gastric mucosa by gastrin. *Bioch Pharmacol.* 1993;46:1551–1557.

27. Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protections: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev.* 2008;88:1547–1565.
28. Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MSA, Lima TCM. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Campinas: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais – SBPM, UNIFESP-SP; 2008.
29. Zakaria ZA, Balan T, Suppaiah V, Ahmad S, Jamaludin F. Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of *Muntigia calabura*. *J Ethnopharmacol.* 2014;151:1184–1193.
30. Rachchh MA, Jain SM. Gastroprotective effect of *Benincasa hispida* fruit extract. *Ind J Pharmacol.* 2008;40:271–275.

Tabela 1.1 – Avaliação da atividade antiulcerogênica do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) de acordo com os respectivos grupos e tratamentos.

Grupos	Subgrupos	Tratamentos	Dose (mg/kg)	Tempo (dias)	Animais (n)
Grupo 1- Controle Negativo	G1a	Solução fisiológica 0,9%	-	3	4
	G1b			7	4
Grupo 2- Controle Positivo	G2a	Lansoprazol	30	3	4
	G2b			7	4
Grupo 3	G3a	Ácido gálico	50	3	4
	G3b			7	4
Grupo 4	G4a	Ácido gálico	100	3	4
	G4b			7	4
Grupo 5	G5a	Ácido úsnico	25	3	4
	G5b			7	4
Grupo 6	G6a	Ácido úsnico	50	3	4
	G6b			7	4
Grupo 7	G7a	Ácido úsnico +	25/50	3	4
	G7b	Ácido gálico		7	4
Total de animais					56

Tabela 1.2 – Avaliação da ação gastroprotetora do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) de acordo com os respectivos grupos e tratamentos.

Grupos	Tratamentos	Dose (mg/kg)	Animais (n)
Grupo I	Solução fisiológica 0,9%	-	6
Grupo II	Lansoprazol	30	6
Grupo III	Ácido gálico	50	6
Grupo IV	Ácido gálico	100	6
Grupo V	Ácido úsnico	25	6
Grupo VI	Ácido úsnico	50	6
Grupo VII	Acido úsnico +	25/	6
	ácido gálico	50	
Total de Animais			42

Tabela 1.3 – Efeito da administração oral do Lansoprazol e dos ácidos gálico (AG) e úsnico (AU) em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos

	Dose	ILU	Inibição	ILU	Inibição
Tratamento	(mg/kg)	(3 dias)	(%)	(7 dias)	(%)
Salina	-	64,75 ± 15,43***	-	42 ± 9,34*	-
Lansoprazol	30	31,75 ± 2,98	68,25	31,25 ± 4,11	68,75
AG	50	38,63 ± 11,29	61,37	8,69 ± 3,76***	91,31
	100	26,65 ± 3,58	73,35	13,79 ± 1,48***	86,21
AU	25	9,53 ± 1,92**	90,47	4,58 ± 2,24***	95,42
	50	10,71 ± 2,33**	89,29	2,47 ± 0,72***	97,53
AG:AU	50:25	1,86 ± 0,19***	98,14	0,59 ± 0,83***	99,41

Os valores são apresentados como a média ± S.D. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 para todos os grupos comparados ao Controle positivo (Lansoprazol 30 mg/kg). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

Tabela 1.4 – Efeito da administração oral do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) sobre os parâmetros bioquímicos de acidez no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	pH	[H ⁺]	pH	[H ⁺]
		(3 dias)	mEq/mL	(7 dias)	mEq/ML
Veículo	-	2,64 ± 0,04	2,2 ± 0,2	2,77 ± 0,23***	1,7 ± 0,7***
Lansoprazol	30	2,64 ± 0,17	2,3 ± 0,8	2,41 ± 0,05	3,8 ± 0,3
AG	50	2,44 ± 0,09*	3,6 ± 0,7*	2,55 ± 0,18	2,8 ± 0,8
	100	2,79 ± 0	1,6 ± 0	2,46 ± 0,18	3,5 ± 1,2
AU	25	2,58 ± 0,12	2,6 ± 0,7	2,43 ± 0,10	3,7 ± 0,6
	50	2,58 ± 0,14	2,6 ± 0,6	2,41 ± 0,08	3,9 ± 0,7
AG: AU	50:25	2,60 ± 0,11	2,5 ± 0,5	2,45 ± 0,13	3,5 ± 0,1

Os valores são apresentados como a média ± S.D. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 para todos os grupos comparados ao Controle positivo Lansoprazol.

Legendas de Figuras

Figura 2.1 – Citotoxicidade do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) frente a células indiferenciadas de macrófagos (J774) e células embrionárias de rim (HEK-293). A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 48 horas na densidade de (1×10^5) células/ml para J774 e 1×10^4 células/ml para HEK-293). As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido do teste de Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ para todos os grupos em comparação com o Controle (DMSO).

Figura 2.2 – Imagens dos estômagos dos ratos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol após 3 dias de tratamento. Os animais foram tratados com solução salina 0,9% (C-), Lansoprazol – 30 mg/kg (C+), ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) em diferentes concentrações.

Figura 2.3 – Imagens dos estômagos dos ratos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol após 7 dias de tratamento. Os animais foram tratados com solução salina 0,9% (C-), Lansoprazol – 30 mg/kg (C+), ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) em diferentes concentrações.

Figura 2.4 – Efeitos do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) sobre a área ulcerada no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol após 3 e 7 dias de tratamento: índice de lesão ulcerativo. Veículo (-): solução fisiológica 0,9%; Controle positivo (+): Lansoprazol (30 mg/kg). Os dados são apresentados como a média $\pm$ S.D. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido do teste de Dunnett * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ para todos os grupos em comparação ao Controle positivo.

Figura 2.5 – Efeitos do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) sobre a área ulcerada no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol após 3 e 7 dias de tratamento: índice de lesão histológico. Veículo (-): solução fisiológica 0,9%; Controle positivo (+): Lansoprazol (30 mg/kg). Os dados são apresentados como a média $\pm$ S.D. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ para todos os grupos em comparação ao Controle positivo.

Figura 2.6 – Curva de calibração do *Alcian blue*, utilizado para quantificação da produção de muco aderido à mucosa gástrica no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol.

