



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÀ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MORFOFUNCIONAIS**

ZULMIRA DE OLIVEIRA CASTRO

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DOS
POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DA ACEROLA (*Malpighia
emarginata*) NO MODELO DE GASTROPATIA INDUZIDA POR
NAPROXENO EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2017

ZULMIRA DE OLIVEIRA CASTRO

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DOS
POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DA ACEROLA (*Malpighia
emarginata*) NO MODELO DE GASTROPATIA INDUZIDA POR
NAPROXENO EM CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Prof. Dra. Antoniella Souza Gomes.

FORTALEZA

2017

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

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

- C353e Castro, Zulmira de Oliveira.
O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DA ACEROLA (*Malpighia emarginata*) NO MODELO DE GASTROPATIA INDUZIDA POR NAPROXENO EM CAMUNDONGOS / Zulmira de Oliveira Castro. – 2017.
77 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes.
1. Úlcera péptica. *Malpighia emarginata*. Flavonóides.. I. Título.

ZULMIRA DE OLIVEIRA CASTRO

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DOS
POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DA ACEROLA (*Malpighia
emarginata*) NO MODELO DE GASTROPATIA INDUZIDA POR
NAPROXENO EM CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Prof. Dra. Antoniella Souza Gomes.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Ma. Conceição da Silva Martins
Faculdade para o Desenvolvimento Sustentável do Nordeste (FADESNE)

Dra. Ana Angélica Queiroz Assunção Santos
Centro Universitário Estácio do Ceará

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu e me deu todas as oportunidades para chegar até aqui.

Agradeço à minha mãe mulher de fibra e guerreira que me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço aos amigos, familiares por sempre estarem direta ou indiretamente torcendo com minhas conquistas e por entenderem minhas ausências.

Agradeço também de forma muito especial a Profa. Antoniella que além de orientadora durante essa caminhada se tornou minha amiga, companheira, confidente e até colo me ofertou quando necessário. Muito obrigada por acreditar em mim.

Agradeço também Profa. Gerly por ter aberto as portas do laboratório (NEMPI) sem nem me conhecer, obrigada pela oportunidade ofertada.

E por fim agradeço todos que colaboraram direta e indiretamente para que esse trabalho fosse concluído, funcionários do departamento, do laboratório, os ICS, outros laboratórios que colaboraram para que esse trabalho fosse realizado.

Obrigada!

“A inteligência é o único meio que possuímos para dominar os nossos instintos”.

Sigmund Freud

RESUMO

A úlcera péptica (UP) acomete milhões de pessoas em todo mundo, considerada heterogênea e multifatorial, é uma das principais doenças que acomete a mucosa gástrica e que tem crescido o número de casos, ocasionando representatividade na economia global. A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) é um fruto avermelhado, sendo originário da região das Antilhas, norte da América do Sul e América Central. Seu cultivo teve maior crescimento na década de 90 quando foi descoberto seu alto teor de vitamina C. Estudos mostram que as frações polissacarídicas extraídas dos subprodutos apresentaram natureza péptica em associação com proteínas, sendo evidenciada principalmente para aquelas extraídas da acerola, abacaxi e caju, efetiva ação antioxidante, sugerindo sua possível aplicação como antioxidantes naturais. O presente estudo avaliou a atividade anti-inflamatória e antioxidante dos polissacarídeos provenientes de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. Os camundongos Swiss receberam pré-tratamento com salina e/ou polissacarídeos provenientes de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (PCA) [3], [10] e [30] mg/kg, por gavagem. Após 30 minutos, receberam naproxeno (300 mg/kg, por gavagem) ou carboximetilcelulose (CMC 0,5% v.o), sendo os animais eutanasiados 6 horas após o protocolo experimental. Os segmentos de estômago foram coletados para a análise dos seguintes parâmetros: macroscopia, microscopia, GSH, MDA, MPO, TNF- α , IL-6 e imunohistoquímica IL-1. O PCA nas doses de [3], [10] e [30] mg/kg, por gavagem reduziu significativamente a lesão gástrica macroscópica e microscópica induzida pelo naproxeno. A PCA nas doses de 10 e 30 mg/kg preveniu a depleção nas concentrações de GSH, reduziu as concentrações de MDA e reduziu a infiltração neutrofílica. O PCA na dose de 30 mg/kg reduziu as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Na análise por imunohistoquímica para IL-1 (interleucina) o grupo pré-tratado com PCA 30 mg/kg obteve uma redução significativa da expressão de IL-1 quando comparado ao grupo NPX. A expressão de IL-10 se mostrou elevada no grupo pré-tratado com PCA 30 mg/kg quando comparado com o grupo NPX. Já para as determinações de TNF- α e COX-2 o grupo pré-tratado com PCA 30 mg/kg obteve uma redução da expressão quando comparado com o grupo tratado com NPX. A partir dos dados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que o PCA tem um efeito anti-inflamatório e antioxidante no modelo experimental de úlcera gástrica induzida por naproxeno.

Palavras-chave: Úlcera péptica. *Malpighia emarginata*. Flavonóides.

ABSTRACT

The peptic ulcer (PU) affects millions of people worldwide, considered heterogenous and multifactorial, is one of the main diseases that affects the gastric mucosa and that has grown the number of cases causing representativeness in the global economy. The acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) is a reddish fruit, originating in the region of the Antilles, north of South America and Central America. Its cultivation had higher growth in the decade of 90 when its high content of vitamin C was discovered. Studies show that the polysaccharide fractions extracted from the byproducts presented pectic nature in association with proteins, being evidenced mainly for those extracted from acerola, pineapple and cashew, effective antioxidant action, suggesting its possible application as natural antioxidants. The present study evaluated the anti-inflammatory and antioxidant activity of polysaccharides from the agro-industrial by-products of the processing of acerola (*Malpighia emarginata*) in the model of gastric lesion induced by naproxen in mice. Swiss mice were pretreated with saline and / or polysaccharides from acerola processing byproducts (PCA) [3], [10] and [30] mg / kg, by gavage. After 30 minutes, they received naproxen (300 mg / kg, by gavage) or carboxymethylcellulose (0.5% vCMC), and the animals were euthanized 6 hours after the experimental protocol. Stomach segments were collected for analysis of the following parameters: macroscopy, microscopy, GSH, MDA, MPO, TNF- α , IL-6 and IL-1 immunohistochemistry. PCA at doses of [3], [10] and [30] mg / kg by gavage significantly reduced macroscopic and microscopic gastric lesion induced by naproxen. PCA at doses of 10 and 30 mg / kg prevented depletion at GSH concentrations, reduced MDA concentrations and reduced neutrophil infiltration. PCA at the dose of 30 mg / kg reduced the concentrations of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6. In the immunohistochemical analysis for IL-1 (interleukin) the pretreated group with PCA 30 mg / kg achieved a significant reduction in IL-1 expression when compared to the NPX group. IL-10 expression was elevated in the pre-treated group with 30 mg / kg PCA when compared to the NPX group. For the determinations of TNF- α and COX-2 the pretreated group with PCA 30 mg / kg obtained a reduction in expression when compared to the group treated with NPX. From the data obtained in this work, it can be concluded that PCA has an anti-inflammatory and antioxidant effect in the experimental model of gastric ulcer induced by naproxen.

Keywords: Peptic ulcer. *Malpighia emarginata*. Flavonoids.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α – Alfa

β – Beta

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais

ANOVA – Análise de variância

cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina

COX – Ciclooxigenase

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – deoxinucleotídeos

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EPM – Erro padrão da média

g – Grama

GC – Guanilato ciclase

GMP – Guanosina monofosfato

GSH – Glutathiona reduzida

HTAB - Hexadecitrimetilamônio

IL – Índice de lesão

i.p. - intraperitoneal

IL-1 – Interleucina 1

IL- 10 – Interleucina 10.

Kg – Kilograma

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio

H. pylori – Helicobacter pylori

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

L-NAME – L-nitro-arginina-metil-éster

L-NIL – L-lisina-N-iminoetil

LPS – Lipopolissacarídeo

M - Molar

mg – miligrama

ml – mililitro

mm – milímetro

MPO – Mieloperoxidase
MDA - Malondialdeído
NaCl – Cloreto de potássio
NFkB – Fator nuclear kappa B
NO – Óxido nítrico
NOS - Sintase do óxido nítrico
NOSc - Sintase constitutiva do óxido nítrico
NOSi - Sintase induzida do óxido nítrico
NOSn - Sintase neuronal do óxido nítrico
ODQ – Droga inibidora seletiva da guanilato ciclase solúvel
OMS – Organização mundial de Saúde
OPD – O-fenilenediamine diidroclorato
PAF - Fator de agregação plaquetária
PBS – Solução tamponada de fosfato
Pg - Picograma
PGE2 – Prostaglandina E2.
PGF1 - Prostaglandina F1.
PGI2 – Prostaglandina I2.
PGs – Prostaglandinas
RNA – ácido ribonucléico
ROS – Espécie reativas de oxigênio
RPM – Rotações por minuto
SH-NP – Grupos sulfidrílicos não protéico
SNAP - S-nitroso-acetilpenicillamina.
SUR – Receptores da sulfoniluréia.
TGI – Trato gastrointestinal.
TNBS – 2,4,6 – trinitrobenzenosulfônico
TNF- Fator de necrose Tumoral .
Tris – Hidroximetil aminometano.
L – microlitro.
µm – Micromêtro
v.o. – via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Figura ilustrativa da anatomia do estômago.....	15
Figura 2	Mecanismo de defesa da mucosa gástrica.....	19
Figura 3	Figura ilustrativa do mecanismo de injúria e defesa da mucosa gástrica quando ocorre a úlcera péptica.....	22
Figura 4	Fluxograma de extração do subproduto da acerola.....	28
Figura 5	Subprodutos da acerola pulverizada e liofilizada para armazenagem e distribuição para realização do experimento.....	29
Figura 6	Fluxograma ilustrativo para protocolo de lesão gástrica e pré tratamento com subproduto da acerola.....	35
Figura 7	Fotomicrografias da mucosa gástrica abertos em local plano com fundo branco e uso do programa de planimetria Image J – Índice de lesão gástrica (mm ²).....	37
Figura 8	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com <i>Malpighia emarginata</i> e/ou naproxeno (NPX).....	43
Figura 9	Efeito protetor dos extratos isolados (PCA) nas doses de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	44
Figura 10	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados PCA e/ou naproxeno (NPX).....	47
Figura 11	Determinação da concentração de MDA (malondialdeído) na mucosa gástrica de camundongos pré tratados com o extrato PCA na concentração de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	48
Figura 12	Determinação da concentração de GSH (glutationa) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato PCA na concentração de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	49
Figura 13	Determinação da concentração de MPO (mieloperoxidase) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	50

Figura 14	Determinação da concentração de IL-6 (interleucina 6) na mucosa gástrica de camundongos pré tratados com o extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	51
Figura 15	Determinação da concentração de TNF alfa na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	52
Figura 16	Determinação IL-1 beta através de imunohistoquímica na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	53
Figura 17	Determinação IL-10 através de imunohistoquímica na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	54
Figura 18	Determinação de TNF α através de imunohistoquímica na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	55
Figura 19	Determinação de COX-2 através de imunohistoquímica na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição físico-química de subprodutos provenientes do processamento da acerola.....	27
Tabela 2	Absorbâncias das culturas celulares expostas aos polissacarídeos extraídos dos subprodutos da acerola.....	42
Tabela 3	Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de camundongos pré-tratados com extrato de (PCA) nas concentrações de 3, 10 e 30 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX).....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Anatomia e Fisiologia do Estômago.....	15
1.2 Lesão gástrica <i>versus</i> gastroproteção.....	16
1.3 Úlcera Péptica.....	21
1.4 Plantas como Alternativa Terapêutica.....	24
1.4.1 Subprodutos de frutas.....	24
1.5 <i>Malpighia emarginata</i> (Acerola)	26
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Obtenção do subproduto do processamento da acerola (<i>Malpighia emarginata</i>)	33
4.2 Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT <i>in vitro</i>	33
4.3 Animais.....	34
4.4 Modelo de lesão gástrica induzida por Naproxeno (NPX)	35
4.4.1 Padronização do modelo de lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.....	35
4.5 Protocolo experimental.....	35
4.5.1 Grupos experimentais.....	35
4.6 Protocolo Experimental.....	36
4.6.1 Avaliação da Atividade Gastroprotetora.....	36
4.6.2 Análise macroscópica da mucosa gástrica de camundongos tratados com extrato isolados de (PCA) no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	36
4.6.3 Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato isolado de (PCA) no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	37
4.7 Avaliação da Atividade Antioxidante Através da Determinação da concentração de glutathione (GHS)	38
4.8 Avaliação do Dano Oxidativo Através da Análise da Concentração de malondialdeído (MDA)	38

4.9 Avaliação da infiltração neutrófilica através determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO)	39
4.10 Dosagem da citocina TNF- α e IL-6.....	39
4.11 Imunohistoquímica para detecção de IL-10, COX2, IL1- β e TNF- α	40
4.12 Análise estatística.....	41
4.13 Aspectos Éticos.....	41
5. RESULTADOS	
5.1 Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT <i>in vitro</i>	42
5.2 Avaliação do efeito protetor dos extratos isolados (PCA) no modelo de gastropatia por naproxeno (NPX) em camundongos – análise macroscópica e planimetria.....	43
5.3 Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de camundongos pré-tratados com extratos isolados (PCA) nas concentrações de 3, 10 e 30 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX)	45
5.4 Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de camundongos pré-tratados com extratos isolados de (PCA) nas concentrações de 3, 10 e 30 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX)	46
5.5 Determinação da concentração de MDA (malondialdeído) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato PCA na concentração de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	48
5.6 Determinação da concentração de GSH (glutathiona) na mucosa gástrica de camundongos tratados com o extrato de PCA nas concentrações de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	49
5.7 Determinação da concentração de MPO (mieloperoxidase) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	50
5.8 Dosagem de citocinas.....	51
5.8.1 Determinação da concentração de IL-6 (interleucina 6) e TNF- α na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	51
5.9 Efeito do PCA sobre a imunomarcação de IL-1 (interleucina 1), IL-10, TNF- α e COX-2 de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	52
5.9.1 Efeito do PCA sobre a imunomarcação de IL-1 (interleucina 1) de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	52

5.9.2 Efeito do PCA sobre a imunomarcção de IL-10 (interleucina 10) de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	53
5.9.3 Efeito do PCA sobre a imunomarcção de TNF α de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	54
5.9.4 Efeito do PCA sobre a imunomarcção de COX-2 de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	55
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

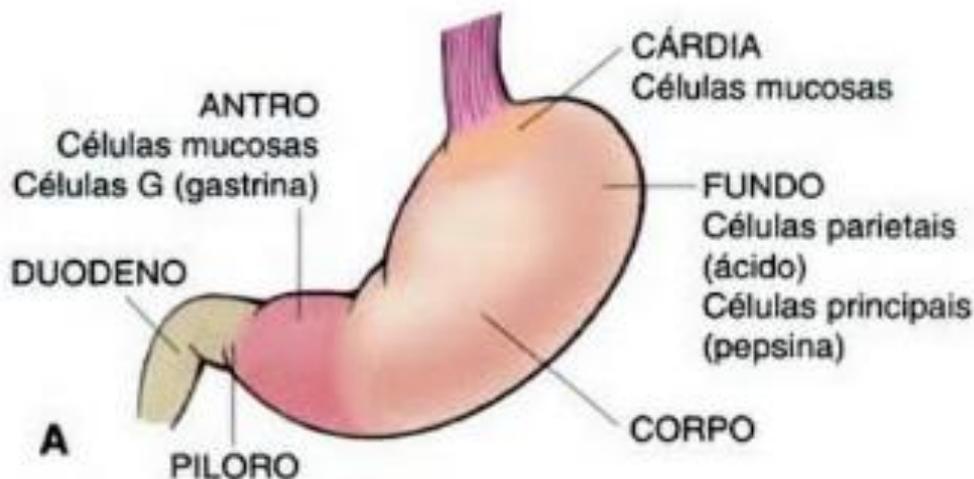
1. INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e Fisiologia do Estômago

O sistema digestório tem função essencial no corpo humano onde desempenha a função de processar os alimentos e distribuir os nutrientes para as células do corpo humano. O estômago é o principal órgão do sistema digestório superior que participa desse processo dos alimentos, processando-os mecanicamente, bem como quimicamente. O estômago é dividido anatomicamente em quatro partes: cárdia, fundo, corpo, antro ou porção pilórica (SON *et al.*, 2015; SCHUBERT; PEURA, 2008).

O estômago é composto por camadas chamadas de mucosa, submucosa, camada muscular e a camada serosa. Cada uma dessas camadas apresentam características e funções diferentes, dependendo da região que estiver localizada. No estômago a mucosa (na qual são encontradas as glândulas oxíntica e glândula pilórica), a submucosa (onde são encontrados vasos sanguíneos e plexo de Meissner), a camada muscular (constituída por uma camada longitudinal externa, uma camada oblíqua, e uma circular interna de músculo liso) e a camada serosa. Cada camada pode apresentar características peculiares dependendo da região que estiver localizada (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Figura 1 – Ilustração da anatomia do estômago.



Fonte: Adaptada de Robbins & Cotran (2005).

A mucosa do estômago tem uma função fundamental, pois nela encontra-se as células oxínticas que secretam principalmente ácido clorídrico e fator intrínseco e o pepsinogênio provem das células principais ou zimogênicas, predominando na

base das glândulas gástricas. As células neuroendócrinas compreendem 2% das células epiteliais em ratos e 1% em humanos (JIANG *et al.*, 2002; BADO *et al.*, 1998).

Sua inervação se dar por meio de uma rede neuronal pelo sistema nervoso entérico (ENS) com processos intrínsecos e extrínsecos dos neurônios aferentes. Assim neurônios pós-ganglionares do ENS regulam a secreção de ácido clorídrico, no caso a acetilcolina e / ou indiretamente para modulação da secreção de gastrina de células G, células D de somatostatina, histamina de células enterocromafins e peptídeo natriurético atrial de células epiteliais (SCHUBERT; PEURA, 2008).

As substâncias secretadas pelas glândulas gástricas são ácido clorídrico (HCl) e o pepsinogênio. O HCl ativa o pepsinogênio formando assim a pepsina que é responsável por iniciar digestão de proteínas, o HCl exerce a função também da absorção de ferro e atua na destuição de microorganismos ingeridos (KAYACETIN; GURESCI, 2014).

Três mecanismos regulam o sistema gástrico, sendo o sendo o neuronal por acetilcolina (ACH) que atua nas células parietais por meio do receptor muscarinico M3 ou indiretamente por meio das células enterocromafins do fundo gástrico, parácrino (histamina que é mediada pelo receptor H2 na célula, ativando assim a H⁺K⁺-ATPase) e endócrino (gastrina que estimula a liberação de ácido e medeia a liberação de histamina nas células ECL), os fatores de inibição são realizados pela somatostatina, fatores de crescimento (EGF) e prostaglandinas E2 e I2 que são estimulantes de muco e bicarbonato (SCHUBERT; PEURA, 2008).

