



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JÉSSICA CARLA BEZERRA DO NASCIMENTO FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO GASTROPROTETORA DO SUMO DE *Citrus x limon* (L.) OSBECK
(RUTACEAE)**

Recife

2018

JÉSSICA CARLA BEZERRA DO NASCIMENTO FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO GASTROPROTETORA DO SUMO DE *Citrus x limon* (L.) OSBECK
(RUTACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Samara Alves Brito

Recife

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

F475a Figueiredo, Jéssica Carla Bezerra do Nascimento.
Avaliação gastroprotetora do sumo de citrus x limon (L.) Osbeck
(Rutaceae) / Jéssica Carla Bezerra do Nascimento Figueiredo. – 2018.
84 f: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Citrus. 2. Úlcera gástrica. 3. Farmacologia. 4. Produtos naturais. I.
Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-266)

JÉSSICA CARLA BEZERRA DO NASCIMENTO FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO GASTROPROTETORA DO SUMO DE *Citrus x limon* (L.) OSBECK
(RUTACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Aprovada em: 31/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Presidente e Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Gildo de Lima (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que trilharam este caminho comigo na UFPE, seja da graduação ou do mestrado. Sei que encontrei dentro desta instituição pessoas maravilhosas que sempre se faziam presentes nos momentos decisivos, de alegrias ou angústias.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Almir Wanderley por ter sido tão paciente comigo durante este período. Tanto na época da graduação quanto no mestrado, fazendo sempre o melhor para me receber e tirar dúvidas. Muitas vezes o ensinamento vai além da bancada, vai além, em como devemos nos portar no mundo e no mercado de trabalho. Obrigada pelas palavras que irão me incentivar a melhorar cada vez mais.

Agradeço também ao professor Dr. Thiago Napoleão e ao professor Dr. Rafael Ximenes. Sou extremamente grata pela ajuda e disponibilidade para a realização deste trabalho.

Não é sempre que temos a sorte de encontrar pessoas que estão dispostas a ajudar em qualquer momento ou situação. Agradeço muito à Prof^a. Dr^a. Samara Alves Brito que esteve comigo desde o primeiro momento em que cheguei ao laboratório. Sendo uma das grandes incentivadoras no término de minha graduação e início de mestrado. Sei que posso dizer que vivenciei e aprendi muito com sua orientação, ensinamentos e apoio. Assim como por sua paciência e pela amizade que tivemos durante todo esse período de convivência.

Agradeço à Anne Catharine que teve um papel imprescindível para que este momento se tornasse realidade. Minha companheira de estudos, experimentos e de vida. Senti-me extremamente acolhida com todo o carinho e apoio que recebi. Muitas vezes precisamos de pessoas que iluminem nossos passos para podermos enxergar que existe sim uma solução e alento. Obrigada por ter sido minha amiga e por nos darmos tão bem!

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Cynthia Layse que se fez infinitamente presente em minha vida no laboratório. Sempre muito dedicada em suas pesquisas, porém muito receptiva e amiga em todos os momentos de dúvida que eu tinha. Aprendi muito em cada experimento realizado e em cada ensinamento dado durante o período em que estava no laboratório.

Agradeço aos meus amigos do laboratório. Àqueles que passaram por um breve momento conosco, àqueles que ficaram uma grande temporada e estavam presentes em diversos experimentos. Experimentos estes que são cansativos e demorados, mas que precisavam de muitas mãos. Mãos amigas, mãos com alto astral, mãos que estavam lá para ajudar e mudar o dia cansativo, para um dia proveitoso e feliz. Obrigada por serem a bateria que necessitava.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Sandra, e minha irmã, Daniela, por estarem sempre presentes em minha vida e pela compreensão neste período que passou. Sei que muitas vezes é complicado entender o que tudo isso representa para quem está fora, mas sempre pude contar com todos.

Agradeço à secretaria da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, especialmente à Nerilin e Rilvan, por toda a ajuda nestes dois anos, por todas as dúvidas tiradas, pela paciência e eficiência para passar as informações necessárias.

Agradeço a CAPES, pelo apoio financeiro, para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Atirei um limão n'água, o rio logo amargou. Os peixinhos
repetiram: É dor de quem muito amou (ANDRADE, 2002)

RESUMO

Citrus x limon (Rutaceae) é conhecido como limoeiro e seus frutos como limão siciliano. Na etnomedicina, o sumo do fruto é usado para o tratamento da hipertensão, gripe, inflamação e desordens gástricas. Neste trabalho foi avaliada a atividade gastroprotetora do sumo de *Citrus x limon* (SCL). Inicialmente, parte do sumo foi liofilizado para caracterização fitoquímica, por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para os estudos *in vivo* em ratos *Wistar*, a atividade gastroprotetora do SCL (10 mL/kg v.o.) foi avaliada em modelos de lesão gástrica induzida por etanol absoluto e indometacina. Em seguida avaliou-se a capacidade antissecretora, a participação do muco e a influência dos grupos sulfidrilas (SH), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG) e canais K^{+}_{ATP} no efeito gastroprotetor. A capacidade cicatrizante gástrica e atividade repitelizante foram realizadas por indução com ácido acético e testes imunohistoquímicos (Ki-67 e BrdU), respectivamente. Pela CCD identificaram-se as classes de metabólitos secundários: flavonoides, saponinas, cumarinas, limonoides e por meio da CLAE os compostos: epigallocatequina ($17,7 \pm 3,9 \mu\text{g/mL}$), galocatequina ($15,2 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$), epicatequina ($6,01 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) e catequina ($3,8 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$). Na úlcera induzida por etanol, a administração única do SCL (25, 50 e 100%, 10 mL/kg v.o.) protegeu a mucosa gástrica em 60,8; 93,3 e 99,48%, respectivamente, em relação ao grupo controle ($156,88 \pm 25,17 \text{ mm}^2$) e a administração do SCL (100%, v.o.) durante 15 dias continuou exercendo efeito gastroprotetor ($74,86 \pm 15,48 \text{ mm}^2$) quando comparado com o controle negativo ($175,3 \pm 35,54 \text{ mm}^2$). O SCL não protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas por indometacina. O SCL reduziu a acidez total gástrica, diminuiu o volume secretório gástrico, aumentou o pH do suco gástrico e mostrou ser dependente dos canais K^{+}_{ATP} no processo gastroprotetor. No modelo de úlcera induzida por ácido acético, após 14 dias de tratamento com SCL 100%, v.o., houve redução da área de lesão ulcerativa em 31,08% em relação ao grupo controle ($61 \pm 1,98 \text{ mm}^2$), ausência de toxicidade e início de proliferação celular do SCL. Os resultados obtidos evidenciam que o SCL apresenta atividade gastroprotetora por ação antissecretória e da ativação dos canais de K^{+}_{ATP} e atividade cicatrizante gástrica.

Palavras-chave: *Citrus*. Úlcera gástrica. Farmacologia. Produtos naturais.

ABSTRACT

Citrus x limon (Rutaceae), popularly known as lemon tree and its fruits as lemon siciliano. In ethnomedicine, fruit's juice is used for the treatment of hypertension, influenza, inflammation and gastric disorders. In this work, the gastroprotective activity of *Citrus x limon* juice (CLJ) was evaluated. Initially, part of the juice was lyophilized for phytochemical characterization using thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). For *in vivo* studies using Wistar rats, CLJ gastroprotective activity (10 mL/kg p.o.) was assessed using absolute ethanol and indomethacin. Subsequently, antisecretory capacity, mucus participation and the influence of sulfhydryl groups (SH), nitric oxide (NO), prostaglandins (PG) and K⁺_{ATP} channels were evaluated in the gastroprotective effect. The gastric healing capacity and re-epithelializing activity were assessed by induction with acetic acid and immunohistochemical tests (Ki-67 and BrdU), respectively. Through the TLC, it was possible to identify the presence of the following classes of secondary metabolites: flavonoids, saponins, coumarins, limonoids and by HPLC identify and quantify the following compounds: epigallocatechin ($17.7 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$), galocatechin ($15.2 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$), epicatechin ($6.01 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) and catechin ($3.8 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$). In ethanol-induced ulcer, single administration of CLJ (25, 50 and 100%, 10 mL/kg p.o.) protected the gastric mucosa at 60.8; 93.3 and 99.48%, respectively, in relation to the control group ($156.88 \pm 25.17 \text{ mm}^2$) and the administration of CLJ (100%, p.o.) for 15 days continued to exert a gastroprotective effect ($74.86 \pm 15.48 \text{ mm}^2$) when compared to the negative control ($175.3 \pm 35.54 \text{ mm}^2$). CLJ did not protect the gastric mucosa against lesions induced by indomethacin. CLJ reduced total gastric acidity, decreased gastric secretory volume, increased gastric juice pH, and was dependent on K⁺_{ATP} channels in the gastroprotective process. In the acetic acid-induced ulcer model, after 14 days of treatment using CLJ 100%, p.o., it was possible to observe the cicatrizing action with reduction of the area of ulcerative lesion in 31.08% when compared to the control group ($61 \pm 1.98 \text{ mm}^2$), absence of toxicity and onset of CLJ cell proliferation. The results showed that CLJ has gastroprotective activity by antisecretory action and activation of the K⁺_{ATP} channels. In addition, the juice under study promotes gastric healing.

Keywords: *Citrus*. Gastric ulcer. Pharmacology. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie <i>Citrus x limon</i> _____	20
Figura 2 - Anatomia do estômago _____	23
Figura 3 – Estrutura do estômago _____	24
Figura 4 – Fisiologia da secreção ácida gástrica _____	26
Figura 5 – Fatores protetores e agressores da mucosa gástrica. _____	27
Figura 6 – Média estimada dos sintomas gastrointestinais entre pacientes com úlceras pépticas. _____	28
Figura 7 – Fluxograma experimental _____	32
Figura 8 – Extração do sumo de <i>Citrus x limon</i> . _____	33
Figura 9 – Análise cromatográfica do SCL _____	46
Figura 10 -. Efeito do pré-tratamento com sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. _____	47
Figura 11 – Estômagos de ratos pré-tratados via oral com sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. _____	48
Figura 12 - Efeito do pré-tratamento com sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) por 15 dias na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. _____	50
Figura 13 – Estômagos de ratos pré-tratados via oral com sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) por 15 dias sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. _____	50
Figura 14 – Efeito do pré-tratamento por via oral sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos de NaCl à 0,9%, ranitidina (60 mg/kg) e sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL, 10 mL/kg). _____	51
Figura 15 – Estômagos de ratos pré-tratados via oral com sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos. _____	52
Figura 16 -. Efeito do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) na determinação do muco aderido ao muco gástrico. _____	53
Figura 17 -. Efeitos do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM. _____	54
Figura 18 – Estômagos com efeitos do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM. _____	55
Figura 19 - Efeitos do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME. _____	57

Figura 20 – Estômagos com efeitos do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME. _____	57
Figura 21 - Efeitos do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com indometacina. _____	59
Figura 22 – Estômagos com efeitos do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com indometacina. _____	60
Figura 23 - Efeitos do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com glibenclamida. _____	62
Figura 24 – Estômagos com efeitos do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com glibenclamida. _____	63
Figura 25 – Efeito cicatrizante do tratamento via oral de NaCl 0,9%, ranitidina (60 mg/kg) e sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL, 10 mL/kg) nas lesões gástricas agudas induzidas por ácido acético em ratos. _____	64
Figura 26 – Estômagos de ratos tratados via oral por 14 dias com sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) sobre as lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratos. _____	64
Figura 27 - Fotomicrografias de mucosa gástrica coradas com HE e PAS dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. _____	69
Figura 28 - Análise imuno-histoquímica para Ki-67 e BrdU da mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético.. _____	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização fitoquímica do sumo _____	35
Tabela 2 - Gradiente de fase móvel utilizado para determinação quali-quantitativa. _____	36
Tabela 3 - Classes de metabólitos secundários encontrados no sumo de <i>Citrus x limon</i> _____	45
Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro, tratados com sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) e ranitidina por via i.d.._____	61
Tabela 5 - Efeito da administração oral do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) e ranitidina durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelode úlcera induzida por ácido acético. _____	66
Tabela 6 - Efeito da administração oral do sumo de <i>Citrus x limon</i> (SCL) e NaCl 0,9% (controle negativo) no consumo de ração e água, evolução ponderal e peso dos órgãos, durante 14 dias. _____	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais usos etnofarmacológicos de <i>Citrus x limon</i>	21
Quadro 2 – Atividade biológica com <i>Citrus x limon</i>	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	18
2.1.1	Espécie: <i>Citrus x limon</i>	19
2.1.2	Etnofarmacologia de <i>Citrus x limon</i>.....	20
2.1.3	Atividades biológicas confirmadas de <i>Citrus x limon</i>	22
2.2	TRATO GASTROINTESTINAL.....	23
2.2.1	Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal.....	23
2.2.2	Fisiologia e regulação neuro-hormonal da secreção ácida gástrica .	25
2.2.3	Úlceras pépticas	26
2.2.4	Terapêutica	27
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.1.2	Objetivos Específicos	31
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	32
4.1	REAGENTES E QUÍMICOS	32
4.2	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	33
4.3	PERFIL FITOQUÍMICO DO SUMO.....	34
4.3.1	Análise por cromatografia em camada delgada	34
4.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	35
4.4	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	36
4.4.1	Animais	36
4.4.2	Avaliação da atividade gastroprotetora.....	37
4.4.2.1	Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto	37
4.4.2.2	Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto com pré-tratamento de 15 dias com SCL	37
4.4.2.3	Úlcera gástrica induzida por anti-inflamatório não esteroide em ratos	38
4.4.3	Avaliação dos fatores protetores da mucosa	38
4.4.3.1	Determinação do muco aderido à mucosa gástrica.....	38

4.4.3.2	Envolvimento de grupamentos sulfidrílicos (Grupos -SH) na gastroproteção (MATSUDA et al., 1999)	39
4.4.3.3	Envolvimento do óxido nítrico (Grupos -NO) na gastroproteção (MATSUDA et al., 1999).....	39
4.4.3.4	Envolvimento das prostaglandinas (PGs) na gastroproteção (MATSUDA et al., 1999)	40
4.4.3.5	Atividade antissecretora ácida gástrica – por meio do método de ligadura pilórica (SHAY, 1945)	40
4.4.3.6	Envolvimento dos canais de K ⁺ _{ATP} na gastroproteção (BALOGUN et al., 2015)	41
4.4.4	Avaliação das propriedades cicatrizantes do sumo de <i>Citrus x limon</i>	41
4.4.4.1	Úlcera gástrica induzida por ácido acético (TAKAGI et al., 1969)	41
4.4.4.2	Análises histológicas	42
4.4.4.3	Análises imunohistoquímicas	42
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	PERFIL FITOQUÍMICO DO SUMO DE <i>CITRUS X LIMON</i>	44
5.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	44
5.1.2	Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	46
5.2	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	47
5.2.1	Atividade gastroprotetora do sumo de <i>Citrus x limon</i> em úlcera induzida por etanol absoluto teste agudo em ratos	47
5.2.2	Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto com pré-tratamento de 15 dias com SCL em ratos	50
5.2.3	Atividade gastroprotetora do sumo de <i>Citrus x limon</i> em úlcera induzida por indometacina em ratos	51
5.2.4	Determinação do muco aderido à mucosa gástrica	53
5.2.5	Envolvimento dos compostos sulfidrilas (grupos –SH) na gastroproteção	54
5.2.6	Envolvimento de compostos de óxido nítrico (grupos –NO) na gastroproteção	56
5.2.7	Envolvimento de prostaglandinas (PGs) na gastroproteção.....	58

5.2.8	Efeito do sumo de Citrus x limon sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em ratos	60
5.2.9	Envolvimento dos canais de K^{+}_{ATP} na gastroproteção.....	62
5.2.10	<i>Atividade cicatrizante do sumo de Citrus x limon em úlcera induzida por ácido acético em ratos.....</i>	<i>63</i>
5.3	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	68
5.4	ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS.....	69
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXO - PARECER APROVADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE	84

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais para o tratamento de enfermidades é datada desde a época medieval (GANGER, 2015), as quais são comumente comercializadas em mercados populares, feiras livres e cultivadas em residências. Devido a diferentes classes de metabólitos secundários encontrados nas plantas tais como flavonoides, terpenos e alcaloides, a população utiliza modos diferentes de preparação, correlacionando suas diferentes partes com a enfermidade que será tratada (SILAMBARASAN; AYYANAR, 2015).

As plantas medicinais costumam ser uma opção barata, eficaz e de fácil acesso pelas populações carentes, que muitas vezes possuem obstáculos no tratamento da saúde, como a escassez de centros de atendimento hospitalar, obtenção de exames e medicamentos. Esta prática desperta o interesse de pesquisadores que buscam comprovar as atividades biológicas destas plantas para a produção de fitoterápicos (JUNIOR & PINTO, 2005; KUTCHAN, 2001).

As variedades cítricas da família Rutaceae são conhecidas pelo ácido cítrico que caracteriza o sabor azedo e ácido dos frutos. *Citrus x limon* cultivado para o uso *in natura* apresenta usos variados na gastronomia e também na medicina popular desde para o tratamento da gripe (CAETANO et al., 2015) até como antimalárico (KFFURI et al., 2016). Estudos têm identificado a presença de componentes bioativos nestes frutos como flavonoides e carotenoides, que são importantes para o tratamento de doenças crônicas como diabetes (SATHIYABAMA et al., 2018), câncer (CAETANO et al., 2015), doenças cardiovasculares (ESAKKIMUTHU et al., 2016) e gastrointestinais como a úlcera péptica (ROZZA et al., 2011).

A úlcera péptica é uma doença com alto índice de morbidade, sendo considerada uma questão importante na saúde pública. A maioria dos pacientes com esta doença apresentam dores abdominais, refluxo e vômitos, diminuindo assim a qualidade de vida (BARKUN & LEONTIDIS, 2010). Ocorrendo devido ao desequilíbrio dos fatores protetores (barreira de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo, NO, PG, SH), e agressores da mucosa (anti-inflamatórios, álcool, peroxidação lipídica, *Helicobacter pilory*) (LAINE, TAKEUCHI, TARNAWSKI, 2008).

Embora existam várias classes de medicamentos sintéticos que são efetivos no tratamento da úlcera gástrica, alguns desses também são responsáveis por

diversos efeitos colaterais como sonolência, reincidência de úlcera, câncer, entre outras (DEBASHIS et al., 2002; FALCÃO et al. 2008; LAM et al., 2013).

As plantas medicinais são procuradas pela população como alternativa para o tratamento de diversas doenças, entre elas a úlcera. A diversidade de princípios ativos presentes em plantas medicinais tem proporcionado a descoberta de fitomedicamentos que apresentam efeitos colaterais reduzidos quando comparados com os medicamentos tradicionais. E isso tem despertado o interesse para o estudo de fontes de alimentos naturais capazes de promover gastroproteção.

Algumas plantas como: *Citrus aurantium* (POLO et al., 2012), *Citrus sinensis* (SELMİ et al., 2017), *Spondias purpurea* (DE ALMEIDA et al., 2017) e *Spondias mombin* (BRITO et al., 2018) apresentaram resultados promissores no tratamento de úlceras gástricas.

Portanto, este trabalho propõe o estudo farmacológico da possível atividade gastroprotetora do *Citrus x limon* e seu mecanismo de ação em ratos Wistar.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

A família Rutaceae apresenta aproximadamente 1.730 espécies descritas dentre os 158 gêneros distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os representantes desta família no Brasil compõem 32 gêneros identificados com 195 espécies (COSTA et al., 2010). As rutáceas são plantas lenhosas classificadas em árvores, arbusto até lianas. Algo comum é a presença de espinhos. Suas folhas são estipuladas, ovário súpero, com mais de dois óvulos por carpelo (CRONQUIST, 1981). Possuem uma grande diversidade de metabólitos secundários, como terpenoides, furocumarinas, flavonoides e alguns alcaloides (DEL RÍO et al., 2004).

O gênero mais comum desta família é o *Citrus*, nome dado por conter o ácido cítrico em seus frutos. Foram descritas variedades dos frutos cítricos em consequência de várias modificações genéticas, mutações espontâneas, hibridização e seleção natural, levando esses frutos a terem um alto impacto econômico, sendo eles cultivados em todo o mundo (PEREZ et al., 2005). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frutos cítricos, em 2012 apresentou uma produção em torno de 20,2 toneladas, ficando atrás somente da China, que lidera o ranking com cerca de 30,2 toneladas no mesmo ano (LV et al., 2015).

Estas diferentes variedades cítricas *C. x limon* (limão), *C. x latifolia* (limão tahiti), *C. x medica* (cidra), *C. x aurantium* (laranja-azeda), *C. x paradisi* (toranja), *C. x reticulata* (mandarina, tangerina), e *C. x sinensis* (laranja) contêm vitamina C, metabólitos secundários como os carotenoides, fenóis, flavonoides, alcaloides, limonoides, cumarinas, ácidos fenólicos, óleos essenciais (AMORIM et al., 2016; LV et al., 2015). Por isto, os cítricos são amplamente utilizados tanto como agentes aromatizantes na gastronomia quanto em pesquisas farmacêuticas.

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais afirmam que uma dieta com frutos e vegetais é benéfica para a saúde, tendo os seus princípios ativos atuantes na prevenção de várias doenças degenerativas e crônicas como o Alzheimer (ONOZUKA et al., 2008), diabetes (KHAZRAI, DEFEUDIS, POZZILLI,

2013) câncer, aterosclerose e, ainda, por possuir diversos agentes antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos (TRIPOLI et al., 2007), antifúngicos (VIUDAMARTOS et al., 2008).