Figura 2.7 – Efeito da administração oral do ácido gálico (AG) e/ou ácido úsnico (AU) sobre a produção de muco na mucosa gástrica de ratos no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol. Veículo: solução fisiológica 0,9%; Lansoprazol (30 mg/kg). Os dados são apresentados como a média $\pm$ S.D. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ para todos os grupos em comparação ao Lansoprazol; ^a $P < 0,05$, ^{aa} $P < 0,01$ e ^{aaa} $P < 0,001$ para todos os grupos comparados ao Veículo.

Figura 2.1

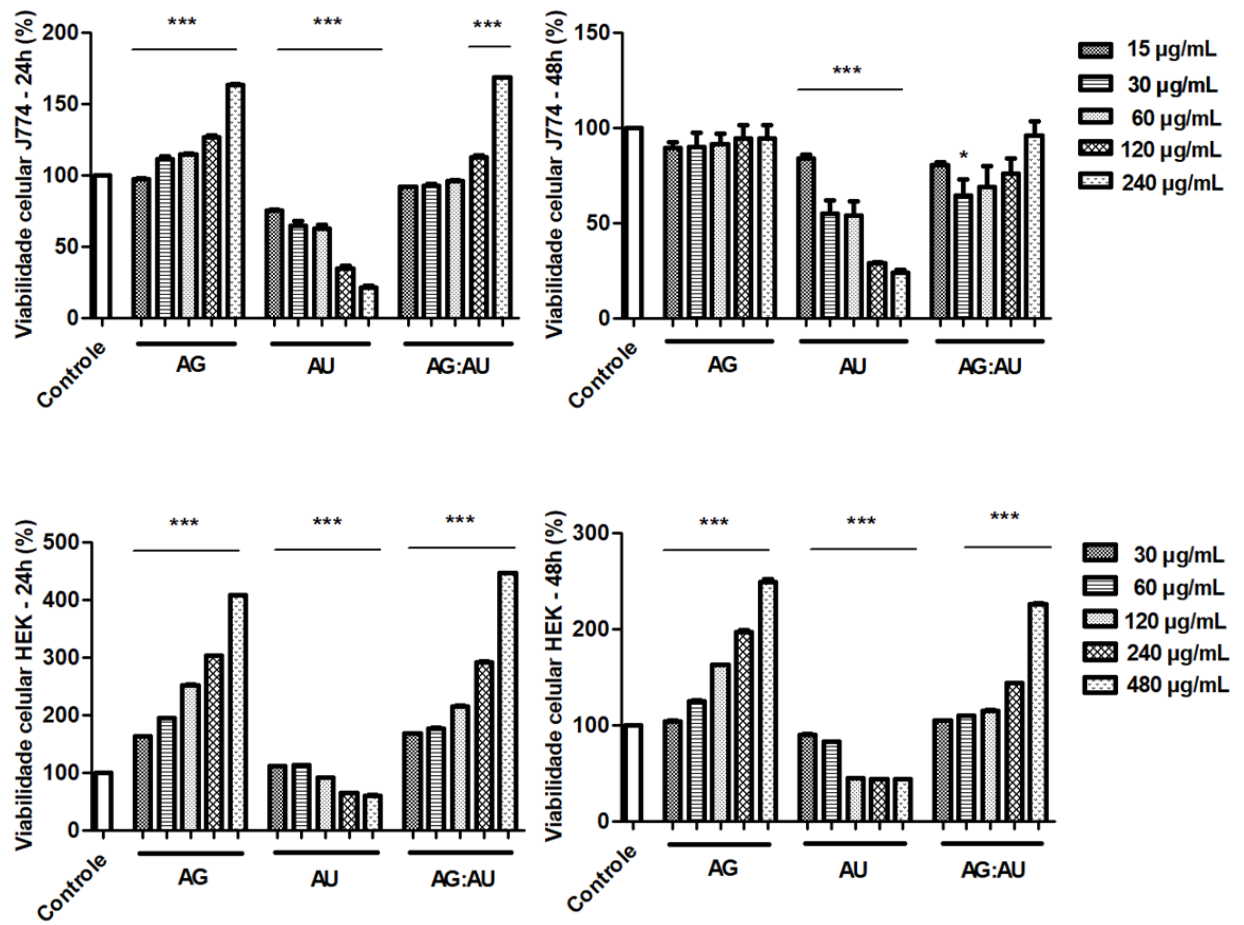


Figura 2.2

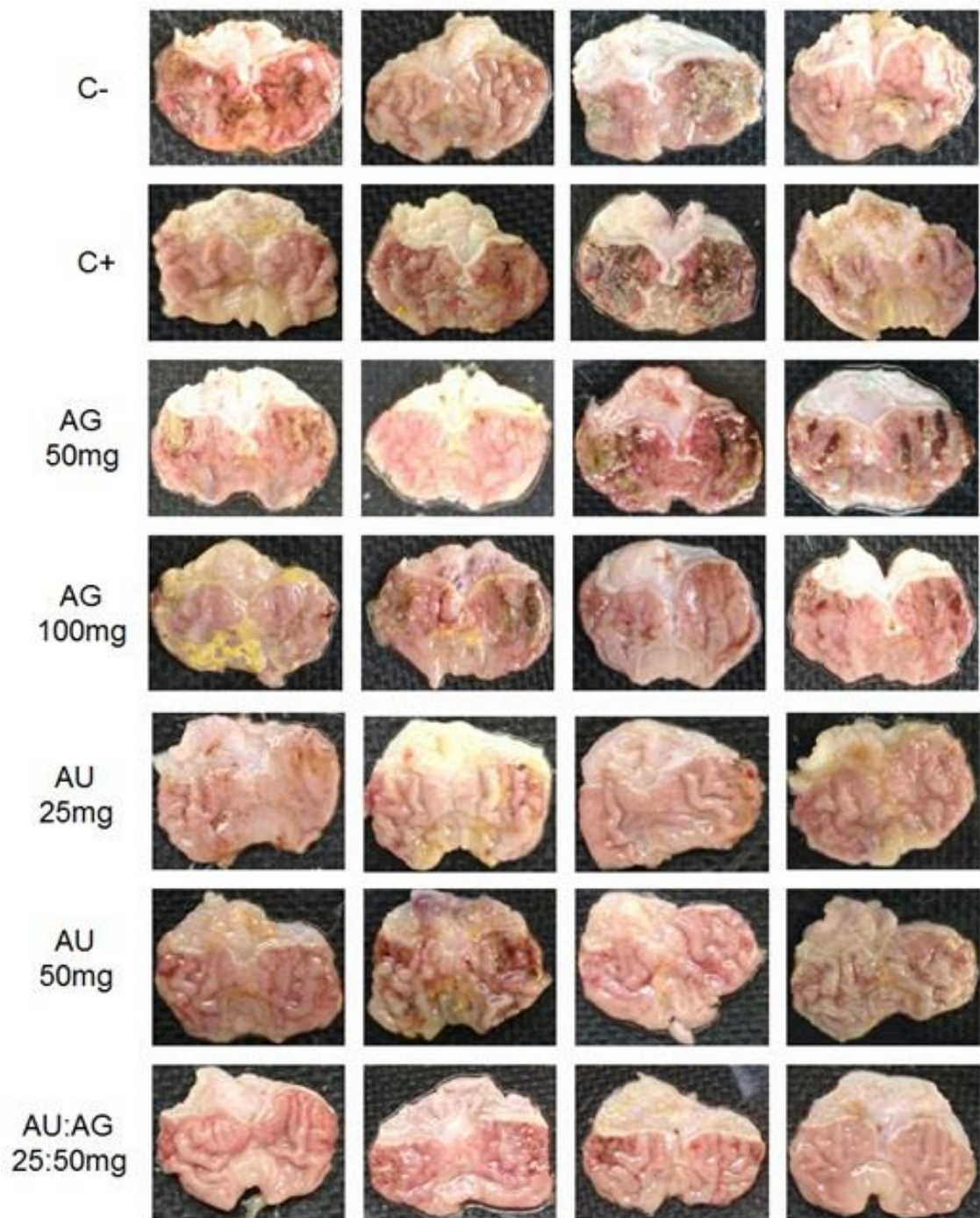


Figura 2.3

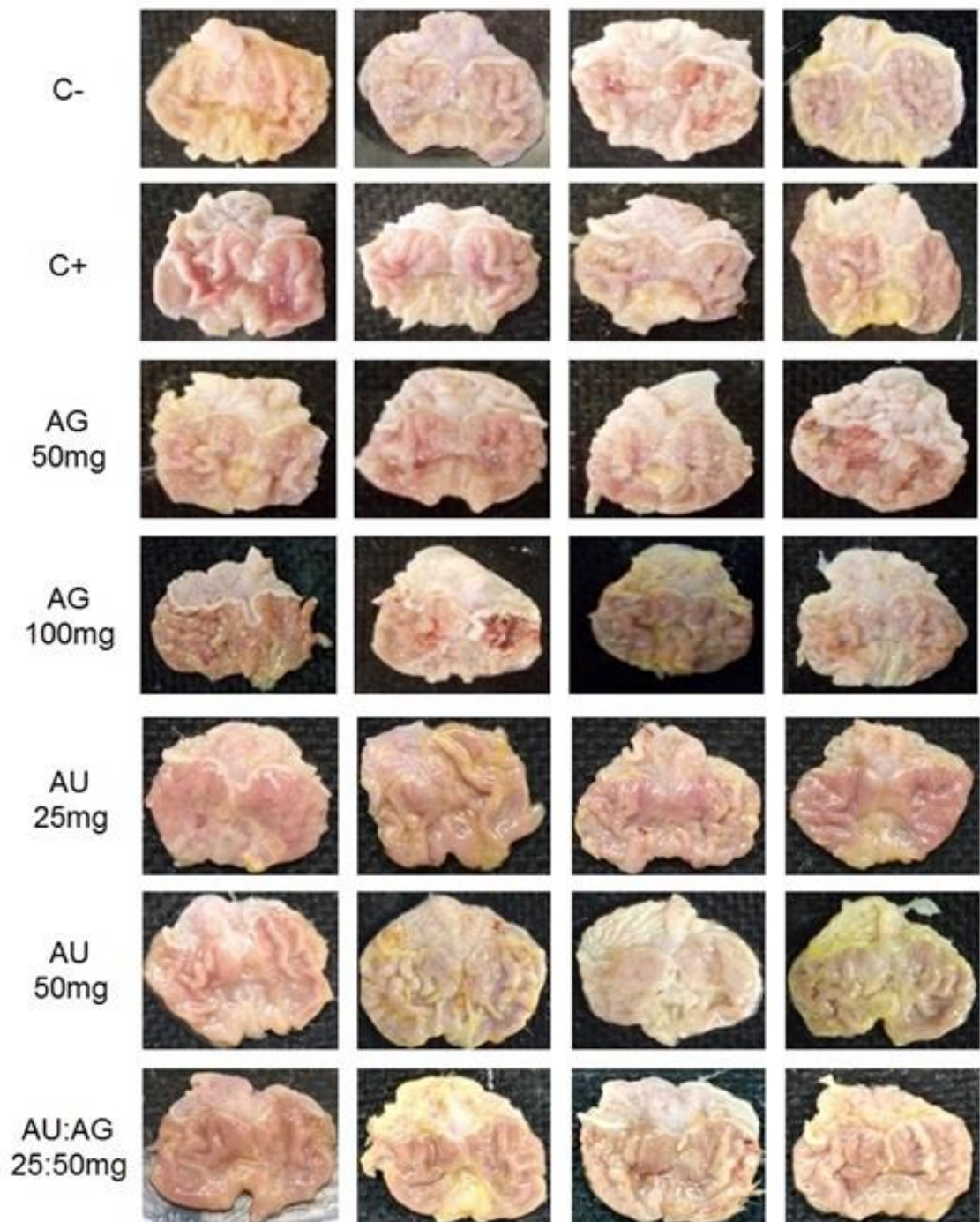


Figura 2.4

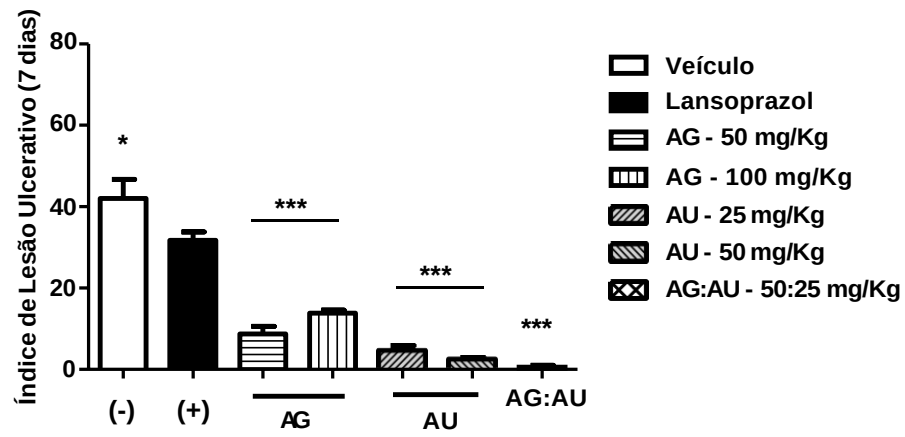
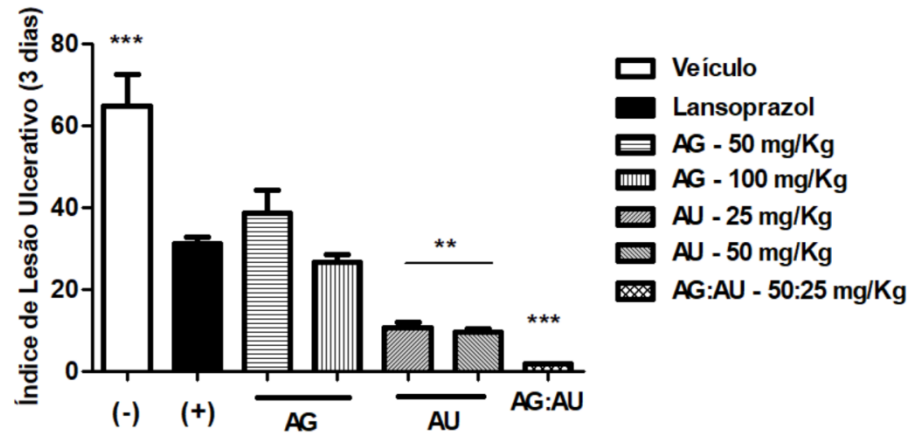