1.2 Lesão gástrica versus gastroproteção

Segundo Abbas e Sakr (2013) e Wallace (2008), a mucosa gástrica é uma barreira importante no organismo, isso se dá devido sua estrutura diferenciada. A mucosa gástrica possui diversos mecanismos de defesa que impedem que ocorra algum dano à mucosa ao ponto de causar uma alteração de importância clínica. Em contrapartida a superfície da mucosa gástrica sofre constantemente exposição a substâncias lesivas que possuem diferentes osmolaridades, havendo algumas substâncias com ações citotóxicas como suco gástrico, fármacos, toxinas bacterianas e o álcool, essas substâncias lesivas determinam o surgimento de uma reação inflamatória carregada por vários mediadores que são liberados pelo próprio epitélio das células e da lâmina própria trazendo como consequência o

desenvolvimento de lesão na mucosa e o aparecimento de patologias como, gastrite e úlcera péptica.

Por alguns anos achava-se que as lesões gástricas estavam relacionadas a substâncias fisiológicas presentes no estômago, como a pepsina e ácido clorídrico. Com o passar dos anos observou-se que além de fatores endógenos serem nocivos a mucosa gástrica, fatores exógenos como determinados alimentos, fumo, ingestão de álcool, fármacos, estresse, predisposição genética e presença de microorganismos como a *Helicobacter pylori* atuam em conjunto reduzindo a defesa da mucosa e promovendo agressão (WALLACE, 2008).

A lesão gástrica está intimamente relacionada ao desequilíbrio ocasionado pelos agentes endógenos ou exógenos e a capacidade da mucosa resistir a agressão através dos seus mecanismos defensivos existentes, como síntese de prostaglandinas citoprotetoras, muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo e motilidade gástrica. Pacientes que fazem consumo abusivo de AINEs ou etanol, por exemplo, possuem uma maior predisposição de vir a ter lesão gástrica. Os AINEs é a classe de fármacos mais prescritas no mundo. A toxicidade gastrintestinal constitui a maior limitação para o uso dos AINEs (PESKAR *et al.*, 2002; BODE; BODE, 2000).

O etanol estimula a secreção de ácido clorídrico, leva a um stress oxidativo com a depleção de glutathiona reduzida (GSH), influencia a atividade da musculatura, reduzindo o fluxo sanguíneo e aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações. Contudo mesmo as células possuindo sistemas de defesa contra danos oxidativos celulares e teciduais, ainda assim o desequilíbrio causado por esses agentes causa produção de reações excessivas como, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (EROs). Enzimas antioxidantes, tais como aqueles que pertencem à superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona (GSH) são fatores importantes na proteção contra o estresse oxidativo na mucosa gástrica induzida por naproxeno (MACMATH, 1990; CHAMBERLAIN, 1993; KONTUREK *et al.*, 1998).

As paredes do estômago não são impenetráveis a substâncias ingeridas ou produzidas. Dessa forma as lesões ulcerativas ou injúrias são inevitáveis. O aumento ou excesso do ácido clorídrico é nocivo a mucosa gástrica, no entanto sua desregulação não deve ser considerada como principal agente na lesão da gástrica (SUERBAUM; MICHETTI, 2002).

Com a descoberta desse fato, novos estudos surgiram e com isso veio a descoberta da bactéria *Helicobacter pylori*, um bacilo gram-negativo flagelado em

forma de espiral que vive no ambiente ácido do estômago e possui a capacidade de colonizar o muco produzido pela mucosa gástrica. Sendo considerados uma das principais causas da úlcera péptica, linfoma gástrico e adenocarcinoma gástrico (WOLFE *et al.*, 2003; BERSTAD, 1993).

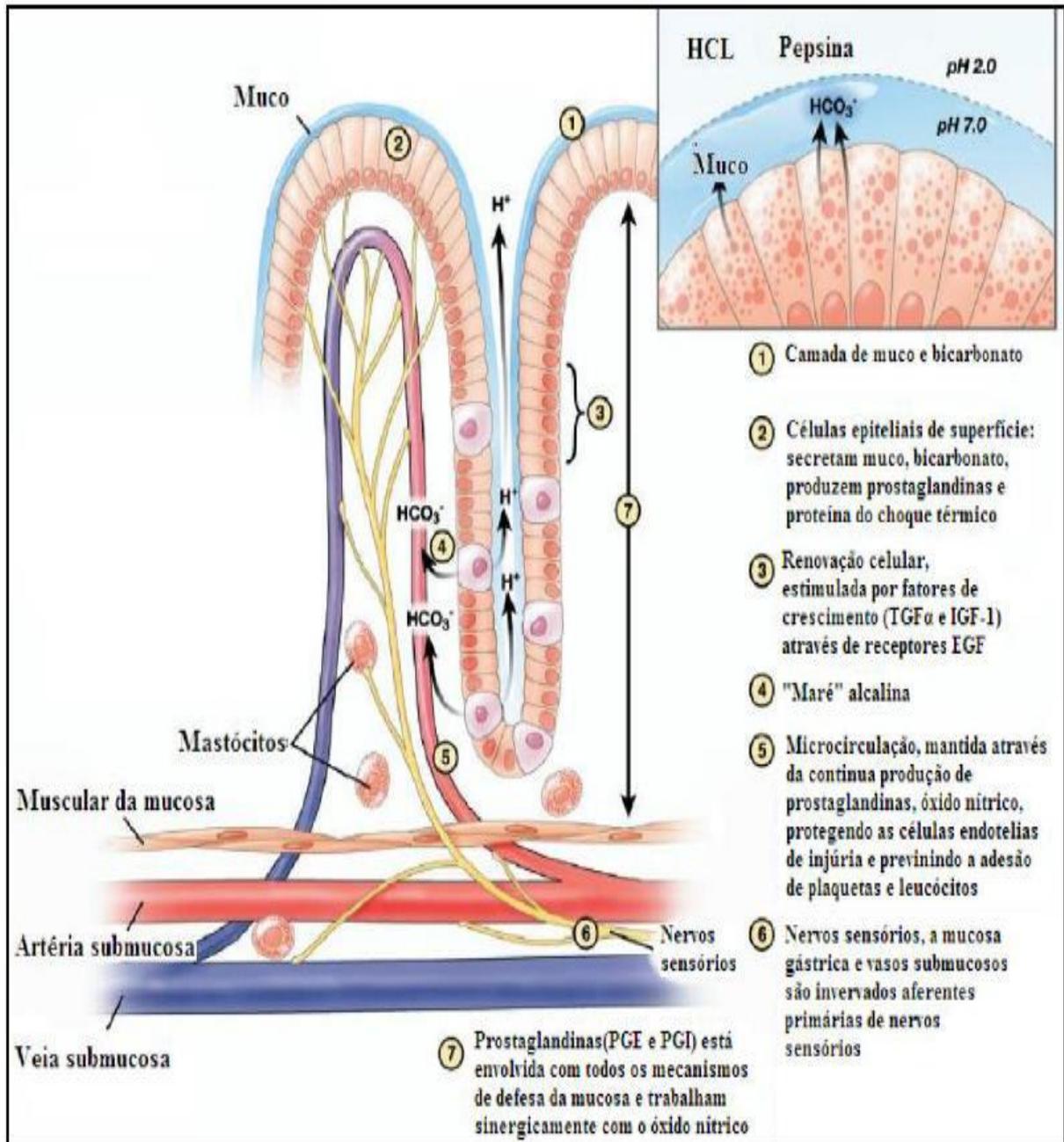
Vale ressaltar que tal bactéria também pode estar presente na mucosa de indivíduos sadios que podem ou não desenvolver lesões ulcerativas (HIRSCHOWITZ *et al.*, 1995).

Dessa forma vários mecanismos estão envolvidos na lesão gástrica, agindo simultaneamente ou não nesse processo de produção da lesão como, por exemplo, o aumento da secreção ácida gástrica, pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão de prostaglandinas endógena, inibição do crescimento e proliferação celular da mucosa, alteração da motilidade gástrica, presença de agentes infecciosos e presença de radicais livres são alguns dos mecanismos envolvidos na ulcerogênese (WOLFE; SOLL, 1988; LEWIS; HANSON, 1991).

Diante disso alguns agentes protetores estão envolvidos na patogênese da lesão gástrica, que permitem que a mucosa permaneça intacta mesmo com a frequente exposição a substâncias com larga variação de temperatura, pH e osmolaridade, assim como substâncias com ação citotóxica e produtos bacterianos capazes de causar reações inflamatórias. Sendo esses agentes ou mecanismos de defesa local ou neurohormonais. Podemos destacar como fatores protetores gástricos a camada de muco, o epitélio superficial da mucosa, secreção de bicarbonato, produção de prostaglandinas, fatores de crescimento e fluxo sanguíneo local (AWAAD, 2012; ALLEN; FLEMSTROM, 2005).

O muco e secreção de bicarbonato são os primeiros agentes de defesa da mucosa gástrica. O muco juntamente com o bicarbonato secretado no estômago forma uma barreira protetora contra ações causadas pelo ácido e pepsina. O muco é capaz de agir como antioxidante e pode reduzir danos da mucosa promovidos por radicais livres. O muco é um agente protetor importante para mucosa gástrica e tem como características forma viscosa, elástica e aderente na forma de um gel transparente composto por 95% de água e 5% de glicoproteína com atividade antioxidante, pois estes açúcares são potentes sequestradores de espécies reativas de oxigênio, que recobre a superfície da mucosa gastrointestinal. Sendo sua secreção controlada por vários fatores (REPETTO *et al.*, 2002; MOJZIS *et al.*, 2000).

Figura 2 – Mecanismo de defesa da mucosa gástrica.



Fonte: Adaptado de Laine, Takeuchi e Tarnawski (2008).

Outro agente protetor é a produção de prostaglandinas, a qual está envolvida em diversos processos fisiológicos como a secreção de ácido, produção de muco e fluxo sanguíneo na mucosa gástrica. As prostaglandinas ocasionam uma gastroproteção através de mecanismos como aumento da secreção de muco e bicarbonato, manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa, inibição da motilidade gástrica, inibição de apoptose, inibição da ativação de mastócitos, diminuição da aderência leucocitária no endotélio vascular e aumento da resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (GOLDSTEIN *et al.*, 2001;

HAWKEY; RAMPTON, 1985).

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido aracdônico. E existem duas principais formas de ciclooxigenase (COX), COX-1 e COX-2. A COX-1 desempenha um papel importante na manutenção da integridade da mucosa, onde produz a maior parte das prostaglandinas na mucosa normal. Já em contraste a COX-2, é normalmente encontrada em baixos níveis na maioria dos tecidos do corpo, mas é expressa em níveis elevados em tecidos inflamados, quando induzida atual como fator importante na cicatrização de úlceras (ZAGHLOOL *et al.*, 2015).

No caso do fluxo sanguíneo que também possui papel fundamental na gastroproteção durante a patogênese da lesão gástrica e seu aumento ocorre como resposta ao agente irritante (KAWANO *et al.*, 2000).

O aumento do fluxo sanguíneo na mucosa é pode estimular o tamponamento do ácido e uma rápida remoção de substâncias tóxicas ou agente irritante, com isso limitar a sua penetração nas camadas mais profundas. Por outro lado a redução do fluxo sanguíneo está intimamente ligada à patogênese das lesões gástrica causadas por stress, etanol e AINEs. Além desses aspectos o fluxo sanguíneo também possui a função de suprir oxigênio, nutrientes e hormônios para mucosa gástrica e participa na regulação da eliminação do ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato e remoção dos produtos incluindo a retrodifusão de íons hidrogênio. Dessa forma o fluxo sanguíneo tem participação fundamental na manutenção fisiológica da integridade mucosa (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

O Óxido Nítrico (NO) é um vasodilatador que atua como importante mediador de defesa da mucosa gastrintestinal, produzido por meio da NO-sintase, está envolvido na regulação do fluxo sanguíneo gástrico e microcirculação gástrica. O NO trata-se de um vasodilatador de extrema importância na mucosa gástrica e uma redução dos seus níveis pode resultar em uma isquemia na mucosa gástrica e a deixar predisposta a ação de agentes nocivos. Ele atua como um agente protetor durante a patogênese da lesão gástrica, com papel fundamental na modulação da integridade da mucosa, prevenindo e reparando as injúrias do Trato Gastrointestinal (TGI) (MUSCARÁ; WALLACE, 1999).

O NO reduz efetivamente a injúria na mucosa gástrica provocada por agentes químicos, como o etanol, e facilita a cicatrização do tecido lesado, sendo importante na regulação das secreções ácidas e alcalinas, secreção de muco e do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, atuando também como agente citoprotetor, anti-

inflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (WHITTLE *et al.*, 1995; SANTOS CERQUEIRA *et al.*, 2012)

Já Wallace e Miller *et al.*, (2000) propuseram que o NO em concentrações reduzidas está relacionado aos efeitos benéficos no TGI, enquanto que em altas taxas pode formar radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens celulares.

Ao surgirem desequilíbrios causados por agentes nocivos à mucosa gástrica e indução do processo inflamatório local, ocorre a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). Mesmo tecidos e células possuindo sistema de defesa contra os danos oxidativos celulares e tecidual as enzimas antioxidantes, tais como aqueles que pertencem à superóxido dismutase (SOD) que é a primeira enzima a ser ativada na mucosa, catalase (CAT) e glutathione (GSH) são fatores importantes na proteção contra o estresse oxidativo na mucosa gástrica induzida, por exemplo, por AINEs como o naproxeno (POTRICH *et al.*, 2010).

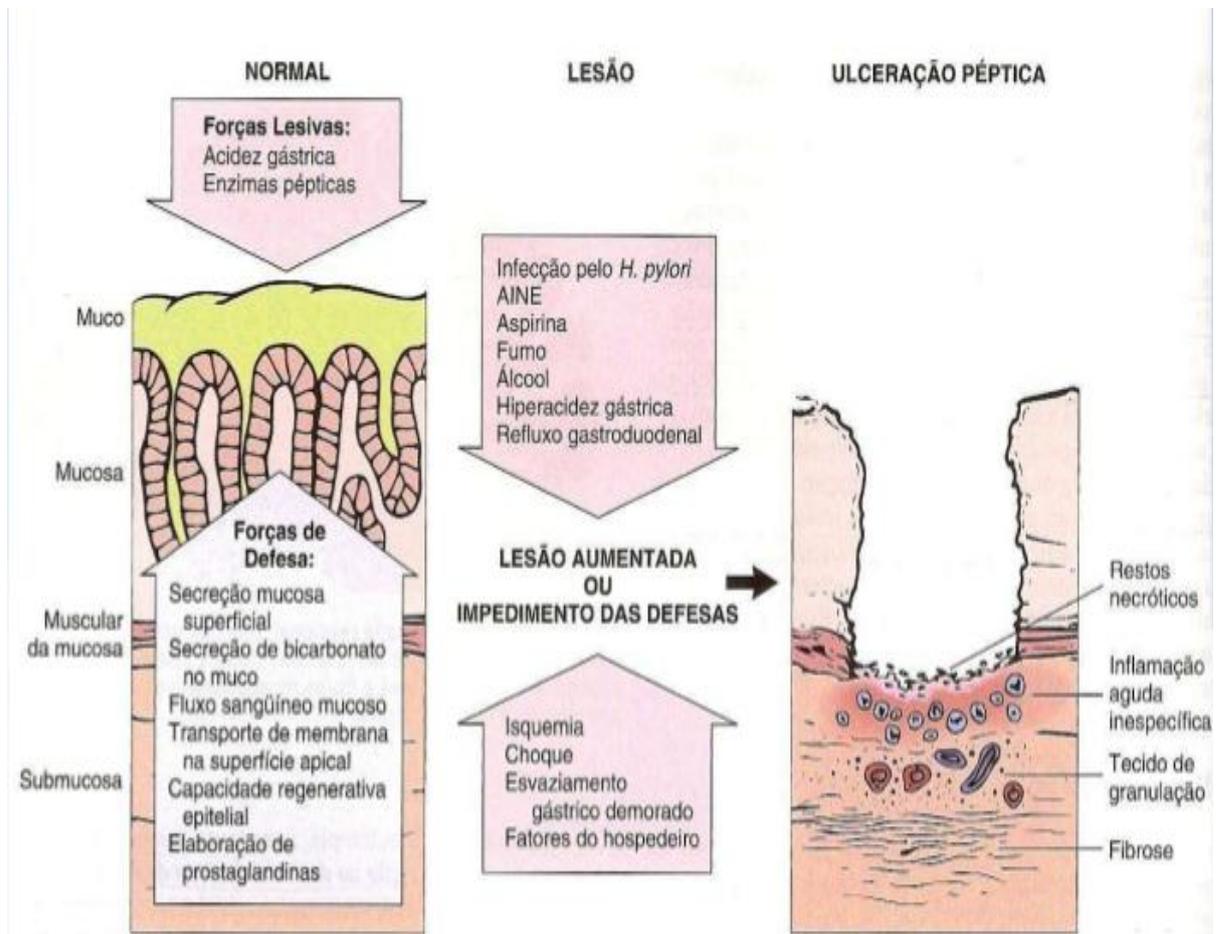
1.3 Úlcera Péptica

Segundo Zakaria *et al.*, (2016), a Úlcera Péptica (UP) acomete milhões de pessoas em todo mundo, considerada heterogênea e multifatorial, é uma patologia gastrointestinal relacionada a inflamação aguda e crônica do estômago e que tem crescido os números de casos, ocasionando representatividade na economia global.

É caracterizada por uma erosão em uma área da mucosa que pode estender-se profundamente, as camadas musculares ou, até o peritônio. Esse processo patogênico ocorre quando o mecanismo de defesa da mucosa é vencido pelos agentes nocivos. Trata-se de um problema crônico e de grande magnitude social, além disso, é resultado de um desequilíbrio entre fatores de proteção intrínsecos e fatores agressores intrínsecos e/ou extrínsecos, presentes na mucosa do trato digestivo (PORTH; MATFIN, 2010).

O desequilíbrio envolvido na ptogenese da UP está intimamente relacionado ao uso de medicamentos, faixa etária, álcool, tabagismo e infecção pela *Helicobacter pylori*, dentre outros como mostra a figura 3 (KLEIN JÚNIOR *et al.*, 2010).

Figura 3 – Figura ilustrativa do mecanismo de injúria e defesa da mucosa gástrica quando ocorre a úlcera péptica.



Fonte: Adaptada de Robbins & Cotran (2005).

Os AINEs promovem lesões gástricas através de mecanismos independentes, inibindo ciclo-oxigenase (COX), enzima fundamental na síntese de prostaglandinas, mas não sendo esse o único mecanismo envolvido na fisiopatologia ou mecanismo com efeito tóxico direto, sobre os mecanismos de defesa da mucosa gastroduodenal, que resulta em aumento da permeabilidade celular, inibição do transporte iônico e da fosforilação oxidativa. Com isso, devido à inibição da COX ocorre a suspensão ou redução significativa da produção de prostaglandinas permitindo assim a formação de lesões causadas por AINEs. Sabe-se que as prostaglandinas são agentes protetores da mucosa, que protegem a mucosa através dos seus efeitos na produção de muco e secreção de bicarbonato, e no aumento do fluxo sanguíneo da mucosa e reduzindo *turnover* celular (WALLACE, 2000; LANGENBACH *et al.*, 1995; MUSUMBA *et al.*, 2009).

