



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO GASTROPROTETOR E CICATRIZANTE DO
EXTRATO PADRONIZADO DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck
(MOROSIL®)**

Allane Patrícia Santos da Paz

BELÉM – PA
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO GASTROPROTETOR E CICATRIZANTE DO
EXTRATO PADRONIZADO DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck
(MOROSIL®)**

Autora: Allane Patrícia Santos da Paz

Orientadora: Prof.^a Dra.^a Vanessa Jóia de Mello

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**BELÉM – PA
2024**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Allane Patrícia Santos da Paz

EFEITO GASTROPROTETOR E CICATRIZANTE DO EXTRATO PADRONIZADO DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (MOROSIL®)

Texto apresentado como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Pará.

Aprovado em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Vanessa Jóia de Mello
(UFPA – Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Marta Chagas Monteiro
(UFPA – Interno)

Prof.^a Dr.^a Lucimar Di Paula dos Santos Madeira
(UFPA – Externo)

Prof.^a Dr.^a Maria Vivina Barros Monteiro
(UFCE – Suplente)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

D111e da Paz, Allane Patricia Santos.
Efeito Gastroprotetor e Cicatrizante do Extrato
Padronizado de Citrus sinensis (L.) Osbeck (Morosil®) /
Allane Patricia Santos da Paz. — 2024.
101 f. : il. color.

Orientador(a): Profª. Dra. Vanessa Jóia de Mello
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2024.

1. Úlcera Gástrica. 2. Estômago. 3. Nutracêutico. 4.
Frutas cítricas. 5. Ensaio do arranhão. I. Título.

CDD 338.17388

Dedicatória

A minha mãe, que sonha os sonhos
dos filhos como se fossem dela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por me tonarem mestre, e a FAPESPA (Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas), pelo financiamento.

Agradeço aos parceiros Prof.^o Romulo Feio, Prof.^o Alejandro Prado, Prof.^o Júlio Pieczarka, Prof.^a Marta Chagas, Prof.^a Barbarella Macchi e Prof.^a Lucimar Di Paula.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais e, a nossa nova casa, o Laboratório de Pesquisa Ensino e Extensão em Análises Clínicas. Sou grata os meus professores de Concórdia, que quando eu estava terminando o ensino médio deram reforço ao meu sonho ao insistiram que eu “tinha futuro” e que deveria fazer uma faculdade.

Ao meu avô, o cearense mais teimoso que já existiu e, que sempre que eu ia para casa me perguntava se já sou doutora. Estamos quase lá, vô.

Aos amigos Eduardo e Yago, pelo apoio nos momentos difíceis e pelas ótimas conversas.

E a uma lista de mulheres muito especiais, que me apoiaram e me ajudaram a manter a sanidade:

Ellen, cuja ausência está sempre presente. E Camila, que além da grande amizade, compartilha comigo essa saudade. Amigas de longa data são testemunhas das nossas vidas.

A comunicadora social Ellayne Larissa Santos da Paz, pela ajuda com as ilustrações e imagens e, também por ser minha irmã. Família a gente não escolhe, mas se me fosse perguntado, eu escolheria você.

Vanessa Jóia, minha maior professora, que quando eu estava terminando a faculdade, me incentivou a fazer mestrado. Quando quase todos me diziam que eu não deveria nem ter saído de casa, ela me disse: “Concordia é pequena pra você”.

E principalmente, a Elenice, minha mãe, que comprou essa briga comigo e sempre me deu o seu apoio, contra tudo e contra todos.

Pessoas que vem de onde eu vim não costumam chegar até aqui, se eu cheguei é porque essas mulheres vieram comigo.

EPÍGRAFE

O Cordel e a lenda “Inácio da Catingueira e Romano” contam que Inácio era um negro escravizado conhecido por ser muito sabido, sua fama era tanta que foi desafiado por Romano, um repentista, para um duelo de inteligência. A disputa já durava dias, para todo verso de Romano, Inácio tinha uma rima melhor. Havia uma grande plateia e os humildes torciam por Inácio. Até que o desafiante, mesmo fugindo ao tema da disputa, decidiu apelar para conhecimentos acadêmicos e, enfim, derrotar o iletrado Inácio:

*Latona, Cibele, Réa,
Íris, Vulcano, Netuno,
Minerva, Diana, Juno,
Anfitrite, Androcéia, Vênus,
Climene, Amaltéia, Plutão,
Mercúrio, Teseu, Júpiter,
Zoilo, Perseu, Apolo,
Ceres, Pandora, desata, agora,
O nó que Romano deu.*

*Seu Romano, desse jeito
Eu não posso acompanhá-lo
Se desse um nó em martelo
Viria eu desatá-lo
Mas como foi em ciência
Cante só que eu me calo.*

Não mais, Inácio. Não mais.

RESUMO

DA PAZ, A. P. S. **Efeito Gastroprotetor e Cicatrizante do Extrato Padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Morosil®)**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2024.

As úlceras gástricas são de origem multifatorial e representam um problema de saúde pública devido a sua alta morbidade, mortalidade e perdas econômicas geradas. Seu tratamento clínico possui uma eficácia terapêutica satisfatória, porém os fármacos existentes induzem muitos efeitos adversos. Desta forma, se faz necessária a pesquisa de novos compostos que sejam eficazes, seguros e com menos efeitos indesejáveis. A laranja moro (*C. sinensis* (L.) Osbeck) possui um extrato seco padronizado (Morosil®), obtido a partir do seu suco, que é rico em compostos bioativos antioxidante e anti-inflamatórios. Portanto, a proposta deste trabalho consiste em avaliar o efeito da suplementação do extrato padronizado de *C. sinensis* (L.) Osbeck (ECS) na citoproteção e cicatrização de diversos modelos de úlcera gástrica induzidas em ratos Wistar, bem como seu o potencial de cicatrização *in vitro* e, analisar possíveis mecanismos de ação relacionados aos efeitos observados. No ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*, a concentração de 1 µg/ml ECS apresentou o melhor percentual de redução do arranhão. Já nos ensaios *in vivo*, a dose de 250 mg/kg foi a que obteve os melhores resultados, atuando positivamente sobre os marcadores de estresse oxidativo MDA, nitrito, GSH e na atividade da CAT. A atuação do ECS sobre a ulceração gástrica parece estar fortemente ligada a regulação das defesas antioxidantes. O extrato não influenciou a acidez gástrica, indicando que a ação citoprotetora encontrada pode estar relacionada à manutenção da barreira mucoprotetora. Portanto, O ESC atuou sobre a migração celular, influenciado na repavimentação do tecido, além de demonstrar potencial terapêutico nos variados modelos de lesão aplicados, apontando para um possível papel citoprotetor e cicatrizante dose-dependente.

Palavras-chave: Úlcera Gástrica; Estômago; Nutracêutico; Frutas cítricas; Ensaio do arranhão.

ABSTRACT

DA PAZ, A. P. S. **Gastroprotective and Healing Effect of Standardized Extract of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Morosil®)**. Dissertation (Master). Pos-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2024.

Gastric ulcers are multifactorial in origin and represent a public health problem due to their high morbidity, mortality, and economic losses. Their clinical treatment has satisfactory therapeutic efficacy, but existing drugs induce many adverse effects. Therefore, it is necessary to research new effective, safe compounds with fewer undesirable effects. Moro orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck) has a standardized dry extract (Morosil®), obtained from its juice, which is rich in antioxidant and anti-inflammatory bioactive compounds. Therefore, this study proposes to evaluate the effect of supplementation with the standardized extract of *C. sinensis* (L.) Osbeck (ECS) on the cytoprotection and healing of several models of gastric ulcer induced in Wistar rats, as well as its *in vitro* healing potential and to analyze possible mechanisms of action related to the observed effects. In the *in vitro* wound healing assay, 1 µg/ml ECS concentration showed the best percentage of scratch reduction. In the *in vivo* assays, the dose of 250 mg/kg was the one that obtained the best results, acting positively on the oxidative stress markers MDA, nitrite, GSH, and the activity of CAT. The action of ECS on gastric ulceration seems to be strongly linked to the regulation of antioxidant defenses. The extract did not influence gastric acidity, indicating that the cytoprotective action found may be related to maintaining the mucoprotective barrier. Therefore, ESC acted on cell migration and influenced tissue repaving, in addition to demonstrating therapeutic potential in the various injury models applied, pointing to a possible dose-dependent cytoprotective and healing role.

Keywords: Gastric Ulcer; Stomach; Nutraceutical; Citrus fruits; Scratch assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Divisões anatômicas do estômago.....	21
Figura 2 - Camadas histológicas do estômago	22
Figura 3 - Imagem representativa do processo de ulceração gástrica	23
Figura 4 - Classes de fármacos antiulcerogênicos.....	26
Figura 5 - Localização geográfica do Monte Etna, Itália.....	31
Figura 6 - <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	32
Figura 7 - Estrutura química da antocianina cianidina-3-glicosídeo	34
Figura 8 - Estruturas químicas da narirutina e hesperidina	35
Figura 9 - Estrutura química do ácido ascórbico	36
Figura 10 - Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos	36
Figura 11 - Figura representativa do ensaio de migração celular.....	38
Figura 12 - Etapas do protocolo de indução de úlcera gástrica com etanol	42
Figura 13 - Etapas do protocolo de indução de úlcera gástrica com indometacina...43	
Figura 14 - Etapas do protocolo de quantificação da acidez por ligadura de piloro ..44	
Figura 15 - Etapas do protocolo de indução de úlcera gástrica com ácido acético ...45	
Figura 16 - Imagens do arranhão por grupo em 0h e 48h de exposição	50
Figura 17 - Gráfico da taxa de migração de células Vero expostas ao ECS ao longo de 48 horas	51
Figura 18 - Gráfico do efeito citoprotetor do ECS sobre as lesões induzidas com etanol	52
Figura 19 - Efeito do tratamento com ECS sobre as alterações morfológicas na indução de lesão com etanol.....	53
Figura 20 - Gráfico do efeito citoprotetor do ECS sobre as lesões induzidas com indometacina.....	54
Figura 21 - Efeito do tratamento com ECS sobre as alterações morfológicas na indução de lesão com indometacina	55
Figura 22 - Gráfico do efeito cicatrizante do ECS sobre as lesões induzidas com ácido acético	57
Figura 23 - Efeito do tratamento com ECS sobre as alterações morfológicas na indução de lesão com ácido acético.....	58
Figura 24 – Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre os níveis de MDA.....	59
Figura 25 – Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre os níveis de Nitrito.....	60

Figura 26 - Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre a Glutathione Total	62
Figura 27 - Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre a atividade de CAT	63
Figura 28 – Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre a atividade de SOD	65

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Distribuição das concentrações por grupo: cicatrização <i>in vitro</i>	38
Quadro 2. Distribuição dos animais por grupo: etanol.....	41
Quadro 3. Distribuição dos animais por grupo: indometacina	42
Quadro 4. Distribuição dos animais por grupo: ligadura de piloro	43
Quadro 5. Distribuição dos animais por grupo: ácido acético	46
 Tabela 1. Efeito do tratamento ECS sobre a acidez gástrica	 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C3G	Cianidina 3-glicosídeo
CAT	Catalase
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
ECS	Extrato padronizado de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Fetal Bovine Serum
GPx	Glutational peroxidase
GR	Glutational redutase
GST	Glutational-S-transferase
GSH	Glutational Total
h	Hora
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H2Ras	Antagonistas de receptores histaminérgicos H2
IBPs	Inibidores da bomba de prótons
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
MDA	Malondialdeído

n	Número de animais
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate Buffered Saline
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta
UFPA	Universidade Federal do Pará

LISTA DE SIMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
[H ⁺]/ml/4h	Íons hidrogênio por mililitro durante 4 horas
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
cm	Centímetro
CO ₂	Gás carbônico (dióxido de carbono)
g	Grama
H ⁺	Íons hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
M	Molaridade
mg	Micrograma
mg/kg	Miligrama por quilograma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol/min/mg	Milimol por minuto por miligrama
mmol/ml/4h	Milimol por mililitro durante 4 horas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
N	Normal
NaHCO ₃	Bicabornato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanometro
nmol/ml	Nonomol por mililitro
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
°C	Graus Celsius
OH ⁻	Hidroxila

p<	Valor-p menor que
p>	Valor-p maior que
p≤	Valor-p menor ou igual
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol/mg	Picomol por miligrama
rpm	Rotações por minuto
U/ml	Unidade por mililitro
v/v	Volume de soluto pelo volume de solução
β	Beta
μmol/mg	Micromol por micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específico	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	Úlcera Gástrica	21
3.1.1	ESTÔMAGO: ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS	21
3.1.2	ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA	23
3.1.3	TRATAMENTO E EFEITOS ADVERSOS.....	25
3.2	Extrato Padronizado de Citrus sinensis (L.) Osbeck	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1	Linhagem celular	37
4.2	Ensaio de cicatrização in vitro	37
4.3	Animais	39
4.4	Avaliação das Lesões Gástricas	40
4.5	Protocolos de Citoproteção Gástrica	40
4.5.1	INDUÇÃO COM ETANOL.....	41
4.5.2	INDUÇÃO COM INDOMETACINA.....	42
4.5.3	ACIDEZ GÁSTRICA: LIGADURA DE PILORO.....	43
4.6	Protocolo de Cicatrização Gástrica	45
4.7	Estresse Oxidativo	46
4.7.1	TBARS.....	47
4.7.2	NITRITO.....	47
4.7.3	GLUTATIONA TOTAL.....	48
4.7.4	CATALASE	48
4.7.5	SUPERÓXIDO DISMUTASE	48
4.8	Análise Estatística.....	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Ensaio de Cicatrização de Feridas <i>in vitro</i>	50
5.2	Protocolos de Citoproteção Gástrica	51
5.2.1	ETANOL.....	51
5.2.2	INDOMETACINA	53

5.2.3	ACIDEZ GÁSTRICA: LIGADURA DE PILORO	55
5.3	Protocolo de Cicatrização Gástrica	56
5.3.1	ÁCIDO ACÉTICO.....	56
5.4	Estresse Oxidativo	58
5.4.1	TBARS.....	58
5.4.2	NITRITO.....	59
5.4.3	GLUTATIONA TOTAL.....	61
5.4.4	CATALASE	62
5.4.5	SUPERÓXIDO DISMUTASE	64
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
	ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica é uma lesão do trato digestivo resultante do desequilíbrio entre fatores que danificam a mucosa, tais como espécies reativas de oxigênio (EROs) e secreção ácido-pepsina; e os que a protegem, como: fluxo sanguíneo, regeneração celular, barreira epitelial e secreção de muco (HUNT *et al.*, 2015; SELMI *et al.*, 2017; BRANDÃO *et al.*, 2019). Tal desequilíbrio está associado a fatores como fumo, álcool, dieta, estresse, presença de *Helicobacter pylori* e uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (BRANDÃO *et al.*, 2019). As úlceras gástricas afetam cerca de 10% da população mundial (LAURET *et al.*, 2015) e representando um problema de saúde pública devido a sua alta morbidade, mortalidade e perdas econômicas geradas (ADINORTEY; ANSAH; GALYUON, 2013).

O tratamento clínico para úlceras gástricas possui uma eficácia terapêutica satisfatória, porém os fármacos existentes induzem muitos efeitos adversos, entre os quais: risco de osteoporose, diminuição da absorção de vitamina B12, diarreia, cefaléia, sonolência, fadiga, dor muscular e constipação (BI *et al.*, 2014; CENA *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020). Apesar de menos frequente, esses medicamentos também podem provocar confusão mental, tontura, ginecomastia, impotência, perda da libido, reações alérgicas, hipotensão e arritmias cardíacas (THOMSON *et al.*, 2010; ORIÁ *et al.*, 2016). Portanto, se faz necessária a pesquisa de novos produtos citoprotetores e cicatrizantes gástricos, que sejam eficazes, seguros e com menos efeitos indesejáveis.

Produtos naturais com propriedades antioxidantes possuem efeitos antiulcerogênicos (REPETTO; LLESUY, 2002). A laranja moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), também conhecida como laranja vermelha ou sanguínea, possui antocianinas, um pigmento antioxidante normalmente não encontrado em outras frutas cítricas e, que são os responsáveis pela coloração avermelhada dessa fruta (DE LIMA; BARBOSA, 2021). Além disso, as laranjas dessa variedade possuem maior concentração de vitamina C e de compostos fenólicos bioativos em comparação com laranjas amarelas (CARDILE *et al.*, 2015; KANEKO; SHIRAKAWA, 2018; DE LIMA; BARBOSA, 2021). Tais características provêm de substâncias que já demonstraram atividades biológicas promissoras para a saúde humana, incluindo a prevenção de

atividade anti-úlceras (BIGONIYA; SINGH, 2014; LV *et al.*, 2015; RUPASINGHE *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2020; DE LIMA; BARBOSA, 2021).

O consumo de preparações (chás, decoctos, etc.) ou do produto *in natura* está presente na medicina popular há milênios, com as mais diversas finalidades, porém tais usos estão sujeitos a variações de dose, modo de preparo e composição química da planta. Todavia, a laranja moro possui um extrato seco padronizado (Morosil®), obtido a partir do suco de *C. sinensis* (L.) Osbeck, comercializado no mercado nacional e internacional, geralmente apresentado em cápsulas contendo 500 mg, consumidas visando, principalmente, perda de peso corporal e prevenção da obesidade (KEGELE *et al.*, 2019).

Inicialmente os estudos demonstram o papel do extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck na prevenção de distúrbios metabólicos, obesidade, resistência à insulina, esteatose hepática e doenças cardiovasculares (RUPASINGHE *et al.*, 2016, DE LIMA; BARBOSA, 2021). Contudo, até então, nenhum estudo abordou os efeitos do Morosil® sobre lesões gástricas, o que tornasse especialmente relevante diante da presença de fitoquímicos que possuem atividades importantes dentro dos processos de proteção gástrica (antioxidantes, anti-inflamatórios, por exemplo). Considerando que a úlcera gástrica possui uma origem heterogênea e que se trata de um produto padronizado, registrado pela ANVISA e que já conta com a aceitabilidade do público, torna-se relevante investigar o efeito da suplementação do Morosil® em modelo de cicatrização de feridas *in vitro*, respeitando o princípio dos 3Rs (redução, substituição e refinamento no uso de animais), antes da aplicação em modelos de citoproteção e cicatrização de úlceras gástricas *in vivo*, avaliando assim o potencial desse nutracêutico na proteção gástrica, dada a sua aceitação comercial já existente, com possibilidade de futuramente estender sua recomendação para que seja considerado também um protetor gástrico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito gastroprotetor e cicatrizante da suplementação do extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (ECS) em modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específico

- Avaliar o potencial de repavimentação celular do ECS através de ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*;
- Avaliar *in vivo* o potencial citoprotetor do ECS nos modelos de lesão gástrica induzida com etanol e indometacina;
- Avaliar *in vivo* o efeito de ECS sobre a acidez gástrica (ligadura de piloro);
- Avaliar *in vivo* o potencial cicatrizante do ECS em modelo de úlcera gástrica induzida cirurgicamente por ácido acético;
- Avaliar o efeito do tratamento sob o estresse oxidativo partir das dosagens de MDA, SOD, CAT, nitrito e GSH no tecido gástrico submetido ao protocolo de ácido acético.

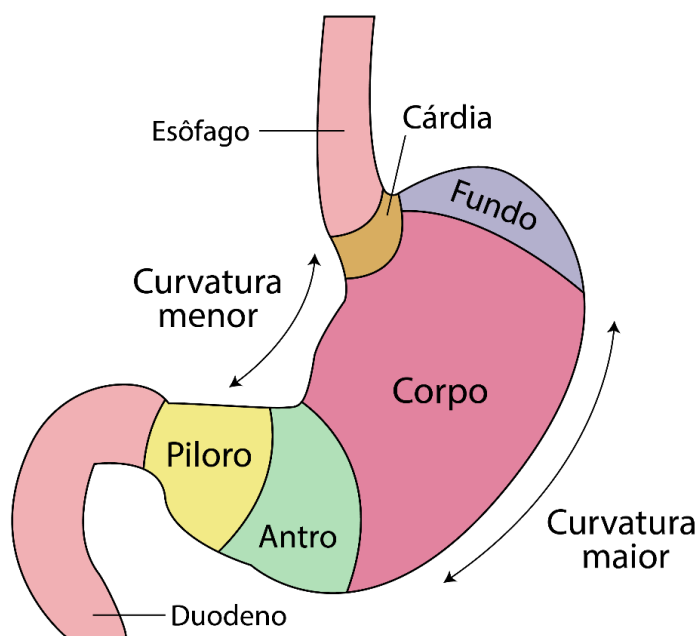
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Úlcera Gástrica

3.1.1 ESTÔMAGO: ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS

O estômago é a região mais dilatada do canal alimentar, em sua anatomia possui uma estrutura sacular, semelhante a uma bolsa, onde a parte convexa, chamada de curvatura maior, estende-se ao longo da linha média esquerda ligada ao esôfago, e a parte côncava, chamada curvatura menor, une-se ao duodeno a direita (WOŁCZUK *et al.*, 2015) (Figura 1).

Figura 1 - Divisões anatômicas do estômago



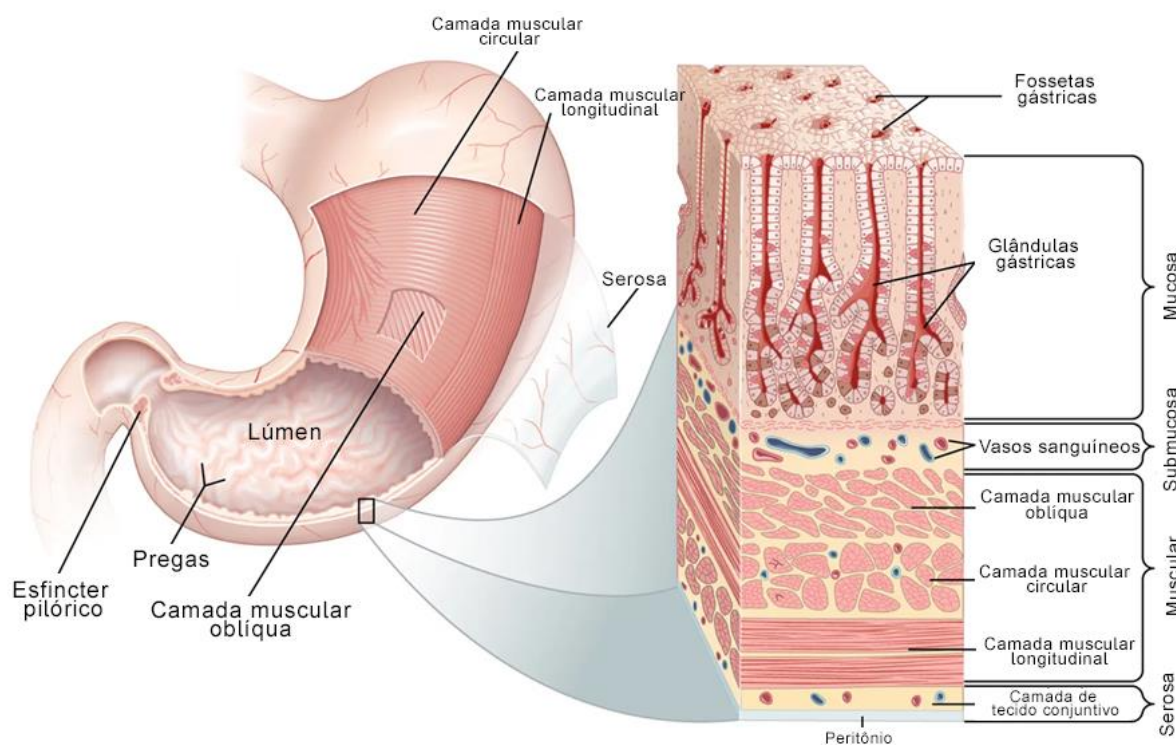
Fonte: elaborado pela autora.