2.1.1 Espécie: *Citrus x limon*

Citrus x limon (L.) (Figura 1, p.17) (Rutaceae), é uma árvore de porte baixo podendo chegar de 3 a 6 m de altura, com ramos repletos de espinhos. Suas flores apresentam pétalas brancas na parte interna e roxa avermelhada na parte externa, cuja floração ocorre durante todo o ano. O fruto apresenta-se na forma oval, são verdes quando jovens e amarelos quando maduros, com uma casca espessa a depender da variedade.

A origem de *C. x limon* pode ter ocorrido por meio de uma hibridação natural entre *Citrus maxima*, *Citrus medica* L. e *Citrus reticulata* Blanco (mandarin) (BARRETT; RHODES, 1976).

Os frutos cítricos estão entre as três mais importantes culturas hortícolas no mundo, sendo o limão considerado a terceira colheita mais importante dentre eles (GONZÁLEZ-MOLINA, 2010). Isso é devido à sua utilização pela indústria gastronômica por causa do seu sabor ácido característico e seus importantes componentes químicos como o ácido cítrico, minerais e flavonoides (DEL RÍO et al., 2004) assim como para tratamento de febre, inflamação, resfriado e dor de estômago (ALARCÓN et al., 2015).

Figura 1 - Espécie *Citrus x limon*



Fonte: http://plants.tagawagardens.com/12130017/Plant/20280/Persian_Lime/

2.1.2 Etnofarmacologia de *Citrus x limon*

O conhecimento popular sobre plantas para fins medicinais é empregado pela população, no entanto, a forma de exploração das diversas partes das plantas pode diferir de uma população para outra. Esta prática é utilizada como alternativas para manutenção da saúde e tratamento de doenças (PINTO, AMOROZO, FURLAN, 2006). Alguns usos etnofarmacológicos de *Citrus x limon* estão descritos no quadro 1 (p. 18):

Quadro 1 – Principais usos etnofarmacológicos de *Citrus x limon*

Parte da planta	Forma de preparo	Utilização popular	Referência
Sementes	Chá	Cefaléia	POSSO et al., 2010
	Óleo	Icterícia	SILAMBARASAN; AYYANAR, 2015
Fruta madura inteira	Sumo	Caspa	
Folhas	Decocção	Febre	
Raiz		Antimalárico	KFFURI et al., 2016
Frutos	Sumo	Anti-inflamatório	ARIAS; RAMÓN-LACA, 2005
		Frieira, Emagrecimento, Enxaqueca (ressaca)	PASSALACQUA et al., 2007
		Tratamento de doenças da síndrome cardio-metabólica (dislipidemia, obesidade, hipertensão)	ESAKKIMUTHU et al., 2016
Sementes e frutos	Aplicação tópica	Anti leishmania	GACHET et al., 2010
Folhas e frutos	Infusão e suco da fruta	Gripe	CAETANO et al., 2015
		Resfriado, Dor de garganta	ALARCÓN et al., 2015

2.1.3 Atividades biológicas confirmadas de *Citrus x limon*

A literatura descreve estudos que comprovam as atividades biológicas de *Citrus x limon*. O quadro 2 (p. 19) mostra 10 atividades para *C. x limon* a parte da planta, material de uso para o estudo, sua atividade biológica e referências.

Quadro 2 – Atividade biológica com *Citrus x limon*

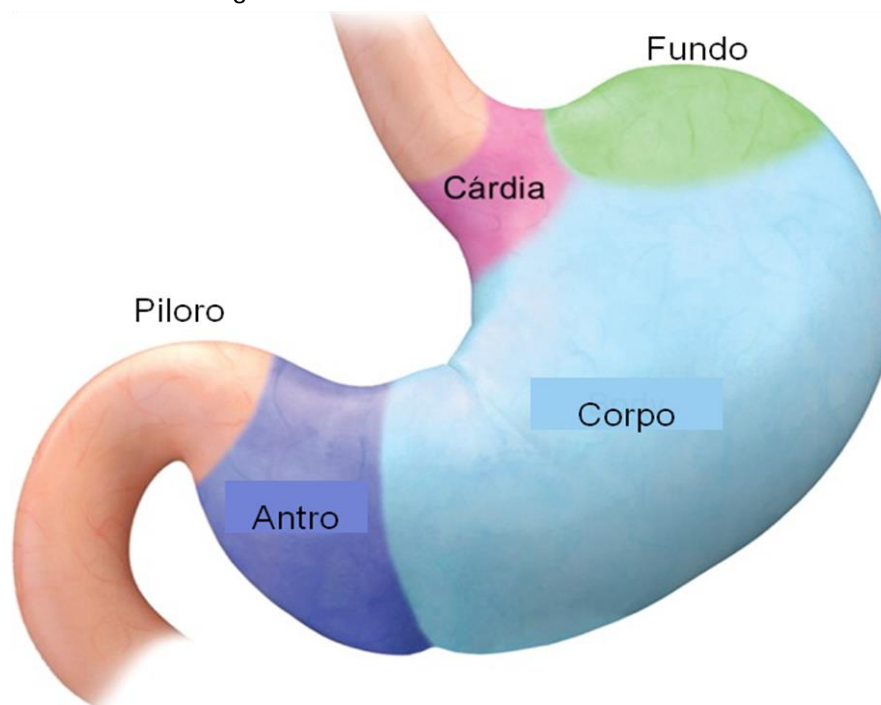
Parte da planta	Material de uso	Atividade biológica	Referência
Casca do fruto	Óleo essencial	Efeito ansiolítico	VIANA et al., 2016
		Antioxidante <i>in vitro</i>	LOIZZO et al., 2016
		Acaricida	ABOELHADID et al., 2016
		Anti-inflamatório	AMORIM et al., 2016
		Gastroprotetor	ROZZA et al., 2011
		Antifúngico	VIUDA-MARTOS et al., 2008
	Extrato aquoso	Emagrecimento	FUKUCHI et al., 2008
Frutos	Nanovesículas do suco	Anticancerígeno	RAIMONDO et al., 2015
	Suco (sumo diluído)	Anticolinérgico	GIRONÉS-VILAPLANA et al., 2015
		Gastroprotetor	BHAVITAVYA et al., 2012
	Extrato etanólico	Hepatoprotetora	BHAVSAR et al., 2007
Folhas	Óleo essencial	Antinociceptivo	CAMPÊLO et al., 2011

2.2 TRATO GASTROINTESTINAL

2.2.1 Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal

O estômago apresenta-se na forma de uma bolsa e está compreendido entre o esôfago e o intestino delgado. O alimento ao ser deglutido se deposita temporariamente em seu interior. Anatomicamente, o estômago está dividido em quatro partes: cárdia, fundo, corpo e antro (Figura 2, p. 20). O estômago tem a capacidade de se contrair ou expandir, dependendo da quantidade de alimento que será depositado nele. A passagem do bolo alimentar para o intestino delgado se deve às contrações peristálticas da musculatura lisa, que irão persistir mesmo depois do órgão ser esvaziado (SCHUBERT; PEURA, 2008; MERCHANT, 2007).

Figura 2 - Anatomia do estômago



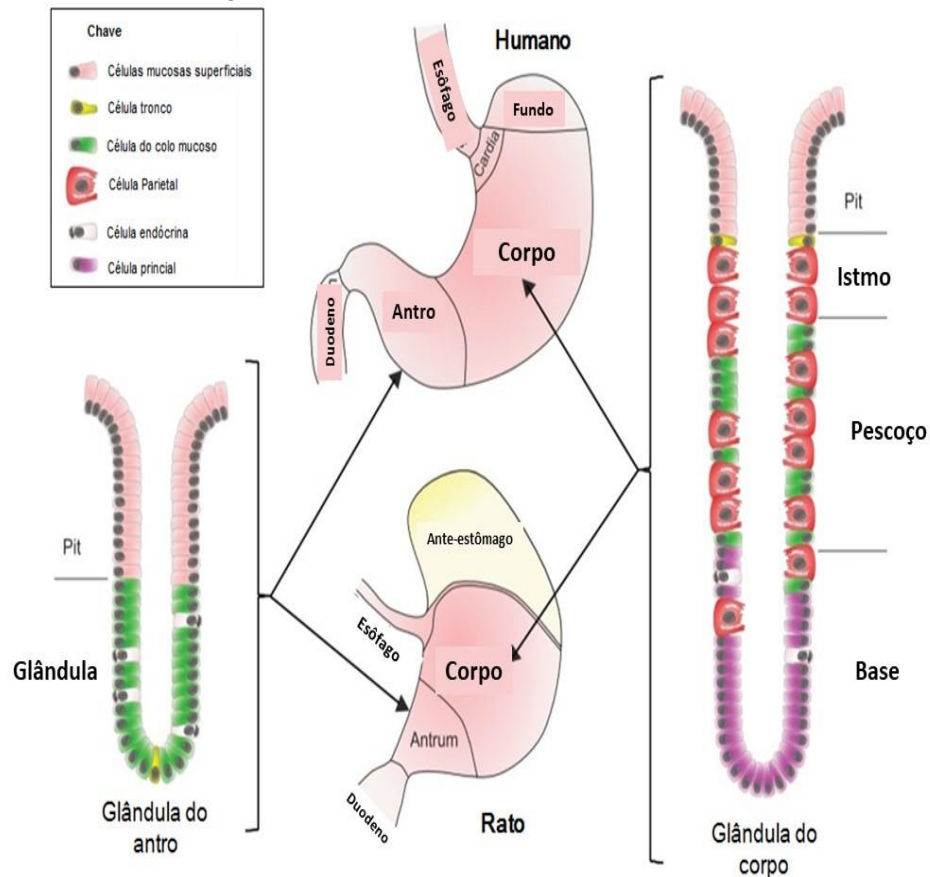
Fonte: Kang et al., 2013.

O revestimento interno do estômago é constituído por quatro camadas: serosa, muscular, submucosa e mucosa. A mucosa gástrica contém pequenas glândulas gástricas responsáveis por secretar uma mistura de enzimas. As células oxínticas são responsáveis pelo controle das funções fisiológicas e digestão (Figura

3, p. 21). Estão divididas em: mucosas (secretam muco, água e bicarbonato), células parietais (secretam HCl e são responsáveis pela lipase gástrica), células principais (secretam pepsinogênio e gastrina) e células enterocromafins (secretam histamina) (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A distribuição de cada célula no lúmen gástrico está relacionada com a função desempenhada. As células G, secretoras de gastrina, responsável pela estimulação de HCl encontram-se no antro e as células D, secretoras de somatostatina, responsáveis pela diminuição dos hormônios gastrointestinais, encontram-se espalhadas por todo o estômago, assim como as células enterocromafins, responsáveis pela secreção de histamina (SOLCIA et al., 2000).

Figura 3 – Estrutura do estômago



Fonte: Burkitt et al., 2017.

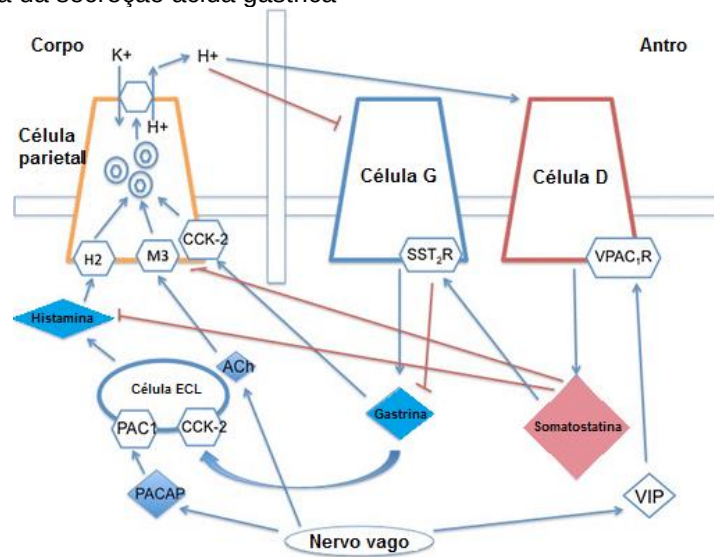
2.2.2 Fisiologia e regulação neuro-hormonal da secreção ácida gástrica

A secreção ácida gástrica (mistura de secreções das células epiteliais superficiais e das secreções das glândulas gástricas) ocorre ao nível cefálico, gástrico e intestinal. Ocorre pelas células parietais no fundo do estômago e é regulada por diversos fatores neuronais (nervo vago), parácrinos (histamina e somatostatina) e hormonais. Um aumento excessivo da secreção ácida gástrica pode aumentar o risco de úlceras pépticas. A fase cefálica ocorre antes da entrada do alimento no sistema digestivo e é mediado pelo sistema nervoso central e periférico. O efluxo eferente vagal libera acetilcolina, que age nos receptores muscarínicos M_3 expressos nas células parietais. A histamina atua no receptor H_2 e é responsável pela estimulação da secreção ácida, produzida na mucosa gástrica, devido à ativação neural da adenilato-ciclase.

A fase gástrica tem início com a entrada de nutrientes no lumen gástrico. O hormônio gastrina, liberado pelas células G, estimula a secreção ácida por meio de dois mecanismos: indireto e direto. Sua maior ação ocorre de forma indireta e provoca a secreção por meio da ligação de receptores expressos em células enterocromafins e colecistoquinina-2 (CCK-2), liberando histamina. Outro mecanismo ocorre devido à gastrina circulante que se liga aos receptores CCK-2 na membrana da célula parietal promovendo a secreção ácida.

A fase intestinal é responsável por manter a homeostase por meio de mecanismo de feedback negativo. Quando o pH do lúmen gástrico diminui, as células gástricas D liberam somatostatina, responsável pela inibição da liberação da histamina e gastrina (METZ et al., 2013; PHAN et al., 2015; SCHUBERT M., 2010). O passo final na secreção ácida gástrica é mediado pela H^+/K^+ -ATPase, chamada de bomba de prótons. A ativação de AMPc ou Ca^{2+} estimula a H^+/K^+ -ATPase nas células parietais (Figura 4, p. 23) (JAIN et al., 2007).

Figura 4 – Fisiologia da secreção ácida gástrica

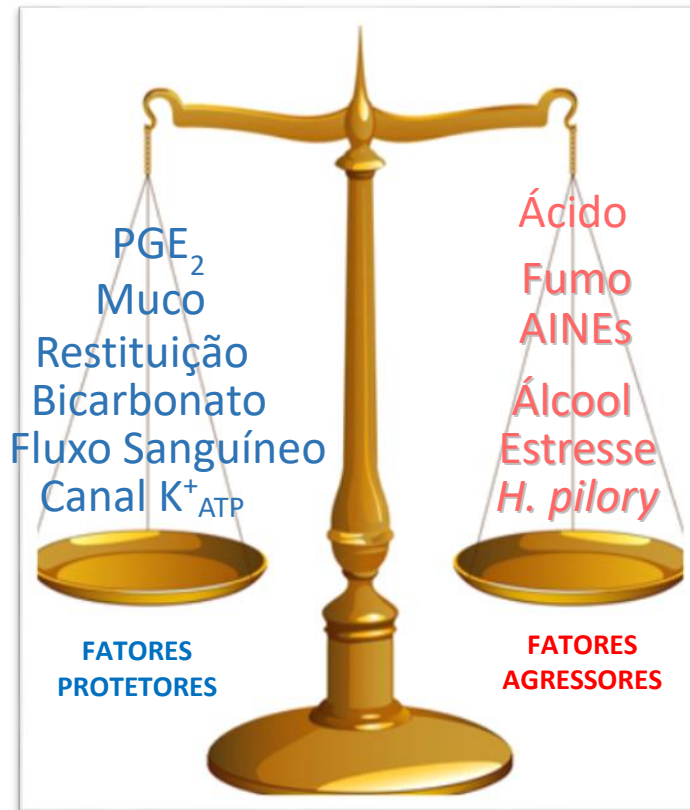


Fonte: Phan et al., 2015.

2.2.3 Úlceras pépticas

Úlceras são lesões inflamatórias e/ou necrosantes na pele ou membrana da mucosa que reveste o trato alimentar. As úlceras pépticas são classificadas de acordo com a sua localização anatômica, sendo elas esofágicas, gástricas ou duodenais (OLIVEIRA et al., 2014). É uma doença crônica e recorrente sendo estimado que 10% da população poderá desenvolvê-la em algum momento da vida (ZAPATA-COLINDRES et al., 2006). O processo da úlcera péptica é multifatorial podendo ser o resultado de um desequilíbrio entre fatores agressivos, como o HCl, infecção causada pela bactéria *Helicobacter pylori*, excessivo uso de anti-inflamatório não esteroide (AINE), álcool, pepsina e espécies reativas de oxigênio; e os fatores citoprotetores: barreira de muco e bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, reparo celular, compostos sulfidrílicos, óxido nítrico e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Figura 5, p. 24) (BEHRMAN, 2005; KLEIN et al., 2010; SOUSA et al., 2018).

Figura 5 – Fatores protetores e agressores da mucosa gástrica.

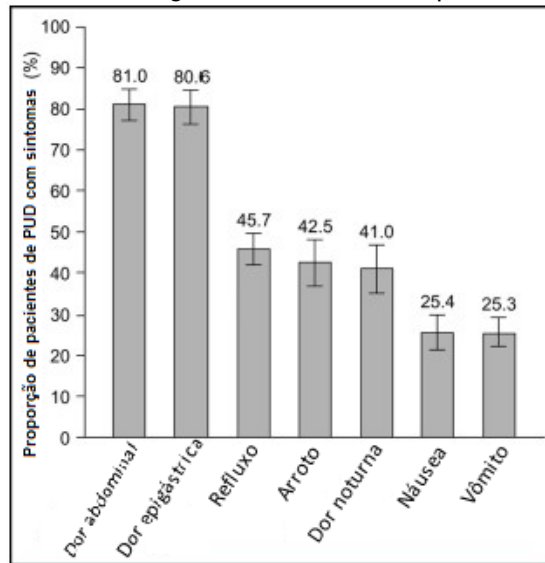


Fonte: <http://hopkins-gi.nts.jhu.edu/images>

2.2.4 Terapêutica

Os medicamentos para o tratamento de úlcera gástrica são utilizados para a cura da úlcera e/ou prevenção de úlceras recorrentes e alívio dos sintomas (Figura 6, p. 25). Eles são destinados a neutralizar os fatores agressivos ou então estimular as defesas da mucosa (GADEKAR et al., 2010).

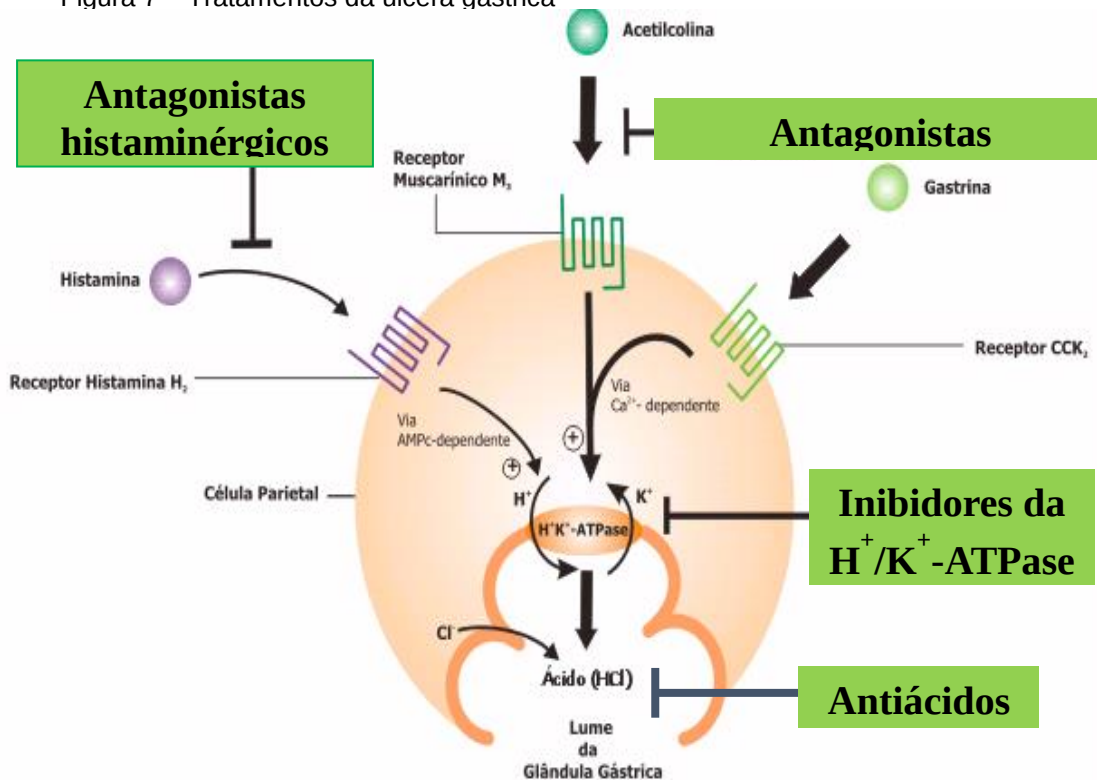
Figura 6 – Média estimada dos sintomas gastrointestinais entre pacientes com úlceras pépticas.



Fonte: Barkun & Leontiadis, 2010.

Os medicamentos para o tratamento da úlcera são divididos em: antiácidos, agentes anticolinérgicos, antagonistas de receptores H_2 , inibidores da bomba de prótons e antibióticos usados para combater o *Helicobacter pylori*. (GADEKAR et al., 2010), (Figura 7, p. 25).

Figura 7 – Tratamentos da úlcera gástrica



Os antiácidos são neutralizantes do ácido clorídrico e compreendem a forma mais simples de tratamento. Os mais utilizados são carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio, bicarbonato de sódio, hidróxido de magnésio, contudo, apenas aliviam os sintomas e possuem vários efeitos colaterais como náuseas, constipação, diarreia (JAIN et al., 2007; MATON, 1999).