Dependendo da sua localização, a úlcera péptica pode ser classificada como: úlcera esofágica, gástrica ou duodenal. As úlceras gástricas e duodenais

representam as formas mais comuns da doença, onde indivíduos em qualquer faixa etária podem ser acometidos por essa enfermidade, prevalente em cerca de 10% da população mundial, sendo um dos distúrbios digestivos mais comuns, resultando em 1,25 hospitalizações adicionais para cada 100 pacientes por ano. Geralmente aparece com 4cm de diâmetro, na grande maioria localizada em duodeno e estômago, mas pode acometer outras porções do trato gastrointestinal (PORTH; MATFIN, 2010; SILVA *et al.*, 2008).

Úlceras pépticas são mais prevalentes no duodeno, 95% estão localizadas na sua primeira porção, e 90% próximo à junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago, as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo, na pequena curvatura (25%). Sua incidência está mais elevada entre homens em relação às mulheres (SILVA *et al.*, 2008).

As úlceras duodenais acometem indivíduos com faixa etária de 30 a 55 anos e a gástrica acomete indivíduos entre 50 a 70 anos. Suas manifestações clínicas podem durar dias, semanas ou meses, podendo persistir por 10 a 20 anos com recidiva dos episódios de cicatrização e irritação. As manifestações clínicas mais comuns são a dor ou sensação de queimação na porção média do epigástrico ou nas costas (pirose), vômitos, distensão abdominal, constipação ou diarreia e sangramento (SMELTZER *et al.*, 2005; ABITBOL, 2012).

Durante anos, para o tratamento da UP eram utilizados os antiácidos com a finalidade de neutralizar a acidez gástrica, dieta alimentar ou cirurgias. Na década de 70 houve uma mudança importante na abordagem terapêutica da UP, onde os antagonistas de receptores de histamina (H₂), foram definidos através da utilização de antagonistas seletivos como a cimetidina e ranitidina. Tempos depois ocorreu uma nova evolução na terapêutica da UP com o surgimento de novas drogas citoprotetoras, como o misoprostol, um análogo da PGE₁, e extensas revisões sobre elas têm sido feitas (OLBE *et al.*, 2003; BLACK *et al.*, 1972).

Mais recentemente surgiram outras classes de drogas gastroprotetoras com mecanismos diferentes como, por exemplo, inibidores da bomba protônica ou H⁺, K⁺ ATPase, envolvida na secreção de HCl pelas células parietais. O omeprazol é uma das principais drogas dessa classe capaz de inibir a secreção ácida por inativação da bomba através da formação de ligações dissulfeto entre as moléculas reagentes do omeprazol com a enzima (BHATNAGAR; SISODIA, 2006).

Estudos desenvolvidos buscam medidas alternativas a terapia convencional no tratamento da lesão gástrica. Tornando os produtos naturais fonte principal desses estudos, especialmente os derivados de plantas. Muitas espécies de vegetais são utilizadas na medicina popular para minimizar os sintomas gástricos. Alguns fatores influenciam a utilização desses fitoterápicos como, por exemplo, menos efeitos colaterais e uma segurança quanto ao seu uso (FALCÃO *et al.*, 2008; ZAGHLOOL *et al.*, 2015).

Diversas plantas medicinais vêm sendo usadas no tratamento úlceras por serem na sua maioria compostas por princípios ativos como flavonóides, taninos ou terpenóides que geralmente demonstram atividade anti-úlcera e por apresentarem ações antioxidante inerentes, ações citoprotetoras ou anti-secretoras (MENDONÇA *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2015).

1.4 Plantas como Alternativa Terapêutica

1.4.1 Subprodutos de frutas

O Brasil é reconhecido mundialmente como grande produtor de frutas que leva a um grande crescimento das atividades agroindustriais. Em consequência desse grande crescimento é o aumento proporcional de subprodutos vindos das atividades de processamento (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Os subprodutos de frutas são materiais orgânicos que se compõem de peles (cascas), sementes e frações de polpa que apresentam diferentes formas e tamanhos normalmente desperdiçados ou descartados pela indústria processadora (MAIA *et al.*, 2007).

A principal fonte de subprodutos agroindustriais é o setor de processamento de sucos que na atividade gera de 30 a 40% destes materiais. Em detrimento desta realidade, diversos estudos buscam destiná-los de forma segura e econômica, caracterizando suas composições químicas e os convertendo em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (VILAS BOAS *et al.*, 2001).

Com a mudança dos hábitos alimentares da população, que está cada vez mais consciente da importância de uma alimentação saudável e uma dieta equilibrada com produtos naturais como frutas e seus derivados. Aumentando a demanda por sucos e promovendo o desenvolvimento na capacidade de produção e

processamento, o que vem a assegurar a oferta desses produtos no mercado (MAIA *et al.*, 2007).

Dessa forma o material descartado pelas indústrias na produção do suco é em média de 45% em massa dos frutos. Este resíduo apresenta grande potencial para ser usado como matéria-prima de excelente qualidade para as indústrias farmacêutica, alimentícia e de rações (VILAS BOAS *et al.*, 2001).

Diante disso, existe uma atenção mundial na possibilidade do aproveitamento desses subprodutos buscando associar a melhoria do valor nutritivo da dieta da população e a redução desses subprodutos das indústrias de alimentos, principalmente aquelas que processam frutas e hortaliças (LAUFENBERG *et al.*, 2003; LOUSADA JUNIOR *et al.*, 2005).

Estudos têm demonstrado que as frutas são ricas em muitos nutrientes e compostos bioativos com atividades antioxidantes, e que esses compostos se concentram em sua maioria nas cascas e sementes (COSTA *et al.*, 2000; MELO *et al.*, 2008).

Vários autores têm associado os efeitos benéficos à saúde do homem, do consumo regular de frutas, vegetais e grãos à presença de substâncias antioxidantes, como os compostos fenólicos, a vitamina C e os carotenóides (VASCONCELOS *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; PIENIZ *et al.*, 2009).

Dentre os diversos constituintes dos subprodutos, enfatiza-se a presença de carboidratos complexos denominados polissacarídeos. Estes compostos que correspondem a macromoléculas constituídas por centenas de monômeros, estão presentes em diversos organismos vivos exercendo funções estruturais e de material de reserva suprindo o metabolismo energético (SANTOS *et al.*, 2010).

Aliado a esse fato, propriedades como a biodegradabilidade, a abundância na natureza e versatilidade de aplicações fazem estas macromoléculas serem amplamente utilizadas na engenharia, biotecnologia e medicina (OVODOV, 1998; EIRAS *et al.*, 2007).

Os principais polissacarídeos encontrados em vegetais são as celulosas, hemicelulosas e pectinas que são macromoléculas de composição heterogênea. Essas estruturas são utilizadas em diversas aplicações tanto na indústria alimentícia como na farmacêutica e cosmética sendo sua extração e caracterização de fundamental importância para que se possa determinar a sua aplicabilidade (PAULA *et al.*, 2010).

Propriedades antitumorais, antivirais e anti-inflamatórias dos polissacarídeos já foram formalmente notificadas e estudos seguem neste contexto, para que se possa melhor elucidar o mecanismo de ação destas macromoléculas (LI *et al.*, 2011). Alguns deles são capazes de modular a proliferação e ativação de células imunocompetentes (KIM *et al.*, 2007), aumentando a expressão de citocinas (HAUER; ANDERER, 1993) e de receptores de superfície (MUELLER *et al.*, 1989), além de atuarem como agentes anti-tumorais (LI *et al.*, 2011), anti-virais (ZHANG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2011) e anti-inflamatórios (ZHANG *et al.*, 2004).

1.5 *Malpighia emarginata* (Acerola)

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) é um fruto avermelhado também conhecida como cereja-das-Antilhas, sendo originário da região das Antilhas, norte da América do Sul e América Central. Seu cultivo teve maior crescimento na década de 90 quando foi descoberto seu alto teor de vitamina C, com isso foi iniciado seu plantio em Porto Rico e posteriormente em Cuba, Flórida e Havaí. Sua inserção no Brasil ocorreu pelo nordeste brasileiro em 1956, onde as sementes são advindas de Porto Rico (LIMA *et al.*, 2003; EMBRAPA, 2012).

Sabe-se que os produtos naturais despertam a atenção da medicina e pesquisadores e com a acerola não é diferente, pois seu alto teor de vitamina C e outras substâncias antioxidantes desempenham diversas funções biológicas, uma delas é reciclar a vitamina E, participa da produção e manutenção do colágeno, minimiza os danos causados pelos radicais livres, que estão envolvidos na patogênese de diversas doenças, dessa forma sua ingestão pode ajudar no tratamento de diversos processos patológicos. A ingestão de vitamina C em doses elevadas é muito útil no tratamento de gripe, resfriado, tuberculose, afecções pulmonares, doenças hepáticas ou das vias biliares entre outras (EMBRAPA, 2012).

Evidências de que o consumo de frutas e hortaliças é benéfico para a manutenção da saúde humana e que diferentes componentes biologicamente ativos com potencial atividade antioxidante são importantes para a prevenção de doenças, esse fato vem conscientizando os brasileiros e contribuindo no fortalecimento e difusão do consumo da acerola. A acerola (*Malpighia emarginata*), um fruto tropical, é bem conhecida como uma fonte extremamente rica em vitamina C, aonde seu teor de vitamina C chega a ser 100 vezes maior que da laranja e 10 vezes maior que a goiaba, também rica em nutrientes como carotenóides, tiamina, riboflavina e niacina

(MESQUITA; VIGOA, 2000; HWANG *et al.*, 2002).

A composição dos subprodutos é extremamente diversificada e depende da origem da matéria-prima e da técnica de produção como podemos ver na tabela seguinte (Tabela 1) (KASUM, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2002; ROSS; LIMA *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Composição físico-química de subprodutos provenientes do processamento da acerola.

Componentes	Subproduto
	Acerola
Cinzas (%)	0,55
Proteínas (%)	1,65
Lipídeos (%)	3,59
Celulose (%)	35,07
Hemicelulose (%)	17,17
Antocianinas (µg/100 g)	8,84
Flavonóides (µg/g)	1,04
Vitamina C (mg/100g)	89,55
Fenólicos Totais (mg/100g)	247

Fonte: Adaptado de Lousada Junior *et al.* (2006) e Sousa *et al.* (2011).

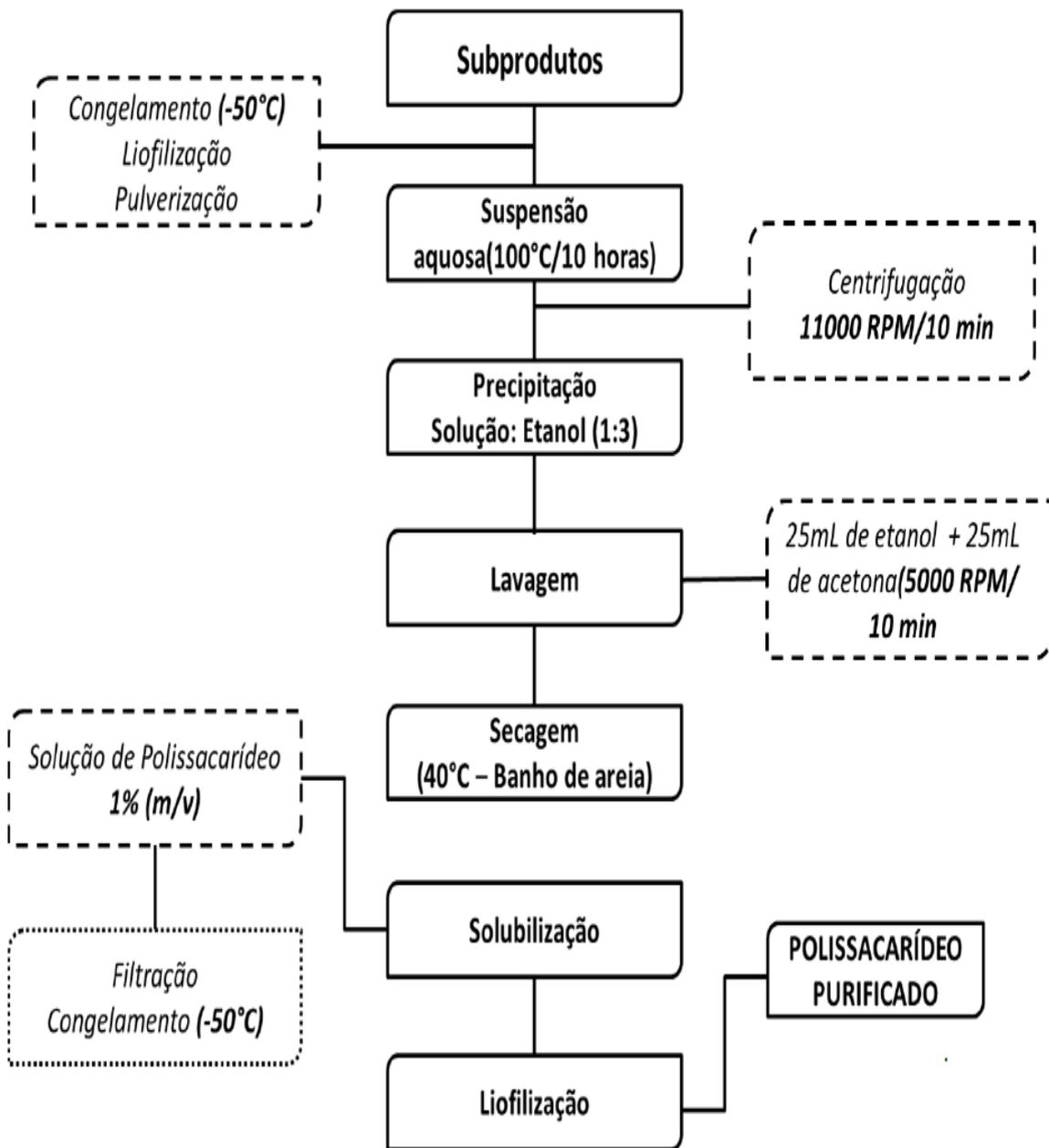
A acerola já tem seu uso difundido na fabricação de licores, geleias, doces em calda e em pasta, sorvetes, chicletes e bombons. Pode ainda ser consumida in natura, sob a forma de suco natural, ou como fonte enriquecedora de vitamina C quando associada ao suco de outras frutas (EMBRAPA, 2012).

Empresa processadora de sucos e de poupas no Nordeste brasileiro no ano de 2009 processou 10.500 toneladas de acerola chegando a um pico de 120.00 toneladas/frutas/dia. No processamento da acerola, após a extração do suco, o subproduto gerado corresponde à semente triturada e polpa, o que segundo Vasconcelos *et al.* (2002), corresponde de 15 a 41% do volume total de toda acerola processada. Avaliando três diferentes cultivares de aceroleiras, Carpentieri-Pípolo *et al.* (2002) determinaram que em média 24% da fruta correspondem a subproduto, valor semelhante ao estimado por Folegatti e Matsuura (2003) que foi de 25%.

Os subprodutos agroindustriais utilizados no presente experimento foram

obtidos do processamento diário de uma indústria produtora de polpas de frutas localizada em Fortaleza (CE- Brasil), sendo provenientes do processamento da acerola constituído basicamente por películas, cascas, sementes e resíduos de polpa. Os subprodutos foram transportados para o Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal do Ceará, congelados a -50°C e liofilizados.

Figura 4- Fluxograma de extração do subproduto da acerola.



Fonte: Sabino (2015).

Após completa secagem, cada material foi pulverizado em liquidificador industrial até a obtenção de farinhas finas, sendo armazenados sob-refrigeração (12°C) em potes de polietileno sem contato com a umidade (FIGURA 5).

Figura 5 – Subprodutos da acerola pulverizada e liofilizada para armazenagem e distribuição para realização do experimento. Painel A: subproduto da acerola pulverizada; Painel B e C: subproduto da acerola em pote de polietileno.



Fonte: Sabino (2015).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A abordagem terapêutica para o tratamento de úlceras gástricas tem como estratégia a utilização de fármacos que inibem a bomba de próton, os citoprotetores e os antagonistas do receptor H2. Entretanto o uso dessas drogas está associado a vários efeitos adversos, como náuseas, ginecomastia, impotência, diarreia, reações alérgicas entre outros. Dessa forma a procura por agentes com menos efeitos colaterais e mais eficazes é bastante relevante, sendo fatores que levam a população a buscar meios alternativos, através do uso de plantas medicinais (CHOUDHARY *et al.*, 2013; ARAB *et al.*, 2015; HALABI *et al.*, 2014).

A falta de estudos sobre a extração potencial de compostos de interesse biológico limita o destino dado a estes materiais, que em sua maioria acabam se tornando lixo orgânico. Estudos apontam o potencial biotecnológico do uso de polissacarídeos principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica considerando, neste último caso, sua efetiva atividade biológica contra bactérias, vírus e tumores, por exemplo.

Sabendo que a quantidade destes materiais pode chegar a toneladas, é de interesse econômico, ambiental e científico a utilização desses produtos, sendo necessária uma investigação científica para que seja possível a sua utilização de forma eficaz e segura. De diferentes substratos, existem poucos registros na literatura sobre a caracterização estrutural de polissacarídeos provenientes de subprodutos agroindustriais do processamento de frutos (ROSS; LIMA *et al.*, 2003; MARTINS; FARIAS, 2002; AJILA *et al.*, 2007; PELIZER *et al.*, 2007).

Com intuito de descobrir novos efeitos do subproduto agroindustrial da acerola (*Malpighia emarginata*) esse estudo surgiu a partir do estudo de (SABINO, 2015) que demonstrou o efeito protetor e antioxidante no modelo de gastropatia induzida por etanol.

Dessa forma, o presente estudo pretende avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante dos polissacarídeos provenientes de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos, através de uma abordagem morfológica envolvendo técnicas de histomorfometria e imunohistoquímica, bem como de análises bioquímicas como: dosagem de citocinas, MDA, MPO e GSH.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante dos polissacarídeos provenientes de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a toxicidade do subproduto agroindustrial do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*), através da técnica de MTT.
- ✓ Avaliar o efeito dos polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*), através de uma análise macroscópica (planimetria) e microscópica (escores histológicos), na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.
- ✓ Compreender a atividade antioxidante dos polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) na concentração da glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos submetidos a gastropatia por naproxeno.
- ✓ Avaliar a sua ação sobre o estresse oxidativo no tecido gástrico através de medidas da concentração de malondialdeído (MDA), na mucosa gástrica de camundongos submetidos à gastropatia por naproxeno.
- ✓ Analisar o efeito dos polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais (casca) do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) na migração de neutrófilos, pela técnica de dosagem de mieloperoxidase (MPO), no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.

- ✓ Identificar a expressão das citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α através da dosagem das citocinas.