Macroscopicamente, o estômago se divide em quatro regiões: cárdia, região estreita, situada na junção gastroesofágica; fundo, região em formato de cúpula à esquerda do esôfago, comumente cheia de gás; corpo, a maior região e responsável pela formação do quimo (produto parcial da digestão do bolo alimentar); e o antro ou piloro, que é uma porção estreita, afunilada, dotada do espesso esfíncter pilórico, que controla a liberação intermitente do quimo para o duodeno (Figura 1) (GARTNER; HIATT, 2000; WILSON; STEVENSON, 2019).

A parede gástrica divide-se em quatro camadas histológicas: a mucosa, a submucosa, a camada muscular e a serosa (ou adventícia) (Figura 2) (WILSON;

STEVENSON, 2019). Histologicamente, as características estruturais das regiões do fundo e do corpo são análogas, a superfície interna do estômago exhibe pregas (rugae), dobras longitudinais da mucosa e submucosa, que desaparecem quando o estômago está distendido (WILSON; STEVENSON, 2019).

Figura 2 - Camadas histológicas do estômago



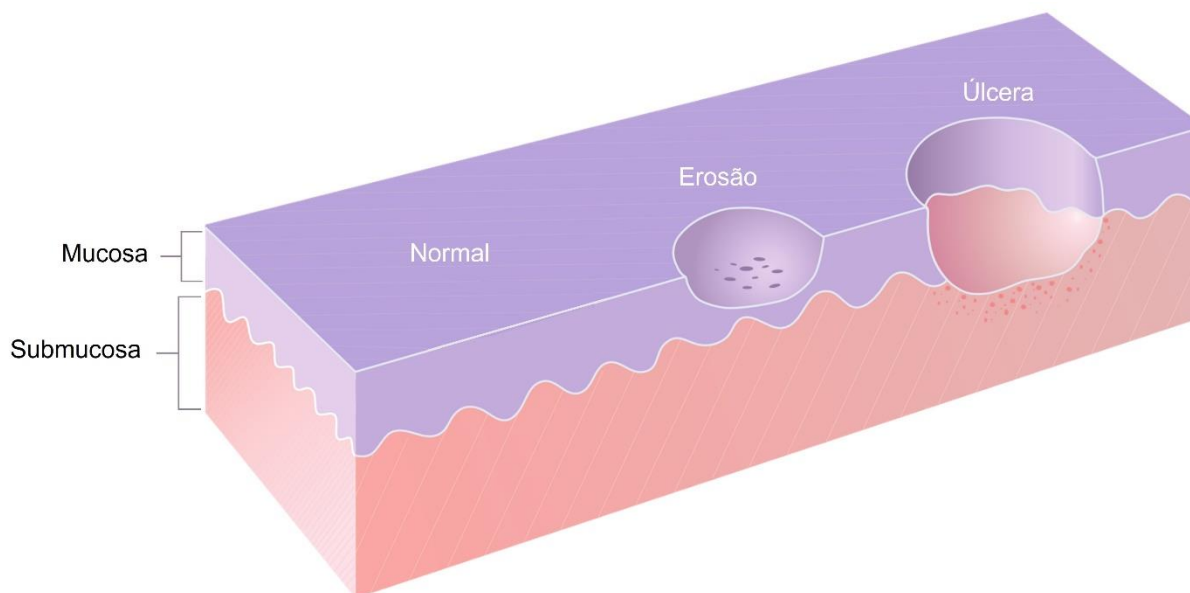
Fonte: adaptado de Encyclopaedia Britannica [s. d.].

A mucosa é constituída por um epitélio colunar simples que reveste uniformemente o estômago e se projeta em estruturas invaginadas denominadas fossetas (fossas, fovéolas ou criptas) gástricas, que vão em direção à lâmina própria (HOFFMAN, 2015; WILSON; STEVENSON, 2019). Essas fossetas conduzem a numerosas glândulas, que se diferem histologicamente em cárdicas, fúndicas (oxínticas) e pilóricas, conforme a região do órgão (HOFFMAN, 2015). A partir da camada submucosa já não há a presença de glândulas. A camada muscular é formada por três camadas de músculo liso: oblíqua interna, circular média e longitudinal externa (GARTNER; HIATT, 2000). A camada serosa é a túnica mais externa do estômago, sendo constituída por um epitélio simples pavimentoso e tecido conjuntivo subjacente (GARTNER; HIATT, 2000).

3.1.2 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

O termo “úlceras pépticas” se refere à lesão ácida péptica do trato digestivo que resulta na ruptura da mucosa, atingindo a submucosa (LANAS; CHAN, 2017) (Figura 3). Essa condição afeta quatro milhões de pessoas por ano, sendo uma das doenças mais prevalentes em todo o mundo (TRIPATHI; SINGH; MUKERJEE, 2021). A incidência da doença ulcerosa péptica varia com a idade, sexo, localização geográfica e está associada a complicações graves, incluindo hemorragias, perfurações, obstrução gastrointestinal e câncer (AHMED *et al.*, 2022). Assim, essa condição clínica representa um problema de saúde mundial devido à sua alta morbidade, mortalidade e as perdas econômica geradas (ADINORTEY *et al.*, 2013). Mundialmente, a prevalência da doença é de cerca de 40% nos países desenvolvidos e 80% nos países em desenvolvimento (ADINORTEY *et al.*, 2013). Como uma estimativa de 15.000 mortes a cada ano (AHMED *et al.*, 2022).

Figura 3 - Imagem representativa do processo de ulceração gástrica



Fonte: adaptado de Wikipédia – Erosion excoriation ulcer 2 (2013).

As úlceras pépticas podem estar localizadas no estômago (gástricas), no esôfago (esofágicas) ou no duodeno (duodenais) (NASCIMENTO *et al.*, 2015). A origem é multifatorial, podendo ser o resultado de um desequilíbrio entre fatores

agressivos e fatores citoprotetores. Os agentes que podem se opor nessa balança são, por exemplo: um ambiente hipersecretor de ácido clorídrico (HCl), infecção causada pela bactéria *Helicobacter pylori*, álcool, excessivo uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs); versus a barreira de muco e bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, reparo celular, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (HUNT *et al.*, 2015; SELMI *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2018; BRANDÃO *et al.*, 2019).

Os AINEs não seletivos, como indometacina, aspirina e ibuprofeno, induzem úlceras pela inibição da produção de prostaglandinas no estômago, isso se dá como consequência da inibição da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) (PATRIGNANI; PATRONO, 2015).

A supressão da biosíntese de prostaglandinas resulta em maior suscetibilidade à lesão da mucosa e, subsequentemente, à ulceração gástrica (ADINORTEY *et al.*, 2013), uma vez que as prostaglandinas exercem efeitos citoprotetores essenciais na manutenção da integridade da mucosa: inibição da secreção de ácido, estímulo a secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa, e estímulo a renovação e reparo celular (PATRIGNANI *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2013; TAKEUCHI, 2014).

As células epiteliais de superficiais são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato que formam uma barreira de proteção pré-epitelial entre o lúmen gástrico e o epitélio que atua contra a ação do ácido luminal e pepsina, mantendo o gradiente de pH na superfície de células epiteliais maior que o do lúmen gástrico (KHAN *et al.*, 2013). Antagonistas muscarínicos, agonistas α -adrenérgicos, anti-inflamatórios, ácidos biliares, fumaça de cigarro e provavelmente o processo infeccioso desencadeado pela bactéria *H. pylori*, são fatores inibidores da secreção de bicarbonato (HØJGAARD *et al.*, 1996; BIGHETTI *et al.*, 2002; WEN *et al.*, 2016).

A presença da bactéria *H. pylori* está associada a 70% dos casos de úlcera gástrica e, se apresenta com um fator de risco para o aparecimento e reaparecimento de úlceras e gastrites e, para o desenvolvimento de câncer duodenal (NAPOLITANO, 2009; MAHACHAI *et al.*, 2018). A fisiologia do trato gastrointestinal é fortemente afetada pela infecção causada pela *H. pylori*, que induz a uma inflamação crônica, aumentando a secreção ácida e inibindo os mecanismos de regulação (MALFERTHEINER, 2011).

A polifarmácia, o uso rotineiro e concomitante de quatro ou mais medicamentos (com ou sem prescrição médica) (WHO, 2019), também pode ser considerada um fator de risco para lesões da mucosa gástrica, pois essa ingestão simultânea pode promover interações medicamentosas indesejadas, especialmente quando se trata de idosos. Pois além de serem a parcela que mais faz uso de polifarmácia, o envelhecimento também influencia a absorção ineficiente de medicamentos, a diminuição do peristaltismo digestivo do idoso, por exemplo, favorece o aumento do período de contato entre o fármaco e a superfície mucosa de absorção, podendo causar lesão gástrica por aderirem a mucosa local (DE OLIVEIRA; CORRADI, 2018).

O etanol é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de úlceras gástricas por causar danos à membrana através da sua capacidade de solubilizar a camada muco-protetora e expô-la às ações proteolíticas e hidrolíticas do ácido clorídrico e da pepsina (OATES; HAKKINEN, 1988; SENER; PASKALOGLU; AYANOGLU-DÜLGER, 2004). Além disso, estimulação da secreção ácida e redução do fluxo sanguíneo, provocados pelo etanol, leva a lesões microvasculares, por meio da ruptura do endotélio vascular, facilitando a permeabilidade (LI et al., 2008; PARK et al., 2015; ABOUL NASER et al., 2020). Assim como outros agentes agressores, o álcool desencadeia desequilíbrios nos processos antioxidantes celulares, por causar a liberação de ânion superóxido e radicais livres, levando ao aumento do estresse oxidativo nos tecidos, evidenciado pelo aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), marcador do aumento da peroxidação lipídica (GLAVIN; SZABO, 1992; MAROTTA et al., 1999; REPETTO; LLESUY, 2002)

3.1.3 TRATAMENTO E EFEITOS ADVERSOS

No tratamento de úlceras pépticas, diversos fármacos antiulcerogênicos buscam se opor ao, já mencionado, desbalanço entre fatores agressores e protetores, e/ou estimular as defesas da mucosa gástrica, a fim de reverter, prevenir e/ou aliviar os sintomas (GADEKAR et al., 2010). Esses medicamentos podem ser divididos em: agentes antissecretores, que correspondem aos antagonistas de receptores histaminérgicos H₂ (H₂Ras), inibidores da bomba de prótons (IBPs) e fármacos anticolinérgicos e; agentes citoprotetores (análogos da prostaglandina, produtores

barreira física) e os antiácidos (Figura 4). Podem ser incluídos nessa divisão, os antibióticos usados quando há presença da bactéria *Helicobacter pylori*.

Figura 4 - Classes de fármacos antiulcerogênicos



Fonte: elaborado pela autora.

O controle da doença ácido péptica é feito basicamente com a supressão da produção de ácido no estômago, utilizando inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol, lansoprazol, esomeprazol e pantoprazol ou, com o uso de antagonistas de receptores histaminérgicos H2 (H2RAs), como cimetidina, ranitidina, nizatidina e famotidina (Wallace e Sharkey, 2012).

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) são derivados benzimidazóis que agem inibindo a bomba de prótons da célula parietal, impedindo a secreção do ácido clorídrico (WELAGE; BERARDI, 2000). Os IBPs são usados em outras condições relacionadas ao ácido gástrico para além de úlcera péptica, como esofagite erosiva, doença do refluxo gastroesofágico, e condições hipersecretórias como a Síndrome de Zollinger-Ellison (MAES *et al.* 2017).

Mesmo sendo classes eficientes de fármacos, tanto os IBPs, quanto os H2Ras, apresentam vários efeitos adversos importantes, agravados pelo uso indiscriminado, como o potencial para hipersecreção ácida de rebote após a retirada do fármaco,

devido à hipergastrinemia resultante da elevação do pH luminal em virtude da supressão ácida prolongada (DACHA *et al.*, 2015; REEVE *et al.*, 2015; FARRELL *et al.*, 2017; NAUNTON *et al.*, 2018).

Em associação com antibióticos (claritromicina, amoxicilina, tetraciclina, metronidazol), fármacos antissecretores (IBPs como omeprazol ou H2Ras como ranitidina) (MAHACHAI *et al.*, 2018), podem ser usados também no combate a *H. pylori*. No entanto, este tratamento pode ter efeitos colaterais, entre eles: náuseas, diarreias e tonturas (BRUNTON, 2001; JAIN *et al.*, 2007).

Acrescentar um IBPs a um tratamento de politerapia complexa, pode provocar interações medicamentosas clinicamente relevantes, levando a complicações, como: risco de trombose, reinternação, falência de órgãos ou agravamento do estado, principalmente em pacientes idosos (CENA *et al.*, 2020). O citalopram e o escitalopram são antidepressivos metabolizados pelo CYP2C19, que é inibido pelos IBPs, elevando os níveis da concentração plasmática, o que pode provocar o prolongamento o intervalo QT e acarretar sérios danos à função cardíaca (OJERO-SENARD *et al.*, 2017). Algo semelhante pode correr com a metabolização da varfarina (CYP2C9 e CYP3A4, onde a concentração plasmática do anticoagulante não diminuiria como esperado, podendo elevar o risco de hemorragia (CENA *et al.*, 2020).

O uso excessivo de IBPs e o alto índice de prescrições inadequadas têm chamado a atenção (LANAS, 2016; CENA *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020), pois além de comuns, são financeiramente onerosas (FRALICK *et al.*, 2020). O que ressalta a importância de promover o uso racional e adequando dos IBPs, identificando a necessidade real de prescrição, escolhendo a alternativa mais racional (LIU *et al.*, 2020).

Entre os efeitos adversos mais comumente associados ao uso de IBPs estão dor de cabeça, erupção cutânea, tontura e sintomas gastrointestinais, incluindo náusea, dor abdominal, flatulência, constipação e diarreia (YIBIRIN *et al.*, 2021). Por afetar a absorção de micronutrientes, os IBPs também podem levar a complicações relacionadas a deficiências nutricionais, como a osteoporose e aumento do risco de fraturas ósseas, pela diminuição na absorção de cálcio no intestino (YIBIRIN *et al.*, 2021). Isso também se aplica a deficiência de vitamina B12, que a longo prazo, pode manifestar anormalidades hematológicas, neurológicas e psiquiátricas (FORCE *et al.*, 2003; MARCUARD *et al.*, 1994). Além disso, a elevação do pH no conteúdo luminal

gástrico, também pode favorecer infecções dentro e fora do trato gastrointestinal (LODATO *et al.*, 2010; HAASTRUP *et al.*, 2018).

Os agentes anticolinérgicos, como escopolamina e atropina, agem bloqueando os receptores muscarínicos da célula parietal, reduzindo assim a secreção ácida e a dor, através da contenção da motilidade duodenal (SCHUBERT, 2016). Além de sua baixa eficácia no controle da acidez, seus efeitos colaterais incluem constipação, visão turva, boca seca, e levaram a sua descontinuação (SCHUBERT, 2016).

A histamina estimula a secreção ácida gástrica ao interagir com receptores H₂, na célula parietal, assim os antagonistas seletivos de receptores H₂ (H₂Ras) reduzem a secreção ácida ao impedir a ligação da histamina (AIHARA *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2007). O surgimento dos H₂Ras diminuiu a necessidade de cirurgia para o tratamento de úlceras, contudo, o seu uso contínuo promove uma alta reincidência, supressão prolongada da secreção ácida gástrica, alterações imunológicas, tontura, impotência, sonolência e erupção cutânea (AIHARA *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2007).

O uso de H₂Ras foi associado a efeitos no nível do sistema nervoso central (confusão mental, dor de cabeça e depressão), danos renais e hepáticos (SAX, 1987). Além de efeitos adversos hematológicos, deficiências nutricionais associadas à diminuição na absorção de ferro e vitamina B₁₂, que estão correlacionados à diminuição da produção de ácido clorídrico no estômago (hipocloridria) (AYMARD *et al.*, 1988). Seu uso pode ocasionar uma tolerância farmacológica dentro de 3 dias após início da utilização (MCRORIE *et al.*, 2014), que junto com os efeitos adversos gerados, representa mais uma limitação para a prescrição. A ranitidina, por exemplo, foi retirada do mercado nos EUA, e posteriormente também no Brasil, devido a presença de *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) em concentrações acima do tolerado (ASCHENBRENNER, 2020). O NDMA é provável carcinógeno humano e, nitrosação da ranitidina, que contém um grupo nitrito e um grupo dimetilamina pode criar NDMA sob condições de pH ácido, como o estômago (WHITE, 2020).

Os agentes citoprotetores são os fármacos que agem geralmente estimulando os mecanismos endógenos de proteção ou produzindo uma barreira física sobre a superfície da mucosa gástrica. Esses protetores da mucosa podem ser fármacos análogos da prostaglandina, como o misoprostol. Níveis elevados de prostaglandina aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e estimulam a secreção de muco e bicarbonato, aumentando consequentemente, os mecanismos de proteção da

mucosa contra o ácido clorídrico e a pepsina (KATORI; MAJIMA, 1997; BIGHETTI et al., 2002). O misoprostol, também conhecido como Cytotec, em doses elevadas pode ser utilizado para indução de aborto, pois provoca contração uterina intensa, o que impôs restrições legais à sua comercialização, limitando sua utilização na terapêutica da úlcera gástrica (BIGHETTI et al., 2002).

A carbenoxolona estimula a síntese de muco citoprotetor através da inibição de enzimas que degradam as prostaglandinas (PESKAR; HOLLAND; PESKAR; 1976; BICKEL; KAUFFMAN, 1981; ENE et al., 1988;). Contudo devido a retenção de sódio, hipertensão, hipocalemia e supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona causada pelo seu uso, a carbenoxolona vem sendo preterida na terapêutica (CAREY; PADIA, 2016). Tais efeitos adversos, provavelmente, estão associados à inibição da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase, que protege os receptores de mineralocorticoides da ativação excessiva pelo cortisol, causando hiperativação (STEWART et al., 1990).

O citoprotetor sucralfato, indicado para úlceras não responsivas à supressão ácida, estimulam os mecanismos de defesa da mucosa atuando como um agente de revestimento, pois quando em contato com o ambiente ácido do estômago forma um complexo de hidróxido de alumínio com glicose sulfatada, gerando um polímero viscoso e pegajoso que adere às células epiteliais, funcionando como uma barreira física antiúlcera (SULOCHANA et al., 2016). O complexo formado adquire carga negativa e se liga eletrostaticamente a grupos químicos carregados positivamente, como as proteínas presentes nas lesões da mucosa (NAGASHIMA, 1981).

Esse fármaco também tampona o ácido clorídrico, inibe a ação da pepsina e adsorve os sais biliares, impedindo a penetração, elevando a depleção de ácido, pepsina e sais biliares da secreção gástrica, o que pode configurar outro mecanismo antiulcerogênico (NAGASHIMA, 1981). Por ser uma barreira protetora tão abrangente, o sucralfato também se liga à mucosa não lesada, exercendo efeitos semelhantes na mucosa regenerada e normal (NAGASHIMA, 1981)

Estudos apontam efeitos adicionais como: inibição da atividade bacteriana; redução da geração de radicais livre; efeitos no metabolismo do ácido araquidônico e no aumento da liberação de prostaglandinas, leva a aumento da secreção de bicarbonato, produção de muco, fluxo sanguíneo e divisão celular; diminuição da apoptose celular; os efeitos no crescimento, regeneração e reparo dos tecidos:

facilitando o fluxo sanguíneo, a proliferação celular e o reparo por meio da ligação de fatores de crescimento aos tecidos; formação de tecido de granulação e reepitelização (MASUELLI *et al.*, 2010; MASJEDI; ESMAEIL; SAFFAEI, 2017; ABTAHI-NAEINI *et al.*, 2022).

O sucralfato é bem tolerado, seus principais efeitos adversos são a constipação e a redução da absorção de outros fármacos, varfarina, digoxina, levotiroxina, furosemida e antivirais (ABTAHI-NAEINI *et al.*, 2022). Outros efeitos adversos incluem boca seca, náuseas, vômitos, cefaleia, prurido, erupções cutâneas e toxicidade de alumínio (ABTAHI-NAEINI *et al.*, 2022).

Os antiácidos são bases fracas que, embora sejam muito eficazes em neutralizar o ácido clorídrico secretado (formando sal e água), compreendem a forma mais simples de tratamento, pois apenas suavizam os sintomas, ou seja, não são capazes de cicatrizar a lesão (SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017). Além disso, os antiácidos não devem ser usados a longo prazo e veem sendo substituídos por outros agentes mais eficazes e seguros, uma vez que, podem levar à hipersecreção ácida de rebote após a retirada do fármaco, além de efeitos adversos locais e sistêmicos dependendo do agente presente na formulação, como náuseas, constipação e diarreia (JAIN *et al.*, 2007; SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017). Mesmo assim, os mais consumidos são: carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio, bicarbonato de sódio, hidróxido de magnésio (JAIN *et al.*, 2007; SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017).

3.2 Extrato Padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

A *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, também conhecida como laranja vermelha, laranja Moro, ou sanguínea, é uma variedade de laranjas doces pigmentadas, pertencente à família Rutaceae, tipicamente cultivadas na área vulcânica ao redor do Monte Etna, leste da Sicília, na Itália (CARDILE *et al.*, 2015; DE LIMA; BARBOSA, 2021) (Figura 5). São comercializadas popularmente como alimentos funcionais ou como extrato seco na suplementação alimentar a fim de promover a manutenção do peso corporal e prevenção da obesidade (KEGELE *et al.*, 2019; RUSSO *et al.*, 2019; FARAG *et al.*, 2020; DE LIMA; BARBOSA, 2021).

Figura 5 - Localização geográfica do Monte Etna, Itália



Fonte: adaptado de Wikipédia - Sicily in Italy (2011).

As laranjas são classificadas em dois grandes grupos de acordo com a coloração da sua polpa: amarelas e vermelhas (ou sanguíneas). Entre as laranjas vermelhas podemos ter três variedades: Moro, Tarocco e Sanguinello, sendo a Moro a variedade mais pigmentada (RAVEH *et al.*, 2020). A coloração avermelhada (Figura 6) se deve à presença de pigmentos chamados antocianinas que atuam como potentes antioxidantes e não são normalmente encontrados em outras frutas cítricas (DE LIMA; BARBOSA, 2021). Além disso, as laranjas Moro possuem maior concentração de vitamina C e compostos fenólicos bioativos em comparação com laranjas amarelas (CARDILE *et al.*, 2015; KANEKO; SHIRAKAWA, 2018; DE LIMA; BARBOSA, 2021).