Os agentes anticolinérgicos bloqueiam os receptores muscarínicos reduzindo assim a secreção ácida e a dor pela contenção da motilidade duodenal, como exemplo: escopolamina, atropina. Os seus efeitos colaterais são constipação, visão turva, boca seca, entre outros (JAIN et al., 2007).

Os medicamentos mais utilizados são os antagonistas de receptores histaminérgicos H_2 (cimetidina, ranitidina e nizatidina) e inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol e pantoprazol). Os antagonistas seletivos de receptores H_2 reduzem a secreção ácida por meio do bloqueio desses receptores, impedindo a ligação da histamina. Antes do desenvolvimento deste fármaco o uso de cirurgia para o tratamento de úlceras era a principal escolha. Contudo, o seu uso contínuo promove uma alta reincidência de úlcera, supressão prolongada da secreção ácida gástrica, alterações imunológicas, tontura, impotência, sonolência e erupção cutânea (AIHARA et al., 2003; JAIN et al., 2007).

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs), H^+/K^+ -ATPase, são derivados benzimidazóis responsáveis pela eficácia na supressão da secreção ácida gástrica, por se ligarem covalentemente em resíduos de cisteína da H^+/K^+ -ATPase de células parietais de forma irreversível, após 24 h novas H^+/K^+ -ATPase são formadas, e também por agirem no final da produção de ácido gástrico (FREEDBERG, LEBWOHL; ABRAMS, 2014). Mesmo sendo uma classe eficiente de fármacos, os IBPs são muitas vezes utilizados de modo indevido pela população, devido ao seu uso exacerbado diversos estudos sobre a sua despresciação podem ser encontrados na literatura (REEVE et al., 2015; FARRELL et al., 2017; NAUNTON et al., 2018). Os IBPs apresentam efeitos adversos como dores de cabeça, diarreia, náusea, constipação, prurido, hipergastrinemia, hipersecreção ácida rebote, má absorção, infecção e câncer (O'NEIL & LEONARD, 2011).

A bactéria *H. pylori* é conhecida por representar um fator de risco tanto para o aparecimento de gastrite, úlceras e seu reaparecimento, quanto para o desenvolvimento de câncer duodenal. Quando não há outro fator de risco para o aparecimento da úlcera péptica como, por exemplo, o uso de álcool ou AINEs, em

aproximadamente 80% dos casos se deve a infecção da *H. pylori* (MAHACHAI et al., 2018). A infecção causada pela *H. pylori* afeta fortemente a fisiologia do trato gástrico induzindo à uma inflamação crônica, aumentando a secreção ácida inibindo os mecanismos que a regula (MALFERTHEINER, 2011). A terapia se dá por meio de antibióticos (claritromicina, amoxicilina, tetraciclina, metronidazol) combinados com fármacos antissecretórios (omeprazol) ou antagonistas do receptor H₂ (ranitidina) (MAHACHAI et al., 2018). No entanto, este tratamento pode ter como efeitos colaterais náuseas, diarreias e tonturas (BRUNTON, 2001; JAIN et al., 2007).

Estudos para o desenvolvimento de medicamentos no tratamento de úlceras vêm apresentando avanços, porém, apontam limite em seu uso, devido aos diversos efeitos colaterais e alta taxa de recorrência de úlceras (AIHARA et al., 2003; JAIN et al., 2007).

A utilização de plantas medicinais para a gastroproteção foi avaliada em diversos estudos (ROZZA et al., 2011; CALDAS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; BRITO et al., 2018). A busca por produtos naturais eficazes, menos tóxicos e de menor custo se deve ao fato dos fármacos sintéticos atualmente empregados na terapia muitas vezes agravarem a doença após o uso prolongado e são onerosos (RATES, 2001; GADEKAR et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade gastroprotetora do sumo de *Citrus x limon* (L) (Rutaceae).

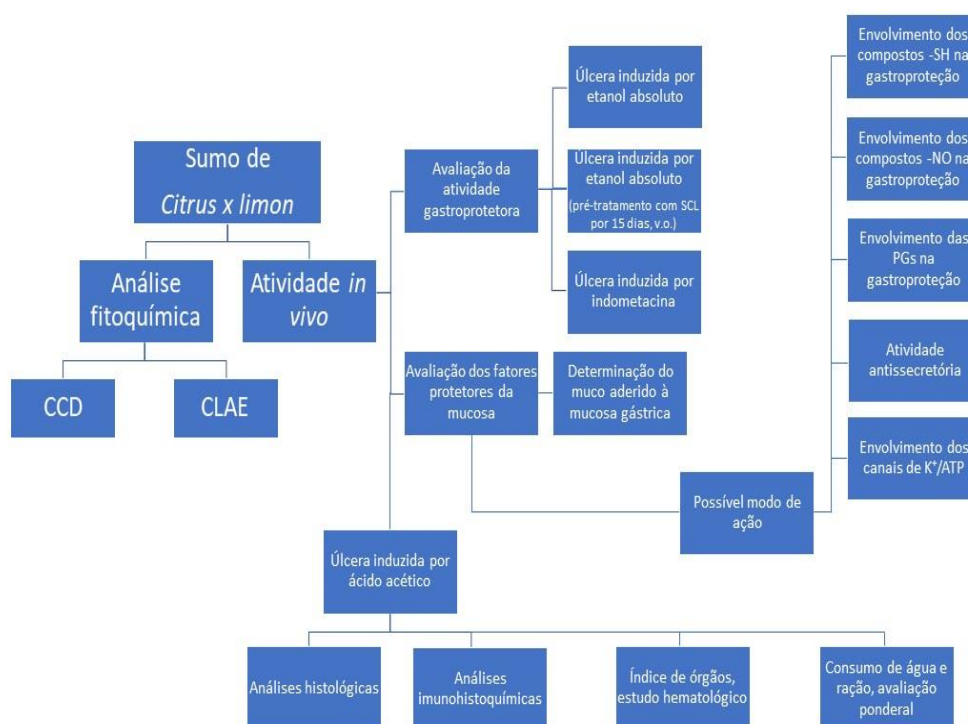
3.1.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar e quantificar os principais constituintes químicos do sumo dos frutos de *Citrus x limon*;
- b) Analisar a atividade gastroprotetora em modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol;
- c) Avaliar a participação do sumo dos frutos de *Citrus x limon* sobre a secreção de muco;
- d) Investigar o mecanismo de ação por meio de compostos NO, SH, prostaglandinas e canais de K^{+}_{ATP} ;
- e) Investigar a atividade antissecretória do ácido gástrico;
- f) Analisar a atividade cicatrizante e os parâmetros hematológicos pelo modelo crônico de lesão induzida por ácido acético;
- g) Investigar a regeneração da mucosa por análises histológicas e imunohistoquímicas.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Os métodos utilizados neste estudo foram realizados conforme o fluxograma experimental apresentado na figura 7 (p. 29).

Figura 7 – Fluxograma experimental



4.1 REAGENTES E QUÍMICOS

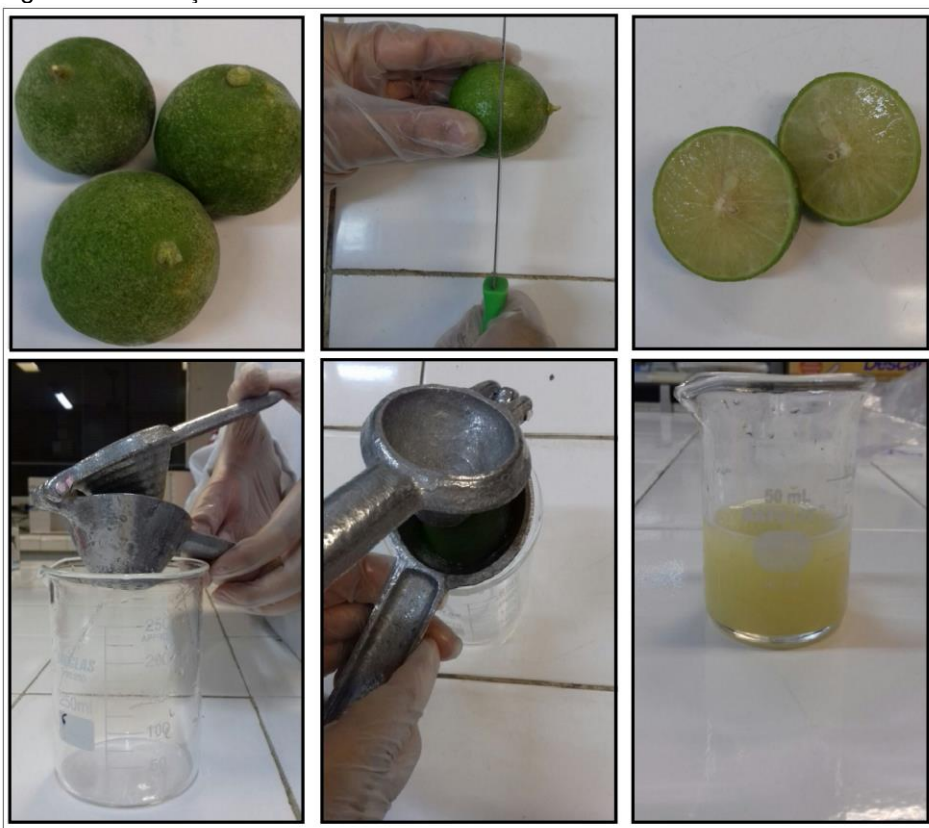
Etanol foi obtido da Êxodo Científica (Sumaré, SP, BRA). O cloreto de sódio, cloreto de magnésio, lansoprazol, cloridrato de ranitidina, azul de Alcian, N-etilmaleimida, éster metílico de N-nitro-L-arginina, ranitidina, glibenclamida, carbenoxolona foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A historesina foi obtida da Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha, e o ácido acético e glicose foram obtidos de Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. Éter etílico, formaldeído e fenolftaleína são da FMaia, Cotia, São Paulo, Brasil; xilazina e cetamina são obtidas da Vetbrands, Paulínia, São Paulo, Brasil. A proteína Ki-67 (código: sc-23900) e a

proteína BrdU (código: sc-32323) são de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.

4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Uma amostra coletada no bairro da Tamarineira em Recife-PE, contendo folhas e frutos de *Citrus x limon*, foi depositada e identificada por especialistas do Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), com o registro #90945. Os frutos de *Citrus x limon* foram coletados entre os meses de setembro de 2016 a agosto de 2017. Para os estudos fitoquímicos foi retirada a água do sumo utilizando um liofilizador e, para estudos *in vivo*, o sumo foi utilizado *in natura*. A Figura 8 (p. 30) representa a extração do sumo.

Figura 8 – Extração do sumo de *Citrus x limon*.



4.3 PERFIL FITOQUÍMICO DO SUMO

Para a realização da cromatografia em camada delgada, foi feita a extração em fase sólida dos constituintes do sumo, para posteriormente liofilizar a amostra para a realização de CLAE.

4.3.1 Análise por cromatografia em camada delgada

Para a preparação da amostra, 10 mL de sumo fresco foi centrifugado a 3000 *g* por 5 min e o sobrenadante separado foi utilizado para análise fitoquímica. A extração em fase sólida (SPE) foi realizada utilizando cartuchos SUPELCO DSC-18 500 mg/3 mL e um sistema manifold de vácuo para SPE Visiprep™ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os cartuchos foram pré-condicionados com 3 mL de metanol e equilibrado com 3 mL de H₂O. O sobrenadante foi carregado no cartucho e, em seguida, o mesmo foi lavado com 4 mL de H₂O. O cartucho foi secado pela passagem de ar durante 1 min e, em seguida, a amostra foi eluída com 3 mL de metanol. O solvente foi evaporado e o resíduo diluído em 0,5 mL de metanol para análise por cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F254 Macherey-Nagel (Duren, Alemanha).

A presença dos grupos de metabólitos secundários no sumo foi avaliada por meio de cromatografia em camada delgada e foram utilizados reveladores químicos específicos (Tabela 1, p. 32).

Tabela 1- Caracterização fitoquímica do sumo

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Revelador	Referência
flavonoides e fenilpropanoides	quercetina, rutina e ácido clorogênico	NEU	WAGNER; BLADT, 1996; BRASSEUR; ANGENOT, 1986
triterpenos e esteroides	β -sitosterol	LB	HARBORNE, 1998
saponinas	-	Lieberman & Burchard	HARBORNE, 1998
mono e sesquiterpenos	timol	anisaldeído sulfúrico	HARBORNE, 1998
cumarinas	cumarina	KOH	WAGNER; BLADT, 1996
alcaloides	pilocarpina	Dragendorff	WAGNER; BLADT, 1996
proantocianidinas condensadas	catequina	vanilina clorídrica	ROBERTS ET AL., 1957
taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	alúmen de ferro 1%	HARBORNE, 1998
Áçúcares redutores	Glicose	trifeniltetrazólio 4%	METZ, 1961
limonoides	-	Ehrlich	BREKSA ET AL. 2015

Nota: KOH – hidróxido de potássio, NEU - acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, água; LB – Liebermann-Burchard.

4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Inicialmente, a solução em estudo foi selecionada e analisada individualmente por CLAE – DAD, usando uma coluna de octadecilsilano (250 x 4,6 mm, 5 μ m, Ascentis C18, marca Supelco) mantida a 40 °C como uma fase estacionária, uma solução de fase móvel utilizada foi composta de 2 solventes: solvente A - 0,1% de ácido fosfórico em água ultrapura (classe CLAE) e solvente B 100% acetonitrilo com quociente de vazão de 0,6 mL/min, gradiente de acordo com a tabela 2, p. 33.

Tabela 2 - gradiente de fase móvel utilizado para determinação quali-quantitativa.

Tempo	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,00	95	5
60,00	5	95
70,00	95	5
75,00	95	5

O volume injetado foi de 40 µL para as amostras (1 mg/mL) e produtos químicos de referência (200 µg/mL) no CLAE-DAD para análises monitoradas de 200 a 400 nm. As concentrações das substâncias padrão em amostras foram calculadas por meio de curvas padrão calibradas usando os 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL. Para a quantificação, o método utilizado foi um equipamento Shimadzu equipado com um modelo de bombas modelo LC - 20ADVP, sendo os dados processados através do software Shimadzu LC solution 1.0 (Japão).

Foram utilizados os padrões: apigenina, borneol, ácido cafeico, catequina, ácido clorogênico, crisina, ácido elágico, epicatequina, epigallocatequina, fisetina, ácido gálico, galocatequina, kaempferol, lupeol, miricetina, naringenina, ácido p-coumarico, ácido protocatequico, quercetina, quercetina 3β, resveratrol, rutina, scopoletin e ácido tânico.

4.4 ESTUDOS *in vivo*

4.4.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas com 2-3 meses de idade, com massa entre 200 – 280 g, oriundos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais receberam água e ração (Presence, Purina, Brasil) *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C). Todos os protocolos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE (Processo n°.23076.021236/2016-77). Em todos os protocolos, os animais foram eutanaziados em uma câmara de CO₂ (por inalação).

4.4.2 Avaliação da atividade gastroprotetora

4.4.2.1 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto

Após 16 h em jejum, os ratos ($n = 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados somente com solução de NaCl 0,9% (grupo controle), lansoprazol (30 mg/kg) ou sumo de *Citrus x limon* (SCL) (25, 50 e 100%, 10 mL/kg). Depois de 1 h, cada animal recebeu 4 mL/kg de etanol absoluto (99,8%) por via oral, de acordo com o método descrito por Morimoto et al., (1991) com algumas modificações. Após 1 hora os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos pela grande curvatura, fotografados. A área ulcerada foi mensurada por planimetria com auxílio do software ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em área total de lesões ulcerativas (ALU) (mm^2).

4.4.2.2 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto com pré-tratamento de 15 dias com SCL

Dezoito animais foram divididos em 3 grupos ($n = 6/\text{grupo}$) e foram pré-tratados uma vez ao dia oralmente durante 15 dias, de acordo com o método descrito por Selmi et al. (2017) com algumas modificações, com solução de NaCl 0,9% (grupo controle), lansoprazol (30 mg/kg) ou sumo de *Citrus x limon* (SCL) (100%, 10 mL/kg). No 15º dia os animais ficaram em jejum por 16 horas. No 16º dia foi administrado etanol absoluto (4 mL/kg v.o.), após 1 hora os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos pela grande curvatura, fotografados. A área ulcerada foi mensurada por planimetria com auxílio do software ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em área total de lesões ulcerativas (ALU) (mm^2).

4.4.2.3 Úlcera gástrica induzida por anti-inflamatório não esteroide em ratos

Após 16 horas de jejum, os animais ($n = 6-8/\text{grupo}$) foram pré-tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (grupo controle), ranitidina (60 mg/kg) ou sumo de *Citrus x limon* (SCL) (100%, 10 mL/kg). Depois de 30 minutos, todos os grupos receberam indometacina (30 mg/kg, s.c.), de acordo com o método descrito por Djahanguiri (1969). Após 6 horas da administração de indometacina os animais foram eutanasiados. Os estômagos foram retirados e abertos pela grande curvatura, fotografados. A área ulcerada foi mensurada por planimetria com auxílio do software ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em área total de lesões ulcerativas (ALU) (mm^2).

4.4.3 Avaliação dos fatores protetores da mucosa

4.4.3.1 Determinação do muco aderido à mucosa gástrica

O experimento foi realizado de acordo com Rafatullah et al., (1990). Método com modificações. Após 16 h de jejum, os animais ($n = 6/\text{grupo}$) receberam por via oral solução de NaCl 0,9% (grupo controle), carbenoxolona (200 mg/kg) ou SCL (100%, 10 mL/kg). Após 1 hora, sob anestesia (xilazina, 6 mg/kg associado à cetamina, 60 mg/kg, intraperitonealmente), os animais foram submetidos à incisão longitudinal para a ligadura do píloro. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados; a porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa em 10 mL da solução 0,1% de Alcian Blue (sacarose 0,16 M/acetato de sódio 0,05 M, pH 5,8). Após 2 h de imersão, o excesso de corante foi removido em dois enxaguamentos sucessivos com 7 mL de sacarose 0,25 M, por 15 min e posteriormente por 45 min. Cada estômago foi transferido sequencialmente para 10 mL de solução de MgCl_2 0,5 M durante 2 h. Quatro mililitros de solução de corante foram então agitados vigorosamente com um volume igual de éter. A emulsão resultante foi centrifugada a

176 xg durante 10 min e a absorbância da camada aquosa foi medida a 595 nm. A quantidade de corante azul extraído por grama de tecido glandular molhado foi então calculada. O resultado foi expresso como mg de Alcian Blue/g de tecido.

4.4.3.2 Envolvimento de grupamentos sulfidrílicos (Grupos -SH) na gastroproteção (MATSUDA et al., 1999)

Após 18 horas de jejum, os animais foram distribuídos em seis grupos (n = 5-7/grupo). Três grupos receberam solução de NaCl 0,9% (grupo controle, 10 mL/kg, i.p.) e três grupos receberam NEM (N-etilmaleimida, 10 mg/kg, i.p). Trinta minutos após o pré-tratamento, administrou-se uma solução de NaCl 0,9%, carbenoxolona (100 mg/kg) ou SCL (100%, 10 mL/kg), pela via oral. As lesões gástricas foram induzidas em todos os grupos com etanol absoluto (4 mL/kg, v.o.) após uma hora de tratamento. Uma hora após a administração de etanol, os animais foram eutanasiados. Os estômagos foram retirados e abertos pela grande curvatura, fotografados. A área ulcerada foi mensurada por planimetria com auxílio do software ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em área total de lesões ulcerativas (ALU) (mm²).

4.4.3.3 Envolvimento do óxido nítrico (Grupos -NO) na gastroproteção (MATSUDA et al., 1999)

Após 18 h de jejum os animais foram distribuídos em seis grupos (n = 5-7/grupo). Três grupos receberam solução de NaCl 0,9% (grupo controle, 10 mL/kg, i.p.) e três grupos receberam L-NAME (L-nitro-arginina metil éster, 10 mg/kg, i.p). Trinta minutos após o pré-tratamento, administrou-se uma solução de NaCl 0,9%, carbenoxolona (100 mg/ kg) ou SCL (100%, 10 mL/kg), pela via oral. As lesões gástricas foram induzidas em todos os grupos com etanol absoluto (4 mL/kg, v.o.) após uma hora de tratamento. Uma hora após a administração de etanol, os animais foram eutanasiados. Os estômagos foram retirados e abertos pela grande curvatura, fotografados. A área ulcerada foi mensurada por planimetria com auxílio do software

ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em área total de lesões ulcerativas (ALU) (mm²).

4.4.3.4 Envolvimento das prostaglandinas (PGs) na gastroproteção (MATSUDA et al., 1999)

Após 18 h de jejum os animais foram distribuídos em seis grupos (n = 4-8/grupo). Três grupos receberam solução de NaCl 0,9% (grupo controle, 10 mL/kg, i.p.) e três grupos receberam indometacina (30 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após o pré-tratamento, administrou-se uma solução de NaCl 0,9%, ranitidina (60 mg/kg) ou SCL (100%, 10 mL/kg), pela via oral. Uma hora depois, todos os animais receberam tratamentos com etanol absoluto (4 mL/kg, v.o). Uma hora após a administração de etanol, os animais foram eutanasiados. Os estômagos foram retirados e abertos pela grande curvatura, fotografados. A área ulcerada foi determinada por planimetria com auxílio do software ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em área total de lesões ulcerativas (mm²).