Figura 2.5

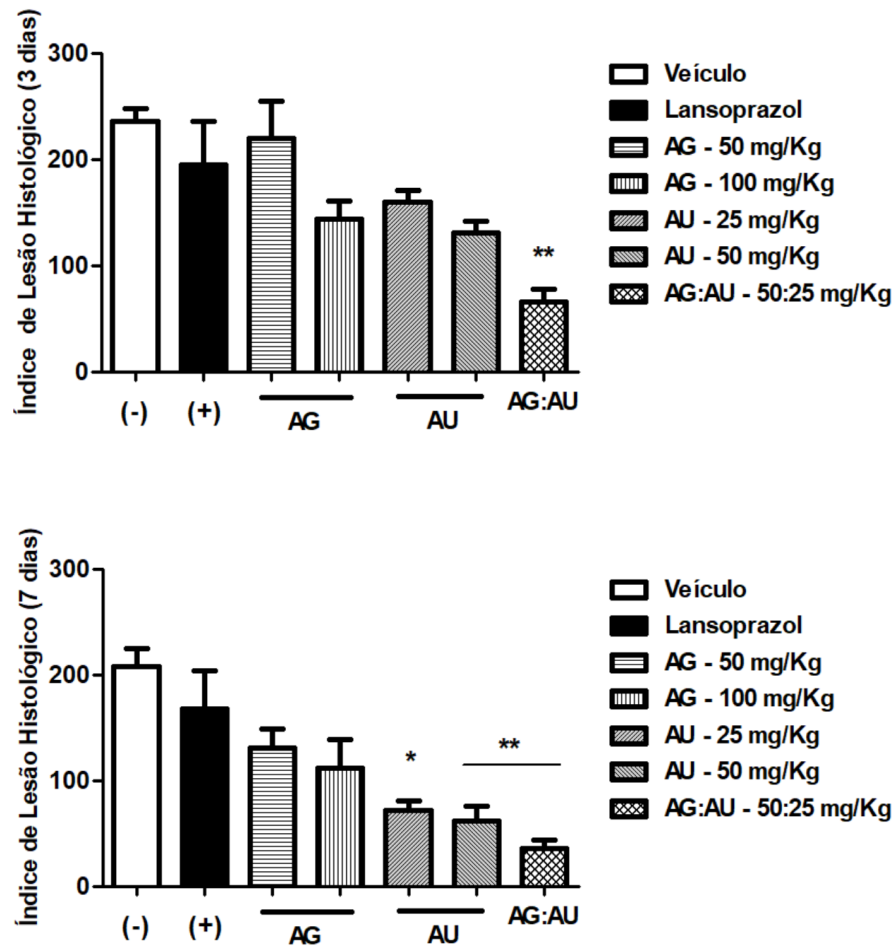


Figura 2.6

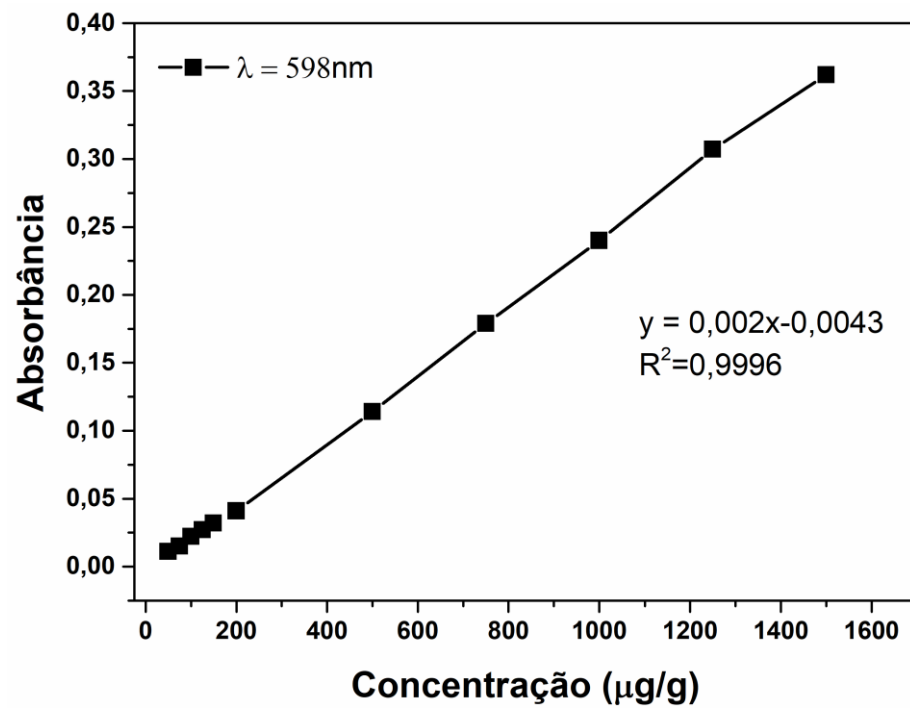
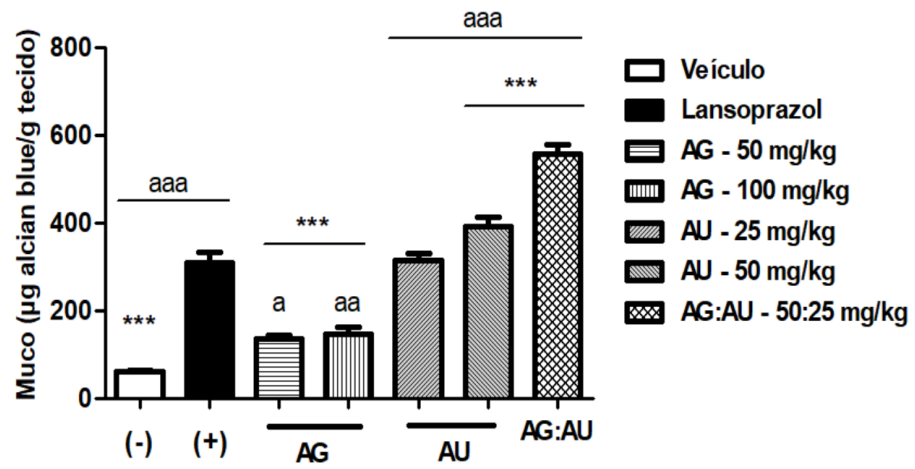


Figura 2.7



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios de citotoxicidade frente às linhagens de células indiferenciadas J774 e HEK-293 demonstraram que o ácido gálico administrado isoladamente proporcionou aumento na viabilidade celular, diferente do ácido úsnico. O efeito combinado dos ácidos apontou um aumento na viabilidade frente às duas linhagens testadas, demonstrando que existe sinergismo entre os dois compostos.

Ambos os ácidos, gálico e úsnico, apresentam atividade gastroprotetora e antiulcerogênica. Os dois compostos produziram aumento significativo no percentual de regeneração do epitélio da mucosa nos animais submetidos à lesão gástrica induzida por etanol e, esse resultado foi ainda mais significativo no grupo de animais tratados com os compostos associados. Os ácidos gálico e úsnico demonstraram ainda manter a medida do pH de forma basal ou levemente aumentada assim como no fármaco de referência utilizado, sem diminuição significativa na acidez da secreção gástrica.

Considerando a quantificação da produção de muco aderido à mucosa gástrica verificou-se o efeito citoprotetor gástrico promovido pelo ácido gálico e ácido úsnico, possivelmente associado ao aumento significativo da produção da barreira mucolítica, este pode ser um dos possíveis mecanismos de ação pelo qual esses compostos atuam protegendo a mucosa gástrica.

Diante de todos os parâmetros avaliados neste trabalho, pode-se concluir que os efeitos em potencial do ácido gálico em associação com ácido úsnico se mostraram inovadores, pois se trata de compostos com atividade gastroprotetora já comprovada em outros estudos, mas que ainda não tinham sido avaliados simultaneamente. Os resultados obtidos mostram-se relevantes, pois fornecem evidências da gastroproteção e do potencial de reparo causados pelos ácidos gálico e úsnico, porém são necessários estudos adicionais que investiguem a interação mostrando os mecanismos de ação envolvidos sobre a capacidade dos compostos agirem conjuntamente.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.A.S.; MELO, M.G.D.; RABELO, T.K.; NUNES, P.S.; SANTOS, S.L.; SERAFINI, M.R.; GELAIN, D. P. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 29, n. 23, p. 2167-2180, 2015.