Figura 6 - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Fonte: adaptado de Galena® [s. d.].

O distrito particular da Sicília, onde as laranjas sanguíneas (ou sicilianas) são cultivadas, possui localização geográfica protegida, pois a produção de antocianinas na polpa e no epicarpo durante o amadurecimento dos frutos se deve as condições climáticas e geológicas específicas do local de cultivo (BRISKEY; MALFA; RAO, 2022).

Sendo a mais pigmentada, a variedade Moro também apresenta a maior quantidade de antocianinas entre as variedades de laranjas vermelhas (FALLICO *et al.*, 2017). As antocianidinas e seus glicosídeos, antocianinas, são pigmentos solúveis em água que contribuem para a coloração de várias flores, sementes, frutas e plantas (DE LIMA; BARBOSA, 2021). São compostos fenólicos pertencentes a uma classe de flavonóides que demonstram várias atividades biológicas promissoras para a saúde humana, como inibição da peroxidação de lipídios e ação antioxidante, atuando contra os radicais livres (RATTY; DAS, 1988; CAVALCANTI *et al.*, 2011), possuem papel na prevenção de dislipidemia, diabetes tipo 2, neurodegeneração, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas e câncer (LV *et al.*, 2015; RUPASINGHE *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2020; DE LIMA; BARBOSA, 2021).

Estudos vem demonstrando o papel anti-inflamatório e cicatrizante das antocianinas, devido atividades indicadoras de aceleração do processo de contração de feridas dérmicas (reepitelização, infiltração de células inflamatórias, proliferação de fibroblastos, angiogênese, formação de fibras de fibronectina, deposição de colágeno e formação de tecido de granulação), podendo ser adjuvantes no tratamento como

material para curativos (NIZAMUTDINOVA *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2013; PALUNGWACHIRA *et al.*, 2019; AHMAD *et al.*, 2021; LOTFINA *et al.*, 2023).

O Morosil® é o extrato seco padronizado obtido a partir do suco de laranjas Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), geralmente comercializado em cápsulas contendo 500mg e consumido visando, principalmente, a perda de peso. Porém, o produto possui várias possibilidades de formulação, além das capsulas e pó, também biscoitos, petiscos funcionais para cães, pastas palatáveis, comprimidos, grânulos, sachês, bebidas instantâneas, softgel, molhos ou caldas terapêuticas.

Estudos científicos demonstram atividade antioxidante e o papel do extrato padronizado da laranja Moro na prevenção de distúrbios metabólicos, obesidade, resistência à insulina, esteatose hepática e doenças cardiovasculares (RUPASINGHE *et al.*, 2016, TOMASELLO *et al.*, 2019; DE LIMA; BARBOSA, 2021). Essa ação terapêutica se deve ao mecanismo sinérgico entre os compostos bioativos promovendo controle de peso, redução de triglicerídeos e colesterol total (SOUSA *et al.*, 2019, DE LIMA; BARBOSA, 2021).

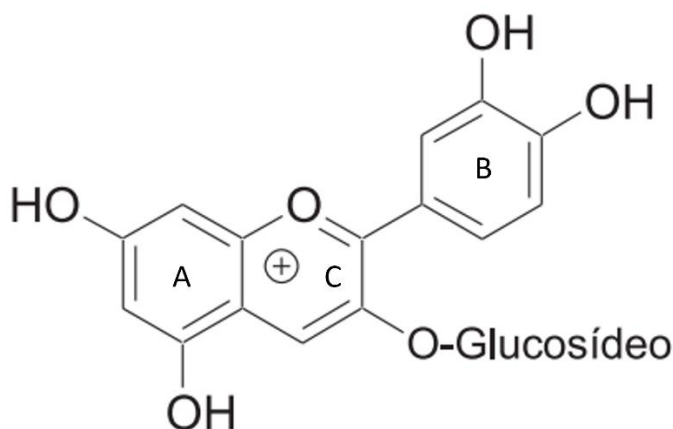
Segundo o certificado de análise do fabricante, o Morosil® (Bionap) fornecido no Brasil pela Galena®, é padronizado em: antocianinas (cianidina-3-glicosídeo) de 0,8 a 0,9 %; ácidos hidroxicinâmicos (cafeico, cumárico, sinapínico, ferúlico, cinâmico) de 0,8 a 1 %; flavanonas (hesperidina e narirutina) de 2 a 2,2 % e; ácido ascórbico de 4,3 a 4,5 %.

O Morosil®, caracterizado por sua cor vermelho purpura, é aprovado pela ANVISA como substância bioativa, fonte de antocianina, amparando sua segurança de uso. A Resolução RDC n. 243/18, define substância bioativa como um nutriente ou não nutriente consumido normalmente como componente de um alimento, que possui ação metabólica ou fisiológica específica no organismo humano. Substâncias bioativas comercializadas na forma de produtos farmacêuticos são chamadas de “nutracêuticos” (GULATI; OTTAWAY, 2006; SANTOS, ALBERT; LEANDRO, 2019).

Os benefícios obtidos da capacidade antioxidante dos compostos bioativos provenientes de sucos de frutas cítricas, como é o caso da matéria prima do Morosil®, derivam tanto da vitamina C como das flavanonas. Estes compostos podem atuar como agentes antioxidantes, hipolipidêmicos, anti-inflamatórios e neuroprotetores (PETERSON *et al.*, 2006; MILENKOVIC *et al.*, 2011; MILENKOVIC *et al.*, 2021).

Majoritária na laranja moro, a cianidina-3-glicosídeo (C3G) é uma antocianina natural que possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (TAN *et al.*, 2019). O catabolismo da C3G no trato gastrointestinal pode produzir metabólitos fenólicos bioativos, como ácido protocatecuico (PCA), floroglucinaldeído (PGA), ácido vanílico e ácido ferúlico, que aumentam a biodisponibilidade de C3G e contribuem tanto para a barreira mucosa quanto para a microbiota (TAN *et al.*, 2019). C3G possui forte atividade antioxidante potencialmente devido as duas hidroxilas presentes no anel B (KONGPICHITCHOKE; HSU; HUANG, 2015) (Figura 7).

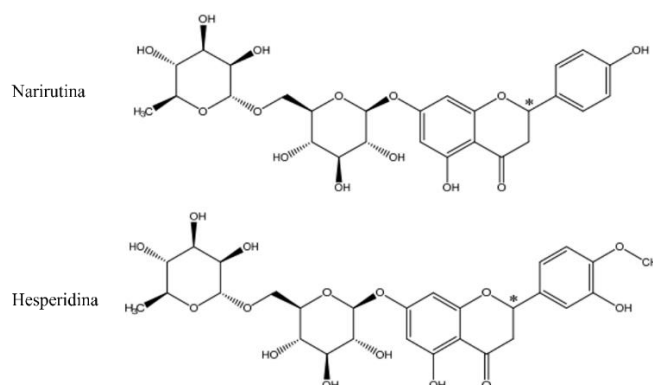
Figura 7 - Estrutura química da antocianina cianidina-3-glicosídeo



Fonte adaptado de Março; Poppi; Scarminio (2008).

Além das antocianinas, há outra subclasse de flavonoides presentes no extrato padronizado Morosil®, as flavanonas. Hesperidina e narirutina são flavanonas na forma glicosídica (Figura 8), encontrados principalmente em plantas cítricas da família Rutaceae, (JIANG *et al.*, 2023) como a laranja moro e, associadas a atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antivirais, protetoras de distúrbios cardiovasculares e neurodegenerativos, entre outros (CHEN; TAIT; KITTS, 2017; PYRZYNSKA, 2022).

Figura 8 - Estruturas químicas da narirutina e hesperidina

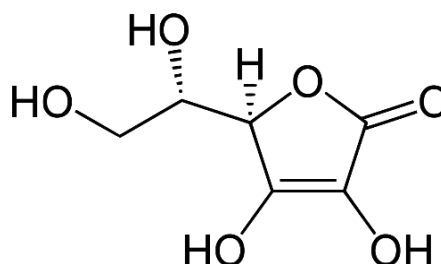


Fonte: adaptado de Jiang *et al.* (2023).

Em ensaios com células tronco, a hesperidina foi capaz de reparar o tecido cartilaginoso, além de demonstrar a capacidade de inibir citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10) e a expressão da subunidade p65 do NF- κ B (XIAO *et al.*, 2018). A ativação de NF- κ B resulta em maior recrutamento de células inflamatórias e maior produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1, IL-6, IL-8 e TNF-alfa (XIAO *et al.*, 2018).

O ácido ascórbico (ou vitamina C) (Figura 9), é um micronutriente essencial na síntese de colágeno, principal antioxidante não enzimático, um regulador do metabolismo e conhecido por reduzir a apoptose (PEREZ-CRUZ; CARCAMO; GOLDE, 2003; FRANK *et al.*, 2006). A reparação e regeneração de tecidos são influenciadas pela vitamina C (BECHARA; FLOOD; GUNTUN, 2015; DIEDERICH *et al.*, 2023). Junto com seu papel na síntese de colágeno, há evidências de que a vitamina C aumenta a proliferação de fibroblastos dérmicos, função importante para a cicatrização de feridas (PULLAR; CARR; VISSERS, 2017). A vitamina C é consumida nesses processos, sugerindo que a suplementação pode ser benéfica na cicatrização (BECHARA; FLOOD; GUNTUN, 2015). Desta forma, a reposição de ácido ascórbico (AA) demonstra melhorar os resultados de cura em certas patologias, predominantemente úlceras de pressão (BECHARA; FLOOD; GUNTUN, 2015). Em terapia combinada com outros agentes, o ácido ascórbico foi capaz de favorecer o debridamento de feridas crônicas (CALDERON *et al.*, 2015; GUNTUN *et al.*, 2021).

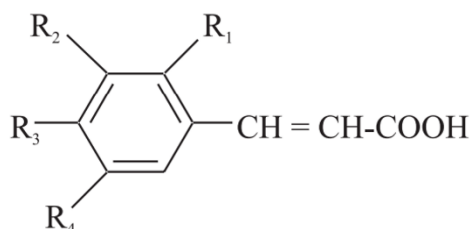
Figura 9 - Estrutura química do ácido ascórbico



Fonte: Wikipédia - L-Ascorbic acid (2009).

Os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (TAOFIQ *et al.*, 2017). A denominação “ácidos cinâmicos” engloba os compostos que possuem a estrutura genérica do ácido hidroxicinâmicos (Figura 10) e substituinte em diferentes posições, os mais comuns são: os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (TAOFIQ *et al.*, 2017). Uma das características dos ácidos cinâmicos é a possibilidade de existência de isomerismo cis/trans (TAOFIQ *et al.*, 2017).

Figura 10 - Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos



Ácido cinâmico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido o-cumárico: $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido m-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = H$; $R_2 = OH$

Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = OH$

Ácido caféico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = R_3 = OH$

Ácido ferúlico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$

Ácido sináptico: $R_1 = H$; $R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH$

Fonte adaptado de Ramalho; Jorge (2006).

Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos fenólicos que modulam a defesa antioxidante em decorrência da inflamação (CÂMARA *et al.*, 2022). O ácido *trans*-cinâmico, demonstrou potencial para acelerar o processo de cicatrização de feridas, pela melhora da migração de fibroblastos e modulação da síntese da matriz extracelular *in vitro* (DE AQUINO *et al.*, 2021). Em modelo animal, curativos de hidrogel incorporado com ácido ferúlico aceleraram a cicatrização de feridas aliviando a lesão oxidativa pela geração de superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e inibição da produção de malondialdeído (MDA) (OU *et al.*, 2021).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem celular

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), cedidas pelo Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular (ICB/UFGA). As células foram cultivadas em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C.

Durante o descongelamento, os criotubos inicialmente foram mantidos em temperatura ambiente para evitar choque térmico com os demais reagentes. Após a estabilização da temperatura, o conteúdo foi homogeneizado com 5 ml de meio DMEM suplementado e centrifugado a 1000 rpm durante 3 minutos. Após isso, o sobrenadante foi desprezado e meio novo foi adicionado ao tubo falcon para a suspensão do material. O conteúdo foi então transferido para uma garrafa de 25 cm³ para a expansão. As células foram mantidas em cultura até a confluência de 70% a 90%.

4.2 Ensaio de cicatrização *in vitro*

A natureza da linhagem celular escolhida para os ensaios *in vitro* (células Vero), visa investigar se o extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (ECS) é capaz de promover repavimentação do epitélio da mucosa gástrica. As células Vero podem ser usadas em ensaios de cicatrização *in vitro* para estimar a migração celular, fator chave no processo de cicatrização de feridas (ROY *et al.*, 2023).

A migração celular foi analisada em quadruplicada através do ensaio de cicatrização *in vitro* (ensaio do arranhão) adaptado de Liang, Park e Guan (2007), tomando o seguinte delineamento:

Dia 01: plaqueio ($3 \cdot 10^{-3}$ células/poço);

Dia 02: carenciamento 1% FBS (Soro Fetal Bovino)

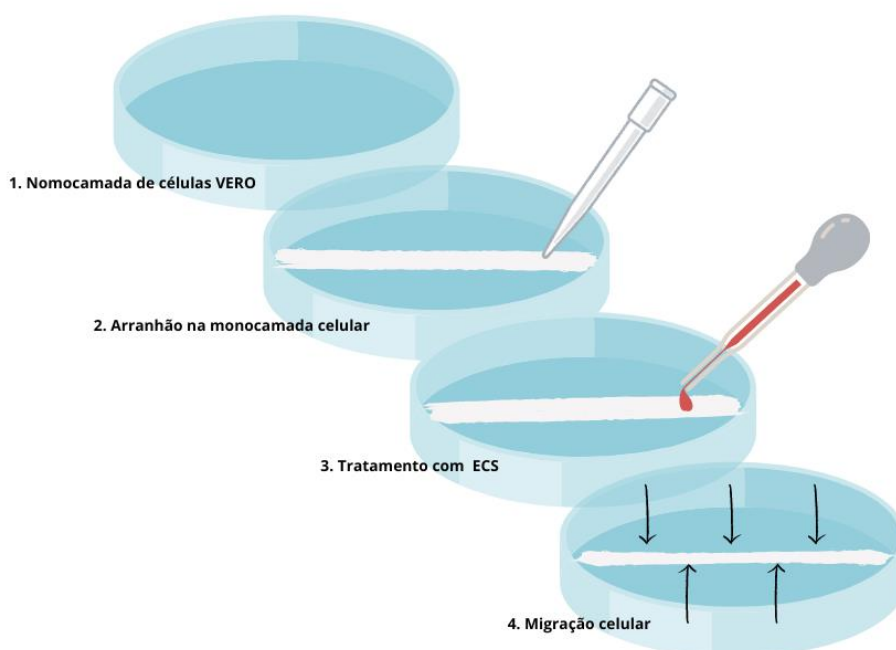
Dia 03: exposição e fotos de 0h, 4h, 8h e 12h;

Dia 04: fotos de 24h;

Dia 05: fotos de 48h.

As células Vero foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 3.10^{-3} células/poço. Após a indução da quiescência, utilizando uma ponta de pipeta de plástico estéril (p200) foi criada uma única ferida/arranhão linear no centro da monocamada celular (Figura 11), após abertura do risco os poços foram lavados 2 vezes com PBS (solução salina tamponada) para remover células flutuantes, em seguida foi feita a exposição, onde foram utilizadas as seguintes concentrações (Quadro 1):

Figura 11 - Figura representativa do ensaio de migração celular



Fonte: elaborado pela autora.

Quadro 1. Distribuição das concentrações por grupo: cicatrização *in vitro*

GRUPO	CONCENTRAÇÕES
Controle Positivo (Suplementado)	FBS 5%
Controle Negativo (Carenciado)	FBS 1%
Tratado ECS 1	FBS 1% + 1 µg/ml ECS
Tratado ECS 0,1	FBS 1% + 0,1 µg/ml ECS

Fonte: elaborado pela autora

As concentrações de ECS utilizadas nesse ensaio foram definidas através de triagem prévia com o teste de viabilidade celular MTT (MOSMANN, 1983) utilizando

concentrações de 400, 200, 100, 50, 10 ,1 e 0,1 µg/ml ECS (TOMASELLO *et al.*, 2022), de onde foram escolhidas as duas melhores doses (Anexo A). Com o auxílio de microscópio invertido (ampliação de 40x) com câmera digital acoplada, imagens das células migrando para a ferida foram feitas nas horas pós exposição: 0h, 4h, 8h, 12h, 24h e 48h. Para quantificar a taxa de migração das células utilizando o software ImageJ (domínio público), uma linha guia dividindo as imagens ao meio foi usada como parâmetro para garantir que as fotos fossem analisadas sempre a partir do mesmo ponto, a largura do arranhão foi dada em pixels/µm. A fórmula a seguir foi usada para calcular o percentual de redução do arranhão a partir da 0h.

$$\text{Taxa de migração (\%)} = 100 - \left(\frac{[Lx \times 100]}{L0} \right) \quad (1)$$

Lx: Largura do arranhão na hora x (hora a ser calculada)

L0: Largura do arranhão na hora zero (0h)

O extrato padronizado utilizado (Morosil® - Bionap) foi fornecido pelo fabricante (Galena®) na formulação em pó e armazenado segundo as especificações do fornecedor (temperatura ambiente controlada, embalagem fechada e protegida da luz e umidade).

4.3 Animais

Foram utilizadas 138 ratas albinas Wistar (*Rattus norvegicus*, com idade a partir de 60 dias (adultas), pesando em torno de 180 a 200 gramas, oriundas do Biotério Central do Instituto Evandro Chagas. Toda regulamentação ética foi respeitada, o projeto foi submetido ao comitê de ética CEUA – UFPA (nº 5220271022), sendo iniciado apenas após a sua aprovação (Anexo B). Os parâmetros de escolha da espécie se deram pela ampla utilização desse modelo para avaliação de atividade gastroprotetora e/ou cicatrizante, devido sua grande correspondência com os seres humanos.

Ao longo do estudo os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais (ICB/UFPA), em ciclo claro-escuro de 12 horas, com controle de temperatura a 25°C

$\pm 2^{\circ}\text{C}$; em grupos de até 5 ratos por caixa, forradas com maravalha. Durante a ambientação (5 a 7 dias), os animais tiveram livre acesso a comida e água potável.

Ao final dos protocolos experimentais, todos os animais foram eutanasiados por anestesia profunda (150 mg/kg de quetamina + 10 mg/kg de xilazina). Após eutanásia, os animais foram descartados de forma apropriada (lixo biológico) e destinados a incineração, via empresa especializada contratada pelo ICB/UFPA.

Os estudos *in vivo* foram divididos em protocolos de citoproteção e de cicatrização, as doses de ECS utilizadas foram baseadas nos estudos de Rtibi *et al.* (2017) e Sathiyabama *et al.* (2018). O extrato padronizado utilizado (Morosil® - Bionap) foi fornecido pelo fabricante (Galena®) na formulação em pó e armazenado segundo as especificações do fornecedor (temperatura ambiente controlada, embalagem fechada e protegida da luz e umidade).

4.4 Avaliação das Lesões Gástricas

Após a eutanásia, os animais foram examinados macroscopicamente, sendo efetuada a ressecção de estômago. Imediatamente após a retirada, os órgãos foram pesados, expressando os resultados pela relação “grama órgão/kg animal” e inspecionados quanto aos parâmetros visuais de normalidade. Para inspeção, os estômagos foram abertos ao longo da grande curvatura, as mucosas lavadas suavemente com soro fisiológico (solução salina 0,9%) e estendidas, com auxílio de alfinetes, sobre uma plataforma de poliestireno para observação e registro fotográfico. Amostras do tecido estomacal foram conservadas a -70°C para análises posteriores. Na determinação da magnitude das ulcerações, foi utilizado o software ImageJ (domínio público) para o cálculo do percentual de área ulcerada, com exceção das lesões induzidas por indometacina, onde foi aplicado um índice de ulceração, calculado a partir da tabela em anexo (Anexo C).

4.5 Protocolos de Citoproteção Gástrica

Os protocolos de citoproteção contemplam lesões gástricas agudas de diferentes mecanismos: indução de úlceras por etanol, que causa lesões por contato, relacionadas ao aumento do estresse oxidativo e redução das defesas antioxidantes

da mucosa e; indução por indometacina, que abrange os danos causados pelos AINEs.

4.5.1 INDUÇÃO COM ETANOL

Após um jejum de 24h, de acordo com o respectivo grupo experimental (Quadro 2), os animais receberam por gavagem o veículo (água), o ECS em três doses diferentes (50 mg/kg, 100 mg/kg e 250 mg/kg) ou uma dose de 500mg/kg de sucralfato (controle positivo). Após 30 minutos, foi administrado etanol absoluto (100% v/v), por via oral, na dose de 0,5 ml/100 g. Os animais foram eutanasiados para avaliação e quantificação as lesões gástricas (conforme item 5.4), 50 minutos após a administração do agente indutor (etanol) (Figura 12).

Quadro 2. Distribuição dos animais por grupo: etanol

GRUPO	Nº DE ANIMAIS	PRÉ-TRATAMENTO	OBJETIVO
Controle Negativo	06	veículo (água) + protocolo de indução	Avaliar a indução do quadro patológico
Controle Positivo:	06	sucralfato + protocolo de indução	Comparar com o tratamento alopático de referência
Tratado 1	6	50 mg/kg de ECS + protocolo de indução.	Construir curva dose-resposta
Tratado 2	6	100 mg/kg de ECS + protocolo de indução.	
Tratado 3	6	250 mg/kg de ECS + protocolo de indução.	

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 12 - Etapas do protocolo de indução de úlcera gástrica com etanol



Fonte: elaborado pela autora.

4.5.2 INDUÇÃO COM INDOMETACINA

Após um jejum de 24h, de acordo com o respectivo grupo experimental (Quadro 3), os animais receberão por gavagem o veículo (água), o ECS em três doses diferentes (100, 250 e 400 mg/kg) ou uma dose de 500 mg/kg de sucralfato (controle positivo). Após 30 minutos, foi administrado, por via subcutânea, 50 mg/kg de indometacina (recém preparada em solução salina com 0,5% NaHCO₃) como indutor de lesões gástricas. Após 3h da indução das lesões, uma nova dose dos pré-tratamentos foi administrada. Os animais foram eutanasiados para avaliação e quantificação as lesões gástricas (conforme item 5.4), 6h depois da administração da indometacina (Figura 13). O protocolo de indução com indometacina foi adaptado de Djahanguiri (1969) e Mello *et al.* (2008).