4.4.3.5 Atividade antissecretora ácida gástrica – por meio do método de ligadura pilórica (SHAY, 1945)

Os animais foram colocados em jejum durante 8 h, com acesso livre a solução de glicose 5%. Foram pesados, marcados e separados em três grupos de animais (n = 6/grupo). Em seguida foram anestesiados com cetamina (60 mg/kg i.p.) e xilazina (6 mg/kg i.p.) e fixados em decúbito dorsal a uma placa de vidro, e realizada a tricotomia da parede abdominal. Através de uma incisão de 2 cm na região epigástrica, o estômago foi localizado e o piloro amarrado com fio de sutura. Imediatamente após a ligadura do piloro, os grupos foram tratados por via intraduodenal com o SCI (10 mL/kg), controle negativo NaCl 0,9% e controle positivo ranitidina (60 mg/kg). Após 4 h da cirurgia, os animais foram eutanasiados (câmara de CO₂), o esôfago foi pinçado para evitar a perda do material secretado e o

estômago removido. O conteúdo gástrico foi coletado, mensurada a massa, centrifugado a $176 \times g$ por 30 minutos e foram determinados o volume (mL) e o pH. No suco gástrico, a acidez total ($\text{mEq}[\text{H}^+]/\text{L}/4\text{h}$) foi determinada no sobrenadante por titulação em pH 7,0 usando uma solução de NaOH a 0,01 mol/L e fenolftaleína como indicador.

4.4.3.6 Envolvimento dos canais de K^+_{ATP} na gastroproteção (BALOGUN et al., 2015)

Após 16 horas de jejum, os animais ($n = 6$) foram pré-tratados oralmente com solução de glicose 4% (grupo controle), glibenclamida – bloqueador de canais para potássio sensíveis a ATP - (10 mg/kg), SCL (100%, 10 mL/kg) e a associação de glibenclamida + SLC. Após 1 h, cada animal recebeu 4 mL/kg de etanol absoluto (99,8%) por via oral. Depois de 1 h os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, fotografados e as lesões foram determinadas por planimetria com auxílio do software ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em área total de lesões ulcerativas (ALU) (mm^2).

4.4.4 Avaliação das propriedades cicatrizantes do sumo de *Citrus x limon*

4.4.4.1 Úlcera gástrica induzida por ácido acético (TAKAGI et al., 1969)

Foram utilizados três grupos de animais ($n = 5/\text{grupo}$). Os ratos foram pesados e restringidos de ração sólida por 8 h. Após este período, os animais foram anestesiados com cetamina (60 mg/kg, i.p.) e xilazina (6 mg/kg, i.p.) e foi realizada a laparotomia abdominal na região epigástrica. Após a exposição do estômago, foi injetado na camada subserosa da parede externa do órgão 5 μL da solução de ácido acético a 30% na face anterior no estômago. O local da injeção foi pressionado delicadamente por 30 segundos para que não houvesse extravasamento do material

injetado. Em seguida, o estômago foi lavado cuidadosamente com solução de NaCl à 0,9% e a parede abdominal suturada. Após a recuperação da anestesia, os animais foram devidamente identificados e transferidos para gaiolas. Após o procedimento, o tratamento foi realizado uma vez ao dia durante 14 dias e os animais tiveram água, ração e massa dos animais controlados nesse período. Os três grupos foram tratados por via oral respectivamente com o SCL (100%, 10 mL/kg, v.o.), controle negativo NaCl 0,9% v.o. e controle positivo ranitidina (60 mg/kg, v.o). Ao final dos tratamentos, os animais foram eutanasiados (câmara de CO₂). O sangue foi retirado e separado para análise hematológica, os órgãos tiveram a massa verificada. Os estômagos foram retirados, fotografados e a área de lesão ulcerativa (ALU) foi determinada por planimetria com auxílio do software ImageJ (Bethesda, MD, USA) e os dados foram expressos em mm².

4.4.4.2 Análises histológicas

Os estômagos com úlceras crônicas foram seccionados e colocados em formalina tamponada a 10%. Após a secagem, as amostras foram lavadas com água, imersas em álcool etílico a 70% por 3 a 4 dias e embebidas em parafina. Secções de parafina de 5 µm de espessura foram tomadas e coradas com hematoxilina/eosina (HE) e Ácido Periódico-Schiff (PAS). A análise histológica dos cortes gástricos foi realizada em sistema de microscopia automatizada MICRO DIP® (Kacillnc).

4.4.4.3 Análises imunohistoquímicas

A imunohistoquímica para Ki-67 e bromodeoxiuridina (BrdU) foi realizada em cortes de 4 µm de espessura em parafina de amostras contendo porções representativas da área ulcerada. Inicialmente, as amostras foram desparafinizadas em xileno e hidratadas. A expressão das proteínas Ki-67 e BrdU foi detectada pelo método da biotina livre em conjugação com a HRP (Horseradish Peroxidase). A recuperação antigênica foi realizada utilizando uma panela de pressão histológica

por dois minutos. As lâminas foram arrefecidas até à temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada usando BSA (albumina de soro bovino) durante 1 h.

Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas durante a noite com anticorpo monoclonal primário anti-camundongo para proteína Ki-67 (Santa Cruz Biotechnology, código: sc-23900, diluição 1: 200) e para proteína BrdU (Santa Cruz Biotechnology, IIB5, código: sc -32323, diluição 1: 200). Em seguida, foi utilizado o sistema de visualização HRP. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB), lavadas em água, contrastadas com hematoxilina, desidratadas e montadas.

Células imuno-reativas para Ki-67 e BrdU foram detectadas pela presença de um cromógeno marrom-avermelhado escuro no núcleo ou núcleo/citoplasma, respectivamente, nas células epiteliais da área da lesão. A reatividade foi indicada utilizando-se os seguintes escores: reatividade positiva-leve (em 10-15% das células analisadas), reatividade moderada (em 25-50% das células analisadas) e forte reatividade (acima de 50% das células analisadas), ou negativo (em menos de 10% de células analisadas).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M). As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett ou teste t student. A análise estatística foi realizada utilizando *GraphPad Prism*® 7.0 Software. O nível de significância mínimo para rejeição da hipótese nula foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL FITOQUÍMICO DO SUMO DE *Citrus x limon*

O sumo de *Citrus x limon* se apresenta na coloração amarelo esverdeado e consistência líquida, sendo detentor de forte odor cítrico. Sua faixa de pH varia entre 2,0 e 3,5. Podendo ser consumido *in natura*.

5.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A prospecção fitoquímica realizada para este trabalho apresentou as seguintes classes de metabólitos secundários: flavonoides, saponinas, cumarinas, terpenos (mono, sesqui e triterpenos e limonoides), fenilpropanoides, esteroides e açúcares redutores (Tabela 3, p. 38).

Tabela 3 – Classes de metabólitos secundários encontrados no sumo de *Citrus x limon*

Classe de metabólitos secundários	SCL
flavonoides	+++ ^{1,2}
fenilpropanoides	+
triterpenos	+
esteroides	+
saponinas	++
monoterpenos e sesquiterpenos	+
alcaloides	-
curaminas	++
proantocianidinas e leucoantocianidinas	-
taninos hidrolisáveis	-
açúcares redutores	+
limonoides	+

Legenda: (-) ausente; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte; (tr) traços; Nota: ⁽¹⁾4'-OH flavonoides livres e heterosídeos; ⁽²⁾3',4'-OH flavonoides livres e heterosídeos

Citrus x limon é bastante empregado na medicina popular e na gastronomia sendo frequentemente associado com efeitos de cura de doenças. Devido a isto, as investigações fitoquímicas desta variedade cítrica são comumente encontradas na literatura, porém, esses estudos se detêm aos flavonoides e carotenoides (GONZÁLEZ-MOLINA et al., 2010; UÇAN, AĞÇAM, AKYILDIZ, 2016).

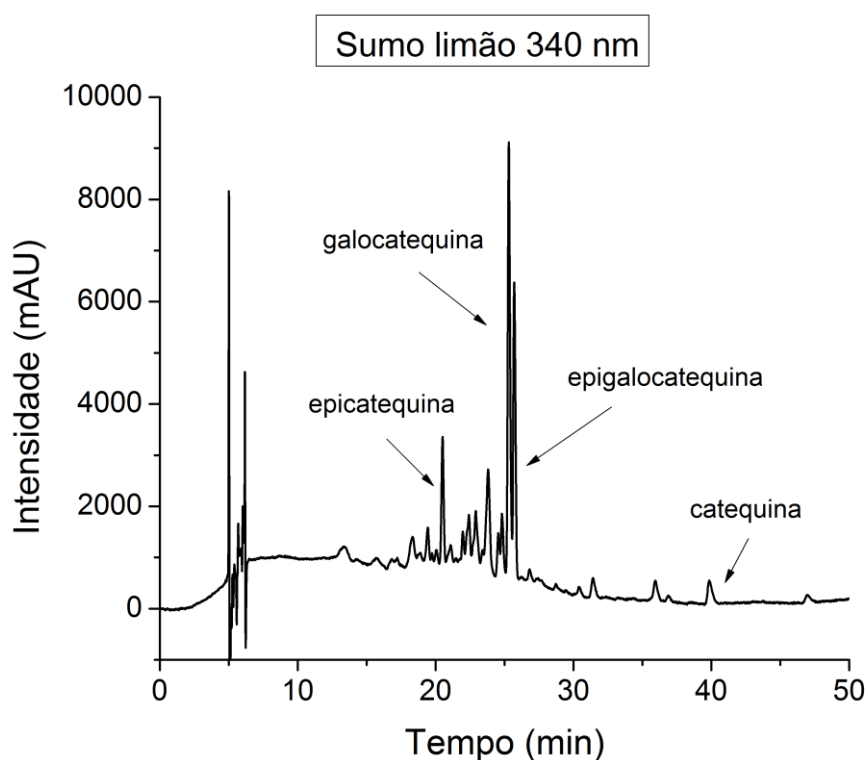
Os flavonoides são os metabólitos secundários mais comuns nas plantas, responsáveis pelo tratamento e prevenção de úlceras pépticas, devido a sua atividade antioxidante, pois são capazes de sequestrar os radicais livres impedindo a peroxidação lipídica (DEL RÍO et al., 2004).

O envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento de úlceras pépticas foi confirmado em vários estudos (SELMİ et al., 2017; YEO et al., 2018). O surgimento de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são gerados por neutrófilos e macrófagos ativos ocasionam uma injúria na mucosa gástrica, por isso compostos atuantes como antioxidantes são importantes na manutenção do equilíbrio gástrico (VISWANATHA, SHYLAJA, MOOLEMATH, 2017).

5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Por meio da análise cromatográfica do SCL foi possível identificar os quatro padrões analíticos utilizados relacionando a similaridade entre os tempos de retenção e o espectro de absorção ultravioleta, bem como quantificá-los (Figura 9, p. 43): epigallocatequina em 26,5 min ($17,7 \pm 3,9 \mu\text{g/mL}$), galocatequina em 25,5 min ($15,2 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$), epicatequina em 20,2 min ($6,01 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) e catequina em 37 min ($3,8 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$).

Figura 9 – Análise cromatográfica do SCL



Estudos demonstraram que a epigallocatequina apresenta efeitos gastroprotetores; este resultado está associado à atividade antioxidante e à manutenção do muco e dos níveis de GSH (ADHIKARY et al., 2011). Em 2010, um estudo feito por Song et al. apresentou o envolvimento dos canais K^+_{ATP} no mecanismo de ação da epigallocatequina, sendo a ativação destes canais extremamente importantes na gastroproteção (RIBEIRO et al., 2015).

A epicatequina é gastroprotetora ao reforçar a barreira mucosa e a neutralização do suco gástrico (ROZZA et al., 2013).

As catequinas são importantes na inibição da histamina sendo comumente relacionada à regulação da secreção ácida gástrica. No estudo de Murakami et al (1992), foi possível observar a inibição da atividade gástrica de H^+,K^+ -ATPase em cinco flavonoides, dentre eles a catequina, epicatequina, epigallocatequina, sugerindo que a atividade antissecretória e antiulcerogênica destes compostos ocorrem devido à sua atividade inibitória sobre H^+,K^+ -ATPase gástrica.

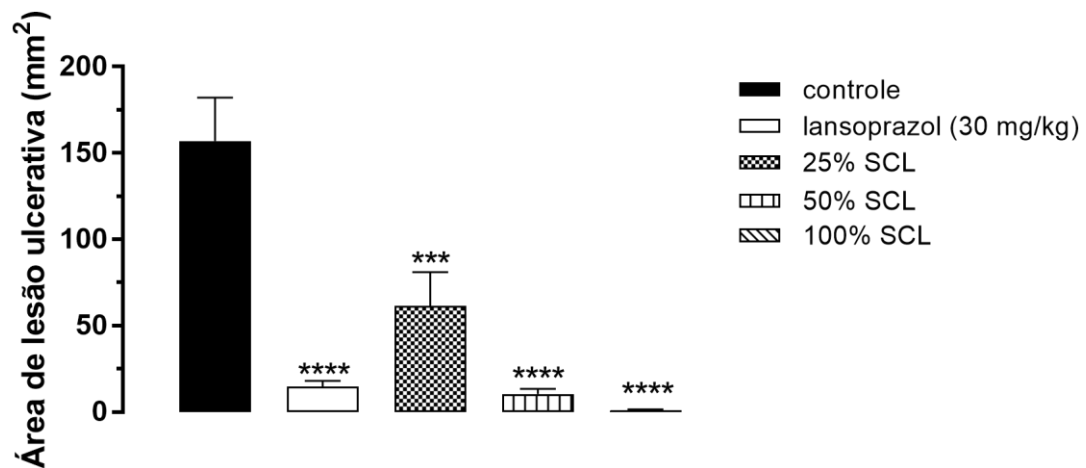
5.2 ESTUDOS *in vivo*

A espécie *Citrus x limon* apresenta diversas atividades biológicas comprovadas. Em relação a sua atividade gastroprotetora, a literatura apresenta somente dois trabalhos a respeito. O primeiro utilizou o óleo essencial da casca dos frutos (ROZZA et al., 2011) e o segundo (BHAVITAVYA et al., 2012), empregou o sumo diluído em água para 100 e 200 mg/kg, diferente à forma utilizada neste trabalho, o que difere do uso popular “sumo puro”.

5.2.1 Atividade gastroprotetora do sumo de *Citrus x limon* em úlcera induzida por etanol absoluto teste agudo em ratos

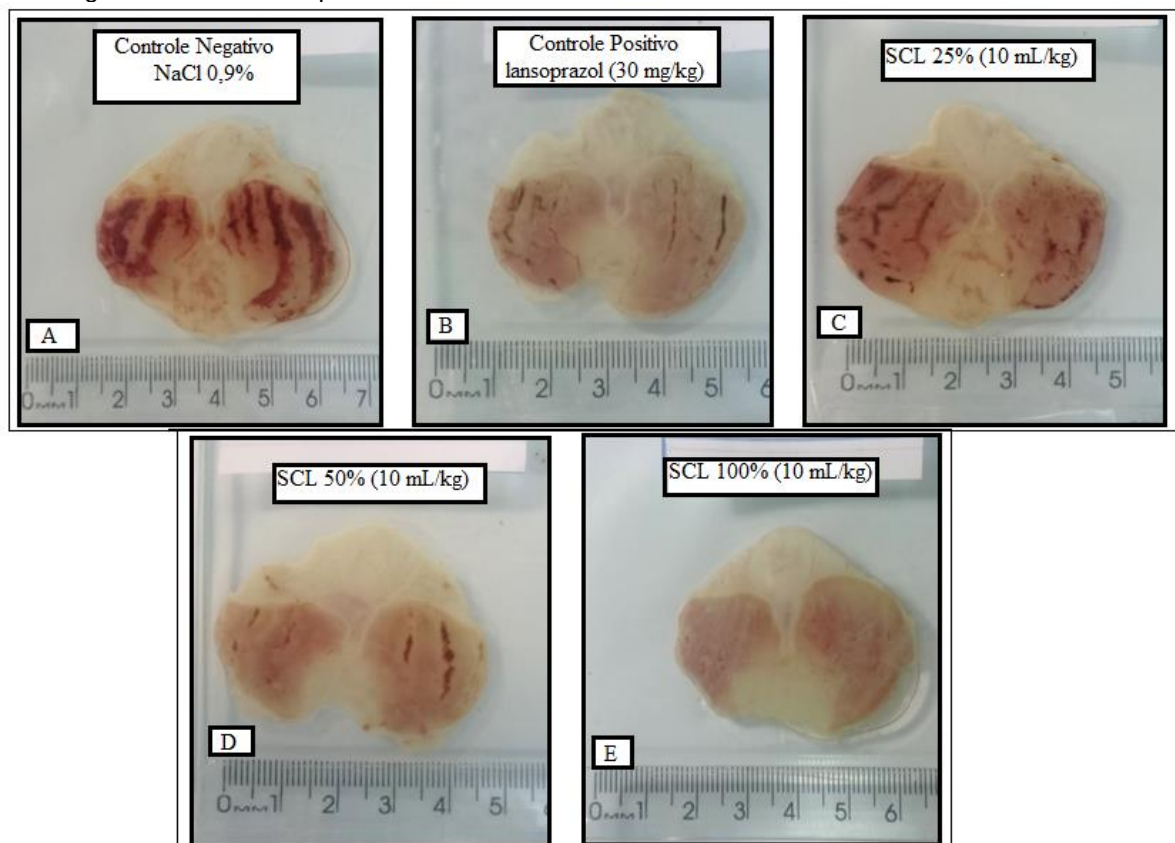
A administração de etanol causou graves danos na mucosa gástrica, com úlceras hemorrágicas e necróticas no grupo controle negativo com área de lesão ulcerativa (ALU) igual a $156,88 \pm 25,17 \text{ mm}^2$. A administração por via oral do SCL 25%, 50%, 100% e o controle positivo lansoprazol significativamente protegeram a mucosa gástrica de lesões induzidas por etanol em 60,81; 93,29; 99,48 e 91%, respectivamente, como pode ser observado na Figura 10, p. 45 e 11, p. 45.

Figura 10 -. Efeito do pré-tratamento com sumo de *Citrus x limon* (SCL) na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. (n = 6/grupo). ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, *** p < 0,001, ****p < 0,0001.

Figura 11 – Estômagos de ratos pré-tratados via oral com sumo de *Citrus x limon* (SCL) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



[A] NaCl 0,9%, [B] lansoprazol (30 mg/kg), [C] SCL 25% (10 mL/kg), [D] SCL 50% (10 mL/kg), [E] SCL 100% (10 mL/kg).

O modelo mais utilizado para avaliar o potencial gastroprotetor de uma substância, é o etanol (SIQUEIRA, 2012). Este modelo é comumente utilizado na averiguação pré-clínica de agentes com potencial atividade gastroprotetora ser o

principal agente nos casos de úlcera gástrica em humanos. Em adição o etanol inflige lesões gástricas hemorrágicas e necróticas na mucosa e resulta na infiltração de células inflamatórias.

O etanol (v.o.) causa danos à mucosa gástrica, devido a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento da peroxidação lipídica (MIZUI et al., 1987), diminuição dos níveis de glutathione (GSH) (IGNATOWICZ, 2013) que é um importante antioxidante responsável por proteger as células contra a peroxidação lipídica.

A produção de espécies reativas de oxigênio é algo natural no metabolismo do ser humano, estando presente em diversas condições fisiológicas importantes, uma delas sendo a fagocitose, onde as EROs eliminam o agente agressor. Quando a sua produção é exacerbada o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), que consegue controlar e reestabelecer o equilíbrio. Contudo, quando ocorre um desequilíbrio entre o sistema pró- e antioxidante, com um aumento dos oxidantes, o dano acontece (SILVA & GONÇALVES, 2010)

A barreira de muco-bicarbonato atua como um lubrificante da superfície do estômago, responsável por reduzir o dano físico ao epitélio. A administração do etanol também está associada à diminuição do muco da parede gástrica (AL-HOWIRINY et al., 2003), liberação de histamina por meio da degranulação de mastócitos (PARK et al., 2004), inibição da liberação de prostaglandinas e por causar distúrbios na microcirculação gástrica contribuindo assim para o aumento de aspectos necróticos e hemorrágicos do ferimento (ABDEL-SALAM et al., 2001).

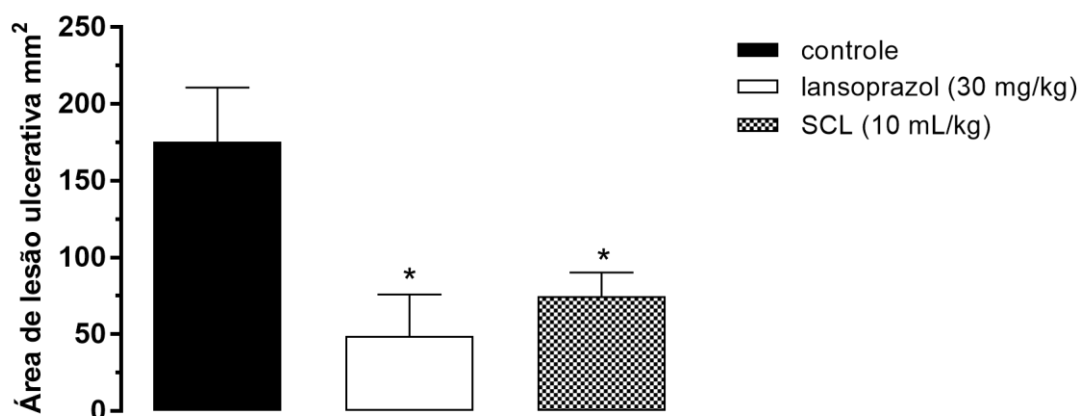
O estudo de Rozza et al. (2011) com o óleo essencial da casca de *Citrus x limon* apresentou efeito gastroprotetor em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos.

Como a população utiliza o suco *in natura* assumimos ser apropriado para fazer o mesmo em nosso trabalho e investigar seus benefícios na concentração de SCL 100% independentemente de todas as concentrações de SCL terem apresentado bom efeito gastroprotetor.