- ARAÚJO, A.A.S.; MELO, M.G.D.; RABELO, T.K.; NUNES, P.S.; SANTOS, S.L. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 29, n. 23, p. 2167-2180, 2015.
- ASALI, A. M.; ALGHAMDI, M.A.; FALLATAH, S. A.; ALHOLAILY, W. A.; ALDANDAN, R.G.; ALNOSAIR, A. H.; ALHARBI, R. A. Risk factors leading to peptic ulcer disease: systematic review in literature. **International Journal of Community Medicine and Public Health**, Ahmedabad, v. 5, n. 10, p. 4617-4624, 2018.
- ASOKKUMAR, K.; SEN, S.; UMAMAHESWARI, M.; SIVASHANMUGAM, A. T.; SUBHADRADEVI, V. Synergistic effect of the combination of gallic acid and famotidine in protection of rat gastric mucosal. **Pharmacological reports**, Kraków, v. 66, n. 4, p. 594–599, 2014.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **Rsc Advances**, Cambridge, v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015.
- BAZIN, M.A.; LAMER, A.C.L.; DELCROS, J.G.; ROUAUD, I.; URIAC, P.; BOUSTIE, J.; CORBEL, J.C.; TOMASI, S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.16, n. 4, p. 6860-6866, 2008.
- BENNETT, J.C.; CALDWELL, S.T.; MCPHAIL, D.B.; MORRICE, P.C.; DUTHIE, G.G.; HARTLEY, R.C. Potential therapeutic antioxidants that combine the radical scavenging ability of myricetin and the lipophilic chain of vitamin E to effectively inhibit microsomal lipid peroxidation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 12, n. 9, p. 2079-2098, 2004.
- BESERRA, A.M.S.E.S.; CALEGARI, P.I.; SOUZA, M.D.C.; SANTOS, R.A.N.; LIMA, J.C.D.S.; SILVA, R.M.; MARTINS, D.T.D.O. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 13, p. 6957-6965, 2011.
- BILICI, M.; OZTURK, C.; DURSUN, H.; ALBAYRAK, F.; SAGLAM, M.B.; UYANIK, A.; GULABOGLU, M.; TEKIN, S.B. Protective Effect of Mirtazapine on Indomethacin-Induced Ulcer in Rats and Its Relationship with Oxidant and Antioxidant Parameters. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 54, n. 9, p. 1868-1875, 2008.
- BODE, C.; BODE, J.C. Alcohol's Role in Gastrointestinal Tract Disorders. **Alcohol Health & Research World**, Rockville, v. 21, n. 1, p. 76-83, 1997.
- BOEGH, M.; NIELSEN, H.M. Mucus as a barrier to drug delivery—understanding and mimicking the barrier properties. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Oxford, v. 116, n. 3, p. 179-186, 2015.