- ✓ Avaliar por meio de imunohistoquímica a expressão IL-1, IL-10, TNF- α e COX-2 no modelo de gastropatia induzida por naproxeno em camundongos pré-tratados com polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do subproduto do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*)

Os subprodutos agroindustriais utilizados no presente experimento foram obtidos do processamento diário de uma indústria produtora de polpas de frutas localizada na cidade de Fortaleza-CE; Brasil, sendo provenientes do processamento da acerola e constituídos basicamente por películas, cascas, sementes e resíduos de polpa. Depois de realizada a extração, purificação e cálculo dos rendimentos finais das frações polissacarídicas extraídas dos subprodutos do processamento da acerola, foram transportados para o Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal do Ceará, congelados a -50°C e liofilizados. As análises foram realizadas no Laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará. Posteriormente o subproduto já liofilizado (PCA) foi cedido pelo Prof. Francisco Wilane para realização desse estudo.

4.2 Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT *in vitro*

A citotoxicidade das frações polissacarídicas foi determinada segundo o descrito por Mossman (1983) utilizando o MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio]. Enzimas desidrogenases mitocondriais têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado, formando um cristal insolúvel de formazan de cor roxa. Após a solubilização com DMSO (dimetil-sufóxido), obtém-se uma solução cuja absorbância pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada será diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Para o procedimento, 200 μL da suspensão celular (aproximadamente 20000 células - cultura IEC 6) foram incubadas em placas na estufa de CO_2 pelo período de 24 horas. Passado a incubação o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com 100 μL das soluções contendo as frações polissacarídicas (PCA) (concentrações de 50 e 100%) e o controle positivo (toxina A do *Clostridium difficile*), sendo incubadas em estufa de CO_2 , por mais 24 horas e posterior remoção do meio de cultura. Os poços da placa foram lavados 2 vezes com PBS estéril e a cada um foram adicionados 100 μL da solução de MTT (5mg/mL) em meio Krebs. O sistema permaneceu em repouso por 20min a 37°C , no escuro. Após a incubação, a solução

de MTT foi removida e foi adicionado 1mL de isopropanol-ácido para dissolver os cristais de "formazan". Finalmente foi adicionado a todos os poços 100µL de DMSO puro, sendo a placa agitada por 5 min com espera de mais 5min para a estabilização da cor. As amostras foram colocadas em cubetas de 1,5mL e a absorbância lida a 570nm no espectrofotômetro, usando como branco uma solução preparada com 0,5mL de MTT (0,5mg/mL) e 1mL de isopropanol-ácido. Os resultados das absorbâncias obtidas foram submetidos ao teste de comparação múltipla de Bonferroni's e os resultados expressos em média e desvio padrão.

4.3 Animais

Foram utilizados 90 camundongos, de ambos os sexos, pesando entre 25 e 30 g. Eles foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ num ciclo de 12h luz/12h escuro. Os animais foram privados de alimento por 18h antes dos experimentos, tendo acesso livre a água. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC e pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC.

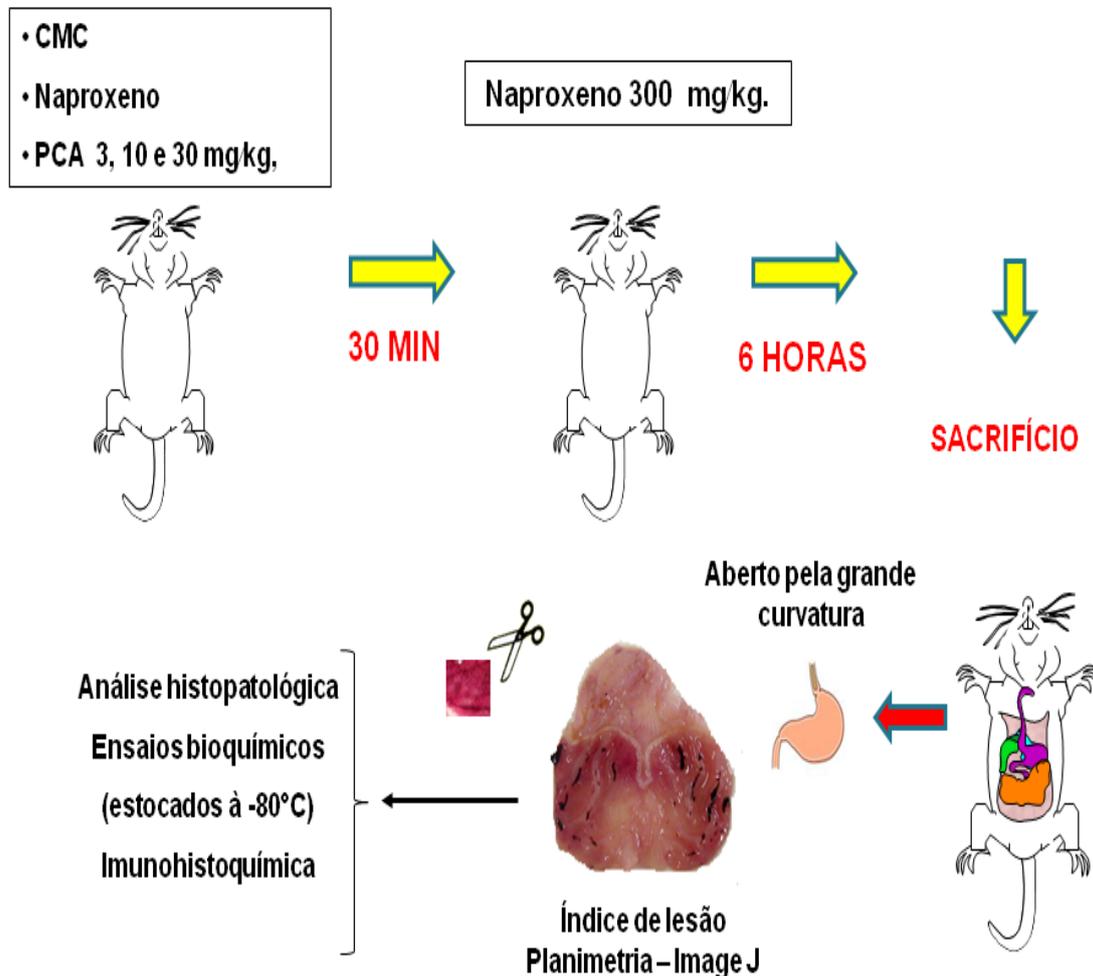
4.4 Modelo de lesão gástrica induzida por Naproxeno (NPX)

4.4.1 Padronização do modelo de lesão gástrica induzida por NPX em camundongos

Os camundongos foram pré-tratados com 0,5% de carboximetilcelulose (veículo/grupo controle) ou polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) (PCA) na dose de 3, 10 e 30 mg/Kg. Após 30 minutos, o NPX (300 mg/kg, v.o.) foi administrado. O grupo controle recebeu apenas veículo ou veículo + naproxeno. Decorridas 6 horas após a administração do NPX, os animais foram eutanasiados por uma dose letal de ketamina e cloridrato de xilazina (respectivamente, 200/60 mg/kg), os estômagos foram retirados rapidamente e abertos pela curvatura maior e lavados com 0,9% de soro fisiológico. A avaliação das lesões da mucosa gástrica foi realizada depois do órgão ser estirado. O dano gástrico foi medido por planimetria por meio do software Image J. Amostras dos estômagos foram fixadas em formalina a 10% imediatamente após a remoção para avaliação histológica subsequente. Além disso, as amostras foram pesadas, congeladas e armazenadas a -70°C até serem utilizadas para

posteriores análises bioquímicas (**Figura 6**).

Figura 6- Fluxograma ilustrativo para protocolo de lesão gástrica e pré-tratamento com subproduto da acerola



Fonte: Figura adaptada.

4.5 Protocolo experimental

4.5.1 Grupos experimentais

Grupo CMC: Os animais CMC 0,5% por via oral. Esse grupo recebeu apenas solução de CMC.

Grupo NPX+CMC: Os animais receberam apenas NPX (300mg/kg. v.o) + CMC 0,5%, 0,5 ml por v.o, por gavagem. Esse grupo recebeu NPX diluído em CMC 0,5% e CMC 0,5%.

Grupo PCA (3 mg/Kg) mais úlcera péptica induzida por NPX: Os animais foram pré-tratados com polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) (PCA) na dose de (3 mg/Kg. v.o.) por gavagem 0,5 ml diluído em água destilada. Após 30 minutos foi administrado 0,5 ml de NPX (300mg/kg. v.o.) diluído em CMC 0,5%.

Grupo PCA (10 mg/Kg) mais úlcera péptica induzida por NPX: Os animais foram pré-tratados com polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) (PCA) na dose de (10 mg/Kg. v.o.) por gavagem 0,5 ml diluído em água destilada. Após 30 minutos foi administrado 0,5 ml de NPX (300mg/kg. v.o.) diluído em CMC 0,5%.

Grupo PCA (30 mg/Kg) mais úlcera péptica induzida por NPX: Os animais foram pré-tratados com polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) (PCA) na dose de (30 mg/Kg. v.o.) por gavagem 0,5 ml diluído em água destilada. Após 30 min foi administrado 0,5 ml de NPX (300mg/kg. v.o.) diluído em CMC 0,5%.

4.6 Protocolo Experimental

4.6.1 Avaliação da Atividade Gastroprotetora

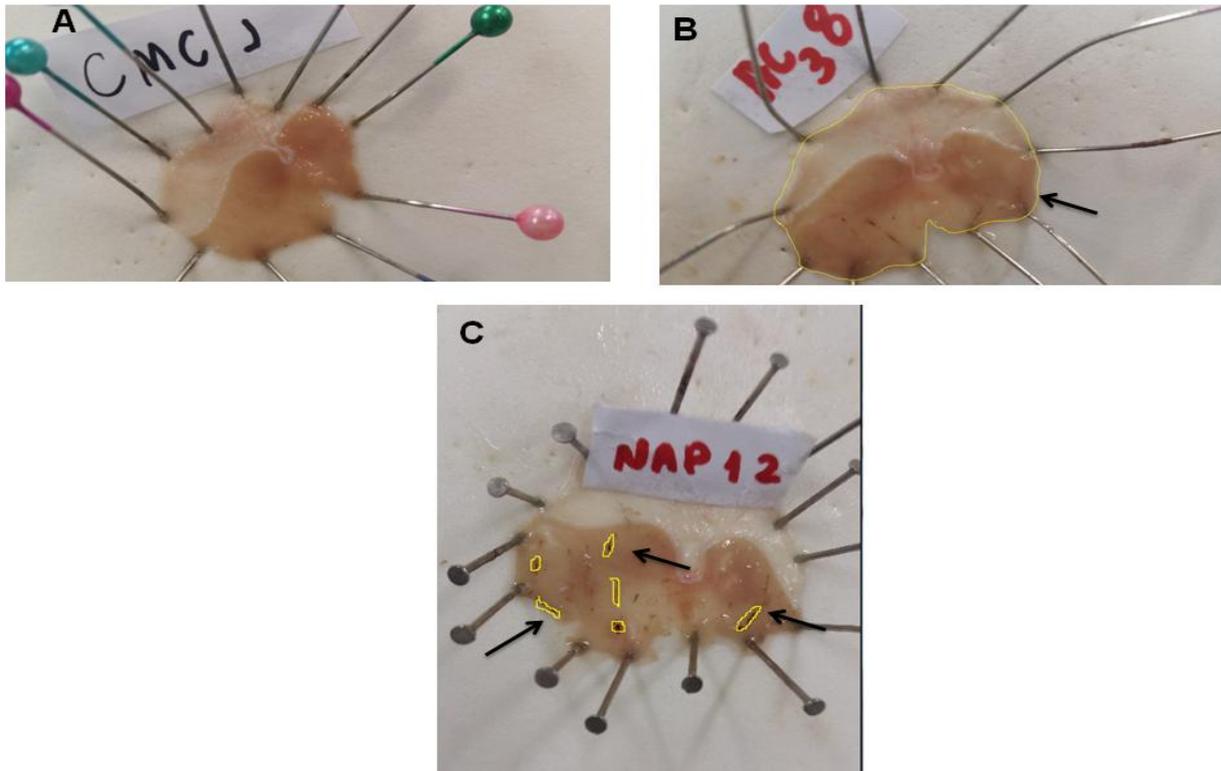
Todos os animais foram avaliados após os tratamentos para avaliação das lesões gástricas induzidas por naproxeno em camundongos. O percentual da face glandular gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de lanimetria computadorizada (imageJ[®]). A área ulcerada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico (ROBERT *et al.*, 1979).

4.6.2 Análise macroscópica da mucosa gástrica de camundongos tratados com extrato isolados de (PCA) no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Os animais foram sacrificados 6 horas após a indução da lesão gástrica, os animais foram analgesiados com ketamina e cloridrato de xilazina (respectivamente, 200/60 mg/kg) e posteriormente eutanasiados. Após deslocamento cervical foi realizado uma laparotomia para remoção do estômago, os estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura lavados com água destilada e colocados em solução de (PBS) (Ko JK-S & Cho CH, 1998). Em seguida, os estômagos foram abertos com auxílio de alfinetes em uma mesa plana com fundo branco e então fotografado com câmera digital para análise das alterações

macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (Imagem J) (FIGURA 7).

Figura 7- Figura adaptada. Fotomicrográfas da mucosa gástrica abertos em local plano com fundo branco e uso do programa de planimetria Image J – Índice de lesão gástrica (mm^2). Painei A: estômago aberto em fundo branco e plano; Painei B: Análise da área total do estômago no programa de planimetria Image J; Painei C: Análise das áreas de lesão do estômago no programa de planimetria Imagem J



Fonte: Próprio autor.

4.6.3 Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato isolado de (PCA) no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Para avaliação histológica, as amostras de estômago foram fixadas em solução de formol a 10% por 24 h. Após a fixação, as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%. O material foi, em seguida, embebido em parafina e seccionado; Seções de 4 micrometros de espessura foram desparafinizadas, coradas com hematoxilina e eosina (H & E) para o estudo em microscópio ótico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de (LAINE; WEINSTEIN, 1988), sendo avaliada a perda da arquitetura de células (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de

células inflamatórias (escores de 0-3), sendo 14 o escore máximo. Toda a avaliação histopatológica foi realizada por um patologista experiente, por meio de um estudo cego.

4.7 Avaliação da Atividade Antioxidante Através da Determinação da concentração de glutathiona (GSH)

A concentração de glutathiona (GSH) em amostras de tecidos do estômago foi realizada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay, (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg de tecido do estômago dos animais foi homogeneizada em 1ml de EDTA 0.02M para cada 100mg de tecido. Alíquotas de 400 μ L do homogeneizado foram misturadas a 320 μ L de água destilada e a 80 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 400 μ L do sobrenadante foi adicionado a 800 μ L de tampão Tris 0,4M (pH 8.9) e 20 μ L de ácido ditio-nitrobenzoico DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em μ g/g de tecido.

4.8 Avaliação do Dano Oxidativo Através da Análise da Concentração de malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA foram determinados pelo método escrito por Mihara e Uchiyama (1978), baseado na reação com o ácido tiobarbitúrico. As amostras de tecidos do estômago foram homogeneizadas com KCl gelado 1.15% para preparar 10% de homogenato. Meio mililitro (0.5ml) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrifuga de 10 ml, 3ml de H₃PO₄ (1%) e 1ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%) foram acrescentados. Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 40 segundos com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mmol/g de tecido.

4.9 Avaliação da infiltração neutrófilica através determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é uma peroxidase abundante nos granulócitos neutrófilos e amostras de tecido gástrico, coletadas dos camundongos pré-tratados com os polissacarídeos e submetidos a gastropatia por naproxeno, foram pesadas colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados num Politron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por BRADLEY et al, 1982.

4.10 Dosagem da citocina TNF- α e IL-6

Os níveis da citocina IL-6 e TNF α foram quantificadas por ELISA. Para a dosagem de IL-6 e TNF- α , foi utilizado a melhor dose polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) (PAC 30 mg/kg). Os tecidos coletados foram homogeneizados em PBS. A detecção da citocina IL-6 foi realizada por meio do Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-6 por 18h em temperatura ambiente com 100 μ L de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200 μ L de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h.

Após o bloqueio, 100 μ L das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-6 em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos.

Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 μ L da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada,

adicionando 50 µL solução de parada (H₂SO₄). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

4.11 Imunohistoquímica para detecção de IL-10, COX2, IL1-β e TNF-α

A imunohistoquímica para IL-10, COX2, IL1-β e TNF-α, foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). seguir, os tecidos foram desidratados em álcool sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilissina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), e (9.0.sob aquecimento em banho maria, por 30 minutos para a recuperação antigênica a 95°C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (20 minutos). Em seguida foi feito bloqueio de proteína (protein in block) por 20 minutos. Os cortes foram incubados overnight com anticorpo primário de cabra anti-IL10 (Santa Cruz), diluído 1:200 COX2 diluído 1:100, IL1-β 1:00 e TNF-α Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) bitinilado IgG anti cabra e coelho diluído 1:400 (Santa Cruz), por 30 minutos.

Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (leica DM1000, Alemanha). Fotografaram 10 campos por corte histológico no aumento de 40x, e foi realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o Image J. Foi considerada células positivas marcadas com coloração marron citoplasmática e nuclear.

4.12 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM), exceto os escores histopatológicos que foram expressos pela mediana.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni e para os escores histológicos foi realizado teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

4.13 Aspectos Éticos

Os protocolos desenvolvidos estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais. Este projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará com parecer favorável N° 105/2015.

5. RESULTADOS

5.1 Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT *in vitro*

Através da aplicação do teste com o MTT pode-se observar uma correlação direta entre a integridade física e funcional da membrana plasmática e do metabolismo mitocondrial das células expostas as diferentes concentrações (50 e 100%) do material estudado. Na Tabela 2, estão presentes os resultados encontrados para a porcentagem de células viáveis, após a exposição a frações dos polissacarídeos estudados.

As densidades óticas, apresentadas na Tabela 2, refletem a viabilidade das células frente à exposição das mesmas ao controle negativo (células e meio de cultura), controle positivo (toxina A do *C. difficile*) e as frações dos polissacarídeos estudados. As duas concentrações analisadas apresentaram valores de absorvância superiores ao controle positivo, o que indica que a não inibição do crescimento celular e conseqüentemente esse percentual de viabilidade celular (cultura IEC-6) a não toxicidade dos polissacarídeos estudados. O resultado desta análise traz segurança para continuar com o estudo em questão, uma vez que se trata de um material seguro à saúde.