5.2.2 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto com pré-tratamento de 15 dias com SCL em ratos

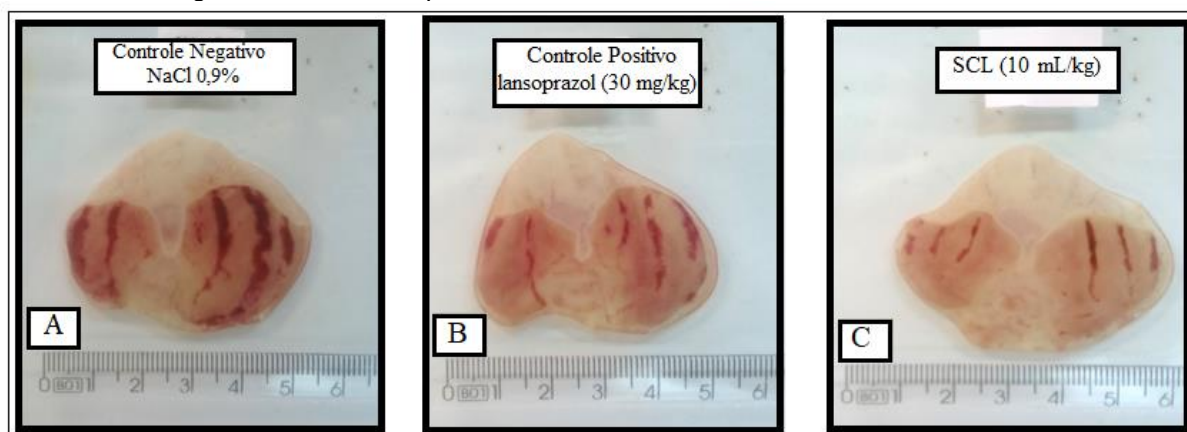
No modelo utilizado para avaliar a gastroproteção associada ao uso contínuo do SCL durante 15 dias resultou que a administração por via oral do SCL 100% e o controle positivo lansoprazol significativamente protegeram a mucosa gástrica de lesões induzidas por etanol em uma percentagem de inibição de 57,29 e 72%, respectivamente, quando comparadas ao controle NaCl 0,9% ($175,3 \pm 35,54 \text{ mm}^2$), como pode ser observado nas Figuras 12 e 13, p. 47.

Figura 12 - Efeito do pré-tratamento com sumo de *Citrus x limon* (SCL) por 15 dias na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. (n = 6 / grupo). ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, *p < 0,05.

Figura 13 – Estômagos de ratos pré-tratados via oral com sumo de *Citrus x limon* (SCL) por 15 dias sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



[A] NaCl à 0,9%, [B] lansoprazol (30 mg/kg), [C] SCL (10 mL/kg).

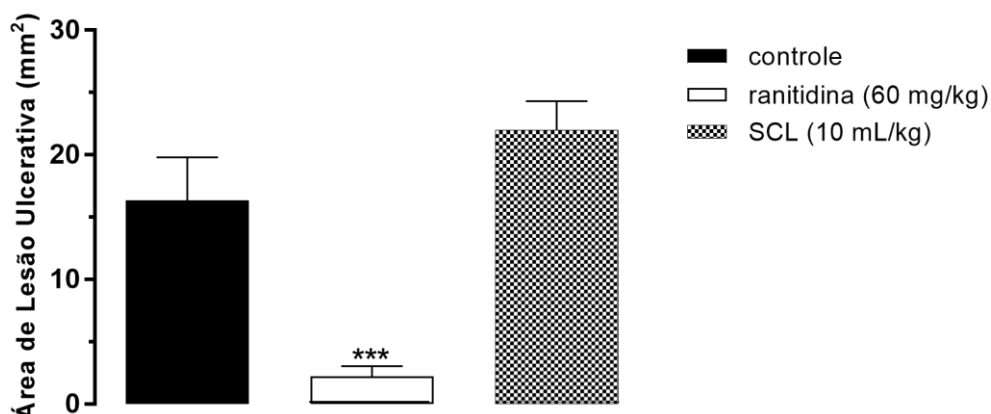
Um estudo feito por Selmi et al. (2017) com o extrato aquoso da casca de *Citrus sinensis* apresentou gastroproteção neste mesmo modelo de úlcera induzida por etanol.

Por este não ser um modelo específico, a proteção contra as lesões ulcerativas pelo SCL pode ser relacionada ao seu envolvimento na estimulação da produção da barreira de muco-bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo, na atividade antioxidante, na secreção ácida gástrica, entre outros. Por isso, estudos específicos devem ser feitos para que seja descoberto o mecanismo de ação.

5.2.3 Atividade gastroprotetora do sumo de *Citrus x limon* em úlcera induzida por indometacina em ratos

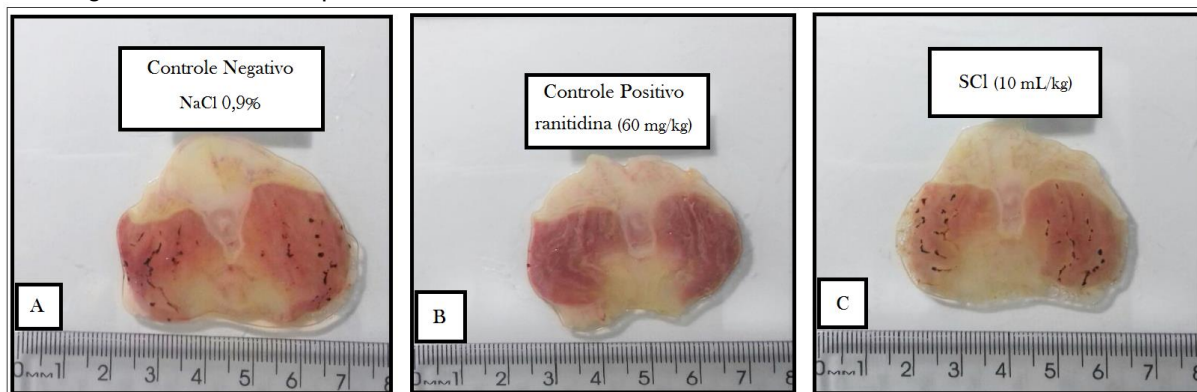
O sumo de *Citrus x limon* não protegeu de forma sistêmica o estômago da lesão gástrica, induzida pela administração subcutânea de indometacina (30 mg/kg), quando comparado com o grupo controle (NaCl 0,9%, v.o). Os resultados sugerem o não envolvimento de prostaglandinas (PGs) e da enzima ciclo-oxigenase (COX), porém experimentos mais específicos são necessários. Enquanto que a administração de ranitidina (60 mg/kg v.o.) reduziu significativamente a área de lesão ulcerativa, quando comparado com o grupo controle (NaCl 0,9% v.o.), conforme as Figuras 14 (p. 48) e 15 (p.49).

Figura 14 – Efeito do pré-tratamento por via oral sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos de NaCl à 0,9%, ranitidina (60 mg/kg) e sumo de *Citrus x limon* (SCL, 10 mL/kg).



Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 6-8 animais/grupo. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Dunnett, *** $p < 0,001$.

Figura 15 – Estômagos de ratos pré-tratados via oral com sumo de *Citrus x limon* (SCL) sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.



[A] NaCl à 0,9%, [B] ranitidina (60 mg/kg), [C] SCL (10 mL/kg).

As lesões gastrointestinais induzidas por AINE ocorrem de duas formas: local (tópica) ou sistêmica, sendo influenciado pela via de administração (WALLACE, 2008).

Os AINEs são ácidos orgânicos fracos. No suco gástrico, eles são lipofílicos e não-ionizados, permitindo que atravessem a membrana e são convertidos para a forma ionizada, quando em meio intracelular (pH = neutro), sendo assim acumulados no interior da célula. Este acúmulo provoca os danos locais (LAINE, TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

O efeito sistêmico dos AINE ocorre na inibição da COX, responsável pela síntese PGs, fortes indutoras de inflamação, porém elas (PG₂) são responsáveis por estimular a secreção do muco, bicarbonato e inibir a secreção gástrica, que são fatores citoprotetores da mucosa. A mucosa gástrica fica desprotegida na utilização de AINE, devido a inibição das PG₂'s (HAWKEY, 2000). Estudos também observaram que a utilização desta classe de medicamentos causa apoptose e necrose de células gástricas independentemente da inibição da COX (TANAKA, 2005; TOMISATO, 2001) e diminui a produção de muco ocasionando úlceras hemorrágicas (BECH et al., 2000).

Estudos em humanos demonstraram que AINEs, como a indometacina, são as drogas mais comuns que causam a úlcera péptica. E que 20% das pessoas que fazem uso destes medicamentos desenvolverão a doença, isto ocorre devido ao seu uso indiscriminado (PARVAN et al., 2017).

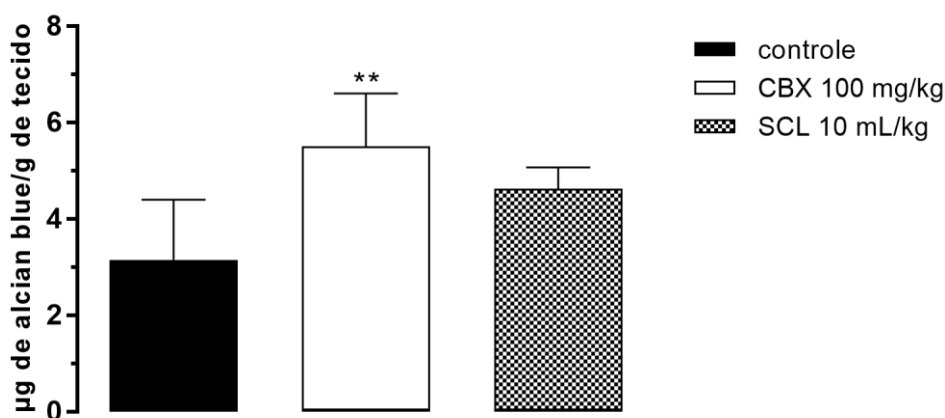
Em um estudo feito por Bhavitavya et al. (2012), utilizando o sumo de *Citrus x limon* (v.o.) diluído em doses de 100 e 200 mg/kg, foi possível observar uma proteção significativa da área ulcerada induzida por indometacina (v.o).

Este trabalho diferiu do estudo citado, pois a administração de indometacina foi por via subcutânea e o sumo não estava diluído. O estudo de Rozza et al. (2011) utilizando óleo essencial extraído da casca do fruto de *Citrus x limon* mostrou uma redução significativa na lesão, ocasionada pela manutenção dos níveis de PGE₂ por estes frutos, por meio de úlcera induzida por indometacina por via subcutânea.

5.2.4 Determinação do muco aderido à mucosa gástrica

Em nosso trabalho, o SCL não estimulou a produção de muco no estômago, sendo este mecanismo não responsável pela ação gastroprotetora do objeto em estudo (Figura 16, p. 50).

Figura 16 -. Efeito do sumo de *Citrus x limon* (SCL) na determinação do muco aderido ao muco gástrico.



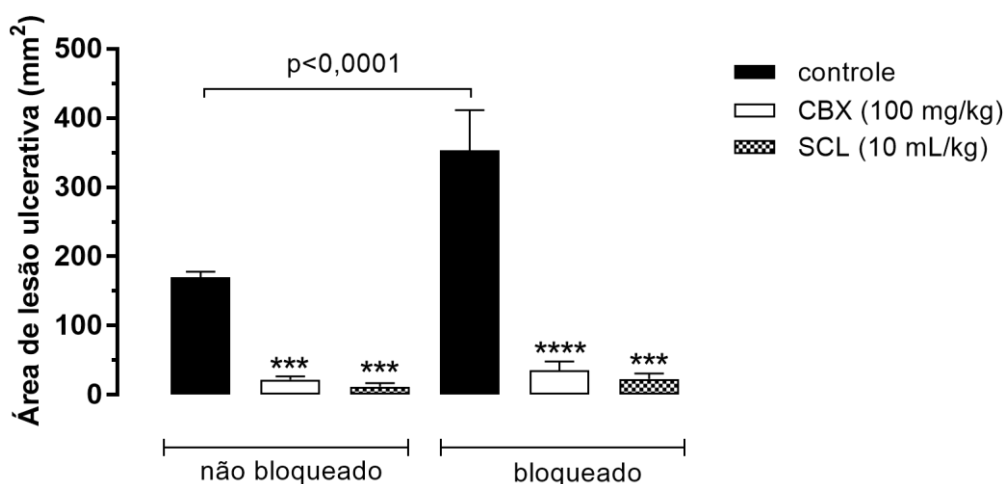
Os resultados são expressos como a média ± S.E.M. (n = 6/grupo). One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, ** p <0,01.

A mucosa gástrica está diariamente sendo exposta a diversos agentes nocivos, por conta disso ela apresenta barreiras protetoras. A barreira mucobicarbonato age como um lubrificante na superfície do estômago, responsável por reduzir os danos físicos ao epitélio (AL-HOWIRINY et al., 2003). Agindo como uma barreira que impede a difusão de H⁺ para o interior das células epiteliais, mantém o meio alcalino e auxilia na remoção dos radicais livres (ALLEN; FLEMSTRON, 2005).

5.2.5 Envolvimento dos compostos sulfidrilas (grupos –SH) na gastroproteção

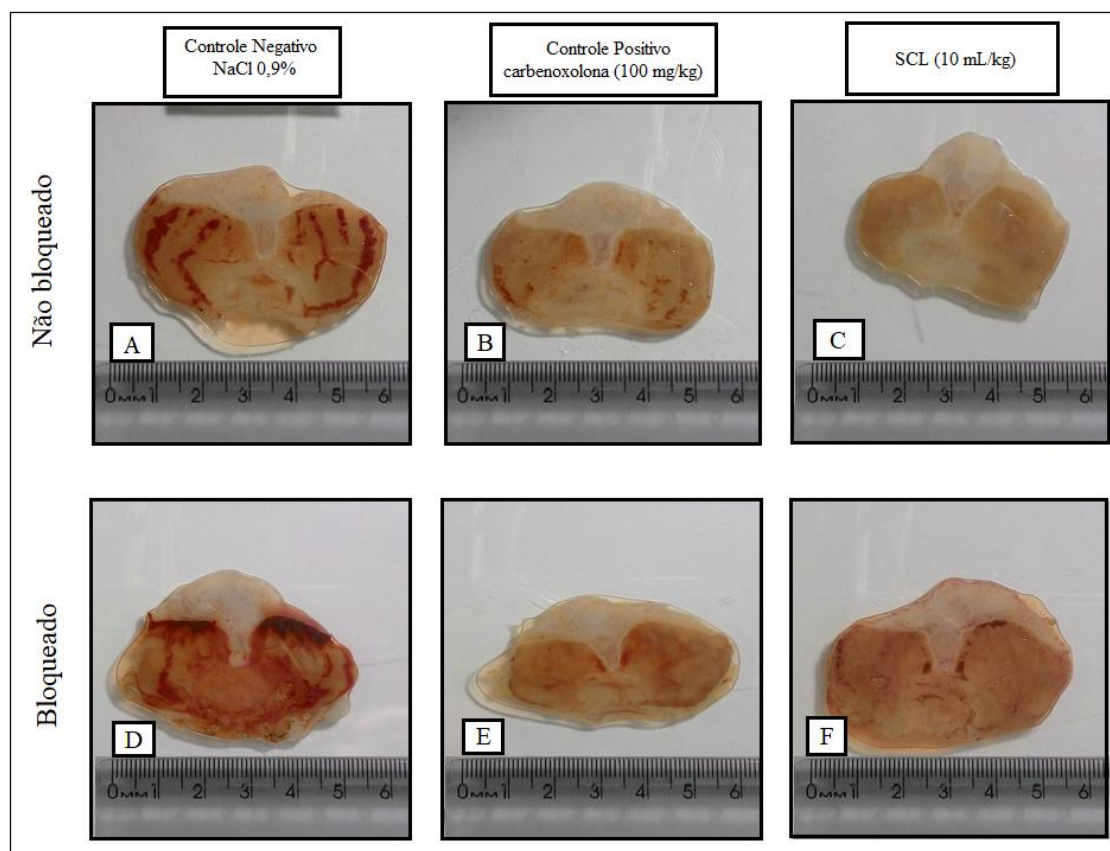
Para o modelo que avalia a participação dos grupos sulfidrilas (SHs) na gastroproteção, os grupos pré-tratados com NEM (N-etilmaleimida 10 mg/kg i.p.) exacerbaram as lesões gástricas induzidas pelo etanol em 51,83% em relação aos grupos pré-tratados com solução de NaCl 0,9%. Nos animais pré-tratados com NEM SCL (10 mL/kg v.o.) e carbenoxolona (100 mg/kg v.o.) continuaram exercendo o seu efeito gastroprotetor (Figura 17, p. 51 e Figura 18, p.52) não diferindo entre os grupos bloqueados e não bloqueados o que sugere que o SCL não depende da presença do –SH na gastroproteção.

Figura 17 -. Efeitos do sumo de *Citrus x limon* (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. (n = 5-7/grupo). ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Figura 18 – Estômagos com efeitos do sumo de *Citrus x limon* (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM.



Não bloqueado: [A] NaCl à 0,9%, [B] carbenoxolona (100 mg/kg), [C] SCL (10 mL/kg); bloqueado: [D] NaCl à 0,9%, [E] carbenoxolona (100 mg/kg); [F] SCL (10 mL/kg).

O oxigênio é necessário para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para que seja feito o metabolismo celular. Somente uma pequena parte do oxigênio consumido é reduzido, produzindo assim uma variedade de substâncias químicas altamente reativas do oxigênio. Estas substâncias são responsáveis, quando em desequilíbrio, por provocarem injúrias teciduais, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A indução da úlcera gástrica pelo etanol causa aumento do EROs no organismo agravando a lesão. Os compostos -SH e -NO são fundamentais para a proteção da mucosa gástrica neste modelo. O composto -SH é um importante antioxidante responsável por proteger as células contra a peroxidação lipídica (IGNATOWICZ, 2013), controlando assim a produção de muco da mucosa gástrica.

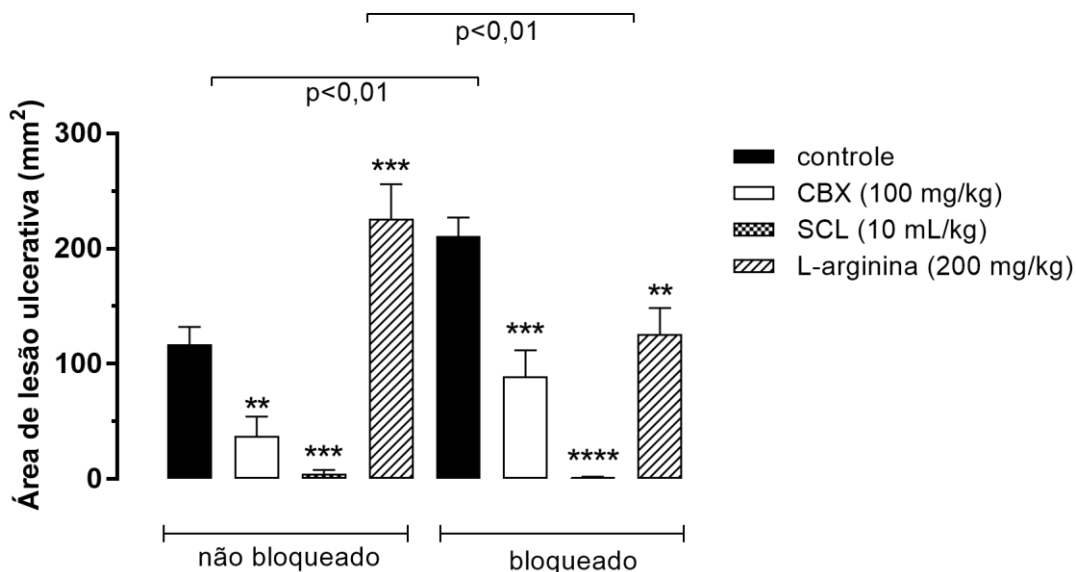
Como exemplo destes compostos está a glutathiona (GSH), que quando há sua depleção deixa o tecido gástrico mais vulnerável a injúrias oxidativas. É o único tiol não protéico presente em espécies aeróbicas e tem como função central o combate ao estresse oxidativo e dano celular, transformando as EROs em espécies menos reativas como água e oxigênio, para que cesse a formação de outras espécies reativas (LUSHCHAK, 2011).

Para investigar o mecanismo de ação, utilizou-se n-etilmaleimida (NEM; bloqueador de -SH). O SCL continuou a exercer um efeito gastroprotetor, portanto esses dados sugerem que o -SH não está envolvido na gastroproteção do SCL, pois ele é capaz de proteger a mucosa mesmo na ausência desses grupos. Resultado este que corrobora com o encontrado por Rozza et al. (2011), onde o composto -SH não estava envolvido no mecanismo gastroprotetor do óleo essencial da casca de *Citrus x limon*.