Quadro 3. Distribuição dos animais por grupo: indometacina

GRUPO	Nº DE ANIMAIS	PRÉ-TRATAMENTO	OBJETIVO
Controle Negativo	6	veículo (água) + protocolo de indução	Avaliar a indução do quadro patológico
Controle Positivo:	6	sucralfato + protocolo de indução	Comparar com o tratamento alopático de referência
Tratado 1	6	100 mg/kg de ECS + protocolo de indução.	Construir curva dose-resposta
Tratado 2	6	250 mg/kg de ECS + protocolo de indução.	

Tratado 3	6	400 mg/kg de ECS + protocolo de indução.	
-----------	---	--	--

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 13 - Etapas do protocolo de indução de úlcera gástrica com indometacina



Fonte: elaborado pela autora.

4.5.3 ACIDEZ GÁSTRICA: LIGADURA DE PILORO

Após a construção da curva dose-resposta, o ECS foi administrado em uma única concentração, a dose escolhida foi a apontada pelos ensaios descritos anteriormente como sendo a mais efetiva. No protocolo (ligadura de piloro) foram utilizados 30 animais, divididos em 3 grupos (Quadro 5):

Quadro 4. Distribuição dos animais por grupo: ligadura de piloro

GRUPO	Nº DE ANIMAIS	PRÉ-TRATAMENTO	OBJETIVO
Controle Negativo	6	veículo (água) + protocolo	Avaliar a indução do quadro patológico
Controle Positivo:	6	“padrão ouro” + protocolo	Comparar com o tratamento alopático de referência
Tratado	6	250 mg/kg + protocolo.	Avaliar o efeito ECS usando a melhor dose

Fonte: elaborado pela autora.

Após jejum de 24 horas, os animais foram anestesiados com solução de quetamina (60 mg/kg) + xilazina (7,5 mg/kg) na dose de 0,1 ml/100 g de peso corporal

e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da apófise xifóide para ligadura (amarração) do piloro, para contensão do suco gástrico. Através de incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago foi localizado e o piloro amarrado com fio de sutura seda 3-0 agulhado (anotação do horário de término para cada animal). Os animais receberam veículo (água), ECS (250 mg/kg) e omeprazol (20 mg/kg), de acordo com o grupo experimental, por via intraduodenal, imediatamente após a ligadura. Em seguida, os órgãos foram internalizados e as incisões dos animais suturadas. Quatro horas após a cirurgia (por ordem de término da amarração do piloro), os animais foram eutanasiados e seus estômagos removidos. Para evitar perda do material secretado, o esôfago foi pinçado (pinça debakey anatômica) antes de remover o estômago, mantendo o piloro amarrado; para então aspirar todo o conteúdo gástrico com seringa de 5 ml e agulha de grosso calibre. O volume coletado foi anotado, centrifugado em tubos de ensaios (1500 rpm/30 minutos). O sobrenadante foi coletado e transferir para Erlenmeyer (50 ml) e adicionado 10 ml de água destilada e adicionadas 2 gotas de fenolftaleína 1% (Figura 15).

Figura 14 - Etapas do protocolo de quantificação da acidez por ligadura de piloro



Fonte: elaborado pela autora.

A acidez total ($[H^+]/\text{ml}/4\text{ h}$) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 1% como indicador ácido-base. No modelo da ligadura pilórica, o conteúdo gástrico, acumulado durante 4 horas, foi avaliado em termos de volume secretado e leitura do pH a partir da modificação dos métodos descritos por Shay *et al.* (1945) e Bianco *et al.* (2022).

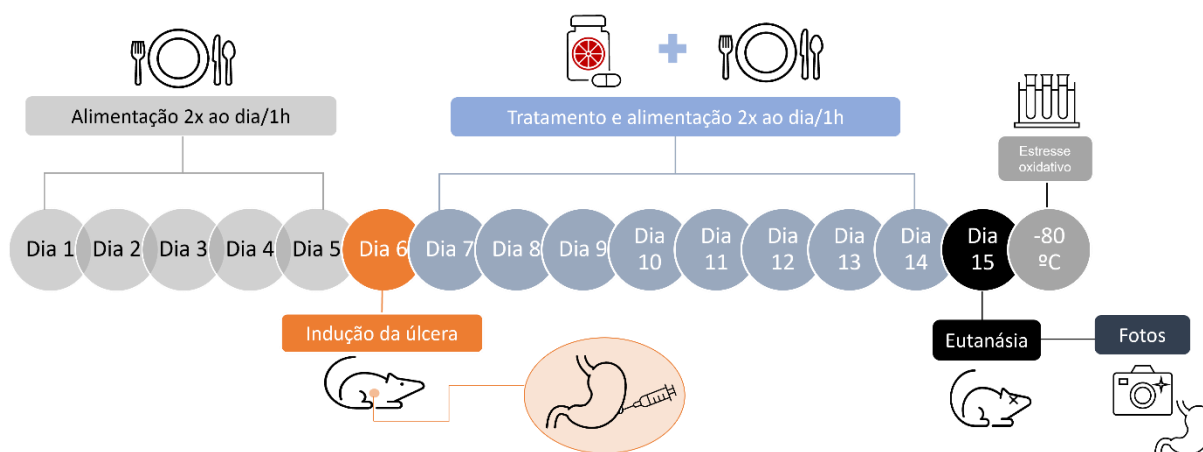
$$Acidez\ Total = \frac{0,1 \times volume\ tilulado}{1000} \quad (2)$$

4.6 Protocolo de Cicatrização Gástrica

4.6.1 INDUÇÃO COM ÁCIDO ACÉTICO

Durante 5 dias os animais tiveram o fornecimento de ração restringido a 2 horas diárias (das 09h00 às 10h00 e das 17h00 às 18h00), com acesso livre à água. Terminado este período, os animais foram submetidos a um jejum de 24h. Para então ser efetuada uma laparotomia abdominal na região epigástrica, sob anestesia intraperitoneal com solução de quetamina (60 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg) na dose de 0,1 ml/100g de peso corporal. Após exposição do estômago, foram injetados na parede externa do órgão, região subserosa da face anterior, 50 µl de solução aquosa de ácido acético (10%). E na face posterior foi injetado 50 µl de solução salina (0,9%). O estômago foi então lavado cuidadosamente com solução salina (0,9%) e a parede abdominal suturada (Figura 14).

Figura 15 - Etapas do protocolo de indução de úlcera gástrica com ácido acético



Fonte: elaborado pela autora.

Após a recuperação da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas sob o regime alimentar restrito descrito anteriormente até o final do tratamento. Para avaliação do efeito cicatrizante do extrato foram usadas quatro doses diferentes de ECS (50 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg e 400 mg/kg). De acordo com o

respectivo grupo experimental (Quadro 4), o tratamento teve início 24 horas após o procedimento cirúrgico e repetido diariamente durante 8 dias. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados (jejum prévio de 24h), sendo os estômagos retirados para inspeção da mucosa e quantificação as lesões gástricas (conforme item 5.4). O protocolo de indução com ácido acético foi adaptado de Takagi *et al.* (1969), Okabe; Pfeiffer (1971) e Mello *et al.* (2008).

Quadro 5. Distribuição dos animais por grupo: ácido acético

GRUPO	Nº DE ANIMAIS	TRATAMENTO	OBJETIVO
Controle Negativo	10	protocolo de indução + veículo (água)	Avaliar a indução do quadro patológico
Controle Positivo	10	protocolo de indução + omeprazol (20 mg/kg)	Comparar com o tratamento alopático de referência
Tratado 1	10	protocolo de indução + 50 mg/kg de ECS	Construir curva dose-resposta
Tratado 1	10	protocolo de indução + 100 mg/kg de ECS	
Tratado 2	10	protocolo de indução + 250 mg/kg de ECS	
Tratado 4	10	protocolo de indução + 400 mg/kg de ECS	

Fonte: elaborada pela autora.

4.7 Estresse Oxidativo

O homogenato do estômago foi obtido a partir da porção de tecido análoga a região ulcerada proveniente dos ensaios de cicatrização (úlceras induzidas com ácido acético). O material, previamente pesado, foi picotado e homogeneizado em ultra turrax (IKA-WERK) na proporção de 1 ml de tampão fosfato (PBS 1:1 p/v) para 1 g de tecido, três vezes em ciclos de 30 segundos (4 °C), a mistura obtida foi centrifugada

por 10 minutos a 5000 rpm (4 °C). O sobrenadante foi alicotado e reservado para análise.

Para a quantificação de proteínas totais da amostra, uma curva padrão foi gerada a partir de concentrações crescentes de albumina bovina, utilizando kit BCA protein (Thermo). A absorbância foi medida no comprimento de onda de 570 nm, em leitora de microplaca Modelo BIO-RAD 450, e os resultados expressos em mg/ml.

4.7.1 TBARS

O malonaldeído (MDA), produto derivado da peroxidação lipídica, reage a presença do ácido tiobarbitúrico (TBARS), formando um produto de coloração rosa claro. A presença de MDA no material biológico foi determinada conforme descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1978).

As proteínas foram recuperadas com o reativo de TBARS: ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 10 mM 0,375% e HCl 0,25M. Em seguida 30µl da amostra homogenada e 570 µl do reativo foram colocados em tubos, o material foi aquecido em banho maria por 45 minutos à 80 °C. Após resfriar, o material foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. Foi feita uma curva com várias concentrações conhecidas de malonaldeído. O produto resultante foi colocado em uma microplaca de 96 poços para leitura em espectrofotômetro a 535 nm (Leitor de microplacas BIO-RAD Modelo 450). A concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi expressa em pmol/mg de proteína.

4.7.2 NITRITO

O óxido nítrico (NO) possui meia vida de apenas alguns segundos nos sistemas biológicos, sendo rapidamente convertido em nitrito e nitrato. A concentração de nitrito é um indicador da produção de NO, que em quantidades elevadas pode levar ao estresse oxidativo.

A produção de NO foi determinada através da reação de Griess. Em microplaca de 96 poços, uma aliquota de 100 µl do sobrenadante foi incubada com 100 µl do reagente de Griess (Nafitileno (0,1%), Sulfanilamida (1%) e Ácido fosfórico (5%) sob temperatura ambiente por 10 minutos (MONCADA, 1992; NIMS *et al.*, 1995). A

absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 510 nm (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader). A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão para nitrito de sódio e os resultados expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

4.7.3 GLUTATIONA TOTAL

Os níveis totais de glutathione (GSH) foram quantificados de acordo com Tietze (1969) e Foyer e Shigeoka (2011). A detecção da enzima reciclada se deu após o cromógeno DTNB ser reduzido a TNB pela ação enzimática da glutathione redutase. O grupo sulfidril da glutathione reage com 1 mM de DTNB para formar TNB, de cor amarela, após o tratamento com glutathione redutase. A absorbância foi imediatamente determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 412 nm (BIO-RAD Modelo 450 Microplate Reader). Os resultados são expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, tendo por base uma curva padrão.

4.7.4 CATALASE

Para a medir a atividade da enzima catalase, 20 μl de amostra foram adicionadas em cada poço, seguido de 100 μl de tampão de amostra (*Assay Buffer*) e 30 μl de metanol. Para dar início a reação de formação do formaldeído, foram adicionados 20 μl de peróxido de hidrogênio a todos os poços. A placa foi então incubada por 20 minutos em temperatura ambiente, sob agitação, e a reação foi interrompida com a adição de 30 μl de hidróxido de potássio em todos os poços, seguida da adição de 30 μl do cromógeno Purpald. Após incubação sob agitação por 10 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 10 μl de periodato de potássio. O material foi então incubado por mais cinco minutos sob agitação. A absorbância da amostra foi lida a 540 nm em leitor de microplaca (BIO-RAD Leitor de Microplacas Modelo 450) e os resultados expressos em quantidade de formaldeído (mmol/min/mg de proteína), em comparação com uma curva padrão (formaldeído 4,25 μM) (JOHANSSON; Borg, 1988; WHEELER *et al.*, 1990).

4.7.5 SUPERÓXIDO DISMUTASE

As superóxidos dismutase (SOD) são metaloenzimas que catalisam a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando uma parte importante do mecanismo celular de defesa antioxidante. O método de determinação foi adaptado de McCord e Fridowich (1969), onde a ação desta enzima, impede a redução do citocromo C, que é detectado pela espectrofotometria e, conseqüentemente, indica a atividade indireta da SOD.

Após o preparo das amostras, uma alíquota de 50 μ L foi adicionada a uma mistura de tampão (citocromo C 0,075 mM, hipoxantina (Sigma-Aldrich) 1,5 mM e xantina oxidase 56 Mm (Sigma-Aldrich). A solução resultante foi incubada a 37 °C e ao abrigo da luz e, após 15 minutos, foi realizada uma única leitura na faixa de 550 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimatzu). Os valores de absorbância foram aplicados em curva padrão de citocromo C para determinação da concentração enzimática, expressa em Unidade SOD/mg proteína: uma unidade de SOD é a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a velocidade de redução do citocromo C em pH 7,8. A atividade de SOD foi expressa em nmol/ml de amostra.

4.8 Análise Estatística

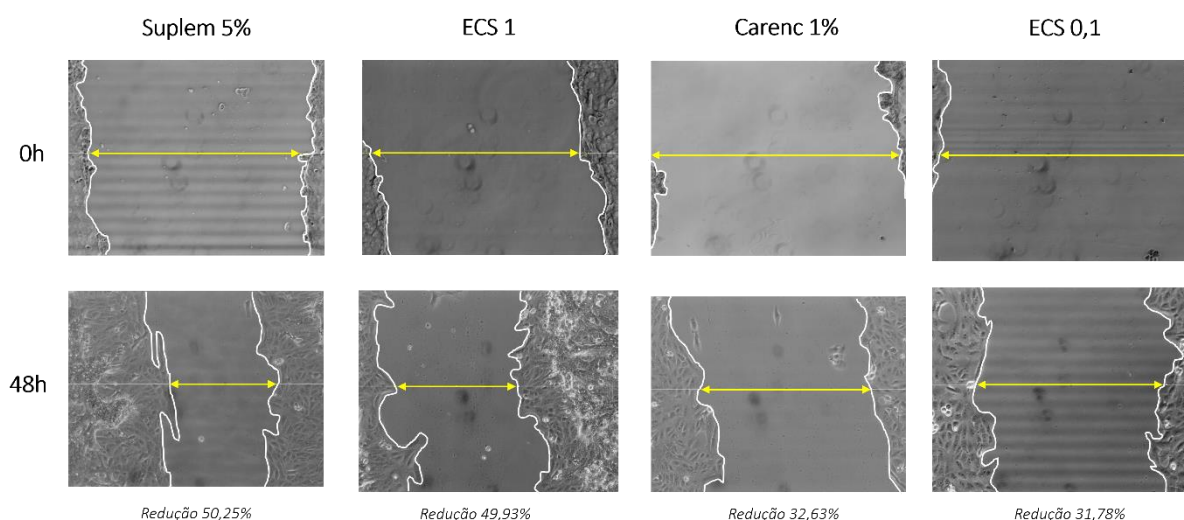
Os dados obtidos analisados estatisticamente no software GraphPad Prism® 5.0, as análises foram avaliadas utilizando análise de variância ANOVA com aplicação dos pós-testes Dunnett e Tukey, considerando o nível de significância $p < 0,05$, para comparação entre os grupos controle (negativo e positivo) e os diferentes tratamentos com ECS, com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov $\alpha = 0,05$ como condicionante.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de Cicatrização de Feridas *in vitro*

Ao final das 48 horas de exposição, a análise das imagens do ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* demonstrou que entre as concentrações de ECS testadas, a concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ teve o melhor desempenho, apresentando percentual de redução do arranhão semelhante ao encontrado no controle positivo (Figura 16).

Figura 16 - Imagens do arranhão por grupo em 0h e 48h de exposição

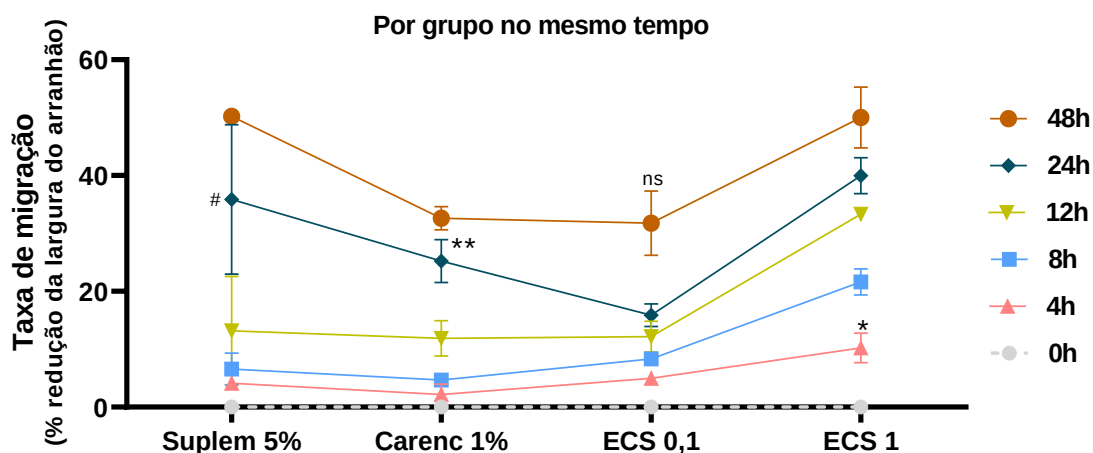


Fonte: elaborado pela autora.

A linha amarela indica o comprimento do arranhão. As linhas brancas indicam as bordas da monocamada celular. **Suplem 5%**: controle positivo suplementado a 5% FBS; **Carenc 1%**: controle negativo carenciado a 1% FBS; **ECS 0,1 e ECS 1**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ e 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente

O gráfico da taxa de migração celular ao longo do tempo (Figura 17) indica que a exposição a menor concentração de ECS (0,1 $\mu\text{g/ml}$) não reduziu o comprimento do arranhão de forma significativa em relação ao controle negativo (carenciado 1% FBS) ($p > 0,05$), além disso, em 24 horas de exposição o controle negativo obteve uma taxa de migração celular mais significativa que O ECS a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0081$).

Figura 17 - Gráfico da taxa de migração de células Vero expostas ao ECS ao longo de 48 horas



Fonte: elaborado pela autora.

Suplem 5%: controle positivo suplementado a 5% FBS; **Carenc 1%:** controle negativo carenciado a 1% FBS; **ECS 0,1 e ECS 1:** extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck a 0,1 µg/ml e 1 µg/ml, respectivamente. Média ± Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns:** não significativo em relação ao carenc 1% em nenhum dos tempos avaliados ($p > 0,05$). ***** a partir deste ponto significativo em relação ao carenc 1% ($p \leq 0,0288$); **#** a partir deste ponto significativo em relação ao carenc 1% ($p \leq 0,0019$), mas não significativo em relação ao ECS 1 ($p > 0,05$); ****** significativo em relação ao ECS 0,1 ($p = 0,00810$)

Já o tratamento com ECS na maior concentração (1 µg/ml) demonstrou uma taxa de migração celular significativa em relação ao grupo controle negativo (carenciado 1% FBS) em todos os tempos a partir de 4 horas de exposição ($p \leq 0,0288$). O controle positivo (suplementado 5% FBS) começou a atuar de maneira significativa no fechamento do arranhão a partir de 24 horas de exposição ($p \leq 0,0019$), contudo não houve diferença significativa na taxa de migração das células suplementadas a 5% FBS em comparação com as células suplementadas com ECS a 1 µg/ml ($p > 0,05$).

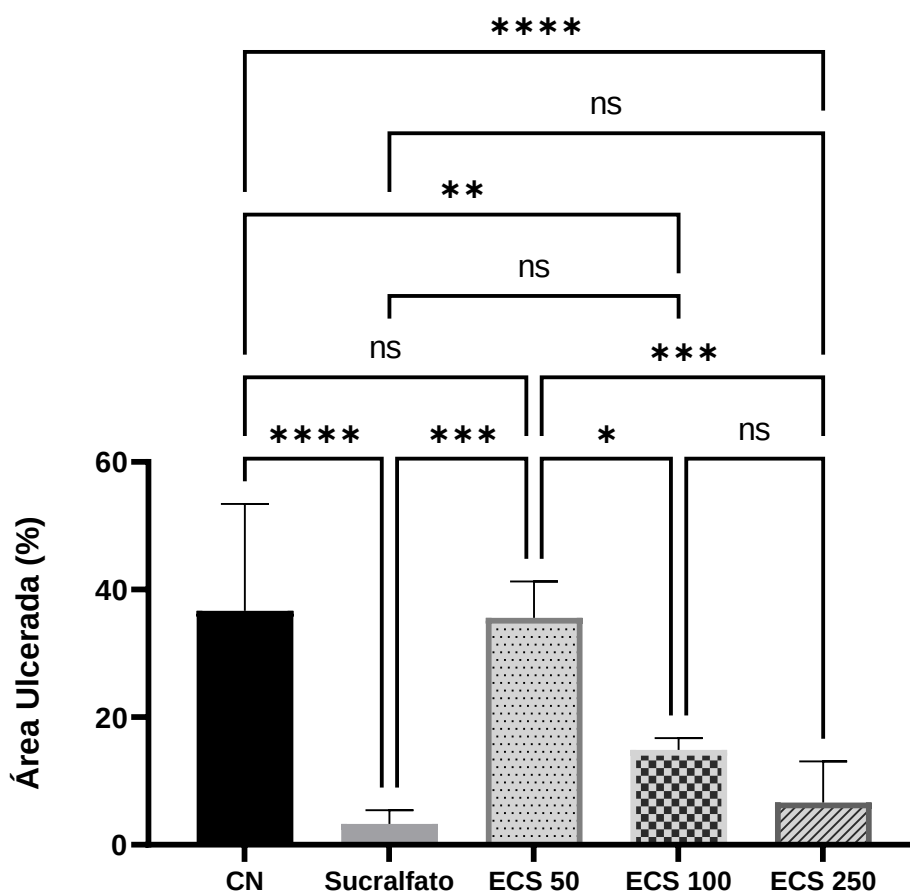
Desta forma podemos concluir que embora ao final das 48 horas de exposição, o percentual de redução do arranhão na maior concentração de ECS seja similar ao apresentado pelo controle positivo, a concentração de 1 µg/ml de ECS necessita de um menor tempo de exposição para retirar as células da situação de carência gerada pela suplementação a 1% de FBS (controle negativo).

5.2 Protocolos de Citoproteção Gástrica

5.2.1 ETANOL

Os resultados demonstraram que tanto o controle positivo, quanto as doses de 100 e 250 mg/kg do ECS, foram eficazes em proteger a mucosa gástrica quando comparados ao controle negativo ($p \leq 0,0033$) (Figura 18). Apenas a menor dose (50 mg/kg) não demonstrou diferença estatística significativa em relação ao controle negativo ($p > 0,05$). As doses de 100 e 250 mg/kg, não diferiram entre si, nem quanto as suas respectivas comparações com o controle positivo sucralfato ($p > 0,05$), demonstrando uma equivalência de eficácia. Ou seja, a dose 100 mg/kg foi tão eficiente quanto a dose de 250 mg/kg, e ambas se mostram tão eficientes quanto o controle positivo, demonstrando que o extrato pode ser comparado ao tratamento padrão na redução das lesões gástricas induzidas com etanol. A figura 19 ilustra o efeito do tratamento com o ECS sobre as lesões gástricas agudas induzidas com etanol através da comparação das alterações morfológicas entre os grupos estudados.