BOLIGON, A.A.; FREITAS, R.B.; BRUM, T.F.; WACZUK, E.P.; KLIMACZEWSKI, C.V.; ÁVILA, D.S.; ... & de FREITAS BAUERMANN, L. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Amsterdam, v. 4, n. 5, p. 358-367, 2014.

BRISDELLI, F.; PERILLI, M.; SELLITRI, D.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; NICOLETTI, M.; BOZZI, A.; AMICOSANTE, G.; CELENZA, G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. **Phytotherapy Research**, London, v. 25, p. 431-437, 2012.

BRUNEAU, E. Basic Anatomy and Physiology of the Gastrointestinal Tract. In: _____. **Passing the Certified Bariatric Nurses Exam**. NewYork: Springer, 2017. p. 19-25.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12.ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 2112p.

BUDAVARI, S. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. In: _____. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12. ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck & Co. Inc., 1996. 360 p.

CARLSON, T.L.; LOCK, J.Y.; CARRIER, R.L. Engineering the mucus barrier. **Annual review of biomedical engineering**, Palo Alto, v. 20, p. 197-220, 2018.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G. SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, Curitiba, PR, 2004. p 443-459.

CARVALHO, E.A.B.; ANDRADE, P.P.; SILVA, N.H.; PEREIRA, E.C.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, Oxford, v. 36, n. 2, p.155-161, 2005.

CASCORBI, I. Drug interactions-principles, examples and clinical consequences. **Deutsches Arzteblatt International**, Cologne, v. 109, n. 33-34, p. 546-556, 2012.

CASTRO, G.A.; CARVALHO, J.E.; TINTO, S.V.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V.C.; Anti-ulcerogenic effect of a whey protein isolated and collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions on oral administration to rats. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 13, n. 1, p. 83-90, 2010.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P.L.; SAVA, G. A review on usnic acid, na interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, n. 4, p. 137-146, 2002.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C.A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Atheneu, 2007.

DIAS, A.; GARCIA, C.; MAJEWSKI, M.; WALLNER, G.; MCCALLUM, R.W.; POPLAWSKI, C.; SAROSIEK, J. Gastric juice prostaglandins and peptide growth factors as potential markers of chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia and gastric cancer: their potential clinical implications based on this pilot study. **Digestive diseases and sciences**, New York, v. 56, n. 11, p. 3220-3225, 2011.

- DÍAZ-GÓMEZ, R.; LÓPEZ-SOLÍS, R.; OBREQUE-SLIER, E.; TOLEDO-ARAYA, H. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 54, n. 2, p. 331-335, 2013.
- DÍAZ-GOMEZ, R.; TOLEDO-ARAYA, H.; LOPEZ-SOLÍS, R.; OBREQUE-SLIER, E. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 59, n. 2, p. 896-900, 2014.
- DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal Mucosal Defense. **Current Opinion Gastroenterology**, London, v. 22, n. 6, p. 599–606, 2006.
- FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; BLANDIZZI, C. Pathophysiology of gastric ulcer development and healing: molecular mechanisms and novel therapeutic options. *In*: _____. **Peptic ulcer disease**. London. ntechOpen, 2011.
- FRANCOLINI, P.; NORRIS, A.; PIOZZI, G.; DONELLI, P.; STOODLEY, P. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, New York, v. 48, n. 11, p. 4360-4365, 2004.
- GALLI, F. Interactions of polyphenolic compounds with drug disposition and metabolism. **Current Drug Metabolism**, Boca Raton, v. 8, n. 8, p. 830–838, 2007.
- GOO, T.; AKIBA, Y.; KAUNITZ, J.D. Mechanisms of intragastric pH sensing. **Currenty Gastroenterology Reports**, Philadelphia, v.12, n. 6, p. 465-470, 2010.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia médica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HATAZAWA, R.; TANAKA, A.; TANIGAMI, M.; AMAGASE, K.; KATO, S.; ASHIDA, Y.; TAKEUCHI, K. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. **AJP Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 293, n. 4, p. G788-G797, 2007.
- HIB J. DI FIORE **Histologia**. Texto e Atlas. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003.
- HINES, L.E.; MURPHY, J.E. Potentially Harmful Drug–Drug Interactions in the Elderly: a Review. **The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**, Hillsborough, v. 9, n. 6, p. 364-377, 2011.
- HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. *In*: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2005, p. 757-768.
- INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, Toronto, v. 61, n. 7, p. 729-736, 2002.
- JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 1181-1205, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 283-316.

KANGWAN, N.; PARK, J.M.; KIM, E.H.; HAHM, K.B. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World Journal Gastrointestinal Pathophysiology**, Beijing, v. 5, n. 1, p. 40, 2014.

KATO, S.; TANAKA, A.; KUNIKATA, T.; MIZOGUCHI, H.; TAKEUCHI, K. The roles of nitric oxide and prostaglandins in alterations of ulcerogenic and healing responses in adjuvant-induced arthritic rat stomachs. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 18-25, 2000.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. Effect of reactive oxygen species action on gastric mucosal in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Kraków, v. 53, n.1, p. 39-50, 2002.