5.2.6 Envolvimento de compostos de óxido nítrico (grupos -NO) na gastroproteção

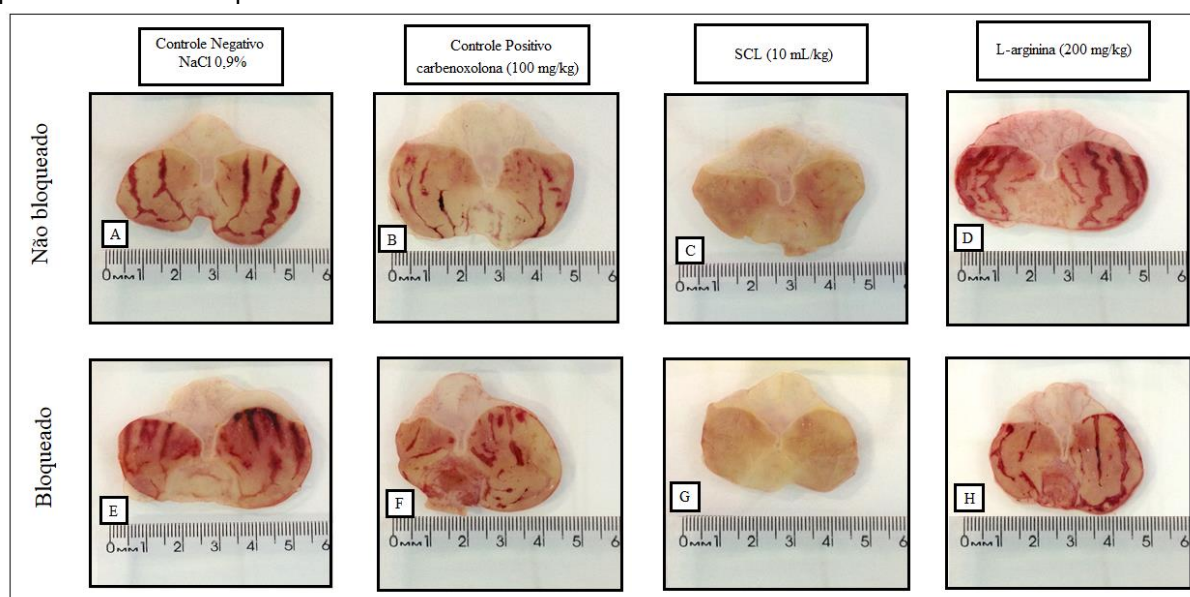
Para o modelo que avalia a participação do óxido nítrico (-NO) na gastroproteção, os grupos pré-tratados com L-NAME (10 mg/kg i.p.) a indução por etanol aumentou as lesões gástricas em 44,69% em relação aos grupos pré-tratados com solução de NaCl 0,9%. Nos animais pré-tratados com L-NAME SCL (100%, 10 mL/kg v.o.) e carbeoxolona (100 mg/kg v.o.) continuaram exercendo seus efeitos gastroprotetores. Ao contrário da L-arginina (200 mg/kg v.o.) - o precursor do -NO apresentou aumento da lesão quando comparado ao controle negativo pré-tratado com NaCl e exacerbou em 44,43% das lesões gástricas quando comparado com o grupo pré-tratado com L-NAME, sugerindo a não participação do óxido nítrico no processo gastroprotetor (Figuras 19 e 20, p. 54).

Figura 19 - Efeitos do sumo de *Citrus x limon* (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. (n = 5-7/grupo). One-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Figura 20 – Estômagos com efeitos do sumo de *Citrus x limon* (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME.



Não bloqueado: [A] NaCl 0,9%, [B] carbenoxolona (100 mg/kg), [C] SCL (10 mL/kg), [D] L-arginina (200 mg/kg); bloqueado: [E] NaCl 0,9%, [F] carbenoxolona (100 mg/kg); [G] SCL (10 mL/kg); [H] L-arginina (200 mg/kg).

O óxido nítrico (NO) é um gás importante que tem como precursor a L-Arginina. Existem três formas do NO no corpo humano: NOS endotelial constitutiva (eNOS), NOS constitutiva neuronal (nNOS) e NOS indutível (iNOS), que é induzida durante a inflamação (PACHER et al., 2007).

A síntese de NO é promovida pela expressão de iNOS/eNOS tratando a inflamação, aumentando o fluxo sanguíneo e a vasodilatação (ZAGHLOOL et al., 2015). O NO se difunde do endotélio de músculos lisos, localizado nas paredes vasculares, reagindo com a guanilil ciclase solúvel, aumentando o nível celular do segundo mensageiro, a guanosina monofosfato cíclica (cGMP). O cGMP age relaxando as células do músculo liso e subsequente aumento do diâmetro dos vasos e consequentemente um aumento no fluxo sanguíneo (MAGIEROWSKI et al., 2015).

Tanto o NO como PG desempenham um papel fundamental no trato gastrointestinal e são responsáveis pela reparação de lesões, angiogênese, produção de muco, respostas inflamatórias (HIRUMA-LIMA et al., 2006).

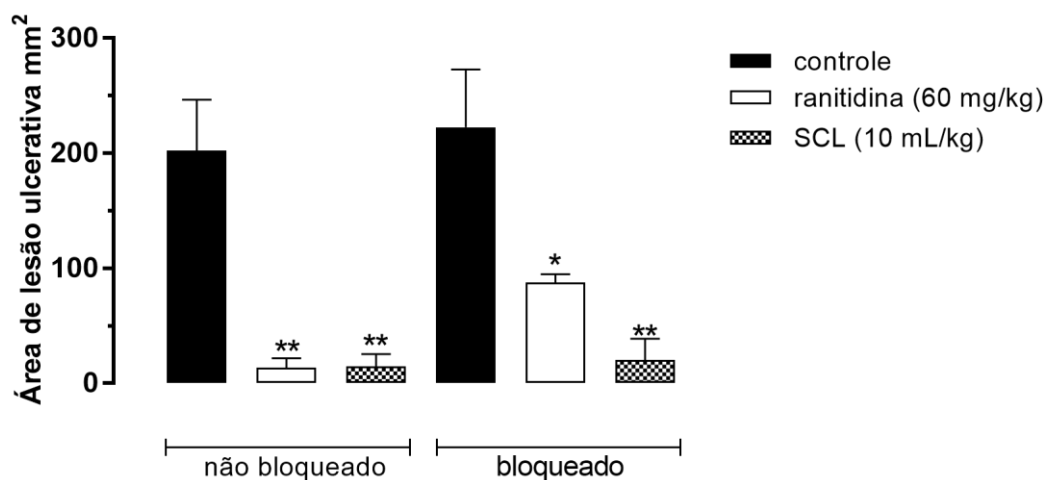
O fato do NO ocasionar a vasodilatação implica que essa molécula gasosa contribui para a manutenção da integridade da barreira da mucosa gástrica, pois ela está responsável por fornecer substâncias tanto nutritivas quanto o bicarbonato para a mucosa gástrica (WALLACE, 2008)

O aumento da área de úlcera gástrica no grupo L-arginina, precursor do -NO, pode ter sido devido à superexpressão da iNOS durante a inflamação apresentando um efeito pró-ulcerogênico (SULUVOY et al., 2017). Para investigar o mecanismo de ação, utilizou-se L-NAME; bloqueador de NOs. O SCL continuou a exercer um efeito gastroprotetor, sugerindo que o NO não está envolvido na gastroproteção do SCL, que protege a mucosa mesmo na ausência desses grupos. Nosso resultado corrobora com o de Rozza et al. (2011), onde o -NO não estava envolvido no mecanismo de ação do óleo essencial da casca de *Citrus limon*.

5.2.7 Envolvimento de prostaglandinas (PGs) na gastroproteção

Para o modelo que avalia a participação de prostaglandinas (indometacina, 30 mg/kg i.p.) na gastroproteção os animais pré-tratados com indometacina SCL (100%, 10 mL/kg v.o.) e ranitidina (60 mg/kg v.o.) continuaram a exercer seus efeitos gastroprotetores.

Figura 21 - Efeitos do sumo de *Citrus x limon* (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com indometacina.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. (n = 4-8/ grupo). ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, *p < 0,05, ** p < 0,01.

A indometacina causa um aumento na secreção ácida e na atividade da pepsina, diminuição da força de secreção do muco e bicarbonato e um aumento na peroxidação lipídica, produzindo assim radicais livres na mucosa gástrica e consequentemente à injúrias (SUELYMAN et al., 2010)

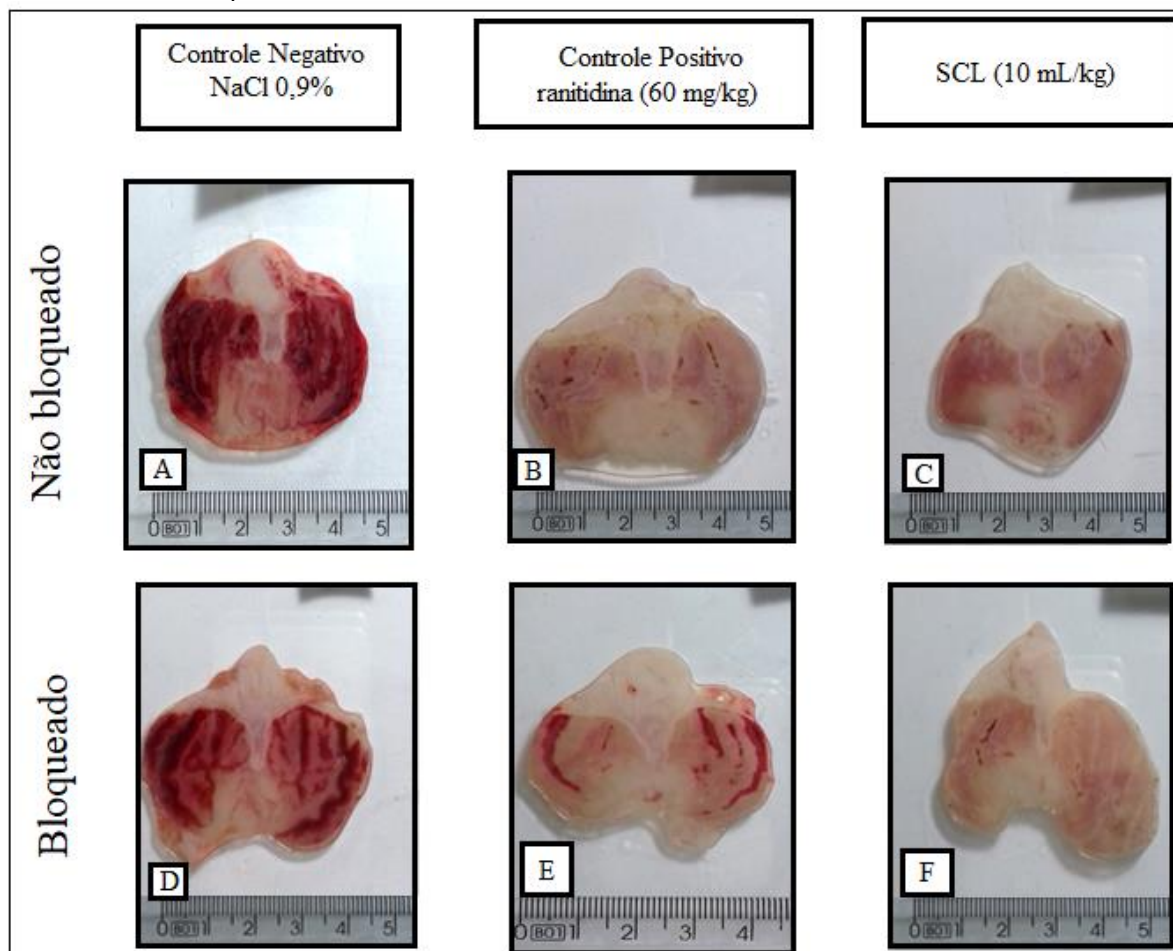
Prostaglandinas (PGs) são produtos finais de ácidos graxos no metabolismo produzido via COX. PGs há muito tempo são conhecidas por se comportarem como importantes mediadores fisiológicos e patológicos que implicam em um número de áreas terapêuticas de interesse, incluindo inflamação, dor, doenças cardiovasculares (PARVAN et al., 2017).

Os AINEs são conhecidos por inibir as duas isoformas da COX e sua agressividade ao trato gastrointestinal e toxicidade foram atribuídas à inibição das PGs gastroprotetoras. Prostaglandinas como a PGE₂ e PGEI₂ produzida pela COX-1 são conhecidas por apresentarem efeitos citoprotetores na mucosa gastrointestinal por reduzir a secreção ácida gástrica, pelas células parietais no estômago, aumento do fluxo sanguíneo e estimulação da liberação de muco. As PGs pró-inflamatórias seriam produzidas pela via da indução da isoforma COX-2. Estas aumentam o grau de inflamação iniciado por outros mediadores de inflamação como a histamina, levando à um aumento da permeabilidade vascular edema (RAO & KNAUS, 2008).

A fim de investigar os mecanismos de ação, a indometacina (Inibidor da COX) foi utilizada. SCL continuou exercendo o seu efeito gastroprotetor, sendo assim, este dado sugere que as PGs não estão envolvidas na gastroproteção deste sumo,

devido a proteção da mucosa mesmo com a ausência deste grupo (Figura 21, p. 56 e Figura 22, p. 57).

Figura 22 – Estômagos com efeitos do sumo de *Citrus x limon* (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com indometacina.



Não bloqueado: [A] NaCl à 0,9%, [B] ranitidina (60 mg/kg), [C] SCL (10 mL/kg); bloqueado: [D] NaCl à 0,9%, [E] ranitidina (60 mg/kg), [F] SCL (10 mL/kg).

5.2.8 Efeito do sumo de *Citrus x limon* sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em ratos

Os parâmetros bioquímicos e mudanças do conteúdo gástrico, a provável atividade antissecretória e a atuação sistêmica e local de algumas drogas são avaliadas através do modelo de ligadura de piloro (BERTÉ et al., 2014; HIRUMA-LIMA et al., 2006).

O tratamento com SCL (100%, 10 mL/kg) e ranitidina (60 mg/kg), reduziram o $[H^+]$, volume gástrico e elevou o pH quando comparado com o grupo controle

negativo. Estes resultados indicam que o SCL contém compostos que agem sistematicamente na gastroproteção por meio de mecanismos antissecretórios (Tabela 4, p. 58).

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro, tratados com sumo de *Citrus x limon* (SCL) e ranitidina por via i.d.

Tratamento	pH	[H ⁺] (mEq/mL/4h)	Volume gástrico (g)
NaCl 0,9%	2,59 ± 0,09	15,11 ± 0,93	0,88 ± 0,04
SCL (10 mL/kg)	3,23 ± 0,07*	7,99 ± 0,20***	0,55 ± 0,04***
ranitidina (60 mg/kg)	3,75 ± 0,19***	12,15 ± 0,72**	0,20 ± 0,02***
Falso operado	3,93 ± 0,14***	4,43 ± 0,34***	0,15 ± 0,01***

Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. de 6 animais/grupo. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnet, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

As lesões gástricas induzidas por este método são causadas pela retenção anormal de ácido gástrico no estômago (TAKEUCHI et al., 1976) ocasionado pelos reflexos vago-vagais independentes de células G e enterocromafins (BAGGIO et al., 2003). A perda da barreira de proteção da mucosa (SAIRAM et al., 2002), inativação da síntese de prostaglandinas (PANDA et al., 2012), a diminuição da concentração de GSH, o aumento da peroxidação lipídica e de radicais livres (RASTOGI et al., 1998) são consequências do acúmulo deste ácido no lúmen.

O processo de secreção ácida gástrica requer receptores funcionais, caminhos sinalizados, canais e transportadores e bombas de secreção ácida.

A fonte da secreção ácida é a célula parietal, localizada nas glândulas da mucosa do fundo, sendo ela mediada pela bomba de prótons (H⁺/K⁺- ATPase) com o efluxo dos canais de K⁺ e Cl⁻. Esta bomba de prótons se funde na membrana apical onde transporta H⁺ pelo lúmen em troca de K⁺ em uma razão de 1:1, este mecanismo ocorre devido à estimulação da histamina.

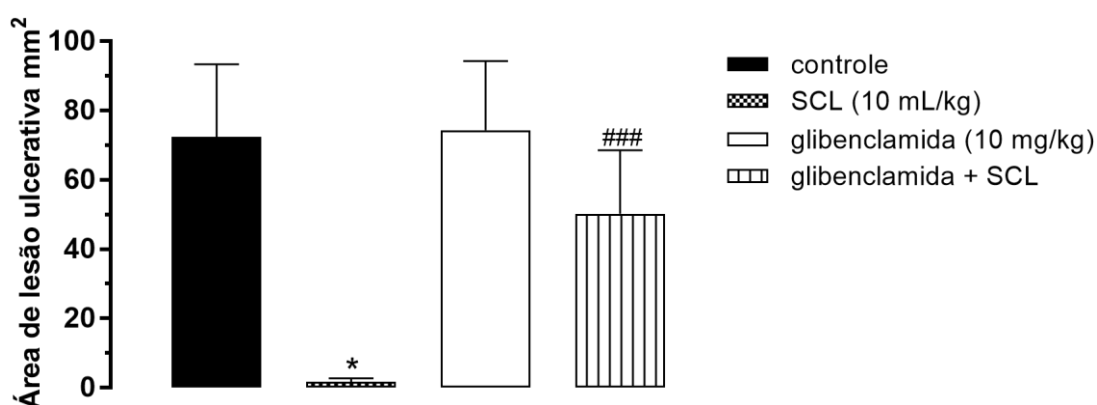
Com a possível identificação de reguladores celulares da secreção ácida, novos fármacos eficazes foram desenvolvidos, os chamados receptores antagonistas de H₂ e PPIs. Porém, esta terapia antissecretória quando utilizada a longo prazo ocasiona diversos efeitos colaterais como: um aumento da inflamação gástrica, desenvolvimento de atropia entre aqueles com infecção por *H. pylori*, causando também tumores no estômago (DI MARIO & GONI, 2014).

O estudo feito por Bhavitavya et al. (2012), diferiu dos resultados apresentados no presente trabalho, pois ao utilizarem o sumo de *Citrus x limon* diluído em doses de 100 e 200 mg/kg, a atividade de pepsina, cuja atuação só ocorre em meio ácido, não diferiu do grupo controle negativo, consequentemente houve um aumento de $[H^+]$. A forma de preparação do sumo empregado no trabalho de Bhavitavya et al. (2012) e a composição fitoquímica, podem ter alterado a capacidade antissecreatória do sumo de *Citrus x limon*.

5.2.9 Envolvimento dos canais de K^+_{ATP} na gastroproteção

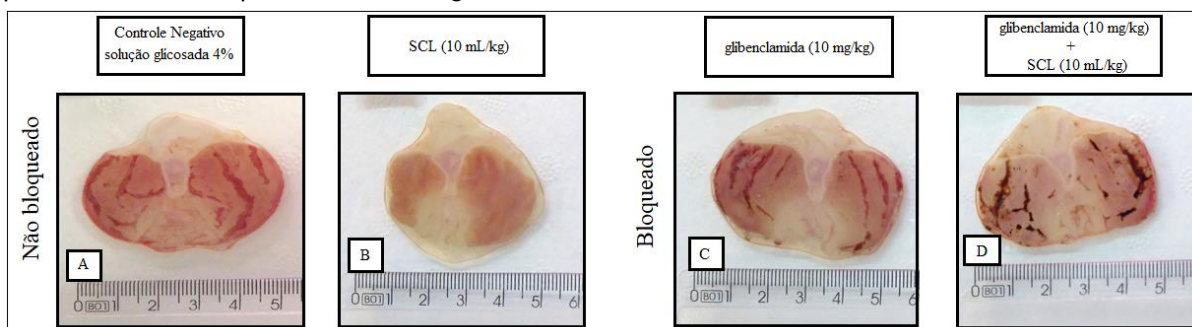
Para o modelo que avalia a participação dos canais K^+_{ATP} na gastroproteção, foi possível observar que no modelo não bloqueado o SCL exerceu o seu efeito gastroprotetor esperado, com percentual de proteção de 97,6% de úlcera gástrica induzida por etanol. Entretanto, quando os animais foram pré-tratados com glibenclamida – um bloqueador de canais para potássio sensíveis a ATP – o SCL teve o seu efeito gastroprotetor revertido, com percentual proteção de apenas 30,6%, quando comparado com o controle ($72,93 \pm 21,02 \text{ mm}^2$). (Figura 23, p. 59 e Figura 24, p. 60).

Figura 23 - Efeitos do sumo de *Citrus x limon* (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com glibenclamida.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. ($n = 6/\text{grupo}$). ANOVA de uma via, seguido pelos testes de Dunnett, * $p < 0,05$, e T de student ### $p < 0,001$.

Figura 24 – Estômagos com efeitos do sumo de *Citrus x limon* (SCL) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com glibenclamida.



Não bloqueado: [A] Solução glicosada à 4%, [B] SCL (10 mL/kg); bloqueado: [C] glibenclamida (10 mg/kg) [D] glibenclamida + SCL.

Alguns estudos apresentaram resultados positivos demonstrando que a ativação dos canais K^+_{ATP} está envolvida na gastroproteção (PESKAR et al., 2002; ROZZA et al., 2013).

A ativação dos canais K^+_{ATP} pode ocorrer por duas vias: primeiramente pelo NO/cGMP/ K^+_{ATP} , onde o NO ativar a guanilato ciclase, aumentando o monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) que irá ativar o canal de K^+_{ATP} (MEDEIROS et al., 2009) E segundo, pela atividade das PGs, que também de acordo com Peskar et al., 2002, quando a biossíntese de PGs é inibida os mediadores para a ativação do K^+_{ATP} passam a ser as PGE_2 endógenas.

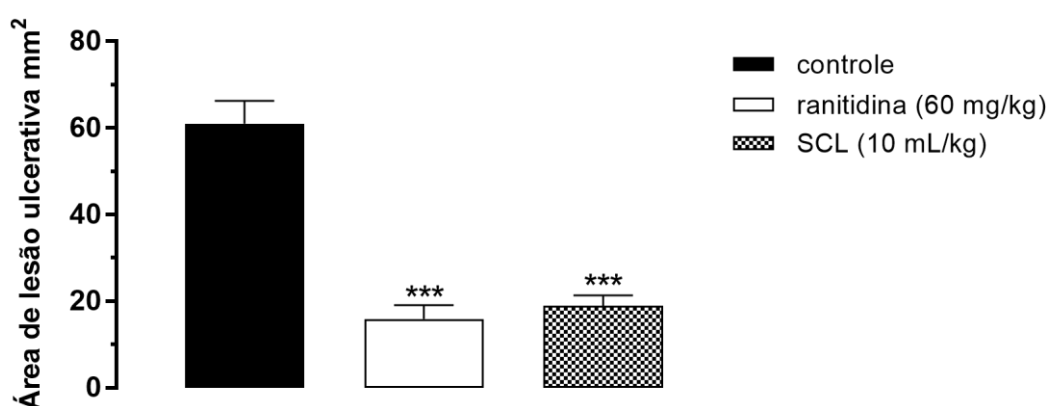
Assim, os canais K^+_{ATP} mediam a gastroproteção aumentando a microcirculação gástrica, inibindo ativação neutrofílica e a produção subsequente de superóxido, assim como na secreção ácida e a contratilidade estomacal (GARCIA et al., 1997).