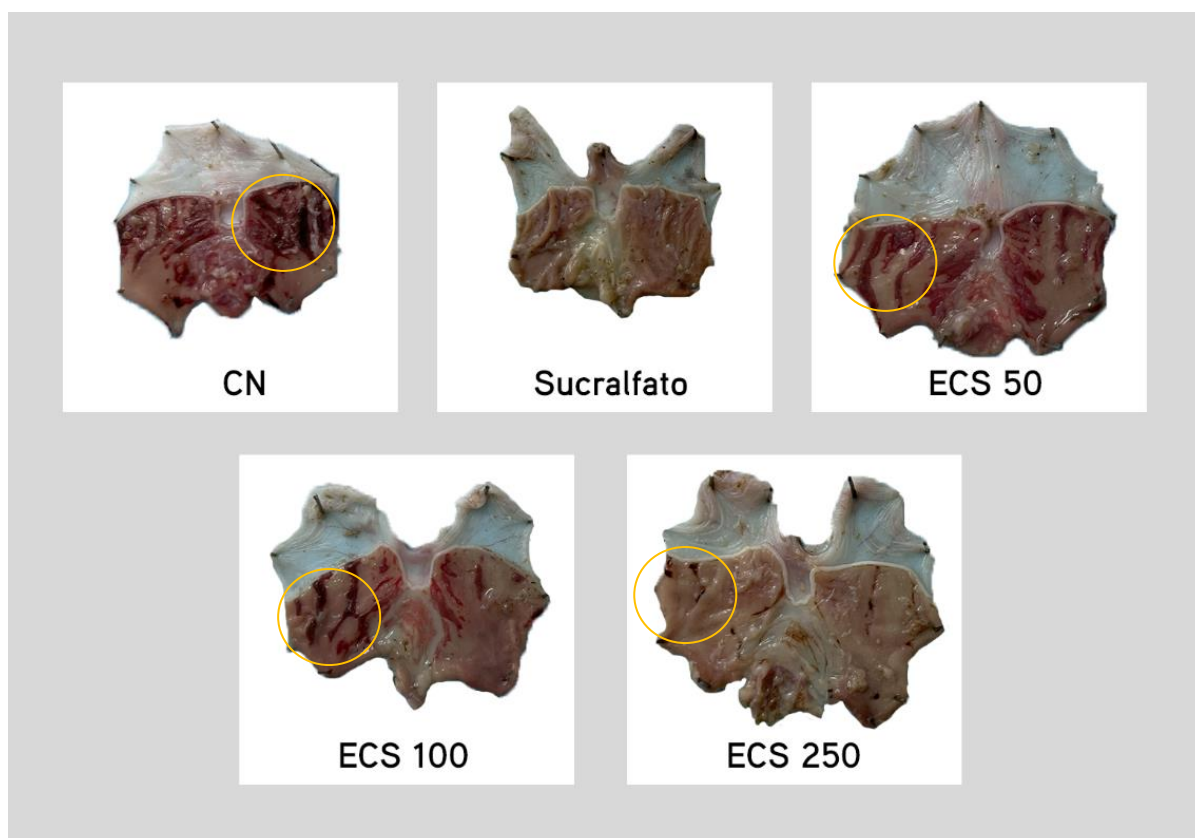
Figura 18 - Gráfico do efeito citoprotetor do ECS sobre as lesões induzidas com etanol



Os animais receberam 0,5 ml/100g de etanol 100% (via oral) 30 min após os respectivos tratamentos, sendo eutanasiados 50 min pós indução (n=6/grupo). **CN**: controle negativo; **ECS**:

extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg, respectivamente. Média $\pm$ Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns** = não significativo ($p > 0,05$); os asteriscos indicam progressivamente significância estatística (* $p = 0,0152$ até **** $p < 0,0001$)

Figura 19 - Efeito do tratamento com ECS sobre as alterações morfológicas na indução de lesão com etanol



Fonte: elaborado pela autora.

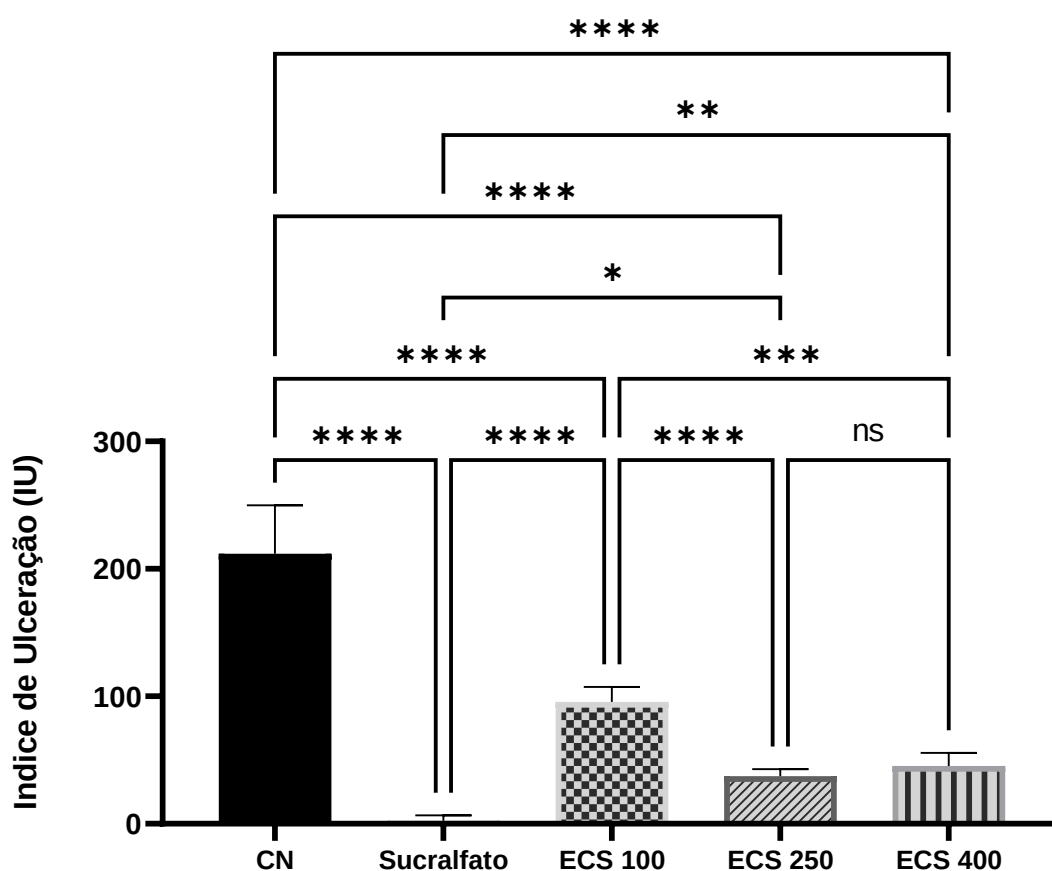
Fotos dos estômagos pós-indução de lesão com etanol 100% (0,5 ml/100g). Principais pontos de lesão indicados pelo círculo amarelo. **CN**: controle negativo; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg, respectivamente

5.2.2 INDOMETACINA

Nas lesões induzidas por indometacina, tanto o controle positivo (sucralfato), quanto as três doses testadas do ECS (100, 250 e 400 mg/kg) apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, ou seja, foram eficazes na contenção das lesões ($p = 0,0001$). A comparação entre as doses de ECS e o controle positivo sucralfato demonstrou diferença estatística significativa ($p \leq 0,0416$). Ou seja, o tratamento padrão ainda é mais eficaz no controle das lesões induzidas por

indometacina (Figura 20). Porém, como demonstrado pelo gráfico estatístico do índice de ulceração, na comparação entre doses de 250 e 400 mg/kg de ECS foi não observada diferença significativa ($p>0,05$), sendo estatisticamente equivalentes entre si, porém superiores a dose de 100 mg/kg ($p\leq 0,0010$). A figura 21 ilustra o efeito do tratamento com ECS sobre as alterações morfológicas na mucosa gástrica induzidas por lesões agudas de indometacina.

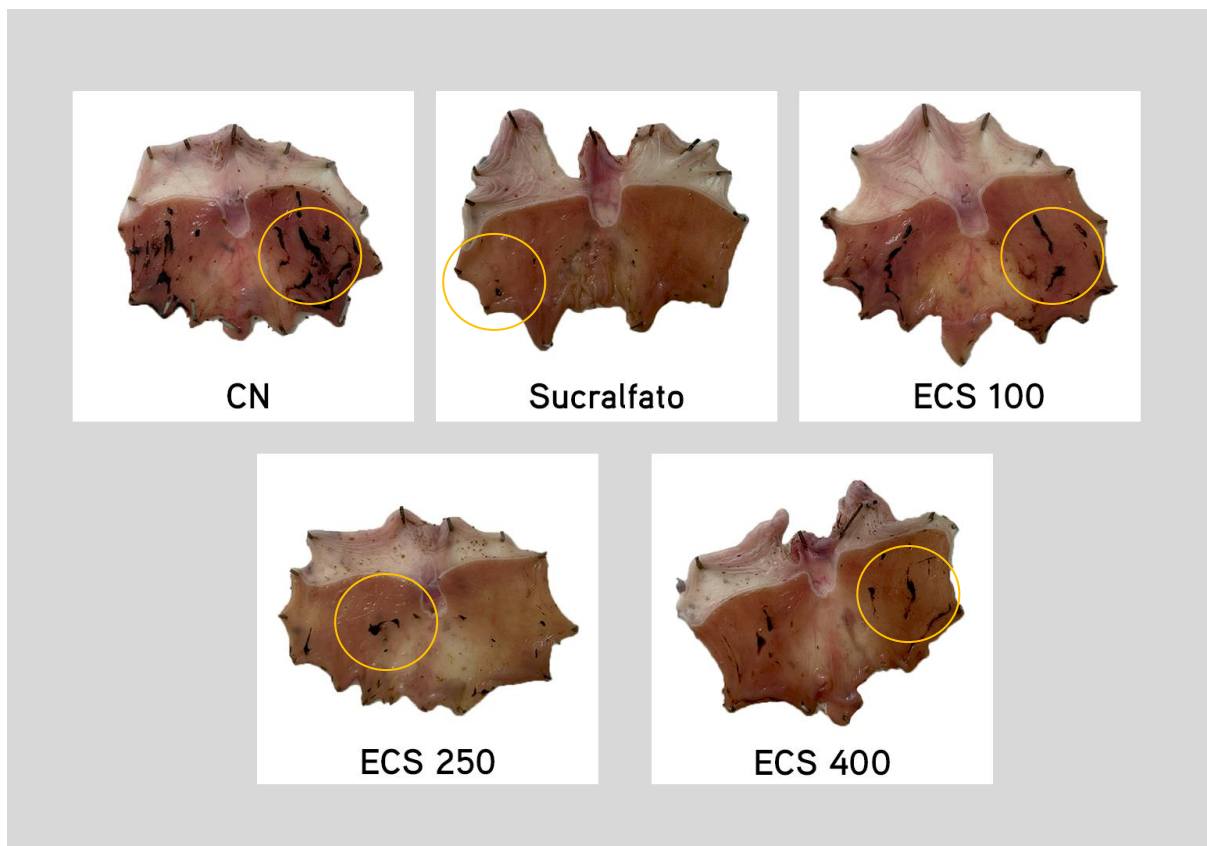
Figura 20 - Gráfico do efeito citoprotetor do ECS sobre as lesões induzidas com indometacina



Fonte: elaborado pela autora.

Os animais receberam os respectivos tratamentos 30 min antes da indução de lesão com 50mg/kg de indometacina (subcutânea) e 3h após. Sendo eutanasiados 50 min após o segundo tratamento (n=6/grupo). **CN**: controle negativo; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 100 mg/kg; 250 mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente. Média $\pm$ Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns** = não significativo ($p>0,05$); os asteriscos indicam progressivamente significância estatística (* $p=0,0416$ até **** $p<0,0001$)

Figura 21 - Efeito do tratamento com ECS sobre as alterações morfológicas na indução de lesão com indometacina



Fonte: elaborado pela autora.

Fotos dos estômagos pós-indução de lesão com indometacina (50 mg/kg). Principais pontos de lesão indicados pelo círculo amarelo. **CN**: controle negativo; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 100 mg/kg; 250 mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente

5.2.3 ACIDEZ GÁSTRICA: LIGADURA DE PILORO

A partir dos resultados experimentos de citoproteção e cicatrização, apresentados anteriormente, foi determinada a curva dose-resposta, com a indicação da dose de 250 mg/kg como sendo a mais efetiva do extrato. Essa dose foi utilizada para analisar possíveis mecanismo de ação através de um modelo que avalia, por via intraduodenal, o efeito da suplementação de ECS sobre a acidez gástrica (ligadura de piloro).

Não houve diferença estatística significativa na comparação entre o extrato e o controle positivo, porém o controle positivo Omeprazol se mostrou eficiente no

controle da acidez gástrica em relação ao controle negativo (Tabela 1) ($p < 0,05$). Demonstrando que a via de ação do ECS não se dá por redução do pH.

Tabela 1. Efeito do tratamento ECS sobre a acidez gástrica

Tratamento	Dose	pH (-log[H ⁺])	Acidez total (mmol/ml/4h)
Controle Negativo	Veículo (água)	0,9931±0,1342	0,1458±0,01170
Omeprazol	20 mg/kg	1,163±0,1927	0,03667±0,001862*
ECS	250 mg/Kg	1,149±0,3154	0,08640±0,05564

Fonte: elaborado pela autora.

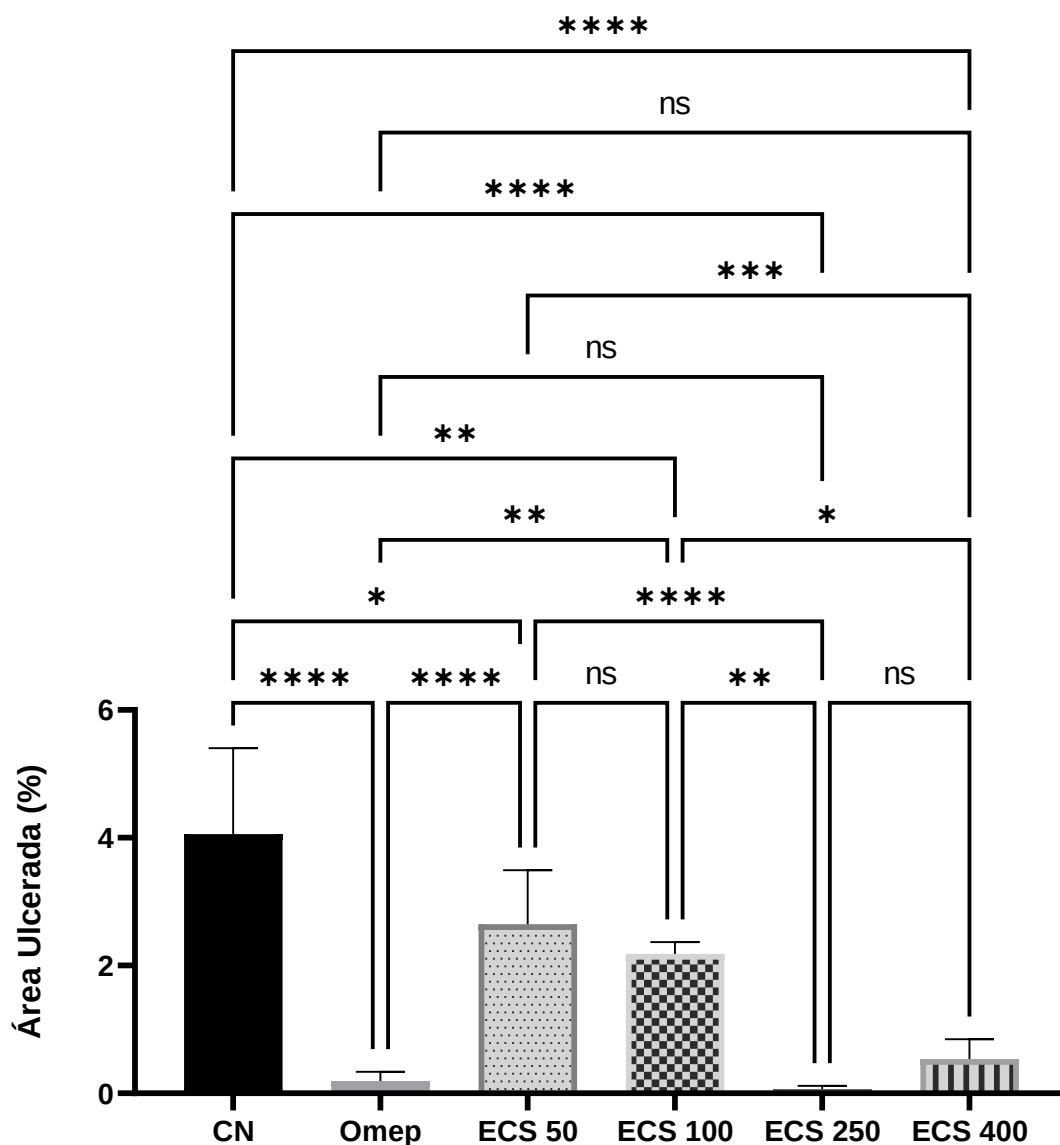
Os animais foram submetidos a laparotomia para amarração do piloro e quantificação da acidez gástrica 4h após o procedimento (n=6/grupo). **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Média ± Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Dunnett. *estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,05$)

5.3 Protocolo de Cicatrização Gástrica

5.3.1 ÁCIDO ACÉTICO

Todas as doses de ECS (50, 100, 250 e 400 mg/kg) e o controle positivo (omeprazol) foram eficazes na contenção das lesões em comparação ao controle negativo ($p \leq 0,0039$), como podemos conferir no gráfico estatístico da proporção de área ulcerada (Figura 22). Não houve diferença entre a dose de 50 e 100 mg/kg e entre 250 e 400 mg/kg ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa na comparação entre as doses de 250 e 400 mg/kg e o controle positivo ($p > 0,05$), o que demonstram que o extrato, nessa faixa de dosagem, pode ser comparado ao tratamento padrão com omeprazol. Sendo a dose de 250 mg/kg a mais promissora, não indicando necessidade de aumento da dosagem. A figura 23 ilustra o efeito do tratamento com ECS sobre as alterações morfológicas resultantes da indução de lesão gástrica crônica usando o ácido acético.

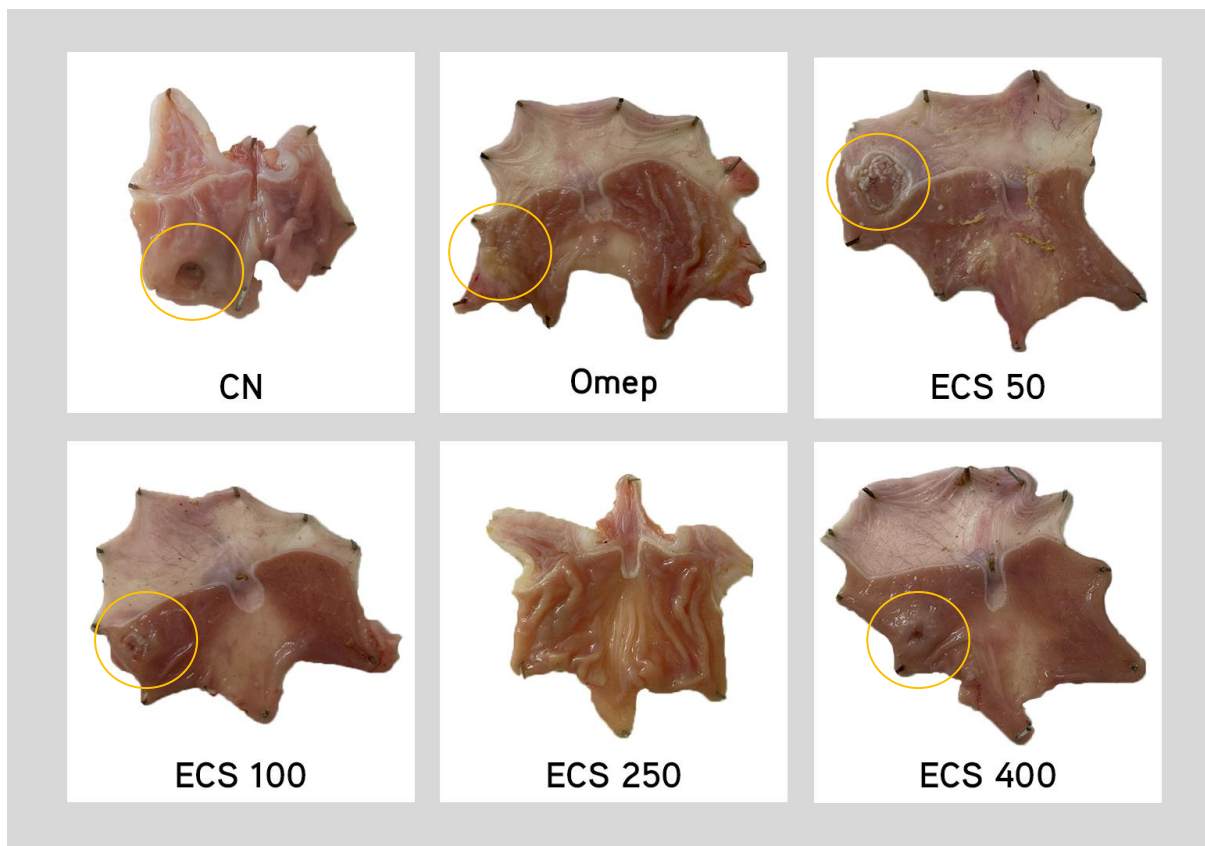
Figura 22 - Gráfico do efeito cicatrizante do ECS sobre as lesões induzidas com ácido acético



Fonte: elaborado pela autora.

Os animais foram submetidos a laparotomia para a indução da lesão por ácido do acético 10% (n=10/grupo). O tratamento iniciou 24h após e teve duração de 8 dias. **CN**: controle negativo; **Omep**: omeprazol; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente. Média ± Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns** = não significativo ($p > 0,05$); os asteriscos indicam progressivamente significância estatística (* $p = 0,0283$ até **** $p < 0,0001$)

Figura 23 - Efeito do tratamento com ECS sobre as alterações morfológicas na indução de lesão com ácido acético



Fonte: elaborado pela autora.