KWIECIEN, S.; JASNOS, K.; MAGIEROWSKI, M.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; BRZOZOWSKI, R.; MACH, T.; WOJCIK, D.; BRZOZOWSKI, T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Kraków, v. 65, p. 613-622, 2014.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.

LALOO, D., PRASAD, S., SAIRAM, K.; HEMALATHA, S. Gastroprotective activity of polyphenolic-rich extract of *Potentilla mooniana*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 52, n. 12, p. 1532-1542, 2014.

LANDA, S.T.; DUMON, K.R.; DEMPSEY, D.T. Anatomy and Physiology of the Stomach and Pylorus. *In*: _____. **The SAGES Manual of Foregut Surgery**. New York: Springer, 2019. p. 49-64.

LI, L.F.; CHAN, R.L.Y.; LU, L.; SHEN, J.; ZHANG, L.; WU, W.K.K.; WANG, L.; HU, T.; LI, M.X.; CHO, C.H. Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: the causal relationship and underlying molecular mechanisms (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 34, n. 2, p. 372-380, 2014.

LIELEG, O.; RIBBECK, K. Biological hydrogels as selective diffusion barriers. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 21, n. 9, p. 543-551, 2011.

LIU, Y.H.; ZHANG, Z.B.; ZHENG, Y.F.; CHEN, H.M.; YU, X.T.; CHEN, X.Y.; ZHANG, X.; XIE, J.H.; SU, Z.Q.; FENG, X.X.; ZENG, H.F.; SU, Z.R. Gastroprotective effect of andrographolide sodium bisulfite against indomethacin-induced gastric ulceration in rats. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 26, n.2, p. 384-391, 2015.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 60, p. 233-239, 2013.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 5, p. 9099-9123, 2015.

MAITY, P.; BINDU, S.; DEY, S.; GOYAL, M.; ALAM, A.; PAL, C.; MITRA, K.; BANDYOPADHYAY, U. Indomethacin, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathology and associated apoptosis in gastric mucosal: a novel role of mitochondrial aconitase oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 5, p. 3058-3068, 2009.

MANSOURI, M.T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B.; FARBOOD, Y.; SARKAKI, A.; BAVARSAD, K. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 111, p. 90-96, 2013.

MARTIN, G.R.; WALLACE, J.L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defence and repair. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 231, n. 2, p. 130–137, 2006.

MASOUD M. S.; ALI A.E.; HAGGAG S.S.; NASR N.M. Spectroscopic studies on gallic acid and its azo derivatives and their iron(iii) complexes. **Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, v. 120, p. 505-511, 2014.

MELO, R.; LEAL, J.P.; TAKÁCS, E.; WOJNÁROVITS, L. Radiolytic degradation of gallic acid and its derivatives in aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 172, n. 2-3, p. 1185-1192, 2009.

MILANI, S.; CALABRO, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microscopy Research & Technique**, New York, v. 53, n. 5, p. 360-371, 2001.

NASCIMENTO, A.M.; SOUZA, L.M.; BAGGIO, C.H.; WERNER, M.F.P.; FERREIRA, D.M.; SILVA, L.M.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, Toronto, v. 85, p. 137-142, 2013.

NIETO, Y.B. Úlcera péptica. **Medicine**, Abingdon, v. 11, n. 3, p. 137-141, 2012.

NIV, Y.; BOLTIN, D. Secreted and membrane-bound mucins and idiopathic peptic ulcer disease. **Digestion**, Princeton, v. 86, n. 3, p. 258-263, 2012.

NUNES, P.S.; ALBUQUERQUE Jr., R.L.C.; CAVALCANTE, D.R.R.; DANTAS, M.D.M.; CARDOSO, J.C.; BEZERRA, S.M.S.; SOUZA, J.C.C.; SERAFINI, M.R.; QUITANS Jr., L.J.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.S. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **BioMed Research International**, New York, v. 2011, 2011.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on

indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 59-65, 2006.

PAL, C.; BINDU, S.; DEY, S.; ALAM, A.; GOYAL, M.; IQBAL, M.S.; MAITY, P.; ADHIKARI, S.S.; BANDYOPADHYAY, U. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. **Free Radical Biology and medicine**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 258-267, 2010.

PANDIAN, R.S.; ANURADHA, C.V.; VISWANATHAN, P. Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) on experimental gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 81, n. 3, p. 393-397, 2002.

PARIKH, N.; HOWDEN, C.W. The safety of drugs used in acid-related disorders and functional gastrointestinal disorders. **Gastroenterology Clinics**, Philadelphia, v. 39, n. 3, p. 529-542, 2010.

PARK, J.; CHA, S.; CHO, S. PARK, Y. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid: catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 18, p. 166, 2016.

PENG, C.C. Ferulic acid is nephrodamaging while gallic acid is renal protective in long term treatment of chronic kidney disease. **Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 31, n. 3, p. 405-414, 2012.

PIRES, R.H.; LUCARINI, R.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Effect of usnic acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, New York, v. 56, p. 595-597, 2012.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SKA, D.S.L.A.W.I.N. Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. **Current Topics in Biophysics**, Göttingen, v. 26, n. 2, p. 217-227, 2002.

POMPILIO, A.; POMPONIO, S.; VINCENZO, V.D.; CROCETTA, V.; NICOLETTI, M.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; BONAVENTURA G.D. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. **Future Microbiology**, London, v. 8, n. 2, p. 281-292, 2013.

RAMSAY, P.T.; CARR, A. Gastric acid and digestive physiology. **Surgical Clinics**, New York, v. 91, n. 5, p. 977-982, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang e Dale Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Churchill Livingstone, 2012, 778 p.

REIS, N.T. **Nutrição clínica sistema digestório**. Rio de Janeiro: Rubio, 2003. 294 p.

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

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

ROSA, C.G.; BORGES, C.D.; ZAMBAZI, R.C.; NUNES, M.R.; BENVENUTTI, E.V.; LUZ, S.R.; D'AVILA, R.F.; RUTZ, J.K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 46, p. 138-146, 2013.