5.2.10 Atividade cicatrizante do sumo de *Citrus x limon* em úlcera induzida por ácido acético em ratos

De acordo com os resultados, o SCL apresenta atividade cicatrizante de úlcera induzida pelo ácido acético ($18,96 \pm 1,09 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo controle ($61 \pm 1,98 \text{ mm}^2$) (Figuras 25 e 26, p. 61). Polo et al. (2012) apresentaram resultado semelhante utilizando o óleo essencial da casca de *Citrus aurantium* (250 mg/kg, v.o.) reduzindo a área da lesão da mucosa gástrica neste mesmo modelo.

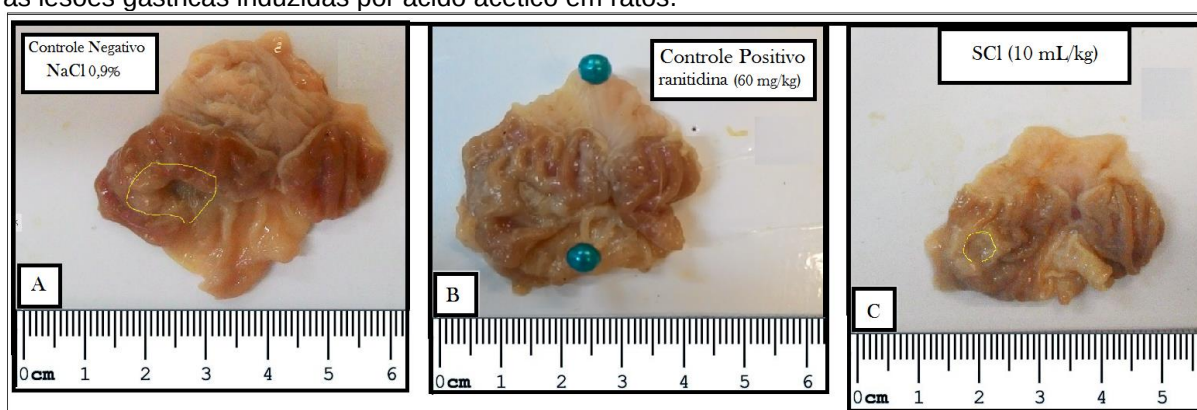
A cronicidade da úlcera induzida por ácido acético se deve à adesão da penetração da base da úlcera no fígado ou pâncreas que causa a retenção e indução da liberação da gastrina pelo antro, com um resultante aumento da acidez, diminuição da atividade péptica, estase gástrica e reincidência de úlcera (OKABE; PFEIFFER, 1972). O efeito de cicatrização de úlceras induzidas por ácido acético pode ser relacionado com o antagonista de H_2 , bloqueio da bomba de prótons, fatores de crescimento e fatores de crescimento epidérmico (SHAHROKHI, 2015).

Figura 25 – Efeito cicatrizante do tratamento via oral de NaCl 0,9%, ranitidina (60 mg/kg) e sumo de *Citrus x limon* (SCL, 10 mL/kg) nas lesões gástricas agudas induzidas por ácido acético em ratos.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5 animais/grupo. Análise de variância ANOVA seguido do teste de Dunnet, *** $p < 0,001$.

Figura 26 – Estômagos de ratos tratados via oral por 14 dias com sumo de *Citrus x limon* (SCL) sobre as lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratos.



[A] NaCl 0,9%, [B] lansoprazol (30 mg/kg), [C] SCL (10 mL/kg).

A úlcera induzida por ácido acético é comumente usada para realizar estudos fisiopatológicos e farmacológicos no tratamento de úlceras pépticas, pois se assemelha às úlceras em humanos tanto em seu processo de cicatrização quanto

por serem difíceis de serem reparadas (OKABE; AMAGASE, 2005; OKABE; PFEIFFER, 1972). Apesar das úlceras que se desenvolvem em humanos cicatrizarem de forma espontânea no decurso do tempo, existe um alto período de relapso depois da cicatrização. Esta doença benigna devido ao padrão repetitivo de sarar e reaparecer a qualifica com um alto índice de morbidade.

A análise de possíveis sinais de alterações hematológicas do SCL foi realizada por meio da determinação de parâmetros hematológicos (Tabela 5, p. 63). Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os diferentes grupos, exceto no número de monócitos que no grupo que recebeu SCL produziu aumento estatisticamente significativo de cerca de 65% em relação ao grupo controle. Entretanto, esse dado isolado foi interpretado como uma flutuação pontual sem relevância clínica. Uma vez que este valor está dentro dos limites de variação para espécie segundo Harkness e Wagner (1993).

Com relação ao consumo de ração, água e avaliação ponderal foi observado que estes parâmetros de consumo de água e ração de SCL não apresentaram diferença em relação ao controle NaCl 0,9%. O índice e característica macroscópica dos diferentes órgãos foram avaliados, pois podem indicar alterações induzidas por substâncias tóxicas. Os resultados não mostraram diferenças significativas quando comparado com o controle (Tabela 6, p. 64) (VAGHASIYA, SHUKLA e CHANDA, 2010).

Tabela 5 - Efeito da administração oral do sumo de *Citrus x limon* (SCL) e ranitidina durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.

Parâmetros hematológicos	Tratamentos			
	Falso operado	NaCl 0,9%	ranitidina (60 g/kg)	SCL (10 mL/kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,77 $\pm$ 0,42	6,83 $\pm$ 0,31	7,65 $\pm$ 0,12	7,49 $\pm$ 0,07
Hemoglobina (g/dL)	13,15 $\pm$ 0,70	12,96 $\pm$ 0,51	14 $\pm$ 0,23	13,58 $\pm$ 0,20
Hematócrito (%)	44,63 $\pm$ 1,49	40,20 $\pm$ 2,33	44,64 $\pm$ 0,92	40,92 $\pm$ 0,54
VCM (μm^3)	58,20 $\pm$ 0,92	56,17 $\pm$ 1,17	57,67 $\pm$ 0,88	54,60 $\pm$ 0,51
HCM (pg)	18,62 $\pm$ 0,23	19,06 $\pm$ 0,22	18,48 $\pm$ 0,29	18,12 $\pm$ 0,26
CHCM (g/dL)	32,06 $\pm$ 0,41	32,40 $\pm$ 0,54	32,52 $\pm$ 0,34	33,16 $\pm$ 0,29
RDW (%)	13,92 $\pm$ 0,22	14,30 $\pm$ 0,23	13,97 $\pm$ 0,39	13,48 $\pm$ 0,40
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	15,20 $\pm$ 0,83	12,10 $\pm$ 0,54	13,22 $\pm$ 1,31	17,35 $\pm$ 0,10
Granulócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	2,49 $\pm$ 0,27	2,60 $\pm$ 0,44	2,60 $\pm$ 0,26	3,55 $\pm$ 0,28
Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	10,96 $\pm$ 0,54	8,96 $\pm$ 0,46	9,30 $\pm$ 0,89	11,48 $\pm$ 0,15
Monócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	1,06 $\pm$ 0,11	1,10 $\pm$ 0,13	1,16 $\pm$ 0,17	1,75 $\pm$ 0,16*
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	564 $\pm$ 22,80	690,8 $\pm$ 49,60	699,2 $\pm$ 22,88	614,0 $\pm$ 28,21

Os valores foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de 6 animais/grupo. Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, *p< 0,05 comparados ao grupo controle.

Tabela 6 - Efeito da administração oral do sumo de *Citrus x limon* (SCL) e NaCl 0,9% (controle negativo) no consumo de ração e água, evolução ponderal e peso dos órgãos, durante 14 dias.

Parâmetros	Tratamentos			
	Falso operado	NaCl 0,9%	ranitidina (60 g/kg)	SCL (10 mL/kg)
Consumo de ração (g)	184,5 ± 3,28***	114,8 ± 1,94	135,9 ± 2,17**	100,8 ± 7,97
Consumo de água (mL)	388,7 ± 14,05***	209,3 ± 12,63	265,3 ± 7,33*	187,5 ± 19,32
Ganho ponderal (g)	55,50 ± 4,22**	35,00 ± 4,70	12,67 ± 2,69**	41,40 ± 6,67
Índice de órgãos (g/g)				
Fígado	35,73 ± 1,37	37,88 ± 1,42	33,00 ± 1,34	37,77 ± 1,19
Rins	8,26 ± 0,10	8,74 ± 0,20	8,18 ± 0,20	8,76 ± 0,25
Baço	3,00 ± 0,05	3,01 ± 0,06	3,04 ± 0,13	2,70 ± 0,01

Os resultados estão expressos em média ± E.P.M. de 6 animais/grupo. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, *p<0,05;

p<0,01; *p < 0,001, comparado com o grupo controle negativo (NaCl 0,9%).

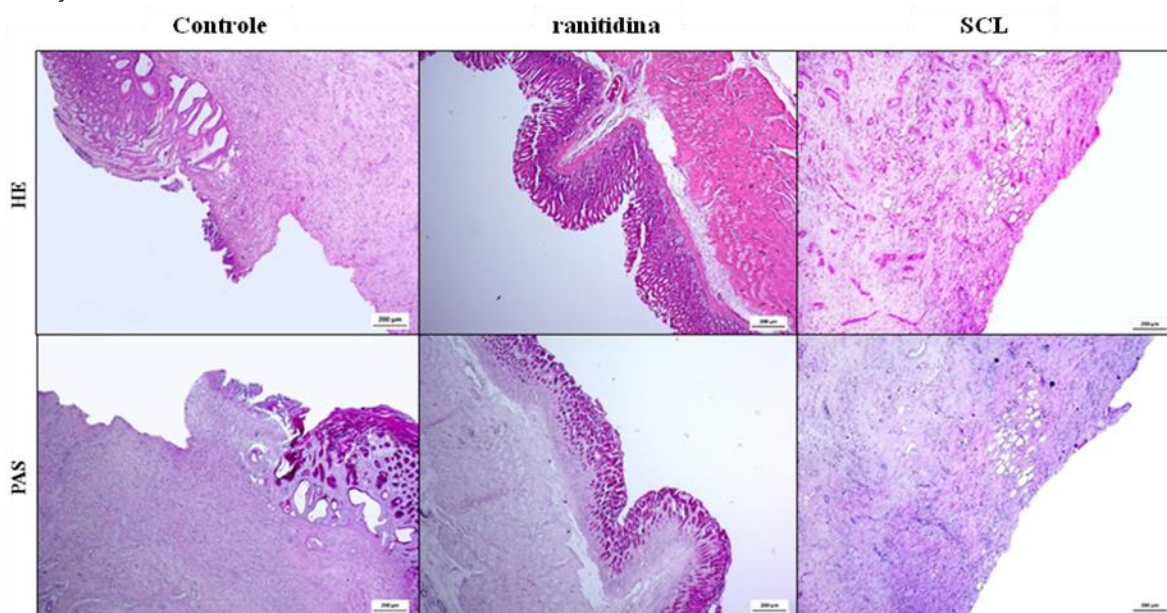
5.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Nesta análise foi possível revelar pela coloração HE que o grupo controle negativo apresentava úlceras bem definidas, com predomínio de células inflamatórias, como polimorfonucleares e linfócitos. Diferentemente do controle positivo da ranitidina (60 mg/kg) que demonstrou a regeneração da mucosa gástrica, evidenciada pelo reaparecimento da camada epitelial e estromal e pela ausência de inflamação, o grupo tratado com SCL (100%, 10 mL/kg) mesmo apresentando repitelização exibiu células inflamatórias e algumas lesões (Figura 27, p. 66).

Vários fatores estão envolvidos na cicatrização da úlcera. Em particular a contração da área ulcerada, repitelização sobre a base da úlcera e formação de tecido de granulação ao redor da área ulcerada representam os principais passos na cura. A contração da margem ferida é necessária para a cicatrização de feridas. Mesmo na cura das úlceras gástricas a migração para o interior do epitélio recém-formado na margem da úlcera é considerada como um evento crucial. A qualidade de reparo da úlcera depende da estabilidade do tecido danificado, o que afeta fortemente a taxa de recaída futura (OKABE & AMAGASE, 2005; MOHOD, KANDHARE, BODHANKAR, 2016).

Embora o tratamento por 14 dias com o sumo de *Citrus x limon* seja macroscopicamente positivo para o processo de cicatrização na úlcera gástrica induzida por ácido acético, quando observado em cortes histológicos pela coloração de HE e PAS, o tecido ainda apresenta lesão e processo inflamatório, mas em menor intensidade que o controle negativo.

Figura 27 - Fotomicrografias de mucosa gástrica coradas com HE e PAS dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético.



Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (grupo controle), ranitidina (60 mg/kg) ou SCL (100%) durante 14 dias. Coloração por Hematoxilina/eosina (HE) e Ácido Periódico Schiff (PAS), aumento, 40x.

5.4 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

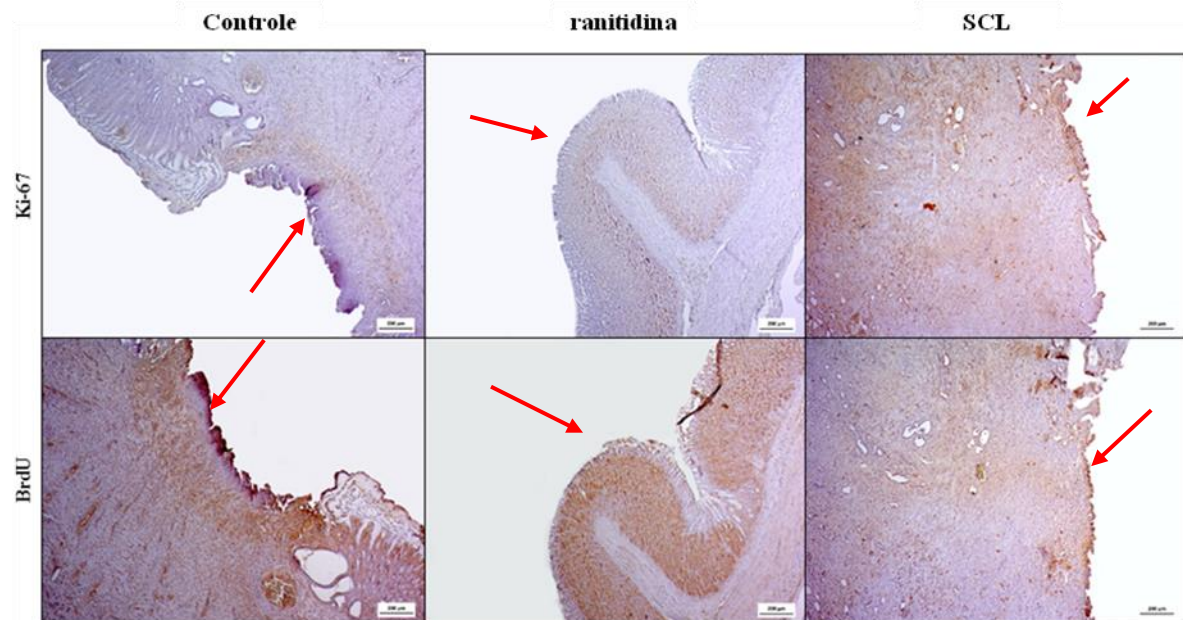
Nesta análise, utilizando anticorpos monoclonais contra Ki-67 e BrdU, o tratamento de 14 dias com SCL (100% 10 mL/kg) mostrou uma pequena diferença de reatividade na mucosa gástrica de animais para os dois marcadores (Ki-67 e BrdU) quando comparado com o grupo controle negativo (Figura 28, p. 67).

O marcador Ki-67 é um antígeno expresso ao longo do ciclo celular, principalmente em células proliferativas, estando presente nos núcleos celulares nas fases G1, GS, G2 da divisão celular, assim como na mitose (SCHOLZEN & GERDES, 2000). A BrdU (5-Bromo-2-desoxiuridina) é um marcador importante no estudo de células mitóticas, com retenção de longo prazo em células divididas e sua passagem para suas células-filhas (KEE et al., 2002).

Na imuno-histoquímica a intensidade desses marcadores foi ligeiramente maior no SCL do que no controle negativo, indicando que o sumo apresentou uma resposta precoce à proliferação celular. Um possível aumento na concentração de

sumo usada ou um período de tratamento mais longo poderia aumentar a resposta da proliferação celular.

Figura 28 - Análise imuno-histoquímica para Ki-67 e BrdU da mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético..



Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl à 0,9% (grupo controle), ranitidina (60 mg/kg) ou SCL (100%) durante 14 dias. As microfotografias mostram a imunorreatividade para Ki-67 e BrdU nos grupos, aumento de 200x

6 CONCLUSÕES

➤ O sumo de *Citrus x limon* apresentou efeito gastroprotetor, inicialmente relacionado ao mecanismo antissecretório, com redução da atividade secretória gástrica e à ativação dos canais de K^+_{ATP} . Em adição, demonstrou atividade cicatrizante no modelo crônico de úlceras gástricas induzidas por ácido acético. Essas atividades foram correlacionadas aos metabólitos secundários majoritários epicatequina, galocatequina, epigalocatequina e catequina.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology**, Paris, v.95, n.1-6, p.105-127, 2001.
- ABOELHADID, S. M.; MAHROUS, L. N.; HASHEM, S. A.; ABDEL-KAFY, E. M. et al. In vitro and in vivo effect of *Citrus limon* essential oil against sarcoptic mange in rabbits. **Parasitology Research**, p.1-8, abr. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-016-5056-8>>. Acesso em: 04 junho 2018.
- ADHIKARY, B.; YADAV, S. K.; BANDYOPADHYAY, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Role of the COX-independent pathways in the ulcer-healing action of epigallocatechin gallate. **Food & Function**, v.2, 338-347, 2011.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K.; OKABE, S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v.98, p.109-127, 2003.
- ALARCÓN, R.; PARDO-DESANTAYANA, M.; PRIESTLEY, C.; MORALES, R.; HEINRICH, M. Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). **Journal of Ethnopharmacology**, v.176, p.207-224, dez. 2015.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier. Protection against acid and pepsin. **American Journal Physiological cell physiology**, v. 288, p. 1-19, 2005.
- AL-HOWIRINY, T.; AL-SOHAIBANI, M, EL-TAHIR, K., RAFATULLAH, S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of “Parsley” *Petroselinum crispum*. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.31, n.5, p.699–711, 2003.
- AMORIM, J. L.; SIMAS, D. L. R.; PINHEIRO, M. M. G.; MORENO, D. S. A.; ALVIANO, C. S.; da SILVA, A. J. R., et al. Anti-Inflammatory properties and chemical characterization of the Essential oils of four *Citrus* species. **Plos One**, Rio de Janeiro, v.11, n.4, p.1-18, abr. 2016.
- ANDRADE, C. D. Poesia completa. Rio de Janeiro: **Nova Aguilar**, 2002.
- ARIAS, B. A.; RAMÓN-LACA, L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.89-95, fev. 2005.
- AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L. Challenges and Solutions to Incorporation of Nutraceuticals in Foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, p. 463-477, 2015.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p.93-98, 2003.

BALOGUN, O.; DAMAZO, A. S.; MARTINS, D. T. O. *Helicteres sacarolha* A. ST. – Hil. et al. Mechanism of actions in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 166, p. 176-184, 2015.

BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **The American Journal of Medicine**, v.123, n.4, p.358-366 e2, abr. 2010.

BARRETT, H.C.; RHODES, A. M.; A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, v.1, p.105–136, 1976.

BECH, P.L.; XAVIER, R.; LU, N.; NANDA, N.N.; DINAUER, M.; PODOLSKY, D.K.; Seed, B. Mechanism of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. **Gastroenterology**, v.119, p.699–705, set. 2000.

BEHRMAN, S.W. Management of complicated peptic ulcer disease. **Archives of Surgery**, v.140, n.2, p.201–208, fev. 2005.

BERTÉ, P.E.; DA SILVA, L.J.; COMANDULLI, N.G.; RANGEL, D.W.; MONACHE F.D. et al. Evaluation of the gastroprotective activity of the extracts, fractions, and pure compounds obtained from aerial parts of *Rubus imperialis* in different experimental models. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.387, p.313–319, 2014.

BHAVITAVYA, B.; ASDAQ, S. M. B.; ASAD, M.; PRASAD, S. Antiulcer Activity of Lemon (*Citrus limon*) fruit juice and its interaction with conventionally used antiulcer drugs in rats. **The Natural Products Journal**, v.2, p.61-68, 2012.

BHAVSAR, S. K.; JOSH, P.; SHAH, M. B.; SANTANI, D. D. Investigation into hepatoprotective activity of *Citrus limon*. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n.4, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem**. Brasília, 1999d.

BRASSEUR & ANGENOT. Un Reactif De Choix Pour La Revelation Des Flavonoïdes: Le Melange Diphenylborate D'aminoethanol -Peg 400. **Journal of Chromatography**, v. 351, p.351-355, 1986.

BREKSA, A. P.; KING, D. E.; VILCHES, A. M. Determination of Citrus Limonoid Glucosides by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Post-Column Reaction with Ehrlich's Reagent. **Beverages**, v. 1, p. 70-81, 2015.

BRITO, S. A.; DE ALMEIDA, C. L. F.; DE SANTANA, T. I.; OLIVEIRA, A. R. S.; FIGUEIREDO, J. C. B. N. Antiulcer activity and potential mechanism of action of the leaves of *Spondias mombin* L. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-20, 2018.