Fotos dos estômagos pós-indução de lesão com ácido acético 10% (50 µl). Área ulcerada indicada pelo círculo amarelo **CN**: controle negativo; **Omep**: omeprazol; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente

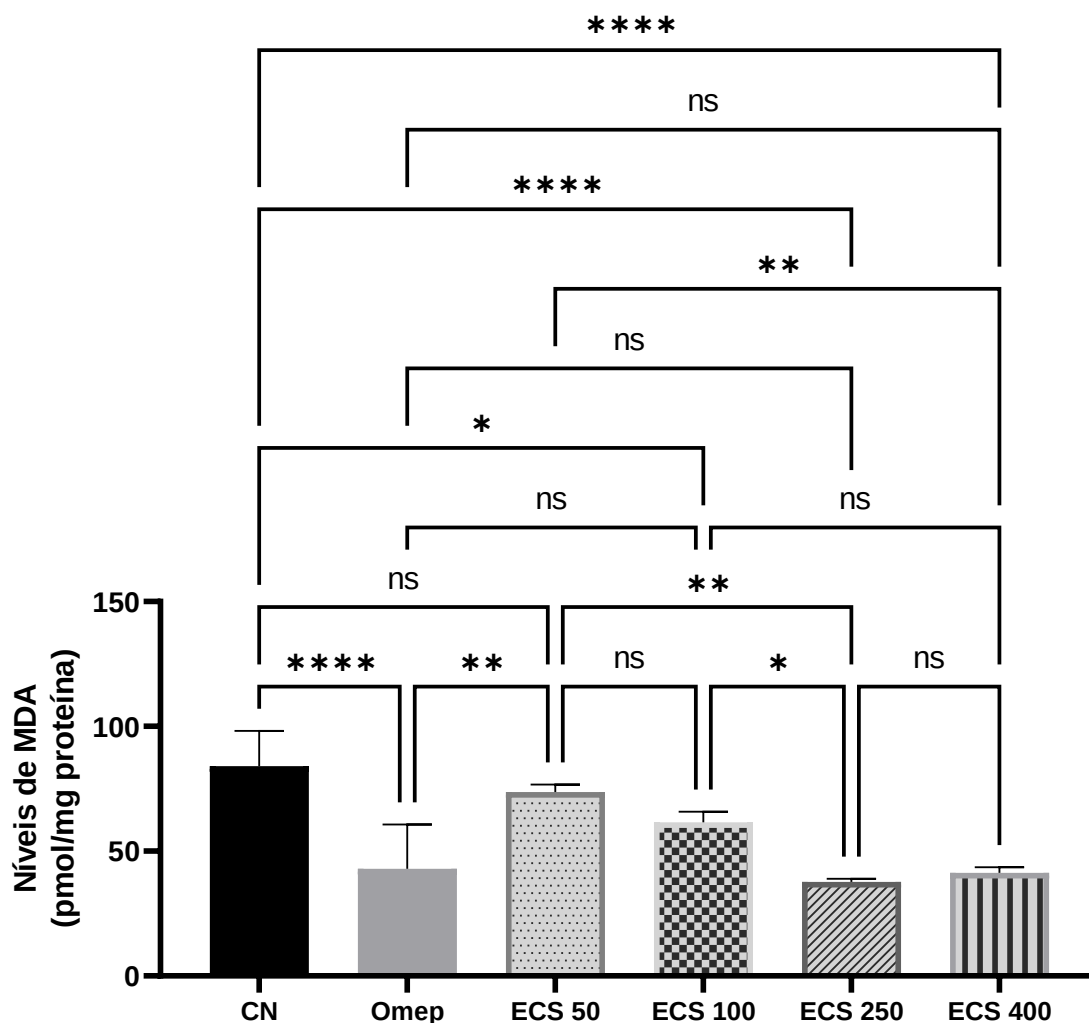
5.4 Estresse Oxidativo

5.4.1 TBARS

Como observado no gráfico da Figura 24, não houve diferença estatística significativa entre o controle negativo e a menor dose do extrato (50 mg/kg de ECS) ($p > 0,05$). Os resultados demonstram que o ECS começa a influenciar os níveis de MDA a partir de 100 mg/kg, uma vez que foram estatisticamente significativas as comparações entre o controle negativo e o controle positivo omeprazol ($p < 0,0001$), assim como entre o controle negativo e as doses de 100, 250 e 400 mg/kg ECS ($p \leq 0,0187$). As doses de 100, 250 e 400 mg/kg ECS obtiveram um desempenho comparável ao tratamento padrão, uma vez que não houve diferença significativa nas suas respectivas comparações como o omeprazol ($p > 0,05$), sendo a dose de 250

mg/kg ECS superior a dose de 100 mg/kg ($p=0,0174$) e estatisticamente equivalente a dose de 400 mg/kg ECS ($p>0,05$).

Figura 24 – Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre os níveis de MDA



Fonte: elaborado pela autora.

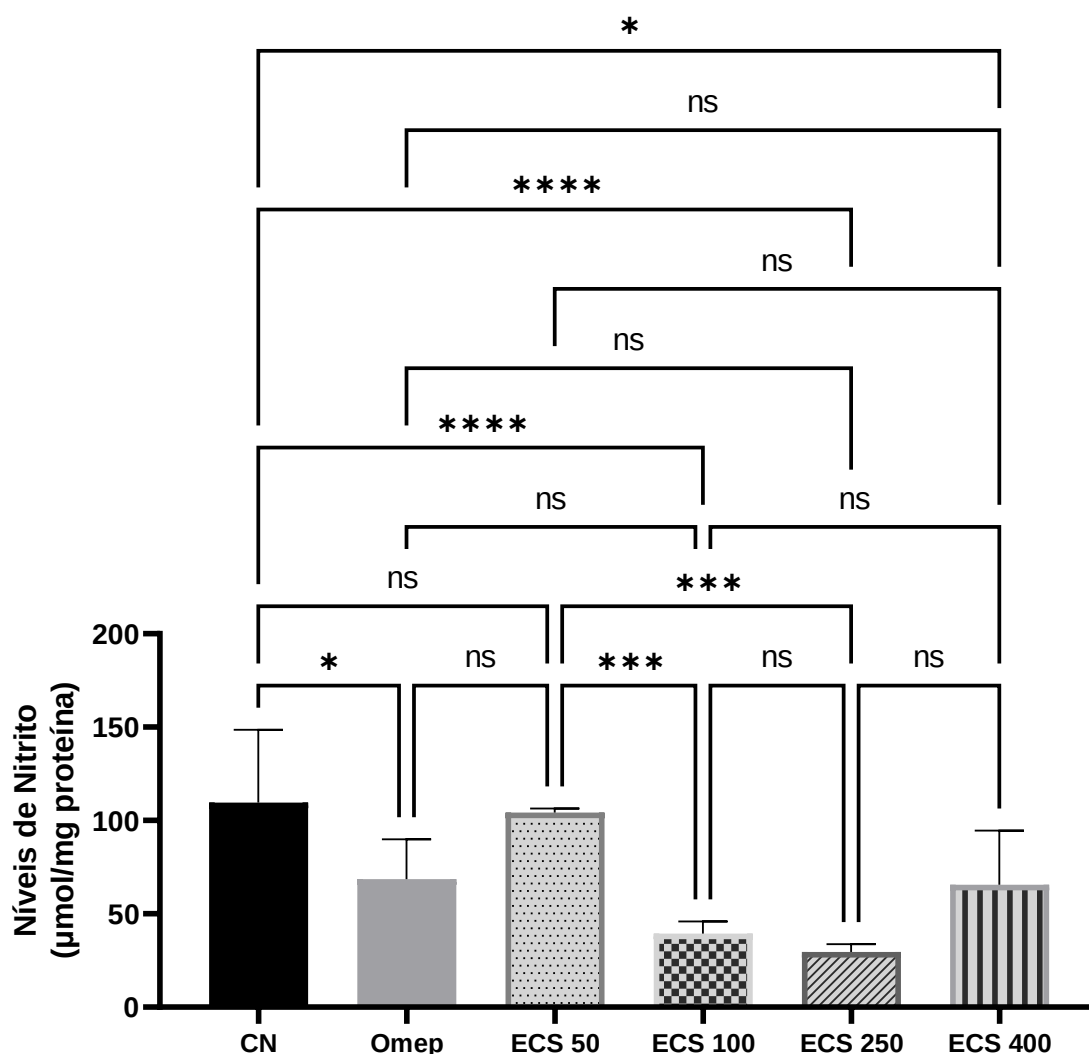
Quantificação dos níveis de malonaldeído (**MDA**) ($n=10/\text{grupo}$). **CN**: controle negativo; **Omep**: omeprazol; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente. Média $\pm$ Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns** = não significativo ($p>0,05$); os asteriscos indicam progressivamente significância estatística (* $p\leq 0,0187$ até **** $p < 0,0001$)

5.4.2 NITRITO

O controle positivo omeprazol foi capaz de reduzir significativamente os níveis de nitrito em comparação ao controle negativo ($p=0,0382$) (Figura 25). Porém não

houve redução significativa na comparação entre o controle negativo e a menor dose de ECS (50 mg/kg) ($p > 0,05$). Os níveis de nitrito começaram a reduzir significativamente a partir da dose de 100 mg/kg de ECS ($p < 0,0001$). As doses de 100, 250 e 400 mg/kg ECS não diferiram significativamente do controle positivo, nem entre si, sendo estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$).

Figura 25 – Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre os níveis de Nitrito



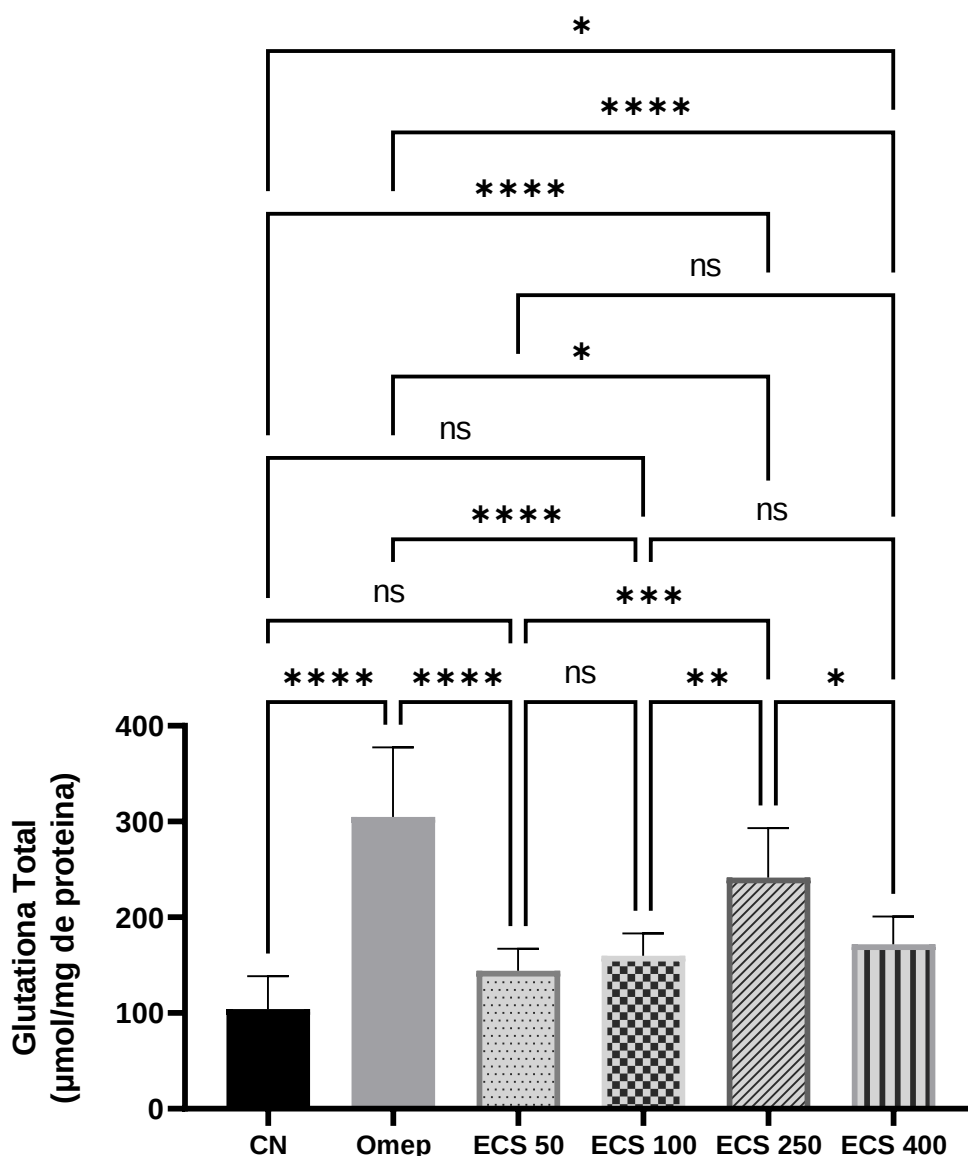
Fonte: elaborado pela autora.

Quantificação dos níveis de nitrito ($n=10$ /grupo). **CN**: controle negativo; **Omep**: omeprazol; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente. Média $\pm$ Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns** = não significativo ($p > 0,05$); os asteriscos indicam progressivamente significância estatística (* $p \leq 0,0382$ até **** $p < 0,0001$)

5.4.3 GLUTATIONA TOTAL

As doses de 50 e 100 mg/kg de ECS não aumentaram significativamente a glutathiona total em relação ao controle negativo ($p > 0,05$) (Figura 26). Já as doses de 250 e 400 mg/kg de ECS ($p \leq 0,0398$) e controle positivo omeprazol ($p < 0,0001$) foram estatisticamente significativos em relação ao controle negativo. O tratamento padrão com omeprazol foi estatisticamente superior as doses de 250 e 400 mg/kg de ECS ($p \leq 0,0196$), sendo a dose de 250 mg/kg ECS estatisticamente superior a dose de 400 mg/kg ECS ($p = 0,0260$) quanto a capacidade de aumentar a glutathiona total.

Figura 26 - Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre a Glutathiona Total



Fonte: elaborado pela autora.

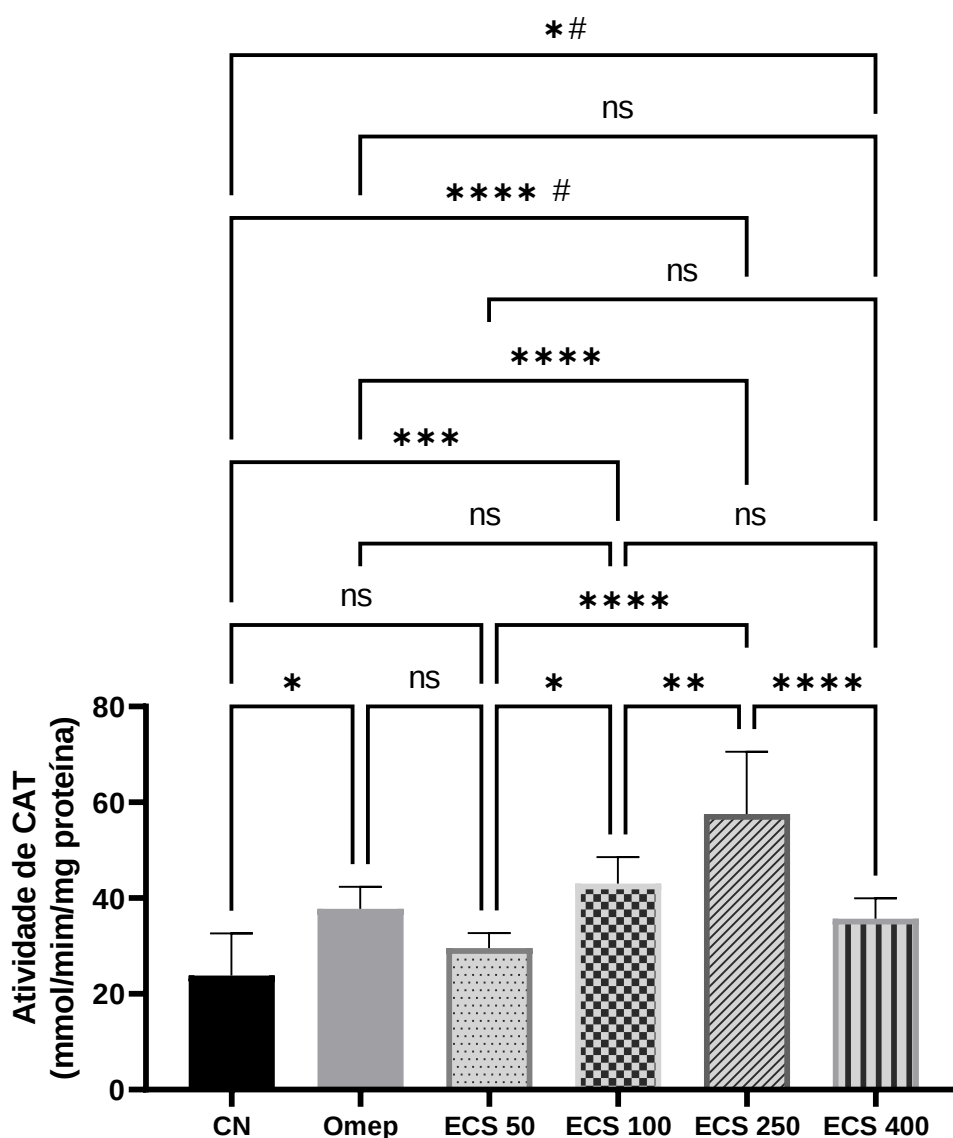
Quantificação da Glutathiona Total (n=10/grupo). **CN**: controle negativo; **Omep**: omeprazol; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente. Média ± Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns** = não significativo ($p > 0,05$); os asteriscos indicam progressivamente significância estatística (* $p \leq 0,0398$ até **** $p < 0,0001$)

5.4.4 CATALASE

A dose de 50 mg/kg ECS não foi capaz de influenciar significativamente a atividade da enzima catalase em relação ao controle negativo ($p > 0,05$) (Figura 27).

Contudo houve aumento estatisticamente significativo na comparação entre o controle negativo e as outras doses de ECS (100, 250 e 400 mg/kg) e, entre o controle negativo e controle positivo omeprazol ($p \leq 0,0444$). O desempenho das doses de 100 e 400 mg/kg foi equivalente e ambas se igualaram ao desempenho do controle positivo, ou seja, não houve diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$). Entretanto, a dose de 250 mg/kg ECS foi significativamente superior ao controle positivo em relação a aumento da atividade da catalase ($p < 0,0001$).

Figura 27 - Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre a atividade de CAT



Fonte: elaborado pela autora.

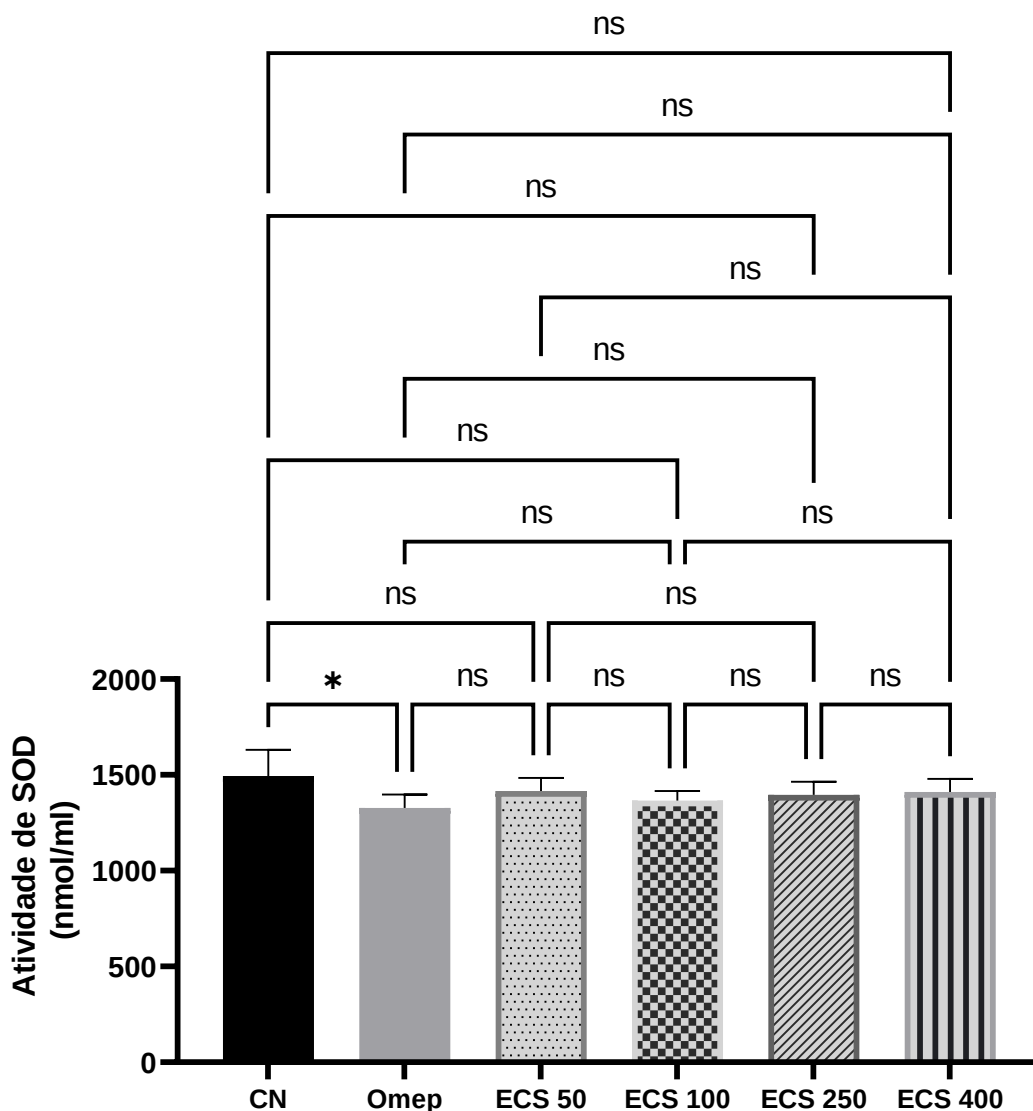
Quantificação da atividade da catalase (**CAT**) (n=10/grupo). **CN**: controle negativo; **Omep**: omeprazol; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250

mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente. Média $\pm$ Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns** = não significativo ($p > 0,05$); os asteriscos indicam progressivamente significância estatística (* $p = 0,0444$; * $p \leq 0,0197$ até **** e **** $p < 0,0001$)

5.4.5 SUPERÓXIDO DISMUTASE

Apenas o tratamento padrão com omeprazol foi capaz de aumentar significativamente a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) ($p = 0,0343$) (Figura 28). Nenhuma das doses do ECS apresentou efeitos estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Figura 28 – Gráfico do efeito do tratamento com ECS sobre a atividade de SOD



Fonte: elaborado pela autora.