Tabela 2 – Absorbâncias das culturas celulares expostas aos polissacarídeos extraídos dos subprodutos da acerola

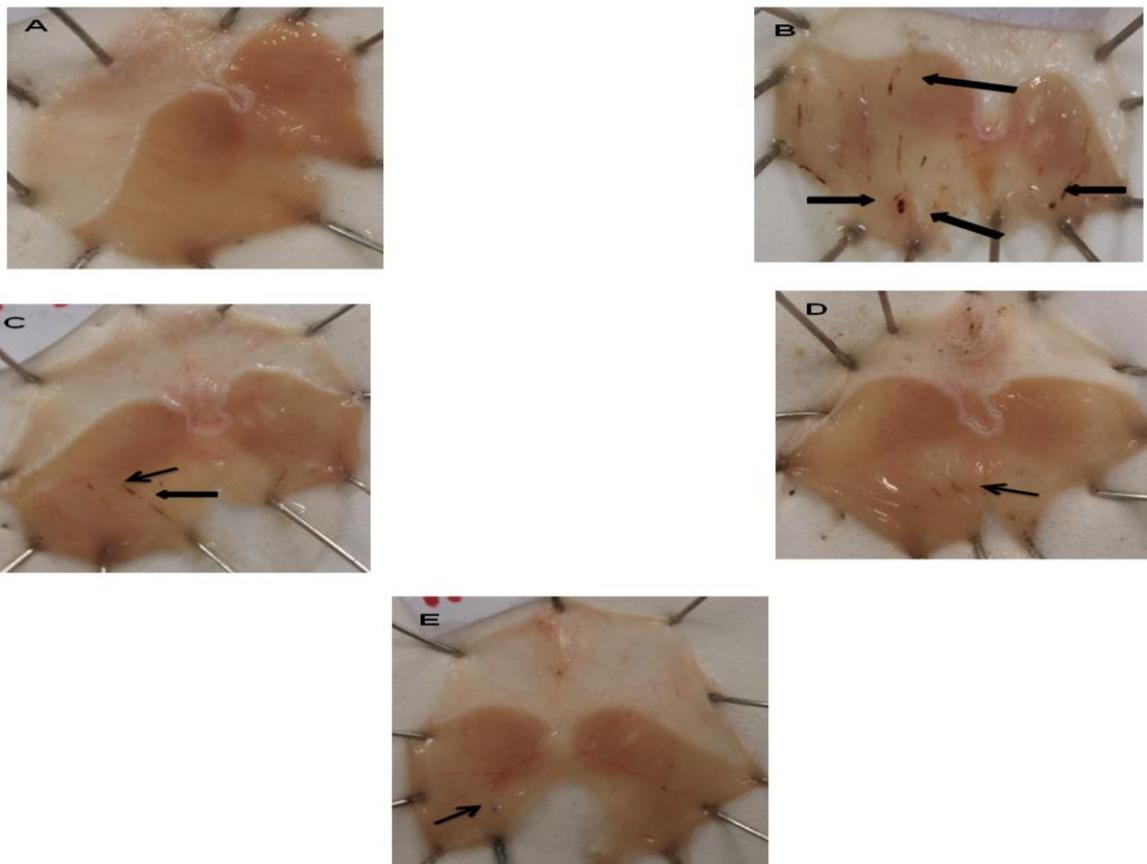
Polissacarídeo	Absorbância (570 nm)	
	50%	100%
Acerola	0,3215 ± 0,015	0,3885 ± 0,048
Controles	Absorbância (570 nm)	
C (-)	0,166 ± 0,04	
C (+)	0,0675 ± 0,03	

C(-): Controle negativo – Células e meio de cultura; C(+): Controle positivo: Cultura celular e toxina A do *Clostridium difficile*; Células epiteliais (cultura IEC 6) expostas a extratos contendo concentração de 50 e 100% dos polissacarídeos estudados. Resultados apresentados em média e desvio padrão pelo teste de Bonferroni's.

5.2 Avaliação do efeito protetor dos extratos isolados (PCA) no modelo de gastropatia por naproxeno (NPX) em camundongos – análise macroscópica e planimetria

Na figura 9 mostra a quantificação das lesões gástricas por mm² observadas no painel figura 8. Pôde se observar que os animais tratados somente NPX 300 mg/kg ($34,82 \pm 4,717$) apresentaram aumento ($p < 0,05$) nas lesões macroscópicas da mucosa gástrica quando comparado ao grupo carboximetilcelulose (CMC). O pré-tratamento com PCA nas três doses testadas (3, 10 e 30mg/Kg), reduziu de forma significativa, a lesão gástrica provocada pela administração do naproxeno.

Figura 8- Fotomicrográfiás da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com *Malpighia emarginata* e/ou naproxeno (NPX): Painel A: grupo carboximetilcelulose (0,5 ml/Kg, via oral); Painel B: grupo CMC (0,5 ml/Kg, via oral) + naproxeno (300 mg/kg, v.o); Painel C: PCA (3 mg/kg, v.o) + naproxeno (300 mg/kg, v.o); Painel D: PCA (10 mg/kg, v.o) + naproxeno (300 mg/kg, v.o); Painel E: PCA (30 mg/kg, v.o) + naproxeno (300 mg/kg, v.o).



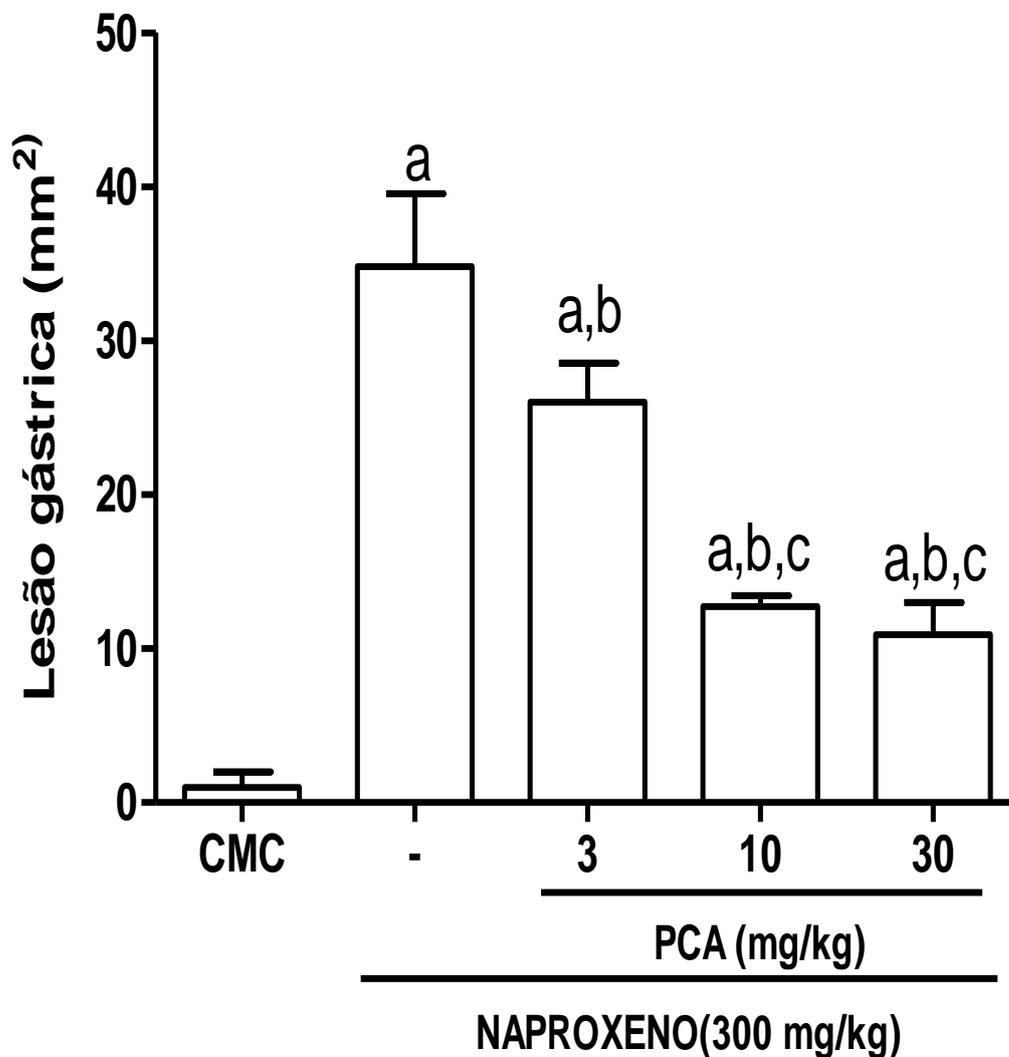
Fonte: Próprio autor.

Quantificando as lesões gástricas por planimetria, através do programa Image J (figura 9), podemos observar que os animais tratados apenas com CMC 0,5%

(grupo controle) não apresentaram lesão na mucosa gástrica, enquanto que a administração de naproxeno na dose de 300mg/Kg resultou no aparecimento de múltiplas lesões gástricas, quando comparado com o grupo controle (1 ± 1).

Os animais pré-tratados com PCA nas três doses testadas de 3($26 \pm 2,545$), 10 ($12,72 \pm 0,7341$) e 30mg/Kg ($10,92 \pm 2,083$), reduziu de forma significativa, a lesão gástrica provocada pela administração do naproxeno ($34,82 \pm 4,717$).

Figura 9 - Efeito protetor dos extratos isolados (PCA) nas doses de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno; (c) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo PCA 3mg/Kg. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferronis.



Fonte: Próprio autor.

5.3 Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de camundongos pré-tratados com extratos isolados (PCA) nas concentrações de 3, 10 e 30 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX).

A tabela 3 mostra as alterações microscópicas que foram observadas por microscopia óptica e avaliadas através de escores de maneira geral de um fragmento de tecido do estômago. Foi observado o desarranjo nas glândulas gástricas com perdas das células epiteliais, edema, hemorragia e intensa infiltração de células inflamatórias no grupo NPX quando comparado com o grupo controle. A tabela 3 mostra os valores em escores das alterações

Tabela 3 – Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de camundongos pré-tratados com os extratos isolados (PCA) nas concentrações de 3, 10 e 30 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX). Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. Teste de Kruskal- Wallis. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle) (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno (NPX), (c) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo PCA 3mg/Kg.

Grupo Experimental (N=5)	Lesão hemorrágica (escore 0-4)	Edema (escore 0-4)	Perda de arquitetura das células (escore 0-3)	Infiltrado de células (0-3)	Total (Escore 14)
CMC (Controle)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,5 (0-1)	0 (0-0)	0,5 (0-1)
NPX	2 (1-3) ^a	3 (1-3) ^a	3 (2-3) ^a	2,5 (2-3) ^a	10,5 (1-3) ^a
PAC 3mg	2 (1-2) ^{a, b}	1 (0-2) ^{a, b}	1,5 (1-2) ^{a, b}	2 (1-2) ^{a, b}	6,5 (1-2) ^{a, b}
PCA 10mg	0,5 (0-1) ^b	1 (0-2) ^{a, b}	1 (1-2) ^{a, b}	0 (0-1) ^b	2,5 (0-2) ^{a, b, c}
PCA 30mg	0 (0-1) ^{b, c}	1 (0-1) ^{a, b}	0 (0-1) ^{a, b, c}	0 (0-1) ^{a, b, c}	1 (0-1) ^{a, b, c}

Fonte: Próprio autor.

O extrato PCA na concentração de 3 mg/Kg reduziu de forma significativa o edema e perda de arquitetura no modelo experimental de lesão gástrica induzidas por NPX, já os parâmetros como lesão hemorrágica e infiltrado celular foi semelhante ao grupo que foi tratado com NPX. O extrato PCA nas concentrações de 10 mg/Kg foi capaz de reduzir de forma significativa o infiltrado de células, de forma que permaneceu semelhante ao grupo tratado com CMC.

Já o extrato PCA nas concentrações de 10 e 30 mg/Kg reduziu de forma

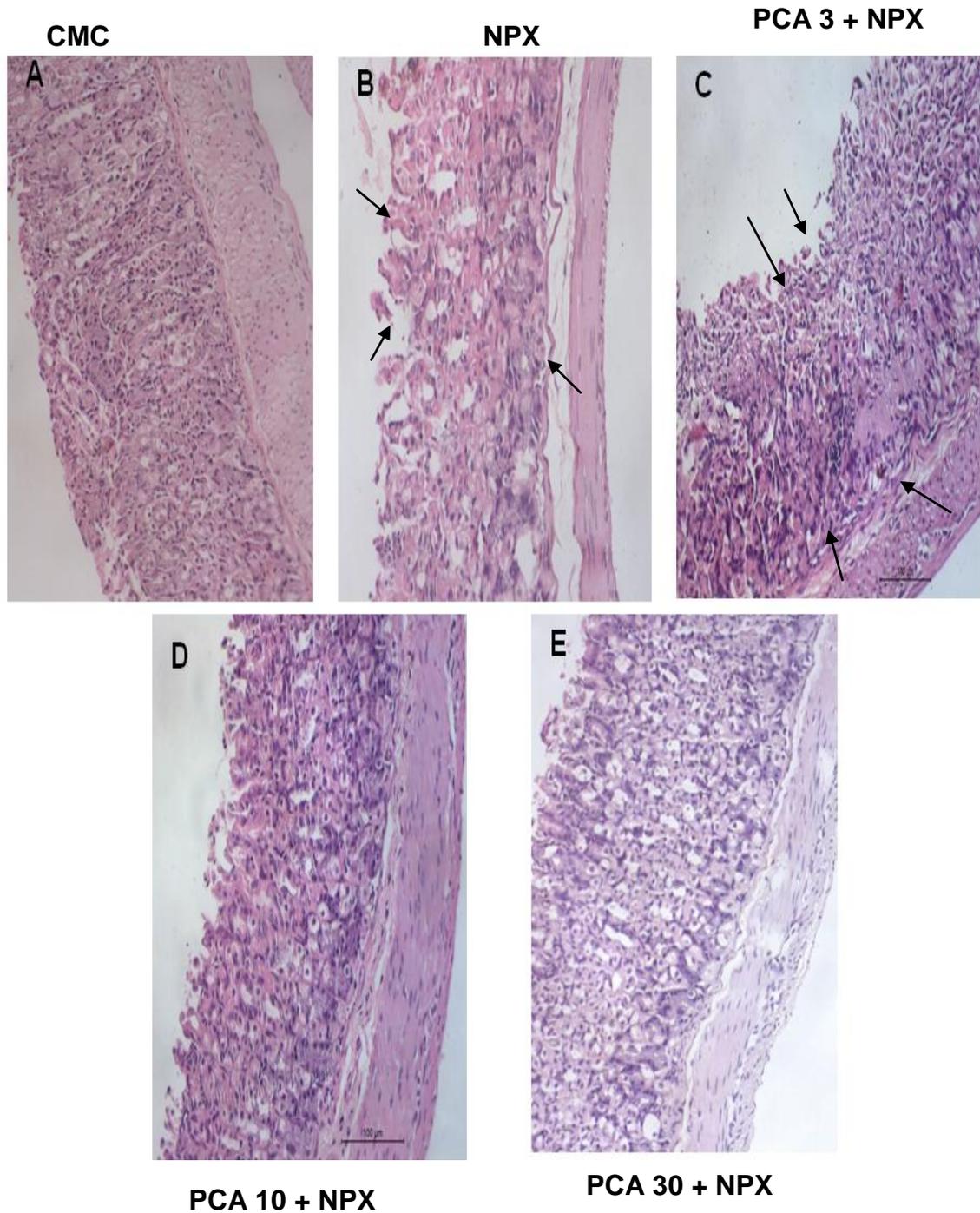
significativa todos os parâmetros avaliados como hemorragia, edema, perda de células epiteliais e a infiltração de células inflamatórias no modelo experimental de lesão gástrica induzidas por NPX. A concentração do PCA 30 mg/Kg foi capaz de preservar o tecido deixando os parâmetros de lesão hemorrágica e infiltrado de células semelhante ao grupo tratado apenas com CMC.

5.4 Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de camundongos pré-tratados com extratos isolados de (PCA) nas concentrações de 3, 10 e 30 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX).

Alterações microscópicas também foram observadas por microscopia óptica. Podemos observar o desarranjo nas glândulas gástricas com perdas das células epiteliais, edema, hemorragia e intensa infiltração de células inflamatórias provocados pela administração de NPX (naproxeno) na **figura 10**, quando comparado com o grupo controle.

O PCA nas concentrações de 3, 10 e 30 mg/Kg, diminuíram de forma significativa os parâmetros avaliados como hemorragia, edema, perda de células epiteliais e a infiltração de células inflamatórias no modelo experimental de lesão gástrica induzidas por NPX (figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados PCA e/ou naproxeno (NPX): Painei A: grupo carboximetilcelulose (0,5 ml/Kg, via oral); Painei B: grupo carboximetilcelulose (0,5 ml/Kg, via oral) + naproxeno (300 mg/kg, v.o); Painei C: PCA (3 mg/kg, v.o) + naproxeno (300 mg/kg, v.o); Painei D: PCA (10 mg/kg, v.o) + naproxeno (300 mg/kg, v.o); Painei E: PCA + naproxeno (300 mg/kg, v.o).

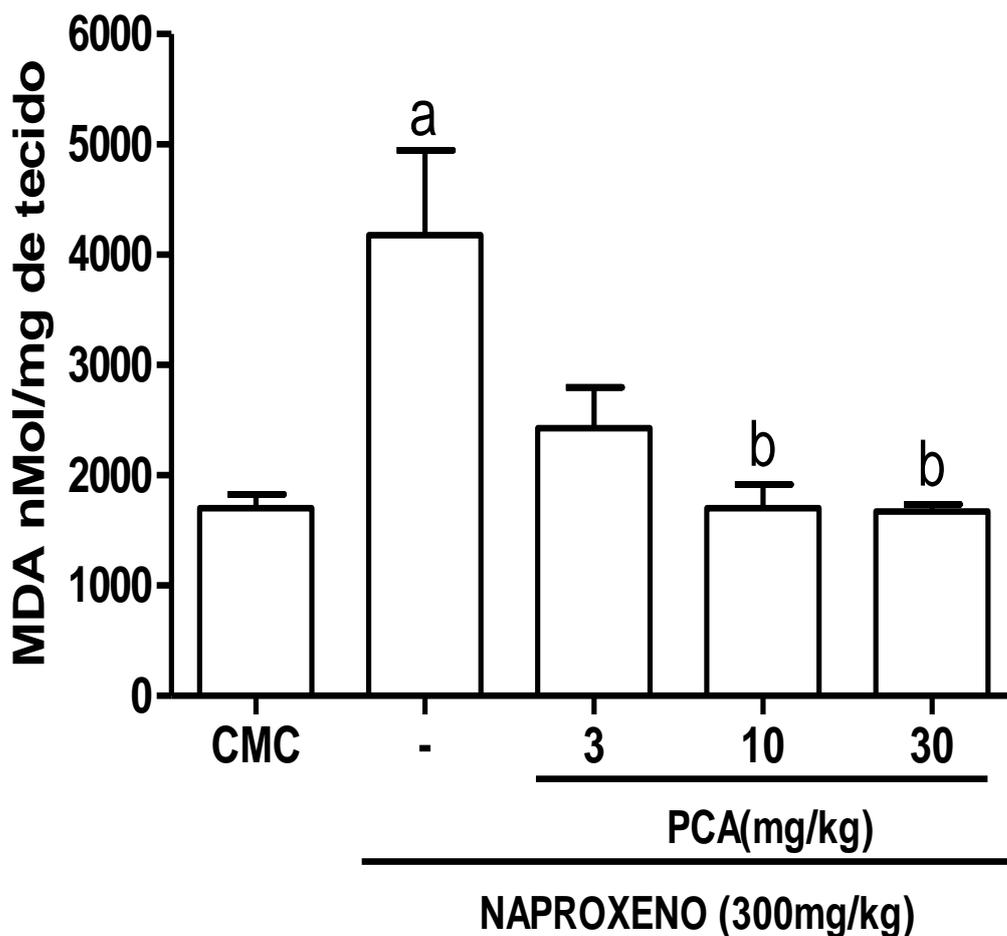


Fonte: Imagem retirada da web.

5.5 Determinação da concentração de MDA (malondialdeído) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato PCA na concentração de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.