BRUNTON, L. L. In Goodman **The Pharmacological Basis of Therapeutics**; Hardman, J. G., Limberd, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Goodman, A. G., Eds., 10th ed.; McGraw-Hill: New York, p.1006–1019, 2001.

BURKITT, M. D.; DUCKWORTH, C. A.; WILLIAMS, J. M.; PRITCHARD, D. M. *Helicobacter pylori* – induced gastric pathology: insights from *In vivo* and *Ex vivo* models. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 2, p. 89-104, 2017.

CAETANO, N. L. B.; FERREIRA, T. F.; REIS, M. R. O.; NEO, G. G. A.; CARVALHO, A. A. Plantas medicinais utilizadas pela população do município de Lagarto – SE, Brasil – ênfase em pacientes oncológicos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.17, n.4, p.748-756, 2015.

CALDAS, G. F.; OLIVEIRA, A. R.; ARAÚJO, A. V.; QUIXABEIRA, D. C.; SILVA-NETO JDA, C.; COSTA-SILVA, J.H.; DE MENEZES, I. R.; FERREIRA, F.; LEITE, A. C.; DA COSTA, J. G.; WANDERLEY, A. G. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Plos One**, v. 9, p. 1-10, 2014.

CAMPÊLO, L. M. L.; ALMEIDA, A. A. C.; FREITAS, R. L. M.; CERQUEIRA, G. S. et al. Antioxidant and Antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2011, p.1-8, mar. 2011.

COSTA, J. F. O. A.; JUIZ, P.; SÃO PEDRO, A.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba. v. 20, n. 4, p.502-505, set. 2010.

CRONQUIST, A. **An Integrated Sistem of Classification of Flowering Plants**: 53-55. Columbia University Press, New York. 1981.

DA SILVA, A. A.; GONÇALVES, R.C. Reactive Oxygen species and the respiratory tract diseases of larges animals. **Ciência Rural**, v. 40, p. 994-1002, 2010.

DE ALMEIDA, C. L. F.; BRITO, S. A.; DE SANTANA, T. I.; COSTA, H. B. A.; JÚNIOR, C. H. R. C.; DA SILVA, M. V. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): antioxidante and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative Mecdine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-14, 2017.

DEBASHIS, B.; KAUSHIK, B.; MRINNALINI, B.; RUSSEL, J.; REITER, R. K. B. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration., protection by melatonin. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.40, p. 693-705, 2002.

DEL RÍO, J.A.; FUSTER, M. D.; GÓMEZ, P.; PORRAS, I., et al. *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chemistry**, Murcia, v.84, p.457-461, maio 2004.

DI MARIO, F.; GONI, E. Gastric acid secretion: changes during a century. **Best practice & research clinical gastroenterology**, v. 28, p. 953-965, 2014.

DJAHANGUIRI, B.; SCAND. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **J. Gastroenterology**, v.4, p.265-257, 1969.

ESAKKIMUTHU, S.; MUTHEESWARAN, S.; ARVINTH, S.; PAULRAJ, M. G. Quantitative ethnomedicinal survey of medicinal plants given for cardiometabolic diseases by the non-institutionally trained *siddha* practitioners of Tiruvallur district, Tamil Nadu, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.186, p.329-342, jun. 2016.

FALCÃO, H. S.; MARIATH, I. R.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M. et al. Plants of the American continent with antiulcer activity. **Phytomedicine**, v.15, p.132–146, 2008.

FARRELL, B.; POTTIE, K.; THOMPSON, W.; BOGHOSSIAN, T.; PIZZOLA, L.; RASHID, F. J.; ROJAS-FERNANDEZ, C.; WELCH, V.; MOAYYEDI, P. Deprescribing proton pump inhibitors: evidence-based clinical practice guideline. **Canadian Family Physician**, v. 63, p. 354-364, 2017.

FREEDBERG, D. E.; LEBWOHL, B.; ABRAMS, J. A. The impact of proton pump inhibitors on the human gastrointestinal microbiome. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 34, p. 771-785, 2014.

FUKUCHI, Y.; HIRAMITSU, M.; OKADA, M.; HAYASH, S. et al. Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by up-regulation of mRNA levels of the enzymes involved in β -oxidation in mouse white adipose tissue. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.43, n.3, p.201-209, nov. 2008.

GACHET, M. S.; LECARO, J. S.; KAISER, M.; BRUN, R.; NAVARRETE, H. et al. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, n.1, p.184-194, mar. 2010.

GADEKAR, R.; SINGOUR, P. K.; CHAURASIYA, P. K.; PAWAR, R. S.; PATIL, U. K. A potential of some medicinal plants as an antiulcer agents. **Pharmacognosy Review**, v.4, n8, p.136-146, jul. 2010.

GANGER, S. Trade in medicinal plants from Spanish America. **Medical Story**, v. 59, n. 1, p. 44-62, jan. 2015.

GARCIA, M. L.; HANNER, H.G.; KOCH, R.; SCHMALHOFER, W.; SLAUGHTER, R. S.; KACZOROWSKI, G. J. Pharmacology of potassium channels. **Advances in Pharmacology**, v. 39, p. 425–471, 1997.

GIRONÉS-VILAPLANA, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FORRERES, F. et al. Beverages of lemon juice and exotic noni and papaya with potential for anticholinergic effects. **Food Chemistry**, v.170, p.16-21, mar. 2015.

- GONZÁLEZ-MOLINA, E.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, n. 2, p. 327-345, 2010.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. **Free radical in biology an medicine**, p.189-276, 1999
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall, 1998.
- HARKNESS, S. E.; WAGNER, J. E., **Biologia e clínica de coelhos roedores**. São Paulo, Brasil, pp. 48–55, 1993.
- HASLER, C. M. Functional food: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v. 52, p. 63-70, 1998;
- HAWKEY, C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology**, Nottingham, v.119, n.2, p.521-535, ago. 2000.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; CALVO, T. R.; RODRIGUES, C. M.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 215-224, 2006.
- IGNATOWICZ, E.; WOZNIAK, A.; KULZA, M.; SENCZUKPRYZBYLOWSKA, M. et al. Exposure to alcohol and tobacco smoke causes oxidative stress in rats. **Pharmacological Reports**, v.65, p.906-913, 2013.
- JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S. M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J. R.; BHOSALE, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p. 1181–1205, 2007.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p. 519-528, fev. 2005.
- KANG, H. C.; MENIAS, C. O.; GABALLAH, A. H.; SHROFF, S.; TAGGART, M. W.; GARG, N.; ELSAYES, K. M. Beyond the GIST: Mesenchymal Tumors of the Stomach. **Radiographics**, v. 33, n. 6, p. 1679-1690, 2013.
- KEE, N.; SIVALINGAM, S.; BOONSTRA, R.; WOJTOWICZ, J. M. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 115, p. 97-105, 2002.
- KFFURI, C. W.; LOPES, M. A.; MING, L. C.; ODONNE, G.; KINUPP, V. F. Antimalarial plants used by indigenous people of the Upper Rio Negro in Amazonas, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.178, p.188-198, fev. 2016.
- KHAZRAI, Y. M.; DEFEUDIS, G.; POZZILLI, P. Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: a review. **Diabetes metabolism research and reviews**, v. 30, p- 24-33, 2013.

KLEIN, L. C. Jr.; GANDOLFI, R.B.; SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; CECHINEL-FILHO, V.; ANDRADE, S.F. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Poligalaceae). **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v.381, n.2 p.121–126, fev. 2010.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. the paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v.125, n.1, p. 58-60, jan. 2001.

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

LAM, J. R.; SCHNEIDER, J. L.; ZHAO, W.; CORLEY, D. A. Proton pump inhibitor and histamine 2 receptor antagonist use and vitamin B12 deficiency. **Journal of the American Medical Association**, v. 310, p. 2435-2442, 2013.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals, 1068 **Aquatic Toxicology**, 101, 13–30, 2011.

LV, X.; ZHAO, S.; NING, Z.; ZENG, H., et al. *Citrus* fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. **Chemistry Central Journal**, Pequim, v.9, n.68, p.1-14, dez. 2015.

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

MAHACHAI, V.; VILAICHONE, R. K.; PITTAYANON, R. ROJBORWONWITAYA, J. LEELAKUSLOVONG, S.; MANEERATTANAPORN, M. et al. *Helicobacter pylori* management in ASEAN: the Bangkok consensus report. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 33, p.37-56, 2018.

MALFERTHEINER, P. The intriguing relationship of *Helicobacter pylori* infection and acid secretion in peptic ulcer disease and gastric cancer. **Digestive Diseases**, v.29, p.459-64, 2011.

MATON, P.N.; BURTON, M.E. Antacids revisited: a review of their clinical pharmacology and recommended therapeutic use. **Drugs**, v.57, p.855–870, 1999.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls and prostaglandins in gastroprotection by mormodin, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. **Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 27-32, 1999.

MEDEIROS, J. V. R.; GADELHA, G. G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. A.; SOARES, P. M. G.; SANTOS, A. A.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Role of the NO/CGMP/K_{ATP} pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **British Journal of Pharmacology**, v, 153, n. 4, p. 721-727, 2008.

METZ, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations, **Naturwissenschaften**, v. 48, p. 596, 1961.

METZ, D. C.; FERRON, G. M.; PAUL, J.; TURNER, M. B.; SOFFER, E. et al. Proton pump activation in stimulated parietal cells is regulated by gastric acid secretory capacity: a human study. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.45, n.5, p.512-519, mar. 2013.

MERCHANT, J.L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines ingastrointestinal homeostasis and disease. **Journal Clinical Investigation**, v. 117, p. 6-12, 2007.

MIZUI T.; SATO H.; HIROSE F.; DOTEUCHI M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sci**, v.41, n.6, p.755–763, ago. 1987.

MOHOD, S. M.; KANDHARE, A. D.; BODHANKAR, S. L. Gastroprotective potential of pentahydroxy flavone isolated from *Madhuca indica* J. F GMEL. Leaves against acetic acid-induced ulcer in rats: the role of oxido-inflammatory and prostaglandins markers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 182, p. 150-159, 2016.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 495-505, 1991.

MURAKAMI, S.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S.; Gastric H⁺, K⁺-ATPase inhibition by catechins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 926-928, 1992.

NAUNTON, M.; PETERSON, G. M.; DEEKS, L. S.; YOUNG, H.; KOSARI, S. We have had a gutful: the need for deprescribing proton pump inhibitors. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 43, p. 65-72, 2018.

OKABE, S.; PFEIFFER, C.J. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. **AM. J. DIG.**, v.17, p.619-629, 1972.

OKABE, S.; AGAMASE, K. An overview of acetic acid ulcer models: the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n. 8, p. 1321- 1341, 2005.

OLIVEIRA, F. A.; ANDRADE, L. N.; SOUSA, E. B. V., SOUSA, D. P. Anti-ulcer activity of Essential Oil Constituents. **Molecules**, v.19, p.5717-5747, maio 2014.

O'NEIL, D. H. R; L. Gastric disorders:modifications of gastric content, antacids and drugs influencing gastric secretions and motility. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. v.13, n.2, 2011.

ONOUZUKA, H; NAKAJIMA, A.; MATSUZAKI, K; SHIN, R.W.; OGINO K.; SAIGUSA, D.; et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and Abeta

pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of Pharmacology**, Sendai, v.326, n.3, p.739-744, set. 2008.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Research**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PANDA, V.; SONKAMBLE, M. Antiulcer activity of Ipomoea batata (sweet potato). **J Funct Foods Health**, v.2, p.48-61, 2012.

PARK, Soojin et al. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanolinduced gastric mucosal damage in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 49, n. 3, p. 384-394, 2004.

PARVAN, M.; SAJJADI, S-E.; MINAIYAN, M. Protective effect of two extracts of *Cydonia oblonga miller* (quince) fruits on gastric ulcer induced by indomethacin in rats, **International Journal of Preventive Medicine**, v. 8, 2017

PASSALACQUA, N. G.; GUARRERA, P. M.; DE FINE, G. Contribution to the knowledge of folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). **Fitoterapia**, v.78, p.52-68, jan. 2007.

PEREZ-PEREZ, J.G.; CASTILLO, I. P.; GARCIA-LINDON, A.; BOTIA, P.; GARCIA-SANCHEZ, F. Fino lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and lisbon on two rootstocks in Murcia (Spain). **Scientia Horticulturae**, Murcia, v.106, n.4, p.530-538, nov. 2005.

PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B. A. Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in Prostaglandin-Mediated Gastroprotection in the Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 301, n. 9, p. 969, 974, 2002.

PHAN, J.; BENHAMMOU, J. N.; PISEGNA, J. R. Gastric hypersecretory states: investigation and management. **Current Treatment Options in Gastroenterology**, v.13, n.4, p.386-397, Set. 2015.

PINTO, E. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.20, n.4, p.751-762, abr. 2006.

POLO, C. M.; MORAES, T. M.; PELLIZZON, C. H.; MARQUES, M. O.; ROCHA, L. R.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gastric ulcers in middle-aged rats: the healing effect of essential oil from *Citrus aurantium* L. (Rutaceae), **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

POSSO, M. B. S.; DE SANT'ANNA, A. L. G. G.; GIARETTA, V. M. A.; CHAGAS, L. R. Terapêuticas não convencionais para o alívio da cefaleia. **Revista Dor**, São José dos Campos, v. 11, n.2, p. 122-129.

RAIMONDO, S.; NASELLI, F.; FONTANA, S.; MONTELEONE, F. et al. *Citrus limon*-derived nanovesicles inhibit câncer cell proliferation and suppress CML xenograft

growth by inducing TRAIL-mediated cell death. **Oncotarget**, v.6, n.23, p.19514-19527, maio 2015.

RAFATULLAH, S., TARIQ, M., AL-YAHYA, M. A, MOSSA, J. S E AGEEL, A.M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 25-34, 1990.

RASTOGI, L.; PATNAIK, G. K.; DIKHIT, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacological Research**, v. 38, n. 2, p.125-132, 1998.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603–613, maio 2001.

RAO, P. & KNAUS E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences**, v. 11, p. 81-110, 2008.

REEVE, E.; ANDREWS, J. M.; WIESE, M. D.; HENDRIX, I.; ROBERTS, M. S.; SHAKIB, S. Feasibility of a patient-centered deprescribing process to reduce inappropriate use of proton pump inhibitors. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 49, p. 29-38, 2015.

RIBEIRO, A. R. S.; DINIZ, P. B. F.; PINHEIRO, M. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP- sensitive K⁺ channels, and gastric mucus secretion. **Chemico-biological Interactions**, v. 244, p. 121-128, 2015.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.2 p.105-110, set. 2002.

ROBERTS, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p.72-80, 1957.

ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M.O.M. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E₂. **Chemico-Biological Interactions**, v.189, p.82-89, out. 2011.

ROZZA, A. L.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TAKAHIRA, R. K.; PADOVANI, C. R.; PELLIZZON, C. H. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: pathways of gastroprotection. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 2, p. 272-278, nov. 2013.

SAIRAM, K.; RAO, C. V.; DORA BABU, M.; VIJAY KUMAR, K.; AGRAWAL, V. K.; GOEL, R. K. Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Emblica officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p.1-9, 2002.

SATHIYABAMA, R. G.; RAJIV GANDHI, G.; DENADAI, M.; SRIDHARAN, G., JOTHI, G.; SASIKUMAR, P.; SIQUEIRA QUINTANS, J. S. Evidence of insulin-dependent signaling mechanisms produced by citrus sinensis (L.) Osbeck fruit peel in an insulin resistant diabetic animal model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 116, p. 86-99, 2018.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 Protein: From the known and the Unknown, **Journal of Cellular Physiology**, v.182, p. 311-322, 2000.

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

SCHUBERT, M. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.26, n.6, p. 598-603, 2010.

SELMİ, S.; RTİBİ, K.; GRAMI, D.; SEBAİ, H.; MARZOUKİ, L. Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, p. 1-12, 2017.

SHAHROKHI, N.; KESHAVARZI, Z.; KHAKSARI, M. Ulcer healing activity of Mumijo aqueous extract against acetic acid induced gastric ulcer in rats. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.7, p.56–59, 2015.

SHAY, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat, **Gastroenterology**, v. 5, p. 43–61, 1945.

SILAMBARASAN, R.; AYYANAR, M. An ethnobotanical study of medicinal plants in Palamalai region of Eastern Ghats, India. **Journal of Ethnopharmacology**, Thanjavur, v. 172, p. 162-178, Jun. 2015.

SIQUEIRA, B. P. J.; MENEZES, C. T.; SILVA, J. P.; SOUSA, D. P. S.; BATISTA, J. S. Antiulcer effect of epoxy-carvone. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.22, n.1, p.144-149, Jan. 2012.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite**, v.51, n.3, p.456-467, nov. 2008.

SOLCIA, E.; RINDI, G.; BUFFA, R.; FIOCCA, R.; CAPELLA, C. Gastric endocrine cells: types, function and growth. **Regulatory Peptides**, v.93, p.31-35, 2000.

SONG, D. K.; JANG, Y.; KIM, J. H.; CHUN, K. J.; LEE, D.; XU, Z. Polyphenol (-)-Epigallocatechin Gallate during Ischemia Limits Infarct Size Via Mitochondrial KATP Channel Activation in Isolated Rat Hearts. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, p. 380-386, 2010.

SOUSA, G. A.; OLIVEIRA, I. S.; SILVA-FREITAS, F. V.; VIANA, A. F. S. C.; NETO, B. P. S.; CUNHA, F. V. M.; GONÇALVES, R. L. G. Gastroprotective effect of ethanol extracts of cladodes and roots of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.)

Bly. Ec Rowl (Cactaceae) on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2018, p. 100-108.

SULUVOY, J. K.; SAKTHIVEL, K. M.; GURUVAYOORAPPAN, C.; BERLIN GRACE, V. M. Protective effect of averrhoa bilimbi L. fruit extract on ulcerative colitis in wistar rats via regulation of inflammatory mediators and cytokines. **Biomed Pharmacother**, v.91, p. 1113-1121, 2017.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effects of several drugs on its healing. **Japan Journal Pharmacology**, v.19, p.418-426, 1969.

TAKEUCHI, K.; OKABE, S.; TAKAGI, K. A new model of stress ulcer in the rat with pylorus ligation and its pathogenesis. **American Journal of Digestive Diseases**, v.21, p.782-788, 1976.

TANAKA, K.; TOMISATO, W.; HOSHINO, T.; ISHIHARA, T.; NAMBA, T.; ABURAYA, M.; KATSU, T.; SUZUKI, K.; TSUTSUMI, S.; MIZUSHIMA, T. Involvement of intracellular Ca^{2+} levels in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p.31059-31067, set. 2005.

TOMISATO, W.; TSUTSUMI, S.; ROKUTAN, K.; TSUCHIYA, T.; MIZUSHIMA, T. NSAIDs induce both necrosis and apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 4, p. 1092-1100, Out. 2001.

TRIPOLI, E.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v.104, p.466-479, nov. 2007.

UÇAN, F.; AGÇAM, E.; AKYILDIZ, A. Bioactive compounds and quality parameters of natural cloudy lemon juices. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 1465-1474, mar. 2016.

VAGHASIYA, Y. K.; SHUKLA, V. J.; CHANDA, S. V. Acute oral toxicity study of Pluchea arguta boiss extract in mice. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 6, p. 113-23, 2010.

VIANA, M. D. M.; CARDOSO, R. M.; SILVA, N. K. G. T.; FALCÃO, M. A. P. et al. Anxiolytic-like effect of *Citrus limon* (L) Burm f. essential oil inhalation on mice. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.18, n.1, jan. 2016.

VISWANATHA, G. L.; SHILAJA, H.; MOOLEMATH, Y. The beneficial role of narigin-A citrus bioflavonoid, against oxidative stress-induced neurobehavioral disorders and cognitive dysfunction in rodents: a sustematic review and meta-analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 909-929, 2017.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus*

reticulate L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, v.19, p.1130-1138, jan. 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis** - A thin layer chromatography atlas. Springer. 2.ed. Munich. 1996.

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

YEO, D.; HWANG, S. J.; KIM, W. J.; YOUN, H. J.; LEE, H. J. The aqueous extract from artemisia capillaris inhibits acute gastric mucosal injury by inhibition of ROS and NF-KB. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 681-687, 2018

ZAGHLOOL, S. S.; SHEHATA, B. A.; ABO-SEIF, A. A.; ABD EL-LATIF, H. A. Potective effects of ginger and marshmallow extracts on indomethacin-induced peptic ulcer in rats. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v.6, p. 421–428, 2015.

ZAPATA-COLINDRES, J.C.; ZEPEDA-GÓMEZ, S.; MONTAÑO-LOZA, A.; VÁZQUEZ-BALLESTEROS, E.; DE JESÚS VILLALOBOS, J.; VALDOVINOS-ANDRACA, F. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. **Canadian Journal Of Gastroenterology**, v. 20, n.4, p.277-280, abr. 2006.

ANEXO

ANEXO - Parecer aprovado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 14 de outubro de 2016.

Ofício nº 107/16

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

Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.021236/2016-77

Certificamos que a proposta intitulada “**Caracterização fitoquímica e avaliação da toxicidade aguda, dos potenciais antioxidante e antiulcerogênico do sumo de *Citrus x limon* (L.) Osbeck (Rutaceae)**”, registrada com o nº 23076.021236/2016-77, sob a responsabilidade de Prof. Dr. **Almir Gonçalves Wanderley** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/09/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 09/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar e camundongos Swiss
Nº de animais	258 ratos e 18 camundongos
Peso/Idade	Ratos: 200-230g/90 dias Camundongos: 30g/60 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CB/UFPE (ratos) Biotério do Departamento de Antibióticos (camundongos)

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584