Quantificação da atividade da superóxido desmutase (SOD) (n=10/grupo). **CN**: controle negativo; **Omep**: omeprazol; **ECS**: extrato padronizado de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas doses de 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg; 400 mg/kg, respectivamente. Média $\pm$ Desvio Padrão. ANOVA pós-teste Tukey. **ns** = não significativo ($p > 0,05$); o asterisco indica significância estatística (* $p = 0,0343$)

6 DISCUSSÃO

Os efeitos multialvo, multiníveis e multivias de tratamentos a base de produtos naturais, vem ganhando cada vez mais espaço no manejo da úlcera gástrica (GONG *et al.*, 2024) como um contraponto aos efeitos adversos encontrados na terapêutica alopática sintética de referência. Uma vez que a terapia medicamentosa contra úlcera gástrica apesar de eficiente, pode apresentar efeitos adversos desfavoráveis, além de resistência aos medicamentos e grande probabilidade de reincidência após a descontinuação do tratamento (ALSINNARI *et al.*, 2022; DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). Esses fatores têm intensificado a busca por novos compostos medicinais, onde produtos fitoterápicos como o ECS, são altamente promissores (ARDALANI; HADIPANAH; SAHEBKAR, 2020; RUIZ-HURTADO *et al.*, 2021).

Considerando que lesões epiteliais da mucosa gástrica levam a problemas gastrointestinais, o ECS demonstrou resultados positivos no ensaio de cicatrização *in vitro* ao promover a reestruturação da monocamada celular epitelial de células Vero, sendo capaz de retirar as células do carenciamento gerado pelo ambiente de FBS a 1%, pois essa concentração abaixo do ideal coloca as células em situação de privação nutricional, uma vez que o FBS é um meio altamente nutritivo que proporciona a proliferação e viabilidade das culturas celulares (LIU *et al.*, 2023). Além disso, o ECS agiu mais rapidamente, necessitando de um menor tempo de exposição em relação ao controle positivo suplementado a 5% FBS (Figura 17). Isso torna-se particularmente interessante quando se leva em conta que a migração de células remanescente ocorre nas primeiras 24 horas após uma lesão, para posteriormente acontecer a proliferação de novas células, caracterizando a segunda fase do mecanismo de cicatrização (SYARINA *et al.*, 2015).

De modo geral, compostos antioxidantes, como os presentes no ECS, exercem papel fundamental na recuperação de feridas (KURAHASHI; FUJII, 2015; CANO SANCHEZ *et al.*, 2018). A presença de EROs pode comprometer a cascata de cicatrização, por danificar os tecidos circundantes durante a fase inflamatória (SOIB *et al.*, 2020). Portanto componentes protetores associados à atividade sequestradora de radicais, podem estimular a migração de células em direção à área afetada (SOIB *et al.*, 2020).

Na literatura científica, o ácido ascórbico é provavelmente o componente do ECS mais fortemente relacionado a cicatrização de feridas em testes *in vitro*, por ser uma biomolécula envolvida em todas as fases desse processo (CHONG *et al.*, 2022; ALHADHRAMI; ALATAWI, 2023; RAVI *et al.*, 2023). Contudo, os outros componentes do ECS possuem grande potencial, uma vez que os resultados apresentados pelo ensaio do arranhão também podem estar influenciados pela presença dos ácidos hidroxicinâmicos, cujos representantes já demonstraram propriedades cicatrizantes em ensaios de arranhão com fibroblastos, como é o caso do ácido *p*-cumárico (BOEING *et al.*, 2021).

Ainda dentre os ácidos hidroxicinâmicos, há indícios de que a natureza mais lipofílica do ácido *trans*-cinâmico aumentaria o seu potencial como candidato a fármaco, uma vez que seu uso resultou em aumento da migração de fibroblastos quando comparado com células tratadas com ácido *p*-cumárico (VIANA; AQUINO; BARRETO, 2021). Já a liberação controlada de ácido ferúlico, através de interações célula-célula, favoreceu o crescimento e migração celular para a área danificada em cultura celular 3D com fibroblastos (SIVAKUMAR *et al.*, 2021). Contudo, em ensaios de cicatrização com queratinócitos, o ácido caféico demonstrou maior eficiência no fechamento de feridas em comparação ao ácido ferúlico (JUNEJA *et al.*, 2019). Entre as flavanonas presentes em ECS, a hesperidina demonstrou efeitos positivos na migração de queratinócitos e fibroblastos através da ativação da via Wnt/ β -catenina, fundamental no processo de cicatrização de feridas através da regeneração tecidual (YOON *et al.*, 2022).

Tendo em vista que, assim como os fibroblastos, os queratinócitos também estão envolvidos na complexa cascata de eventos que envolvem a cicatrização, a capacidade dos compostos presente no ECS de estimular a migração em vários tipos celulares é fundamental na aceleração dessa cascata de eventos.

Os achados *in vitro*, reforçaram a hipótese de que o ECS apresenta potencial no tratamento da úlcera gástrica, embasando sua aplicação em modelos *in vivo*. Considerando a etiologia multifatorial da úlcera gástrica, diferentes modelos de indução de lesão são necessários na investigação de um potencial agente terapêutico. Os ensaios de citoproteção aplicados abrangeram indução de lesões por contato com etanol, relacionadas ao aumento do estresse oxidativo e redução das defesas antioxidantes da mucosa (REPETTO; LLESUY, 2002) e; lesões causadas por

indometacina, relacionadas a capacidade dos AINEs de inibir a produção de prostaglandinas (PATRIGNANI; PATRONO, 2015). Tanto nos ensaios com etanol, quanto nos ensaios com indometacina, o sucralfato foi usado como controle positivo por ser uma terapia padrão que se enquadra bem em casos de lesões agudas, devido a sua capacidade de formar rapidamente um filme protetor sobre a mucosa gástrica (SULOCHANA *et al.*, 2016).

O etanol penetra rapidamente na mucosa gástrica e causa lesões acompanhadas de edema, danos à membrana, esfoliação celular com alteração de células epiteliais e vasculares, necrose e infiltração de leucócitos na camada submucosa, erosão e formação de úlceras (LI *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2015; ABOUL NASER *et al.*, 2020). A redução dos sinais morfológicos que foi observada indica que o tratamento com ECS (Figura 18) foi capaz de proteger contra lesões gástricas induzidas pela administração de etanol tão bem quanto o controle positivo. Resultados positivos são encontrados quando se analisa os compostos do ECS de forma isolada contra lesões gástricas induzidas dessa procedência, por exemplo, o efeito protetor da cianidina 3-glicosídeo (C3G) (LI *et al.*, 2008) e da nanoemulsão com ácido ferúlico (ABD-ALLAH *et al.*, 2024). Contudo, foram encontrados resultados mais satisfatórios utilizando altas doses do extrato da casca de *Citrus sinensis* L Osbeck (400 mg/kg) em comparação com o uso isolado de hesperidina (SELMİ *et al.*, 2017), o que reforça o poder da atuação sinérgica dos componentes do ECS.

A indometacina possui o maior potencial ulcerogênico para humanos entre os AINEs mais comuns (CHANUDOM, TANGPONG, 2015). Existem evidências de que outros fatores independentes de COX também atuam nesse processo, já que a indometacina é um indutor de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em modelos animais (POLAT; SULEYMAN; ALP, 2010), o que pode contribuir para as lesões na mucosa. A capacidade de reduzir o índice de ulceração demonstrada pelo ECS no modelo de indução com indometacina (Figura 20), pode estar associada, assim como no modelo de etanol, a estimulação do sistema antioxidante, dadas as propriedades gastroprotetoras do ácido ascórbico relacionadas aos seus efeitos positivos no sistema antioxidante e na diminuição atividade da mieloperoxidase (enzima que contribui para o dano tecidual na inflamação) demonstradas em úlceras gástricas induzidas por indometacina (KOC *et al.*, 2008). O ácido felúrico também demonstrou

capacidade de suprimir o estresse oxidativo e a inflamação em úlceras gástricas no mesmo modelo de úlceras (ERMIS *et al.*, 2023).

Os achados promissores quanto a citoproteção deram margem para a investigação da capacidade de cicatrização gástrica do ECS, através da indução de lesões com ácido acético. Nesse modelo o ácido acético provoca lesão vascular e necrose isquêmica, o que provoca o surgimento de uma lesão com características patológicas e processo de cicatrização muito semelhante às úlceras humanas, inclusive pela possibilidade de recidiva, simulando uma ulceração crônica (OKABE; AMAGASE, 2005). A terapia padrão usada como controle positivo foi o omeprazol, tratamento de primeira escolha como inibidor da secreção ácida e usado no tratamento de lesões persistentes.

Assim como ocorrido *in vitro*, o tratamento com ECS demonstrou propriedades cicatrizantes também *in vivo* (Figura 22), estando de acordo com os achados em úlcera gástrica induzida por ácido acético usando ácido hidroxicinâmico *p*-cumárico como tratamento, cujos efeitos benéficos foram associados ao aumento dos níveis de mucina, redução da glutathione, diminuição da quantidade de hidroperóxidos lipídicos e aumento das atividades da superóxido dismutase e catalase sem interferir na atividade da mieloperoxidase no tecido gástrico (BOEING *et al.*, 2021). Além disso, outro ácido hidroxicinâmico presente no ECS (ácido sinápico) já demonstrou capacidade de reduzir as lesões macroscópicas, suprimir a inflamação, o estresse oxidativo e a apoptose nos tecidos do cólon em colite ulcerativa induzida por ácido acético (SHAHID *et al.*, 2022). Entre as flavanonas presentes no ECS, a hesperidina revelou atividade cicatrizante gástrica na mucosa ulcerada com ácido acético pela redução do estresse oxidativo e da inflamação devido à redução da migração de neutrófilos, além de um significativo favorecimento da produção de mucina (DA SILVA *et al.*, 2019).

A redução da acidez gástrica é o principal mecanismo de ação terapêutica na úlcera gástrica, sendo a via de atuação de fármacos de primeira escolha como omeprazol. Portanto o ensaio de ligadura de piloro buscou investigar se esta seria a via através da qual o ECS é capaz de exercer um efeito positivo sobre as defesas antioxidantes da mucosa gástrica. Os resultados demonstraram que o extrato não reduziu o pH do suco gástrico de forma significativa (Tabela 1). Contudo outras vias podem ser propostas, pois alguns dos compostos presentes no ECS já demonstraram

favorecer o aumento dos níveis de mucina, como o ácido *p*-cumárico (BOEING *et al.*, 2021) e a hesperidina (DA SILVA *et al.*, 2019). Portanto a atuação do ECS pode estar ligada a um mecanismo citoprotetor de barreira, pois o aumento na produção de muco auxilia na prevenção de lesão ao contribuir com manutenção da integridade da mucosa, bem como no processo cicatricial (repavimentação do epitélio) ao proteger a área ulcerada contra agressores endógenos, como as secreções estomacais e, contra agressores exógenos, como os AINEs, álcool, alimentação desequilibrada, estresse, entre outros (KAWAI *et al.*, 1994; SENO *et al.*, 1995; CHANUDOM, TANGPONG, 2015).

O ECS atuou positivamente sobre os marcadores de estresse oxidativo MDA, nitrito, GSH e na atividade da CAT (Figuras 24, 25, 26 e 27, respectivamente), dosados no tecido ulcerado pelo ácido acético. Como marcador indireto da produção de óxido nítrico (NO), a capacidade de reduzir os níveis de nitrito demonstrada pelo ECS é relevante no contexto da úlcera gástrica, pois o NO gerado a partir da iNOS (óxido nítrico-sintase induzida) atua na indução de úlcera gástrica através da formação de espécies reativas de oxigênio e consequentes efeitos tóxicos nas células (Cho, 2001), estando ligado a carcinogênese (EISENBRAND *et al.*, 1984; TARI *et al.*, 2003; VENTURINI *et al.*, 2024). Lesões gástricas induzidas por ácido acético apresentam superexpressão de iNOS, diretamente proporcional ao aumento da cratera da úlcera, indicando que a iNOS pode contribuir para a inflamação dos tecidos durante a formação da lesão (GUO *et al.*, 2003).

Ademais, a ulceração gástrica induzida por ácido acético diminui os níveis de GSH (GARABADU *et al.*, 2021), aumenta a peroxidação lipídica, indicada pelo aumento dos níveis teciduais de MDA e, reduz a atividade enzimática de SOD e CAT (DA SILVA *et al.*, 2019; FOADODDINI *et al.*, 2022). O aumento da atividade de enzimas antioxidantes após exposição da mucosa gástrica ao ácido acético é um mecanismo de combate a geração de EROs, principalmente o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) no caso da SOD e, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no caso da catalase (da Silva *et al.*, 2019). O $O_2^{\cdot-}$ é uma espécie reativa de oxigênio muito comum e que pode causar sérios danos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Como parte do mecanismo de defesa do organismo, a SOD converte $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e, a catalase (CAT) converte o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Contudo, apesar dos níveis de SOD não terem sido influenciados pelo ECS (Figura 28), ainda podemos afirmar que o extrato atuou em favor de defesas antioxidantes em relação a CAT e GSH. Uma vez que, mesmo não sendo um radical livre (por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica), o H_2O_2 também é uma espécie com alto potencial reativo, pois participa da reação de geração da hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), o mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima (BARBOSA *et al.*, 2010). Além disso, diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares, tornando-se potencialmente tóxico para as células (BARBOSA *et al.*, 2010). GSH, por sua vez, além de acelerar o processo de cicatrização agindo na redução das reações inflamatórias, também participa das reações de metabolização de peróxidos, como H_2O_2 , no metabolismo de antioxidantes exógenos, como o ácido ascórbico e, atua como substrato para várias enzimas antioxidantes, como glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (CNUBBEN *et al.*, 2001).

O MDA é um marcador de peroxidação lipídica, processo mediado pela interação dos radicais hidroxila com a membrana celular; posteriormente produzindo radicais livres derivados de lipídios, conhecidos por serem produtos extremamente reativos e que causam danos oxidativos (REPETTO; LLESUY, 2002). A capacidade do ECS de reduzir os níveis de MDA indica que ele atua como eliminador de EROs e, reforça a hipótese do mecanismo de ação sobre a barreira muco-protetora, uma vez que aumento da peroxidação lipídica está envolvido no aumento da vulnerabilidade da mucosa gástrica, por prejudicar a barreira mucosa e facilitar a ocorrência de úlceras gástricas (ÖNER; IZGÜT-UYSAL; SENTÜRK, 1994); ao mesmo tempo que uma das funções da camada de muco é a retenção de radicais livres, fornecendo proteção antioxidante para as células mucosas epiteliais e assim impedindo as lesões oxidativas (ESTIVALLET; RODRIGUES; MARRONI, 1998). Portanto, a atuação do ECS sobre a ulceração gástrica parece estar fortemente ligada a regulação das defesas antioxidantes, atuando no balanço favorável entre os fatores agressores e protetivos da mucosa.

7 CONCLUSÃO

O ECS demonstrou potencial terapêutico ao atuar benéficamente nos variados modelos de lesão gástrica aplicados, apontando para um possível papel citoprotetor e cicatrizante dose-dependente, relacionado ao balanço positivo das defesas antioxidantes. De modo geral, a dose de 250 mg/kg foi a que obteve os melhores resultados, contudo em relação a dose de 400 mg/kg, pode ser observada uma tendência negativa, indicando que acima desse valor podemos estar saindo da faixa de segurança e entrando em uma dosagem tóxica com possíveis efeitos deletérios a mucosa gástrica. Dados os resultados negativos no ensaio de acidez gástrica, pode-se propor que o ECS promove citoproteção agindo na barreira mucoprotetora; além de atuar na migração celular, influenciando na repavimentação do tecido para cicatrização da úlcera gástrica. Os efeitos demonstrados pelo ECS, podem estar relacionados ao efeito sinérgico dos compostos majoritários presentes no extrato, associados a via multiação de cada composto, atuando simultaneamente na cicatrização e gastroproteção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLAH, Hend et al. Ferulic acid nanoemulsion as a promising anti-ulcer tool: in vitro and in vivo assessment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 50, n. 5, p. 460-469, 2024. DOI: 10.1080/03639045.2024.2341786

ABOUL NASER, Asmaa et al. Management of Citrus sinensis peels for protection and treatment against gastric ulcer induced by ethanol in rats. **Biomarkers**, v. 25, n. 4, p. 349-359, 2020. DOI: 10.1080/1354750X.2020.1759693

ABTAHI-NAEINI, Bahareh et al. Topical sucralfate for treatment of mucocutaneous conditions: A systematic review on clinical evidences. **Dermatologic therapy**, v. 35, n. 4, p. e15334, 2022. DOI: 10.1111/dth.15334.

ADINORTEY, M.B.; ANSAH, C.; GALYUON, I. In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. **Ulcers**, v. 2013, p. 1–12, 2013. DOI: 10.1155/2013/796405

AHMAD, Shihab Uddin et al. Evaluation of wound-healing and antioxidant effects of Marantodes pumilum (Blume) Kuntze in an excision wound model. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 228, 2021. DOI: 10.3390/molecules26010228.

AHMED, OUSMAN; NEDI, TESHOME; YIMER, EBRAHIM M. Evaluation of anti-gastric ulcer activity of aqueous and 80% methanol leaf extracts of Urtica simensis in rats. **Metabolism Open**, v. 14, p. 100172, 2022. DOI: 10.1016/j.metop.2022.100172.

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.

ALHADHRAMI, Nahlah A.; ALATAWI, Raedah AS. Synthesis of nanostructured silica particles for controlled release of ascorbic acid: Microstructure features and in vitro

scratch wound assay. **Biotechnology Journal**, v. 18, n. 7, p. 2300078, 2023. DOI: 10.1002/biot.202300078

ALSINNARI, Yaser M. et al. Risk factors for recurrence of peptic ulcer disease: a retrospective study in tertiary care referral center. **Cureus**, v. 14, n. 2, 2022. DOI: 10.7759/cureus.22001

ARDALANI, Hamidreza; HADIPANAH, Amin; SAHEBKAR, Amirhossein. Medicinal plants in the treatment of peptic ulcer disease: A review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 20, n. 8, p. 662-702, 2020. DOI: 10.2174/1389557520666191227151939

ASCHENBRENNER, Diane S. Ranitidine withdrawn from the market. **AJN The American Journal of Nursing**, v. 120, n. 8, p. 23, 2020. DOI: 10.1097/01.NAJ.0000694552.42987.b0.

AYMARD, Jean-Pierre et al. Haematological adverse effects of histamine H₂-receptor antagonists. **Medical toxicology and adverse drug experience**, v. 3, p. 430-448, 1988.

BACHA, W. J.; WOOD, L. M. **Color atlas of veterinary histology**. 3 ed. Wiley-Blackwell: Philadelphia, 2012. 356 p.

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010. DOI: 10.1590/S1415-52732010000400013

BARREIROS, André LBS; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, p. 113-123, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000100021

BECHARA, Nada; FLOOD, Victoria M.; GUNTON, Jenny E. A systematic review on the role of vitamin C in tissue healing. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1605, 2022. DOI:10.3390/antiox11081605

BI, WEI-PING; MAN, HUI-BIN; MAN, MAO-QIANG. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: a review. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 45, p. 17020, 2014. DOI:10.3748/wjg.v20.i45.17020

BIANO, Laiza S. et al. Gastroprotective action of the ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 284, p. 114792, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114792

BICKEL, Martin; KAUFFMAN JR, Gordon L. Gastric gel mucus thickness: effect of distention, 16, 16-dimethyl prostaglandin e2, and carbenoxolone. **Gastroenterology**, v. 80, n. 4, p. 770-775, 1981.

BIGHETTI, Aparecida Érica; ANTÔNIO, Márcia Aparecida; DE CARVALHO, João Ernerto. Regulação e modulação da secreção gástrica. **Revista de Ciências Médicas**, v. 11, n. 1, 2002.

BIGONIYA, P., SINGH, K. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus sinensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 330-340, 2014. DOI: 10.1016/j.bjp.2014.07.011

BOEING, Thaise et al. Gastric healing effect of p-coumaric acid isolated from *Baccharis dracunculifolia* DC on animal model. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, p. 49-57, 2021. DOI: 10.1007/s00210-020-01928-9

BRANDÃO, L. B.; et al. Aspectos atuais no tratamento da Doença Ulcerosa Péptica. **Revista de Saúde**, v. 10, n. 1Sup, p. 03-07, 2019. DOI: 10.21727/rs.v10i1Sup.1710

BRISKEY, David; MALFA, Giuseppe Antonio; RAO, Amanda. Effectiveness of “Moro” Blood Orange *Citrus sinensis* Osbeck (Rutaceae) Standardized Extract on Weight

Loss in Overweight but Otherwise Healthy Men and Women—A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 427, 2022. DOI: 10.3390/nu14030427

BRUNTON, L. L. In **Goodman The Pharmacological Basis of Therapeutic's**; 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.

CALDERON, Mariano del Sol et al. Combined therapy of Ulmo honey (*Eucryphia cordifolia*) and ascorbic acid to treat venous ulcers. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 23, p. 259-266, 2015. DOI: 10.1590/0104-1169.0020.2550

CÂMARA, José S. et al. Behind the Scenes of Anthocyanins—From the Health Benefits to Potential Applications in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Fields. **Nutrients**, v. 14, n. 23, p. 5133, 2022. DOI: 10.3390/nu14235133

CANO SANCHEZ, Mariola et al. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 98, 2018.. DOI: 10.3390/antiox7080098

CARDILE, V.; GRAZIANO, A. C. E.; VENDITTI, A. Clinical evaluation of Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) orange juice supplementation for the weight management. **Natural product research**, v. 29, n. 23, p. 2256-2260, 2015. DOI:10.1080/14786419.2014.1000897

CAREY, R. M.; PADIA, S. H. Primary mineralocorticoid excess disorders and hypertension. **Endocrinology Adult and Pediatric**. Seventh edition Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 1871-91, 2016.

CAVALCANTI, Rodrigo N.; SANTOS, Diego T.; MEIRELES, Maria Angela A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. **Food research international**, v. 44, n. 2, p. 499-509, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.12.007

CENA, C.; TRAINA, S.; PAROLA, B.; BO, M.; FAGIANO, R.; SIVIERO, C. Prescription of proton pump inhibitors in older adults with complex polytherapy. **European Journal of Hospital Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 341-345, 2020. DOI: 10.1136/ejhpharm-2018-001697

CHANUDOM, Lanchakon; TANGPONG, Jitbanjong. Anti-inflammation property of *Syzygium Cumini* (L.) skeels on indomethacin-induced acute gastric ulceration. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2015, n. 1, p. 343642, 2015. DOI: 10.1155/2015/343642

CHEN, Xiu-Min; TAIT, Andrew R.; KITTS, David D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food chemistry**, v. 218, p. 15-21, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.016

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 253-256, 2001. DOI: 10.1016/S0928-4257(01)00034-1

CHONG, Wai Ting et al. In-vitro and in-vivo evaluations of tocotrienol-rich nanoemulsified system on skin wound healing. **Plos one**, v. 17, n. 5, p. e0267381, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0267381

CNUBBEN, Nicole HP et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 141-152, 2001. DOI: 10.1016/s1382-6689(01)00077-1

DACHA S, RAZVI M, MASSAAD J, CAI Q, WEHBI M. Hypergastrinemia. **Gastroenterol Rep (Oxf)**, 3(3): 201–208, 2015. DOI: 10.1093/gastro/gov004

DA SILVA, Luísa Mota et al. Hesperidin, a citrus flavanone glycoside, accelerates the gastric healing process of acetic acid-induced ulcer in rats. **Chemico-biological interactions**, v. 308, p. 45-50, 2019. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.05.011

DE AQUINO, Fernanda Lima Torres et al. trans-Cinnamic acid, but not p-coumaric acid or methyl cinnamate, induces fibroblast migration through PKA-and p38-MAPK signalling pathways. **Journal of Tissue Viability**, v. 30, n. 3, p. 363-371, 2021. DOI: 10.1016/j.jtv.2021.05.003

DE LIMA, L. P.; BARBOSA, A. P. A review of the lipolytic effects and the reduction of abdominal fat from bioactive compounds and moro orange extracts. **Heliyon** v. 7, n. 8, p. e07695, 2021. DOI:10.1016/j.heliyon.2021.e07695

DE OLIVEIRA, Henrique Souza Barros; CORRADI, Maria Luiza Galoro. Aspectos farmacológicos do idoso: uma revisão integrativa de literatura. **Revista de Medicina**, v. 97, n. 2, p. 165-176, 2018. DOI: 10.11606/issn.1679-9836.v97i2p165-176

DE SOUSA, Deyse Maiane Dias et al. Fitoterápicos utilizados para perda de peso comercializados em farmácias. **Research, Society And Development**, v. 8, n. 4, p. e184930-e184930, 2019.