Na lesão gástrica por NPX observamos um aumento significativo dos níveis de MDA por nMol/mg (**Figura 11**), quando comparado com o grupo controle (CMC) ($1750 \pm 83,71$ nMol/mg). A administração do PCA nas doses de 3 mg/kg ($2429 \pm 368,1$ nMol/mg), 10 mg/kg ($1970 \pm 167,2$ nMol/mg) e 30 mg/kg ($1874 \pm 63,95$ nMol/mg) reduziu de forma significativa a peroxidação lipídica induzida no modelo de gastropatia por NPX ($4531 \pm 720,7$ nMol/mg).

Figura 11 – Determinação da concentração de MDA (malondialdeído) na mucosa gástrica de camundongos pré tratados com o extrato PCA na concentração de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferronis.

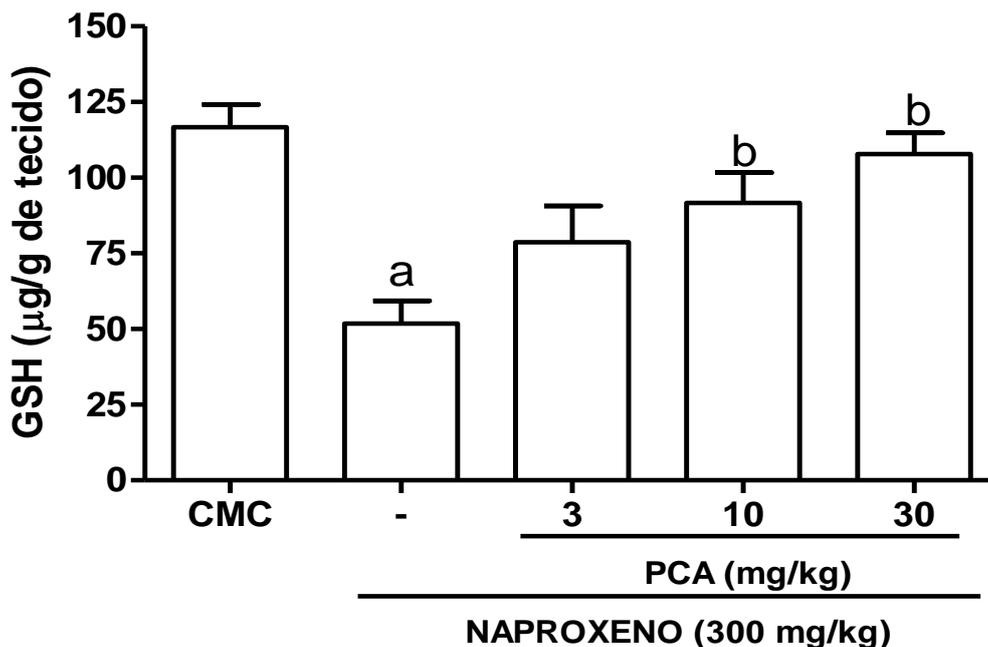


Fonte: O próprio autor.

5.6 Determinação da concentração de GSH (glutaciona) na mucosa gástrica de camundongos tratados com o extrato de PCA nas concentrações de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.

Na **figura 12** A determinação dos grupos sulfidrilicos não protéicos na mucosa gástrica de camundongos por ($\mu\text{g/g}$) mostrou que os níveis de glutaciona reduzida (GSH) no modelo de gastropatia induzida pela NPX. O grupo NPX ($51,87 \pm 7,415 \mu\text{g/g}$) observa-se uma depleção dos níveis de GSH quando comparado ao grupo controle ($123,4 \pm 7,143 \mu\text{g/g}$) (CMC). A administração do extrato PCA, nas doses de 30 mg/kg ($112,8 \pm 8,38 \mu\text{g/g}$) e 10mg/kg ($91,66 \pm 10,05 \mu\text{g/g}$) de peso corporal, apresentou uma atividade antioxidante significativa, determinado através da concentração de GSH no tecido gástrico, quando comprado com o grupo NPX ($51,87 \pm 7,415 \mu\text{g/g}$). Dessa forma, podemos sugerir uma atividade antioxidante importante e capacidade de preservar os níveis de GSH semelhantes ao grupo controle (CMC) quando os animais são pré-tratados com o extrato de PCA nas concentrações de 10 mg/kg e 30mg/kg.

Figura 12 – Determinação da concentração de GSH (glutaciona) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato PCA na concentração de 3, 10, 30 mg/kg no modelo de lesão gátrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferronis.

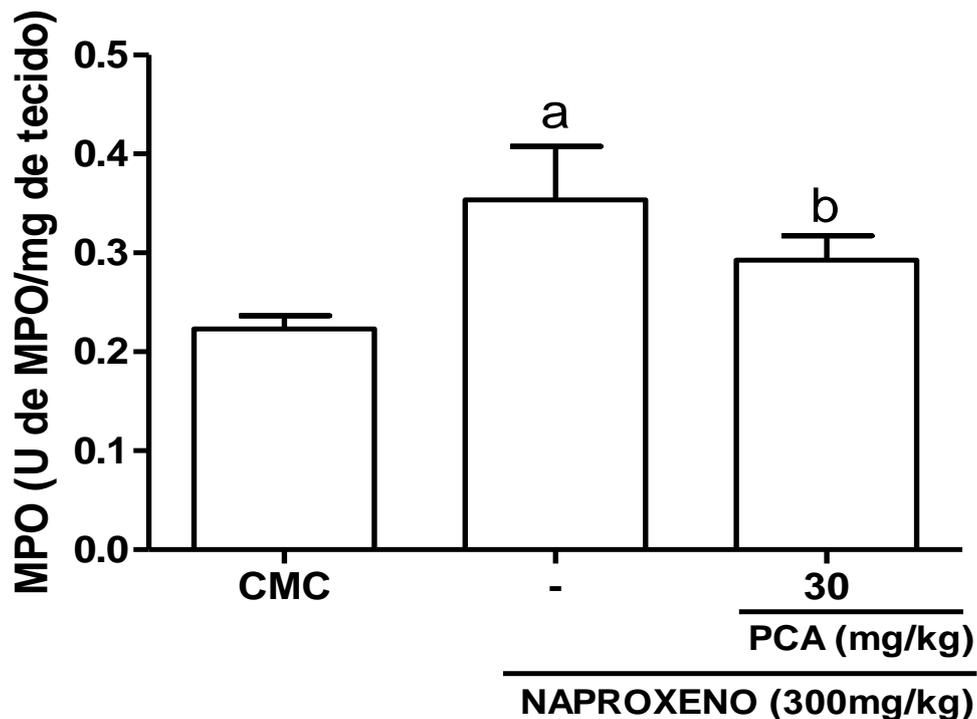


Fonte: O próprio autor.

5.7 Determinação da concentração de MPO (mieloperoxidase) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.

Na determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO/mg) podemos demonstrar que o extrato de PCA, apresentaram uma redução significativa nos níveis de MPO no tecido gástrico avaliado. Para a dosagem de MPO foi utilizado a melhor dose dos PCA (30 mg/kg). No modelo experimental, o NPX ($0,3537 \pm 0,05421$ mg) foi capaz de promover uma maior infiltração de neutrófilo na parede gástrica, aumentando de forma significativa a concentração de MPO, quando comparado com o grupo controle (CMC) ($0,2233 \pm 0,01306$ mg). Diante dos resultados obtidos, foi observado que o PCA na dose de 30mg/Kg ($0,2928 \pm 0,02449$ mg), promoveu uma redução importante na concentração de MPO, quando comparado com o grupo NPX ($0,3537 \pm 0,05421$ mg) (Figura 13).

Figura 13 – Determinação da concentração de MPO (mieloperoxidase) na mucosa gástrica de camundongos pré tratados com o extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: O próprio autor.

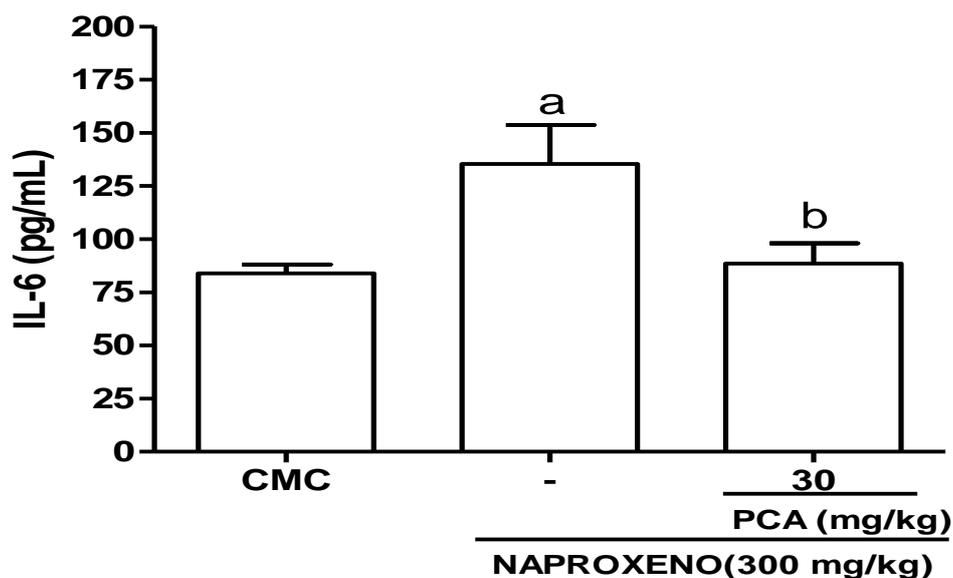
5.8 Dosagem de citocinas

Os níveis da citocina IL-6 e TNF- α na mucosa gástrica foram quantificados por ELISA. Para a dosagem de IL-6 e TNF- α , foi utilizado a melhor dose do PCA (30 mg/kg).

5.8.1 Determinação da concentração de IL-6 (interleucina 6) e TNF- α na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

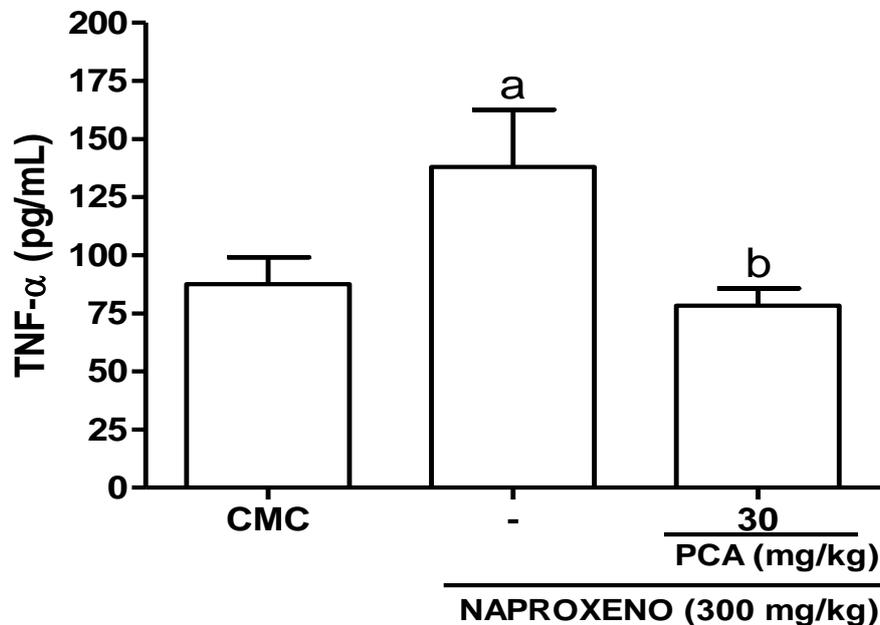
As amostras estomacais foram submetidas a ensaio para determinação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 por pg/ml. Os dados resultaram em um aumento significativo de IL-6 ($135,4 \pm 18,33$ pg/ml) e TNF- α ($137,9 \pm 24,58$ pg/ml) na mucosa gástrica dos animais tratados com NPX (Figura 14 e Figura 15) respectivamente. A administração de 30 mg/Kg do PCA foi capaz de diminuir significativamente as citocinas IL-6 ($88,54 \pm 9,52$ pg/ml) e TNF- α ($78,21 \pm 7,580$ pg/ml) na mucosa gástricas, quando comparados com a mucosa dos animais tratados com NPX ($135,4 \pm 18,33$); $137,9 \pm 24,58$ pg/ml).

Figura 14 – Determinação da concentração de IL-6 (interleucina 6) na mucosa gástrica de camundongos pré tratados com o extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferronis.



Fonte: O próprio autor.

Figura 15 – Determinação da concentração de TNF alfa na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno.



Fonte: O próprio autor.

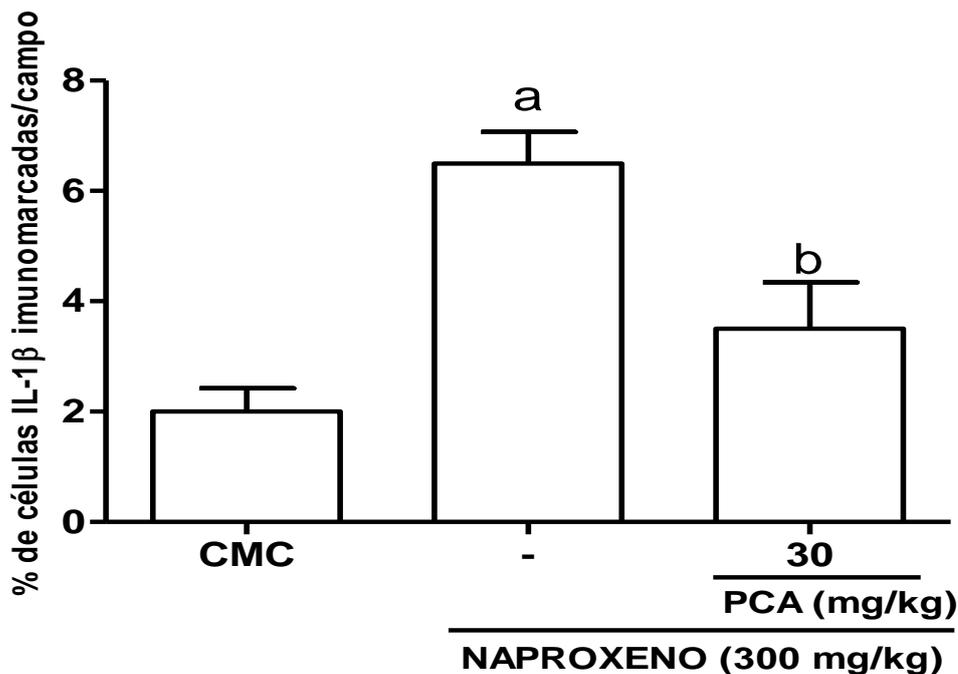
5.9 Efeito do PCA sobre a imunomarcção de IL-1 (interleucina 1), IL-10, TNF- α e COX-2 de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

5.9.1 Efeito do PCA sobre a imunomarcção de IL-1 (interleucina 1) de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Para demonstrar o papel da capacidade anti-inflamatória podemos observar o papel do extrato de PCA na capacidade de promover a diminuição da expressão da % de células IL-1b imunomarcadas/campo (Figura 16). Nossos dados resultaram em um aumento significativo de IL-1 ($6,500 \pm 0,5669$ % de células IL-1b imunomarcadas/campo) na mucosa gástrica dos animais tratados com NPX em relação ao grupo veículo tratado com CMC ($3,125 \pm 0,2950$ % de células IL-1b imunomarcadas/campo). A administração de 30 mg/Kg do PCA foi capaz de diminuir significativamente a IL-1 ($2,000 \pm 0,1890$ % de células IL-1b imunomarcadas/campo)

na mucosa gástricas, quando comparados com a mucosa dos animais tratados com NPX ($6,500 \pm 0,5669$ % de células IL-1b imunomarcadas/campo).

Figura 16 – Determinação IL-1 beta através de imunohistoquímica na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferronis.



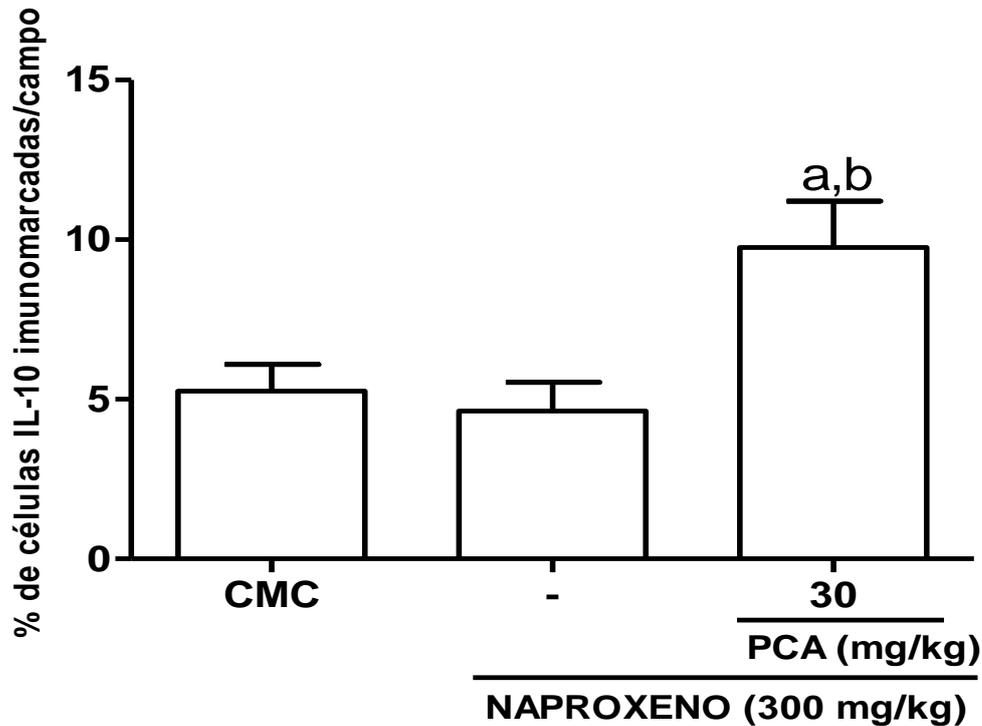
Fonte: O próprio autor.

5.9.2 Efeito do PCA sobre a imunomarcção de IL-10 (interleucina 10) de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Para demonstrar o papel da capacidade anti-inflamatória podemos observar o papel do extrato de PCA na capacidade de promover um aumento da expressão da % de células IL-10 imunomarcadas/campo (Figura 17). Nossos dados resultaram em uma redução significativa de IL-10 ($4,625 \pm 0,9051$ % de células IL-10 imunomarcadas/campo) na mucosa gástrica dos animais tratados com NPX em relação ao grupo controle tratado com CMC ($5,250 \pm 0,8399$ % de células IL-10 imunomarcadas/campo). A administração de 30 mg/Kg do PCA foi capaz de elevar significativamente a IL-10 ($9,750 \pm 1,461$ % de células IL-10 imunomarcadas/campo) na mucosa gástricas, quando comparados com a mucosa dos animais tratados com

NPX ($4,625 \pm 0,9051$ % de células IL-10 imunomarcadas/campo).