SALIMZADEH, L.; BAGHERI, N.; ZAMANZAD, B.; AZADEGAN-DEHKORDI, F.; RAHIMIAN, G.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M.; SHIRZAD, H. Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis. **Microbial pathogenesis**, Boca Raton, v. 80, p. 67-72, 2015.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E.; LÓPEZ-LORENZO, Y.; CRUZ-ANTONIO, L.; MATUS-MEZA, A.S.; SÁNCHEZ-MENDOZA, Y.; ARRIETA, J. Gastroprotection of Catechin D against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryls. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 3, p. 622, 2019.

SANTOS, N.P.S.; NASCIMENTO, S.C.; WANDERLEY, M.S.O.; PONTES-FILHO, N.T.; SILVA, J.F.; CASTRO, C.M.M.B.; PEREIRA, E.C.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 64, n. 2, p. 154-160, 2006.

SCHUBERT, M. Gastric acid secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, London, v. 32, p. 452-460, 2016.

SCHUBERT, M.L. Functional anatomy and physiology of gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, London, v. 31, p. 479-485, 2015.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, London, v. 27, n. 6, p. 536-542, 2011.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 134, n. 7, p. 1842-1860, 2008.

SEGATORE, B.; BELLIO, P.; SETACCI, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.; CELENZA, G. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 19, n. 3-4, p. 341-347, 2012.

SIDAHMED, H.M.A.; AZIZAN, A.H.S.; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; ABDELWAHAB, S.I.; TAHA, M.M.E.; HADI, A.H.A.; KETULY, K.A.; HASHIM, N.M.; LOKE, M.F.; VADIVELU, J. Gastroprotective effect of desmosmodin C isolated from *Mitrella kentii* against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhage in rats: possible involvement of glutathione, heat-shock protein-70, sulfhydryl compounds, nitric oxide, and anti-*Helicobacter pylori* activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 13, n. 183, p. 1-15, 2013.

SIEGMUND, S.; HAAS, S.; SCHNEIDER, A.; SINGER, M.V. Animal models in gastrointestinal alcohol research a short appraisal of the different models and their results. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, London, v. 17, n. 4, p. 519-542, 2003.

SIGURDSSON, H.H.; KIRCH, J.; LEHR, C-. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 453, n. 1, p. 56-64, 2013.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana**. Uma abordagem integrada. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 687-719.

SIQUEIRA-MOURA, M.P.; LIRA, M.C.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Validation of a UV-spectrophotometric analytical method for the determination of usnic acid in liposomes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 621-628, 2008.

STRAND, D.S.; KIM, D.; PEURA, D.A. 25 Years of Proton Pump Inhibitors: A Comprehensive Review. **Gut and Liver**, Basel, v. 11, n. 1, p. 27-37, 2017.

SU, Z.Q.; MO, Z.Z.; LIAO, J.B.; FENG, X.X.; LIANG, Y.Z.; ZHANG, X.; LIU, Y.H.; CHEN, X.Y.; CHEN, Z.W.; SU, Z.R.; LAI, X.P. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 22, p. 371–378, 2014.

SUSSMANN, R.A.C.; ANGELI, C.B.; PERES, V.J.; KIMURA, E.A.; KATZIN, A.M. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin E. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 585, n. 24, p. 3985–3991, 2011.

SZABO, S. Gastric “cytoprotection” is still relevant. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Richmond, v. 29, n. S4, p. 124-132, 2014.

SZABO, S.; VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **Journal of Physiology-Paris**, Paris, v. 94, n. 2, p. 77-81, 2000.

SZLACHCIC, A.; KRZYSIEK-MACZKA, G.; PADJO, R.; TARGOSZ, A.; MAGIEROWSKI, M.; JASNOS, K.; DROZDOWICZ, D.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T. The impact of asymmetric dimethylarginine (ADAMA), the endogenous Nitric Oxide (NO) synthase inhibitor, to the pathogenesis of gastric mucosal damage. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v.19, n. 1, p. 90-97, 2013.

TAKAI, M.; UEHARA, Y.J.A. Beisler. Usnic acid as potential antineoplastic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 22, n. 11, p. 1380-1384, 1979.

TAKEUCHI, H.; TRANG, V.T.; MORIMOTO, N.; NISHIDA, Y.; MATSUMURA, Y.; SIGIURA, T. Natural products and food components with anti-*Helicobacter pylori* activities. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 20, n. 27, p. 8971-8978, 2014.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing: state of the art. **Gastroenterology Polska**, Wroclaw, v. 17, n. 3, p. 171-179, 2010.

TEYSSSEN, S.; SINGER, M.V. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, London, v. 17, n. 4, p. 557-573, 2003.

TULASSAY, Z.; HERSZÉNYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, London, v. 24, n. 2, p. 99-108, 2010.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 473-485, 2013.

VIJAYAKUMAR, C.S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M.K.; PARVATHAVARTHINI, A.B.; KUNDU, A.B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, n. 5, p. 564 -566, 2000.

WALLACE, J.L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; DUDAR, G.K. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 148, n. 3, p. 274–278, 2006.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protections: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, Washington, v. 88, n. 4, p. 1547-1565, 2008.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective factors of the gastric and duodenal mucosa: an overview. **Current gastroenterology reports**, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 24, 2015.

YOU, B.R.; MOON, H.J.; HAN, Y.H.; PARK, W.H. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 1334–1340, 2010.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS DA UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones 2126 6840 | 2126 8351
www.ccb.ufpe.br

Recife, 10 de maio de 2018.

Ofício nº 27/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Noemia Pereira da Silva Santos**

Centro de Acadêmico do Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.046268/2017-66

"Certificamos que a proposta intitulada **"Estudo da ação gastroprotetora e anti-ulcerogenica de nanossistemas contendo ácido gálico e avaliação do sinergismo com sua co-encapsulação com o ácido úsnico."** registrada com o nº 23076.046268/2017-66 sob a responsabilidade de **Prof.ª Noemia Pereira da Silva Santos** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/05/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 ano e 1 mês após parecer favorável
Espécie/ linhagem/raça	Ratos heterogênicos
Nº de animais	148
Peso/Idade	250-300g/ 80-90 dias
Sexo	Macho (130) Fêmea (18)
Origem	Departamento de Nutrição

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