Figura 17 – Determinação IL-10 através de imunohistoquímica na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

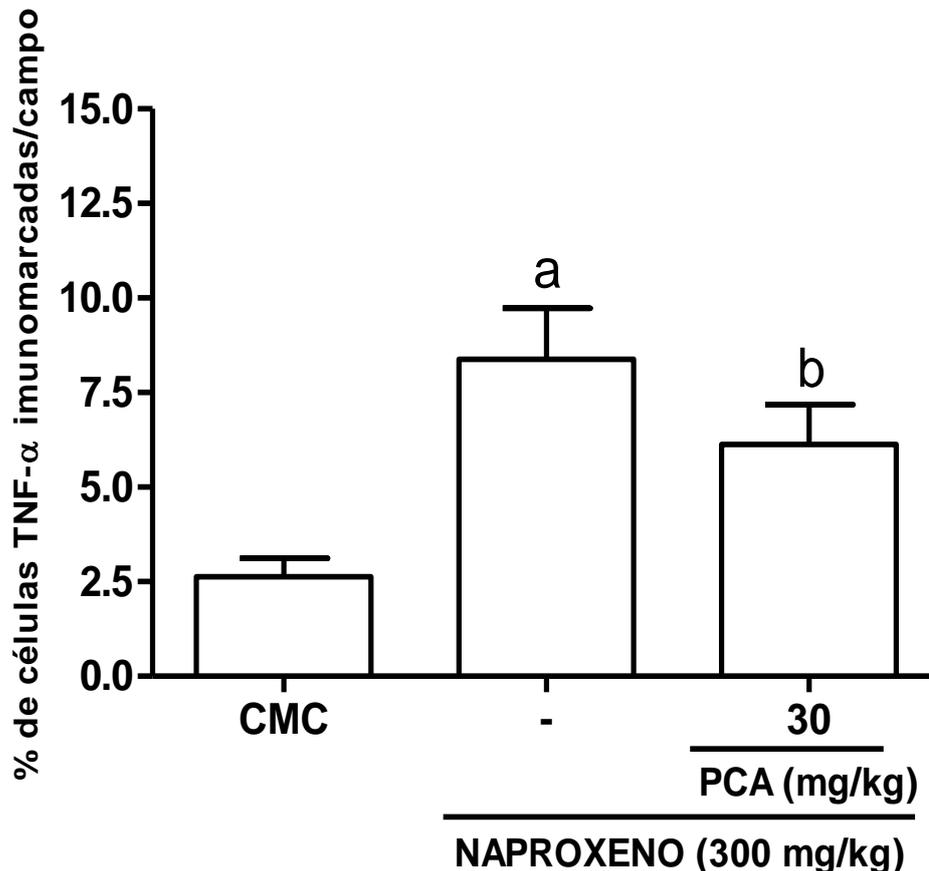


Fonte: O próprio autor.

5.9.3 Efeito do PCA sobre a imunomarcção de TNF α de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

As amostras estomacais foram submetidas a determinação de TNF α % de células imunomarcadas/campo através de imunohistoquímica. Os dados resultaram em um aumento significativo de TNF- α ($8,375 \pm 1,362$ % de células TNF- α imunomarcadas/campo) na mucosa gástrica dos animais tratados com NPX (Figura 18) quando comparado com o grupo CMC ($2,625 \pm 0,4978$ % de células TNF- α imunomarcadas/campo). A administração de 30 mg/Kg do PCA foi capaz de diminuir a expressão de TNF- α ($6,125 \pm 1,060$ % de células TNF- α imunomarcadas/campo) na mucosa gástricas, quando comparados com a mucosa dos animais tratados com NPX ($8,375 \pm 1,362$ % de células TNF- α imunomarcadas/campo).

Figura 18 – Determinação de TNF α através de imunohistoquímica na mucosa gástrica de camundongos pré tratados com extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.



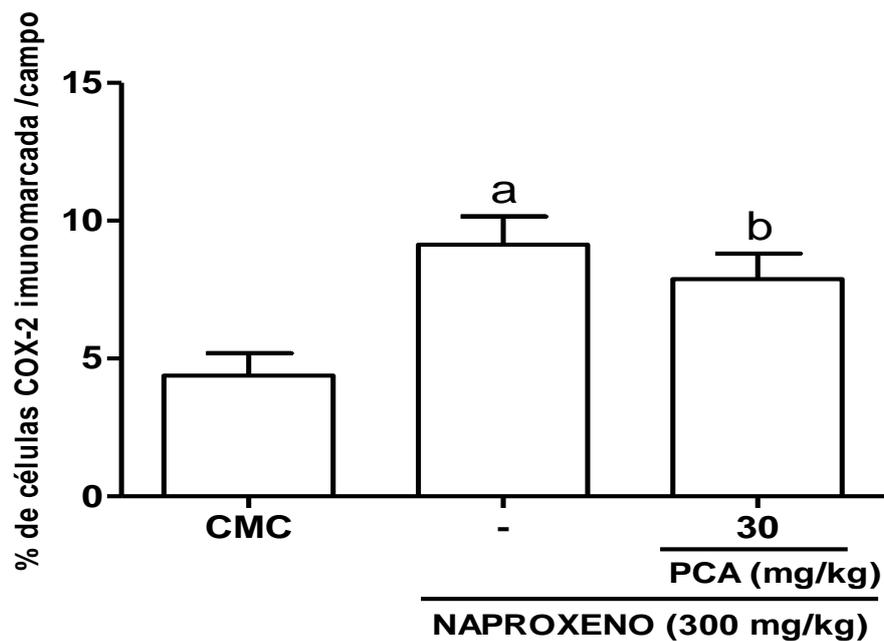
Fonte: O próprio autor.

5.9.4 Efeito do PCA sobre a imunomarcagem de COX-2 de camundongos pré-tratados com o extrato de PCA no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Para demonstrar o papel da COX-2 podemos observar o papel do extrato de PCA na capacidade de promover um aumento da expressão da % de células COX-2 imunomarcada /campo (Figura 19). Nossos dados resultaram no aumento significativo de COX-2 ($9,125 \pm 1,025$ % de células COX-2 imunomarcada /campo) na mucosa gástrica dos animais tratados com NPX em relação ao grupo controle tratado com CMC ($4,375 \pm 0,8224$ % de células COX-2 imunomarcada /campo). A administração de 30 mg/Kg do PCA foi capaz de reduzir a expressão de COX-2 ($7,875 \pm 0,9342$ % de células COX-2 imunomarcada /campo) na mucosa gástricas,

quando comparados com a mucosa dos animais tratados com NPX ($9,125 \pm 1,025$ % de células COX-2 imunomarcada /campo).

Figura 19 - Determinação de COX-2 através de imunohistoquímica na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com extrato de PCA na concentração de 30 mg/kg no modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos. (a) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo CMC (controle); (b) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Naproxeno. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferronis.



Fonte: O próprio autor.

6. DISCUSSÃO

No estudo Leffa *et al*, 2017 e Leffa *et al*, 2014 mostra que a *Malpighia emarginata* fruta popularmente conhecida como acerola e possui uma grande quantidade de vitamina C, carotenóides e flavonóides sendo ela fonte antioxidante. E que ao ser utilizado na dieta de camundongos com obesidade induzida, conseguiu reduzir o estresse oxidativo, a genotoxicidade e trouxe efeitos benéficos nos rins, no sangue e na medula óssea. Potencializando dessa forma os resultados encontrados em nosso estudo.

O uso de plantas no tratamento de diversas enfermidades trata-se de uma prática milenar, estudos mostram que o uso de polissacarídeos extraídos de subprodutos agroindustriais no tratamento da lesão gástrica foi extremamente relevante tendo resultados positivos. Mostrando que o polissacarídeo extraído de subprodutos como a acerola, abacaxi, manga e maracujá nas concentrações de 50% e 100%, quando testados em células não afetou o metabolismo da cultura celular das mesmas. Sendo essas células viáveis mesmo após a exposição aos polissacarídeos citados acima corroborando para o presente estudo (SABINO, 2015).

O experimento de citotoxicidade celular utilizados na presente pesquisa objetivou determinar se os polissacarídeos extraídos do subproduto estudado afetariam a integridade da cultura celular testada. Através da aplicação do teste com o MTT pode-se observar uma correlação direta entre a integridade física e funcional da membrana plasmática e do metabolismo mitocondrial das células expostas as diferentes concentrações (50 e 100%) dos materiais estudados. Estão presentes os resultados encontrados para a porcentagem de células viáveis, após a exposição a frações dos polissacarídeos estudados. As densidades óticas refletem a viabilidade das células frente à exposição das mesmas ao controle negativo (células e meio de cultura), controle positivo (toxina A do *C. difficile*) e as frações dos polissacarídeos estudados. As duas concentrações analisadas apresentaram valores de absorvância superiores ao controle positivo, o que indica que não houve inibição do crescimento celular e conseqüentemente, a não toxicidade dos polissacarídeos estudados.

Dessa forma o extrato de PCA nas concentrações de 50% e 100% se mostrou que a atividade antioxidante total (ATT) é extremamente relevante já que a acerola apresenta maior grandeza molecular. No estudo de Sabino (2015) mostra que os

produtos de acerola, abacaxi e caju que apresentaram menores grandezas moleculares (10-4 g/mol), foram aqueles que apresentaram maiores AAT, enquanto os produtos de manga e maracujá, que apresentaram as maiores massas molares (106 e 105 g/mol, respectivamente), foram aqueles que apresentaram menores AAT.

Segundo Luo *et al.*, 2010 a ATT é frequentemente utilizada para avaliação do poder antioxidante total de compostos naturais, podendo ser utilizadas tanto em solventes orgânicos como aquosos, sendo um eficiente índice que reflete a AAT dos polissacarídeos extraídos de diferentes substratos vegetais.

Os resultados do presente trabalho demonstram que os polissacarídeos isolados de subprodutos agroindustriais do processamento da acerola (*Malpighia emarginata*) (PCA) são capazes de reduzir as lesões gástricas induzidas por naproxeno em modelo experimental em camundongo. O PCA reduziu o edema, o infiltrado inflamatório e a alteração de arquitetura da mucosa gástrica.

A produção de ácido gástrico e a secreção mucosa são fatores importantes responsáveis pela manutenção da integridade da parede gastrointestinal, mas subjacentes ao equilíbrio homeostático, pois o comprometimento da homeostase gástrica pode levar à erosão da mucosa e ulceração (ROBERT, 1979). Alguns estudos mostram que o desenvolvimento da lesão da parede gástrica induzida por anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) envolve um aumento na secreção de ácido gástrico e inibição da síntese de muco, levando a um declínio nos níveis de prostaglandinas locais (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Com a inibição da biossíntese de prostaglandinas no estômago, diminuem seus mecanismos de defesa, tornando este órgão mais vulnerável à lesão (BATLOUNI, 2010). Essa inibição é responsável pelos principais efeitos colaterais dos AINE, como gastrite, disfunção plaquetária, comprometimento renal e broncoespasmos (JÚNIOR, e tal., 2007), pois as PG mantêm a integridade da parede gástrica através da inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco e bicarbonato, inibição da ativação de mastócitos, diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular, inibição da apoptose, e aumento e manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

O Naproxeno (NPX) é um AINE comumente prescrito, e está frequentemente associado a lesões gástricas e enteropáticas (AADLAND *et al.*, 1987), uma propriedade atribuída a fatores que incluem ativação de neutrófilos, deficiência de prostaglandinas endógenas (PG) e aumento da produção de espécies reativas de

oxigênio (ERO) (TANAKA *et al.*, 2001). A relação das ERO e as lesões gástricas induzidas por naproxeno foi esclarecida por alguns autores. Segundo Quintero e Miranda (2000) e Dall'Acqua e Viola (2001), o naproxeno está entre os compostos que contêm ácido aril-propiónico em sua estrutura química, o qual se comporta como fotossensibilizador. Com a absorção de fótons do comprimento de onda apropriado, o cromóforo atinge um estado excitado, e esta energia de excitação é então transferida para moléculas de oxigênio, gerando ERO, como superóxido e radicais hidroxila (ONOUÉ; TSUDA, 2006). As ERO reagem com o DNA nuclear, resultando na quebra da sua cadeia, que segundo Condorelli *et al.* (1995) e Bosca, Marin e Miranda (2001) é facilitada por uma interação não covalente entre o fármaco e o DNA, induzida pela transferência de elétrons e de energia para o DNA.

Através de uma análise macroscópica observamos que a administração do naproxeno (NPX) apresentou lesão na mucosa gástrica, enquanto os animais que receberam apenas o veículo CMC (controle) não desenvolveram lesão alguma. Contudo, os pré-tratamentos com o extrato de polissacarídeos da acerola se mostraram eficientes na avaliação macroscópica nas doses testadas, reduzindo de forma significativa à lesão gástrica provocada pela administração de NPX.

A análise microscópica revelou que a administração de naproxeno causou lesões na parede gástrica caracterizada por desarranjo nas glândulas gástricas com perdas das células epiteliais, edema, hemorragia e intensa infiltração de células inflamatórias, quando comparado com o grupo controle CMC. Por outro lado, os grupos pré- tratados com o extrato dos polissacarídeos da acerola nas doses de 3, 10 e 30 mg/Kg, diminuíram significativamente a infiltração de células inflamatórias, a formação de edema, a perda de células epiteliais e os danos hemorrágicos induzidos por NPX. Este resultado corrobora com os achados de Carvalho *et al.* (2015) que observou que a administração oral de NPX resulta em lesões gástricas macroscópicas e microscópicas, evidenciadas por edema, perda de células epiteliais, infiltração de células inflamatórias e hemorragia.

Diante da redução de todos os parâmetros de inflamação medidos, podemos afirmar que ambos os extratos possuem propriedade gastroprotetora, o que corrobora estudos anteriores. Podemos ainda sugerir que a propriedade gastroprotetora se dá pela atividade antioxidante dos compostos fenólicos contido nos extratos. Frutas e vegetais contêm constituintes químicos bioativos, incluindo flavonóides, terpenos, xantonas, saponinas, alcalóides e taninos, capazes de

oferecer gastroproteção (SANTOS & RAO, 2001; MORIKAWA *et al.*, 2006). Segundo Repetto *et al.* (2002) e Thompson *et al.* (2006), evidências clínicas e experimentais sugerem que o estresse oxidativo está estreitamente relacionado à etiopatologia da doença ulcerosa péptica, e que substâncias antioxidantes, como a mangiferina (um polissacarídeo extraído da *Mangifera indica*) podem desempenhar ação gastroprotetora. Sistemas antioxidantes complexos, como eliminadores de radicais e inibidores da produção de radicais livres, ajudam a prevenir danos oxidativos causados por altas concentrações de radicais livres (MAHMOOD T; GUPTA; KAISER, 2009).

Como as doenças gastrointestinais, incluindo danos induzidos por AINE, envolvem estresse oxidativo produzido pela geração de radicais livres e peroxidação lipídica, se torna necessária a medição de biomarcadores sanguíneos do balanço redox, para estimar os danos causados pelas ERO e a eficiência das defesas antioxidantes do organismo, os quais podem avaliar o dano oxidativo à estruturas lipídicas, através da peroxidação lipídica (LPO) bem como o dano oxidativo à proteínas, através dos compostos carbonílicos e sulfidrílicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Adicionalmente, o PCA diminuiu o estresse oxidativo induzido pelo naproxeno, evitando a depleção das concentrações de GSH (dose de 10 mg/kg e 30 mg/kg) e revertendo o efeito do NPX sobre o aumento do MDA.

Uma forma alternativa para analisar o estresse oxidativo é obtida pela quantificação da peroxidação lipídica. O radical lipídico é instável e degrada-se muito rapidamente em produtos secundários. A maioria deles são aldeídos eletrófilos, tais como o MDA (malondialdeído), que é o principal marcador do dano oxidativo, não-enzimático, nos lípidos insaturados das membranas celulares, conduzindo à oxidação de ácidos graxos e a formação do radical lípido (REED, 2011). Altos níveis de MDA indicam um aumento da peroxidação lipídica (KASHYAP *et al.*, 2005).

Malondialdeído (MDA) é um metabolito do processo de peroxidação lipídica e, portanto, um indicador de oxidação e um marcador de estresse oxidativo, sendo possível mensurar o grau de peroxidação lipídica nos tecidos através da medição dos seus níveis (DEEPA *et al.*, 2012). Na lesão gástrica induzida por naproxeno, observamos um aumento significativo dos níveis de MDA. A administração de PCA foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica induzida no modelo de gastropatia por NPX. Como os radicais livres, quando aumentam de modo excessivo, provocam

demasiada produção de intermediários reativos como o MDA, nesse contexto, podemos sugerir uma atividade antioxidante importante dos polissacarídeos extraídos da acerola, através da capacidade de reduzir os níveis de MDA.

Tratando-se da concentração de MDA, observou-se efeito semelhante ao apontado anteriormente, frente à relação que existe entre sua presença e os níveis de GSH na mucosa gástrica. Como era de se esperar, o grupo tratado com etanol, apresentou uma maior concentração de MDA quando comparado ao grupo naive, sendo a concentração desta substância no primeiro grupo 79,15% superior ao segundo grupo. Dentre os polissacarídeos avaliados no grupo teste, aqueles provenientes da acerola, abacaxi e caju, que foram os mesmos que mantiveram os maiores de valores de GSH na mucosa, apresentaram menores níveis de MDA, sendo inferiores ao grupo controle em 56,5; 58,1 e (A) (B) 94 41,2%, respectivamente não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo naive. Este fato indica que estes polissacarídeos foram capazes de reduzir a concentração de MDA na mucosa lesada a valores próximos aos estabelecidos para o tecido normal, evitando o consumo de GSH (SABINO, 2015).

A ação tóxica de ERO também pode ser avaliada pela ação de compostos antioxidantes endógenos como a glutathiona (GSH), um marcador da saúde celular com um papel importante na manutenção de proteínas celulares e lipídios no seu estado funcional, além de fornecer uma proteção importante ao participar dos sistemas de defesa celular contra danos oxidativo. A molécula de GSH é um carreador de radia livres quando presentes no tecido, a fim de neutralizar essas moléculas tóxicas para as células, GSH são oxidadas (MARÍ *et al.*, 2009).

No modelo de gastropatia induzida por naproxeno é possível observar uma redução significativa nos níveis de GSH. Como há a geração de radicais livres durante os mecanismos de ação de NPX, as GSH foram oxidadas. Em contrapartida, os PCA foram capazes de preservar os níveis de GSH significativamente, preferivelmente nas doses mais elevadas, determinada através da preservação quase integral da concentração de GSH no tecido gástrico, quando comprado com o grupo NPX. Estes resultados corroboram os de Rodeiro *et al.* (2007). Como a produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica desempenham papéis importantes na ulceração gástrica induzida por naproxeno, é possível afirmar que a eficácia do extrato da acerola se deu devido às suas ricas composições fenólicas, conferindo-lhes importante atividade antioxidante contra os

radicais livres formados pelo uso do naproxeno.

Sabino (2015) mostra que animais submetidos à gastropatia induzida por etanol 50% quando pré-tratados com subproduto da acerola mostrou que o tratamento dos animais com etanol 50% (grupo controle) depletou os níveis de glutaniona reduzida (GSH) da mucosa gástrica em 71% em média, quando comparado ao grupo naive. Entretanto, observou-se que o pré-tratamento com as soluções das frações polissacarídicas da acerola (1mg/Kg), promoveu um aumento significativo nos níveis de GSH em 66,7, 64 e 62%, respectivamente, ao se comparar os valores apresentados no grupo controle. As médias apontadas para a concentração de GSH destas frações foram estatisticamente iguais ($p < 0,05$) ao grupo que não sofreu estresse alcoólico (naive), indicando que estes materiais foram capazes, mesmo em baixas concentrações, de manter os níveis de GSH na mucosa gástrica semelhantes ao observado para o grupo naive.

Outro passo crucial na lesão gastrointestinal induzida por AINE é a infiltração de neutrófilos, que pode levar a distúrbios na microcirculação e na produção de radicais livres tóxicos para a mucosa (ZHANG *et al.*, 2008). No presente estudo observou-se que mesmo os animais submetidos a gastropatia induzida por NPX e pré tratados com subproduto da acerola principalmente na dose de 30 mg/kg tiveram uma redução dos danos a mucosa, redução do infiltrado de neutrófilos e conseqüentemente redução da inflamação, também observou uma atividade antioxidante.

MPO é um marcador enzimático de inflamação e infiltração de neutrófilos que é elevado em condições ulceradas e reduzido durante o processo de cicatrização (SOUZA *et al.*, 2004). A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizado como marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrintestinal, além de ter papel fundamental na produção de espécies reativas de oxigênio (BRADLEY *et al.*, 1982). No modelo experimental, o NPX foi capaz de promover uma maior infiltração de neutrófilo na parede gástrica, aumentando de forma significativa à concentração de MPO. Dessa forma observou-se no grupo pré-tratado com o subproduto da acerola na dose de 30mg/kg a ausência de infiltrado de neutrófilos na parede gástrica e a depleção significativa da concentração de MPO.

Outra observação importante foi o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF alfa e IL-6 beta, aumentadas na mucosa gástrica dos animais tratados

com naproxeno. Os pré-tratados com PCA reduziu acentuadamente a lesão gastrointestinal, diminuindo os níveis de MPO, bem como das citocinas inflamatórias, TNF alfa e IL-6 beta, citadas anteriormente. Assim, a supressão da infiltração de neutrófilos e a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias parecem contribuir para o efeito protetor PCA contra lesões induzidas por naproxeno. Outros estudos demonstraram que os compostos fenólicos estão envolvidos na prevenção do estresse oxidativo, com suas propriedades anti-inflamatórias, inibindo a infiltração de neutrófilos, como mostrado por Vieira *et al* (2011).

Dessa forma, estes resultados sugerem uma possível atividade anti-inflamatória e antioxidante do nosso material em estudo, os polissacarídeos isolados dos subprodutos da acerola por apresentarem uma capacidade de inibir significativamente a inflamação e o estresse oxidativo, resultando em melhoria dos sinais clínicos, com a redução da ulceração, redução da atividade de MPO, aumento nos níveis de GSH e redução dos níveis de MDA na mucosa gástrica de animais com gastropatia induzida por naproxeno.

7. CONCLUSÃO

Portanto, o PCA demonstrou ter um efeito anti-inflamatório e antioxidante no modelo de úlcera gástrica induzida por naproxeno. A partir dos dados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que o PCA tem um efeito anti-inflamatório e antioxidante no modelo experimental de úlcera gástrica induzida por naproxeno. Dessa forma, observou-se o quão promissor o uso de subprodutos da acerola no tratamento de gastropatias. Assim, se faz necessário mais estudos sobre seus mecanismos e seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório na patogênese da lesão gástrica.

REFERÊNCIAS

A cultura da acerola / [editores técnicos, Marcelo Calgato, Marcos Brandão Braga]. – 3. ed. rev. ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2012. 144 p. ; 11 cm x 15 cm. –(Coleção Plantar; 69).

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffe arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.2, p.414-420, março/abril, 2010.

ABITBOL, R. A. **Doença ulcerosa péptica**. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em 08 de setembro de 2017.

AJILA, C. M.; BHAT, S. G.; PRASADA RAO, U. J. S.; Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, 102, pp. 1006–1011, 2007.

ALBERT, B.; BRAY, D.; LEWIS J.; RAFF, M.; ROBERTS K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. Nova York, Garland Publishing, 1983.

Allen, A., Flemström, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**. Jan;288(1):C1-19, 2005.

ASPINALL, G.O. **Polysaccharides**. Ed. Pergamon Press, Oxford. 228p, 1970.

AUGST, A. D., KONG, H. J. E MOONEY, D. J. (2006). Alginate Hydrogels as Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, vol.6, p. 623, 2006.

AWAAD, A. S.; EL-MELIGY, R. M.; SOLIMAN, A. G.. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **J. of Sau. Chem. Soc.** 2012. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2012.03.002>.

ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K. e CONN, E. E. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, v.3, 1980. p. 473-500.

BERSTAD, K.; BERSTAD, A. *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease. **Scand J. Gastroentero.**,v. 28, p. 561-7, 1993.

BODE JC, BODE C. Alcohol, the gastrointestinal tract and pancreas. **Ther Umsch.** Apr; 57(4):212-9, 2000.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **Biol Chem**, v. 387, n. 10-11, p. 1329-35, 2006 Oct-Nov 2006. ISSN 1431-6730. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081103>>.

CHAMBERLAIN, J. A tendency to pay more attention to what something is called rather than what it is. **J Pharm Pharmacol.** Sep;45(9):769, 1993.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; PRETE, C. E. C.; GONZALEZ, M. G. N.; POPPER, I. O. Novas cultivares de acerola (*Malpighia emarginata* DC). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 124-126, abril, 2002.

COLA, M. M; BARBASTEFANO, V.; HIRUMA, L. C.A.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. **Biota Neotrop.**, vol. 6, n. 3, Dec , 2006.

CHEN, D. et al. Rat stomach ECL cells up-date of biology and physiology. **Gen Pharmacol**, v. 32, n. 4, p. 413-22, Apr 1999. ISSN 0306-3623. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10323481>>.

CUNHA, P. L. R.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química nova**, v.32, n.3, p.649-660, 2009

COSTA, R.P.; MENENDEZ, G.; BRICARELLO, L.P.; ELIAS, M.C.; ITO, M. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impactos nos lipídios e aterosclerose. **Revista**

da **Sociedade de Cardiologia**, São Paulo, v.10, n.1, p.819-832, 2000.

CUNHA, P. L. R.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química nova**, v.32, n.3, p.649-660, 2009

EDWARDS, M.; BULPIN, P. V.; DEA, I. C. M.; REID, J. S. G. Biosynthesis of legume seed galactomannans in vitro. **Planta**, vol.178, p. 41–51, 1989.

EIRAS, C., PASSOS, I. N. G., BRITO, A. C. F. de; SANTOS JÚNIOR, J. R. dos, ZUCOLOTTI, V., OLIVEIRA JR, OSVALDO N., KITAGAWA, I. L., CONSTANTINO, C. J. L., CUNHA, H. N. da, Nanocompósitos eletroativos de poli- α -metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Química Nova**, vol.30, n. 5, p. 1158-1162, 2007.

FOLEGAATI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. Produtos. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P. **A cultura da acerola**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 164-184, 2003.

GUTTERIDGE, J.M., HALLIWELL, B. Reoxygenation injury and antioxidant protection: a tale of two paradoxes. **Arch Biochem Biophys.**, Dec;v. 283, n.2, p. 223-6, 1990.

HAWKEY, C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology**, 119, p. 521-535. 2000.

HAUER, J.; ANDERER, F. A. Mechanism of stimulation of human natural killer cytotoxicity by arabinogalactan from *Larix occidentalis*. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, vol. 36, n.4, pp. 237–244, 1993.

HAWKEY, C.J., RAMPTON, D.S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? **Gastroenterology**. Nov; v.89, n.5, p.1162-88, 1985.

HIRSCHOWITZ, E.A., OHWADA, A., PASCAL, W.R., RUSSI, T.J., CRYSTAL, R.G. In vivo adenovirus-mediated gene transfer of the Escherichia coli cytosine

deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine. **Hum Gene Ther.** Aug; v.6, n.8, p.1055-63, 1995.

INNGJERDINGEN, K. T.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; PETERSEN, D.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, M.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1046–1058, 2007.

JIANG, X.; SUZAKI, E.; KATAOKA, K. Immunofluorescence detection of gastric H(+)/K(+)-ATPase and its alterations as related to acid secretion. **Histochem Cell Biol**, v. 117, n. 1, p. 21-7, Jan 2002. ISSN 0948-6143. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11819094>>.

KIM, Y.; GIRAUD, D.W.; DRISKELL, J.A. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, Netherlands, v.20, n. 6, p. 458-465, 2007.

KAYAÇETIN, S.; GÜREŞÇİ, S. What is gastritis? What is gastropathy? How is it classified? **Turk J Gastroenterol**, v. 25, n. 3, p. 233-47, Jun 2014. ISSN 2148-5607. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25141310>>.

KAWANO, S., TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. **J Gastroenterol Hepatol**. Mar;15 Suppl:D1-6; 2000.

KIM, Y.; GIRAUD, D.W.; DRISKELL, J.A. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, Netherlands, v.20, n. 6, p. 458-465, 2007.

KIM, G. Y.; OH, Y. H.; PARK, Y. M. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 309, n. 2, p. 399–407, 2003.

Konturek, P. C.; Brzozowski, T.; Sliwowski, Z.; Pajdo, R.; Stachura, J.; Hahn, E. G.; Konturek, S. J. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. **Scand. J. Gastroenterol.**, 33, n. 7, p. 691-

700, 1998.

KUTTY, K.; SCHAPIRA, R. M.; RUISWYK, J. V.; KOCHAR, M. S.; Úlcera péptica. In: **Tratado de Medicina Interna.**, Rio de Janeiro, Guanabara-koogan, p. 398-400, 2005.

KLEIN, L. C. et al. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 381, n. 2, p. 121-6, Feb 2010. ISSN 1432-1912. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20054524>>.

LEWIS, D.A., HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Prog Med Chem.**; v.28, p. 201-31; 1991.

LAINÉ L., TAKEUCHI K., TARNAWSKI A., “Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside,” *Gastroenterology*, vol. 135, pp. 41–60, 2008.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, n.2, p.167-198, 2003.

LOUSADA JUNIOR, J. E.; NEIVA, J. N. N.; RODRIGUEZ, N. M.; PIMENTEL, J. C. M. P.; LÔBO, R. N. B. Consumo e digestibilidade de subprodutos do processamento de frutas em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.2, p.659-669, 2005.

LOUSADA JUNIOR, J. E. et al. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.37, n.1, p. 70-76, 2006.

LI, J.; LIU, Y.; FAN, L.; AI, L.; SHAN, L. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus Jujuba* cv. Jinsixiaozao. **Carbohydrate Polymers**, vol.84, n.1, p 390–394, 2011./

LIMA, V. L. A.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, D. E. S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D. C.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 101-103, 2003.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S. L. **Processamento de Frutas Tropicais**. Fortaleza, Edições UFC, 2007. 320p.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.83-93, 2002.

MACMATH, T.L. Alcohol and gastrointestinal bleeding. **Emerg Med Clin North Am**. Nov;8(4): 859-72; 1990.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.83-93, 2002.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.A.G.L.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.44, n.2, p.193-201, 2008.

MESQUITA, P. C.; VIGOA, Y. G. La acerola. Fruta marginada de America con alto contenido de acido ascorbico. **Alimentaria**, v. 37, n. 309, p. 113-125, 2000.

MUSCARÁ MN, WALLACE JL. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am J Physiol**. Jun; v.276, n.6 Pt 1, p.1313-6; 1999.

MUELLER, E. A.; HAMPRECHT, K.; ANDERER, F.A. Biochemical characterization of a component in extracts of *Viscum album* enhancing human NK cytotoxicity. **Immunopharmacology**, vol.17, n.1, p. 11–18, 1989.

OVODOV, Y. S. Polysaccharides of phanerogams: their structure and physiological activity. **Bioorganicheskaya Khimiya**, v. 24, n. 7, p. 483-501, 1998.

OLIVEIRA, L.F. et al. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 3, p. 259-262, 2002.

OVODOV, Y.S. Structure of pectic polysaccharides isolated from onion *Allium cepa* L. using a simulated gastric medium and their effect on intestinal absorption. **Food Chemistry**. vol .134, p. 1813–1822, 2012.

PEREIRA, G. I. S. et al. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, vol. 27, n. 4, agosto, 2003.

PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R. de; ESTEFANEL,V.; ANDREAZA, R. Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de frutas e hortaliças. **Ciência e Agrotecnologia**, vol. 33, n. 2, p.552-559, março/abril, 2009.

PELIZER, L. H; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management e Innovation**. Vol 2, n. 1, março 2007.

PESKAR, B.M., EHRLICH, K., PESKAR, B.A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **J Pharmacol Exp Ther.**; Jun;301(3):969-74; 2002.

PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**, v. 2. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p. 944-947.

POTRICH F.B., ALLEMAND A., DA SILVA L.M., et al., “Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 130, pp. 85–92, 2010.

ROSEN,S.D., ROGERS, A.I. Clinical recognition and evaluation of peptic ulcer disease. **Postgrad Med**. Oct; v.88, n.5, p.42-7,51,55; 1990.

RIOS, E. R. V. **Efeitos farmacológicos da esculina em modelos animais de lesão gástrica e possíveis mecanismos envolvidos.** Dissertação (mestrado), programa de pós-graduação em farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

RUSSO, V. C.; DAIUTO, É. R.; VIEITES, R. L. Fresh cut yellow melon (CAC) submitted to different type cuts and concentrations of calcium chloride stored under modified passive atmosphere. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 33, n. 1, p. 227-236, ROBERT, A., NEZAMIS, J.E., LANCASTER, C., HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**. Sep; v.77, n.3, p. 433-43; 1979.

REPETTO, M.G., LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res**. May; v.35, n.5, p.523-34; 2002.

SABINO, LUIZ BRUNO DE SOUSA. **Caracterização química e determinação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de frações polissacarídicas extraídas a partir de subprodutos agroindustriais de frutas tropicais.** Dissertação (mestrado), programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

SMELTZER, S. C. et al. **Brunner & Suddarth, Tratado de Enfermagem Médicocirúrgica**, v. 1. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 995-997 e 1073-1075.

SANTOS, M. S.; PETKOWICZ, C. L. O.; HAMINUIK, C. W. I.; CÂNDIDO, L. M. B. Polissacarídeos Extraídos da Gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): Propriedades Químicas e Perfil Reológico. **Polímeros**, vol. 20, p. 352-358, 2010.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A., eds.; **Food Polysaccharides and their applications**, ed. 2., CRC Press : Flórida, 2006, Cap 6 e 8.

SANTOS CERQUEIRA, G. et al. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 683, n. 1-3, p. 260-9, May 2012. ISSN 1879-0712. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22426163>>.

SANTOS, F.A., RAO, V.S. 1,8-cineol, a food flavoring agent, preventsethanol-induced gastric injury in rats. **Dig Dis Sci**. Feb;46(2):331-7; 2001.

SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B.; OLIVEIRA, L.A. A goma de cajueiro como sistema inovador de extração líquido-líquido. **Revista Exacta**, v.5, p. 145 – 154, 2007.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1842-60, Jun 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474247>>.

SILVA, C. R. L. et al. Sistema digestório. In: FIGUEIREDO, M, N, A.; VIANA, D. L.; MACHADO, W. C. A. (Coord.) **Tratado Prático de Enfermagem**, v. 1. 2. ed. São Caetano do Sul: Yendis Editora, 2008, p. 215-238.

SON, D. J. et al. Gastroprotective efficacy and safety evaluation of scoparone derivatives on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Nutrients**, v. 7, n. 3, p. 1945-64, Mar 2015. ISSN 2072-6643. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25781220>>.

SRIVASTAVA, R.; KULSHRESHTHA, D. K. Bioactive polysaccharides from plants. **Phytochemistry**, vol. 28, n. 11, p. 2877-2883, 1989.

SUERBAUM, S., MICHETTI, P. Helicobacter pylori infection. **N Engl J Med**. Oct , v.347, n. 15, p.1175-86; 2002.

VIEIRA, P. A. F. et al. Caracterização química do resíduo do processamento agroindustrial da manga (*Mangifera Indica L.*) Var. Ubá. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, vol. 20, n. 4, p.617-623, 2009.

VASCONCELOS, V.R., NEIVA, J.N.M, PIMENTEL, J.C.M. et al. Utilização de subprodutos do processamento de frutas na alimentação de caprinos e ovinos. *IN:*

SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA – PECNORDESTE, 6, Fortaleza-CE, **Anais...** Fortaleza: FAEC, 2002. p.83-99.

VASCONCELOS, V.R., NEIVA, J.N.M, PIMENTEL, J.C.M. et al. Utilização de subprodutos do processamento de frutas na alimentação de caprinos e ovinos. *IN: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA – PECNORDESTE*, 6, Fortaleza-CE, **Anais...** Fortaleza: FAEC, 2002. p.83-99.

VILAS BOAS, E. V. de B. Tecnologia de processamento mínimo de banana, mamão e kiwi. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PÓS-COLHEITA E PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2002, Brasília, DF. **Anais...** Brasília:EMBRAPA, 2002. p. 1-7.

WALLACE,J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Am. J. Med.**, v.110, n.1A, p.19S-23S, 2001.

WALLACE, J.L.; KEENAN, C.M.; GRANGER, D.N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. **Am. J. Physiol.**, 259, 462-467,1990.

WHITTLE, B.J., LÁSZLÓ, F., EVANS, S.M., MONCADA, S. Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. **Br J Pharmacol.** Oct;116(4):2286-90, 1995.

WOLFE, M.M. Risk factors associated with the development of gastroduodenal ulcers due to the use of NSAIDs. **Int J Clin Pract Suppl.** Apr;(135):32-7; 2003.

WOLFE, M.M., SOLL, A.H. The physiology of gastric acid secretion. **N Engl J Med.**Dec 29;319(26):1707-15; 1988.

WALLACE J.L., GRANGER D.N., “The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense,” *FASEB Journal*, vol. 10, pp. 731–740, 1996.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 17, n. 6, p. 24, Jun 2015. ISSN

YOSHIDA, N., YOSHIKAWA, T., NAKAMURA, Y., ARAI, M., MATSUYAMA, K., IINUMA, S., YAGI, N., NAITO, Y., MIYASAKA, M., KONDO, M. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci.** Nov;40(11):2300-4;1995. 1534-312X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26109006>>.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n.2, 2006.

ZHANG, M.; ZHANG,L.; CHEUNG, P.C.K., OOI, V.E.C. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuberregium*. **Carbohydrate Polymers**, vol. 56, p. 123–128, 2004.

ZAKARIA, Z. A. et al. Mechanism(s) of action underlying the gastroprotective effect of ethyl acetate fraction obtained from the crude methanolic leaves extract of *Muntingia calabura*. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, p. 78, 2016. ISSN 1472-6882. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912079>>.

ZAPATA-COLINDRES, J. C. et al. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. **Canadian Journal of Gastroenterology**.