DIEDERICH, Antje et al. Influence of Ascorbic Acid as a Growth and Differentiation Factor on Dental Stem Cells Used in Regenerative Endodontic Therapies. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 3, p. 1196, 2023. DOI: 10.3390/jcm12031196

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of gastroenterology**, v. 4, n. 3, p. 265-267, 1969.

DOS SANTOS, Julia Rodrigues Martins Pastor; ALBERT, André Luis Mazzei; LEANDRO, Katia Christina. Importância de uma regulamentação específica com as definições e classificações dos produtos comercializados como suplementos alimentares, alimentos funcionais e nutracêuticos. **Revista de Direito Sanitário**, v. 19, n. 3, p. 54-67, 2019.

EISENBRAND, G. et al. Formation of nitrite in gastric juice of patients with various gastric disorders after ingestion of a standard dose of nitrate--a possible risk factor in gastric carcinogenesis. **IARC Scientific Publications**, n. 57, p. 963-968, 1984.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. [s. d.]. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/stomach#/media/1/567085/68634>. Acesso:05 fev. 2023

ENE, M. D.; CLAMP, J. R.; ROBERTS, C. J. Effects of cimetidine and carbenoxolone on gastric mucus. **Gut**, v. 29, n. 5, p. 636-641, 1988.

ERMIS, Aleyna et al. Ferulic acid treats gastric ulcer via suppressing oxidative stress and inflammation. **Life**, v. 13, n. 2, p. 388, 2023. DOI: 10.3390/life13020388

ESTIVALLET, Hidê Virgínia; RODRIGUES, Maria Inês; MARRONI, Norma Possa. Efeito do etanol e do peróxido de hidrogênio intragástrico sobre a mucosa gástrica de rã (*Rana catesbeiana*, SHAW). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, p. 55-66, 1998.

FALLICO, Biagio et al. Bioactive compounds in blood oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Level and intake. **Food chemistry**, v. 215, p. 67-75, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.142.

FARAG, Mohamed A. et al. Sweet and bitter oranges: An updated comparative review of their bioactives, nutrition, food quality, therapeutic merits and biowaste valorization practices. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127306, 2020.

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.

FOADODDINI, Mohsen et al. Therapeutic potential of *Ferula foetida* (Bunge) Regel on gastric ulcer model in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-10, 2022. DOI: 10.1007/s11356-021-16687-0

FORCE, Rex W. et al. Increased vitamin B12 requirement associated with chronic acid suppression therapy. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 37, n. 4, p. 490-493, 2003.

FOYER, Christine H.; SHIGEOKA, Shigeru. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant physiology**, v. 155, n. 1, p. 93-100, 2011. DOI: 10.1104/pp.110.166181

FRALICK, Michael et al. Estimating the use of potentially inappropriate medications among older adults in the United States. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 68, n. 12, p. 2927-2930, 2020. DOI: 10.1111/jgs.16779

FRANK, Juergen et al. Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 5, p. 827-836, 2006. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.034

GADEKAR, R. et al. A potential of some medicinal plants as an antiulcer agents. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 136, 2010. DOI: 10.4103/0973-7847.70906

GARABADU, Debapriya; SINGH, Sonia; GAUTAM, Tancha. *Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard Ameliorates Acetic Acid-induced Rat Gastric Ulcer. **Journal of Dietary Supplements**, v. 18, n. 3, p. 278-292, 2021. DOI: 10.1080/19390211.2020.1770393

GARTNER, L. P.; HIATT, J.L. **Atlas colorido de histologia**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000.

GALENA®. [s. d.]. Disponível em: <https://www.galena.com.br/morosil>. Acesso: 12 jan. 2023

GLAVIN, Gary B.; SZABO, Sandor. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB journal**, v. 6, n. 3, p. 825-831, 1992. DOI: 10.1096/fasebj.6.3.1740232

GONG, Haiying et al. Treatment of gastric ulcer, traditional Chinese medicine may be a better choice. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 117793, 2024. DOI: 10.1016/j.jep.2024.117793

GULATI, Om P.; OTTAWAY, Peter Berry. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. **Toxicology**, v. 221, n. 1, p. 75-87, 2006.

GUNTON, Jenny E. et al. Vitamin C improves healing of foot ulcers: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **British Journal of Nutrition**, v. 126, n. 10, p. 1451-1458, 2021. DOI: 10.1017/S0007114520003815

GUO, Jin-Sheng et al. Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 9, n. 8, p. 1767, 2003. DOI: 10.3748/wjg.v9.i8.1767

HAASTRUP, Peter Fentz et al. Side effects of long-term proton pump inhibitor use: a review. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 123, n. 2, p. 114-121, 2018. DOI: 10.1111/bcpt.13023

HOFFMANN, W. Current status on stem cells and cancers of the gastric epithelium. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 8, p. 19153-19169, 2015. DOI: 10.3390/ijms160819153

HUNT, R. H. et al. The stomach in health and disease. **Gut**, v. 64, n. 10, p. 1650-1668, 2015. DOI:10.1136/gutjnl-2014-307595

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.

JIA, Y. et al. A dietary anthocyanin cyanidin-3-O-glucoside binds to PPARs to regulate glucose metabolism and insulin sensitivity in mice. **Communicat. Biol.** 3 (1), 1–10. 2020.

JIANG, B; CAO, S; ZHANG, J; WANG, Z. Chiral Separation, Configuration Confirmation and Bioactivity Determination of the Stereoisomers of Hesperidin and Narirutin in Citrus reticulata Blanco. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 873, 2023. DOI: 10.3390/molecules28020873

JOHANSSON, Lars H.; BORG, LA Håkan. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Analytical biochemistry**, v. 174, n. 1, p. 331-336, 1988. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90554-4

JUNEJA, Kriti et al. Metabolite profiling and wound-healing activity of Boerhavia diffusa leaf extracts using in vitro and in vivo models. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2020. DOI: 10.1016/j.jtcme.2019.02.002

KANEKO, T.; SHIRAKAWA, T. A. Study on Supplement Containing Moro (Citrus Sinensis (L.) Osbeck) Orange Extract of a Randomized Placebo-controlled Trial Part 2: Analysis of Efficacy on BMI Reduction. **Medical treatment and new medicine**, v. 55, n. 1, p. 65-9, 2018.

KATORI, M.; MAJIMA, M. Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors. **Nihon Yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica**, v. 109, n. 6, p. 247-258, 1997.

KAWAI, Takashi et al. Gastric epithelial damage induced by local ischemia-reperfusion with or without exogenous acid. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal**

and Liver Physiology, v. 266, n. 2, p. G263-G270, 1994. DOI: 10.1152/ajpgi.1994.266.2.G263

KEGELE, C. S. et al. A randomized trial on the effects of CitrusiM® (Citrus sinensis (L.) Osbeck dried extract) on body composition. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 27, p. 29-36, 2019. DOI: 10.1016/j.yclnex.2019.08.002

KOC, Murat; IMIK, Halit; ODABASOGLU, Fehmi. Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. **Biological trace element research**, v. 126, p. 222-236, 2008. DOI: 10.1007/s12011-008-8205-9

KONGPICHITCHOKE T, HSU JL, HUANG TC. Number of Hydroxyl Groups on the B-Ring of Flavonoids Affects Their Antioxidant Activity and Interaction with Phorbol Ester Binding Site of PKC δ C1B Domain: In Vitro and in Silico Studies. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 18, p. 4580-4586, 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00312

KURAHASHI, Toshihiro; FUJII, Junichi. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. **Journal of Developmental Biology**, v. 3, n. 2, p. 57-70, 2015.

LANAS, A.; CHAN, F. K. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10094, p. 613-624, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32404-7

LANAS, Angel. We are using too many PPIs, and we need to stop: a European perspective. **Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG**, v. 111, n. 8, p. 1085-1086, 2016. DOI: 10.1038/ajg.2016.166

LAURET, M.E.; RODRIGUEZ-PELÁEZ, M.; PÉREZ, I; RODRIGO, L. Peptic ulcer disease. **Austin Journal of Gastroenterology**, v. 2, p. 1055-1063, 2015.

LI, Chun-Ying et al. Gastroprotective effect of cyanidin 3-glucoside on ethanol-induced gastric lesions in rats. **Alcohol**, v. 42, n. 8, p. 683-687, 2008. DOI: 10.1016/j.alcohol.2008.08.009

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007. DOI: 10.1038/hprot.2007.30

LIU, Y.; ZHU, X.; LI, R.; ZHANG, J.; ZHANG, F. Proton pump inhibitor utilisation and potentially inappropriate prescribing analysis: insights from a single-centred retrospective study. **BMJ open**, v. 10, n. 11, p. e040473, 2020. DOI:10.1136/bmjopen-2020-040473

LIU, Shuai et al. Fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1942, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-29060-7

LODATO, Francesca et al. Adverse effects of proton pump inhibitors. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 193-201, 2010.

LOTFINA, F.; NOROUZI, M.-R.; GHASEMI-MOBARAKEH, L.; NAEIMIRAD, M. Anthocyanin/Honey-Incorporated Alginate Hydrogel as a Bio-Based pH-Responsive/Antibacterial/Antioxidant Wound Dressing. **J. Função. Biomater**, 14(2), 72, 2023. DOI: 10.3390/jfb14020072

LV, X. et al. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. **Chemistry Central Journal**, v. 9, p. 1-14, 2015. DOI: 10.1186/s13065-015-0145-9

MAES, Marina L.; FIXEN, Danielle R.; LINNEBUR, Sunny Anne. Adverse effects of proton-pump inhibitor use in older adults: a review of the evidence. **Therapeutic advances in drug safety**, v. 8, n. 9, p. 273-297, 2017. DOI: 10.1177/2042098617715381

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.

MAHACHAI, Varocha et al. Helicobacter pylori management in ASEAN: The Bangkok consensus report. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 33, n. 1, p. 37-56, 2018. DOI: 10.1111/jgh.13911

MALFERTHEINER, P. The intriguing relationship of Helicobacter pylori infection and acid secretion in peptic ulcer disease and gastric cancer. **Digestive Diseases**, v. 29, n. 5, p. 459-464, 2011. DOI: 10.1159/000332213

MARÇO, Paulo Henrique; POPPI, Ronei Jesus; SCARMINIO, Ieda Spacino. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008.

MARCUARD, Stefan P.; ALBERNAZ, Lisa; KHAZANIE, Prabhaker G. Omeprazole therapy causes malabsorption of cyanocobalamin (vitamin B12). **Annals of internal medicine**, v. 120, n. 3, p. 211-215, 1994.

MAROTTA, F. et al. Ethanol-related gastric mucosal damage: evidence of a free radical-mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. **Digestion**, v. 60, n. 6, p. 538-543, 1999. DOI: 10.1159/000007703

MASJEDI, Mohsen et al. Cytokine indexes in pemphigus vulgaris: perception of its immunopathogenesis and hopes for non-steroidal treatment. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 16, n. 3, p. 1223, 2017.

MASUELLI, Laura et al. Topical use of sucralfate in epithelial wound healing: clinical evidence and molecular mechanisms of action. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 4, n. 1, p. 25-36, 2010.

MCCORD, Joe M.; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCRORIE, Johnson W.; KIRBY, James A.; MINER, Philip B. Histamine2-receptor antagonists: rapid development of tachyphylaxis with repeat dosing. **World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 57, 2014. DOI: 10.4292/wjgpt.v5.i2.57

MELLO, V.J.; et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 237-244, 2008. DOI: 10.1016/j.phymed.2007.06.004

MILENKOVIC, D. et al. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: a randomized controlled crossover study. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, p. 1-9; 2011.

MILENKOVIC, Dragan et al. Nutrigenomic modification induced by anthocyanin-rich bilberry extract in the hippocampus of ApoE^{-/-} mice. **Journal of Functional Foods**, v. 85, p. 104609, 2021. DOI: 10.1016/j.jff.2021.104609

MONCADA, S. The 1991 Ulf von Euler Lecture: The L-arginine: nitric oxide pathway. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 145, n. 3, p. 201-227, 1992.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

NAGASHIMA, R. Mechanisms of action of sucralfate. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 3, n. Suppl 2, p. 117-127, 1981.

NAPOLITANO, Lena. Refractory peptic ulcer disease. **Gastroenterology Clinics**, v. 38, n. 2, p. 267-288, 2009. DOI: 10.1016/j.gtc.2009.03.011

NASCIMENTO, RAPHAELA FRANCELINO do et al. Activity of alkaloids on peptic ulcer: what's new?. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 929-950, 2015. DOI: 10.3390/molecules20010929

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.

NIMS, Raymond W. et al. Colorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solutions. **Methods**, v. 7, n. 1, p. 48-54, 1995.

NIZAMUTDINOVA, Irina Tsoy et al. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2806-2812, 2009. DOI: 10.1016/j.fct.2009.08.016.

OATES, Peter J.; HAKKINEN, John P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v. 94, n. 1, p. 10-21, 1988. DOI: 10.1016/0016-5085(88)90604-X

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. **J. Lipid Res.** 19, 1053-1057. 1978.

OJERO-SENARD, Ana et al. A comparative study of QT prolongation with serotonin reuptake inhibitors. **Psychopharmacology**, v. 234, p. 3075-3081, 2017. DOI: 10.1007/s00213-017-4685-7.

OKABE, Susumu; AMAGASE, Kikuko. 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. DOI: 10.1248/bpb.28.1321

OKABE, S.; ROTH, J. L.; PFEIFFER, C. J. Differential healing periods of the acetic acid ulcer model in rats and cats. **Experientia**, v. 27, n. 2, p. 146-148, feb. 1971. DOI: 10.1007/BF02145860

DE OLIVEIRA, Beatriz Monteiro Magalhães et al. Gastroprotective and gastric healing effects of the aqueous extract of *Casearia sylvestris* in rodents: Ultrasound, histological and biochemical analyzes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 298, p. 115660, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115660

ÖNER, G.; IZGÜT-UYSAL, V. N.; SENTÜRK, Ü. K. Role of lipid peroxidation in cadmium-induced impairment of the gastric mucosal barrier. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 9, p. 799-804, 1994. DOI: 10.1016/0278-6915(94)90155-4

ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. Sistema digestório: integração básico-clínica. **São Paulo: Blucher**, v. 1, p 653, 2016. DOI:10.5151/9788580391893

OU, Qianmin et al. More natural more better: Triple natural anti-oxidant puerarin/ferulic acid/polydopamine incorporated hydrogel for wound healing. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2021. DOI: 10.1186/s12951-021-00973-7

PALUNGWACHIRA, Pakhawadee et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of anthocyanins extracted from *Oryza sativa* L. in primary dermal fibroblasts. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/2089817

PARK, Jae-Heung et al. *Ganoderma lucidum* pharmacopuncture for teating ethanol-induced chronic gastric ulcers in rats. **Journal of pharmacopuncture**, v. 18, n. 1, p. 72, 2015. DOI: 10.3831/KPI.2015.18.008

PATRIGNANI, Paola et al. Managing the adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 605-621, 2011. DOI: 10.1586/ecp.11.36

PATRIGNANI, Paola; PATRONO, Carlo. Cyclooxygenase inhibitors: from pharmacology to clinical read-outs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 422-432, 2015. DOI: 10.1016/j.bbalip.2014.09.016

PEREZ-CRUZ, Isabel; CARCAMO, Juan M.; GOLDE, David W. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 336-343, 2003. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3559

PESKAR, B. M.; HOLLAND, A.; PESKAR, B. A. Effect of carbenoxolone on prostaglandin synthesis and degradation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 146-148, 1976.

POLAT, Beyzagul; SULEYMAN, Halis; ALP, Hamit Hakan. Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. **Chemico-biological interactions**, v. 186, n. 1, p. 82-89, 2010. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.03.041

PULLAR, Juliet M.; CARR, Anitra C.; VISSERS, Margreet. The roles of vitamin C in skin health. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 866, 2017. DOI: 10.3390/nu9080866

PYRZYNSKA, Krystyna. Hesperidin: A review on extraction methods, stability and biological activities. **Nutrients**, v. 14, n. 12, p. 2387, 2022. DOI: 10.3390/nu14122387

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochemical medicine and metabolic biology**, v. 39, n. 1, p. 69-79, 1988.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química nova**, p. 755-760, 2006.

RAVI, Dharavath et al. Ascorbic acid-loaded gellan-g-poly (ethylene glycol) methacrylate matrix as a wound-healing material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 251, p. 126243, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126243

RDC n. 243/18. INSTRUÇÃO NORMATIVA – IN nº 28, de 26 de julho de 2018. Disponível: Ministério da Saúde (saude.gov.br). Acesso: 09 jan. 2023.

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

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 35, p. 523-534, 2002. DOI:10.1590/s0100-879x2002000500003

ROY, Ishika et al. Evaluation of wound healing property of the ethanolic extract of glycyrrhiza glabra on vero cell lines using in vitro scratch assay test. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 15, n. Suppl 1, p. S630-S635, 2023. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_61_23

RUIZ-HURTADO, Porfirio Alonso et al. Propolis and its gastroprotective effects on nsaid-induced gastric ulcer disease: A systematic review. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3169, 2021. DOI: 10.3390/nu13093169

RUPASINGHE, H. P. V. et al. Phytochemicals in regulating fatty acid β -oxidation: potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. **Pharmacology & therapeutics**, v. 165, p. 153-163, 2016. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.06.005

RUSSO, Marina et al. Blood orange (Citrus sinensis) as a rich source of nutraceuticals: investigation of bioactive compounds in different parts of the fruit by HPLC-PDA/MS. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4606-4610, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2019.1696329.

SALAŁA, M., MOSIŃSKA, P. Pharmacological Treatment of Peptic Ulcer Disease. In **Introduction to Gastrointestinal Diseases** Vol. 2 (pp. 39–51). Springer International Publishing, 2017.

SATHIYABAMA, Rajiv Gandhi et al. Evidence of insulin-dependent signalling 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. DOI: 10.1016/j.fct.2018.03.050.

SAX, Michael J. Clinically important adverse effects and drug interactions with H2-receptor antagonists: an update. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 7, n. 6P2, p. 110S-115S, 1987.

SHAHID, Mudassar et al. Sinapic acid ameliorates acetic acid-induced ulcerative colitis in rats by suppressing inflammation, oxidative stress, and apoptosis. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4139, 2022. DOI: 10.3390/molecules27134139

SCHUBERT, M. L. Gastric acid secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 32, n. 6, p. 452–460, 2016.

SELMİ, S., RTİBİ, K., GRAMİ, 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. DOI:10.1186/s12944-017-0546-y

SENER, Goksel; PASKALOGLU, K.; AYANOGLU-DÜLGER, G. Protective effect of increasing doses of famotidine, omeprazole, lansoprazole, and melatonin against ethanol-induced gastric damage in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 171, 2004. Disponível em: <https://www.ijp-online.com/text.asp?2004/36/3/171/6873>

SENO, Kyoji et al. Role of mucus in gastric mucosal injury induced by local ischemia/reperfusion. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 126, n. 3, p. 287-293, 1995.

SHAY, H. et al. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 46–61, 1945.

SIVAKUMAR, Singaravelu et al. Ferulic acid loaded microspheres reinforced in 3D hybrid scaffold for antimicrobial wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 463-473, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.124

SOIB, Husnul Hanani et al. Bioassay-guided different extraction techniques of Carica papaya (Linn.) leaves on in vitro wound-healing activities. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 517, 2020. DOI: 10.3390/molecules25030517

SOUSA, GLAUBERT A. et al. Gastroprotective effect of ethanol extracts of cladodes and roots of Pilosocereus gounellei (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl (Cactaceae) on experimental ulcer models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 218, p. 100-108, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2018.02.009

STEWART, P. M. et al. Mineralocorticoid activity of carbenoxolone: contrasting effects of carbenoxolone and liquorice on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. **Clinical Science**, v. 78, n. 1, p. 49-54, 1990.

SULOCHANA, Suresh P. et al. Clinical drug–drug pharmacokinetic interaction potential of sucralfate with other drugs: review and perspectives. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 41, p. 469-503, 2016.

SYARINA, Pauzi Nur Aimi et al. Wound healing potential of Spirulina platensis extracts on human dermal fibroblast cells. **EXCLI journal**, v. 14, p. 385, 2015. DOI: 10.17179/excli2014-697

TAKAGI, KEIJIRO; OKABE, SUSUMU; SAZIKI, RYUICHI. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 418-426, 1969. DOI: 10.1254/jjp.19.418

TAN, J.; Li, Y.; Hou, D.-X.; Wu, S. The Effects and Mechanisms of Cyanidin-3-Glucoside and Its Phenolic Metabolites in Maintaining Intestinal Integrity. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 479, 2019. DOI: 10.3390/antiox8100479

TAOFIQ, Oludemi et al. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 281, 2017. DOI: 10.3390/molecules22020281

TARI, Akira et al. Does intragastric nitrite concentration reflect gastric carcinogenesis in Japanese Helicobacter pylori-infected patients?. **Digestive diseases and sciences**, v. 48, p. 1730-1736, 2003. DOI: 10.1023/a:1025438827070

THOMSON, A. B.; SAUVE, M. D.; KASSAM, N.; KAMITAKAHARA, H. Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 19, p. 2323, 2010. DOI: 10.3748/wjg.v16.i19.2323

TIETZE, Frank. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969. DOI: 10.1016/0003-2697(69)90064-5

TOMASELLO, Barbara et al. Anti-adipogenic and anti-oxidant effects of a standardised extract of Moro blood oranges (Citrus sinensis (L.) Osbeck) during adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **Natural Product Research**, v. 35, n. 16, p. 2660-2667, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2019.1660337

TOMASELLO, Barbara et al. Phytocomplex of a Standardized Extract from Red Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) against Photoaging. **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1447, 2022. DOI: 10.3390/cells11091447

TRIPATHI, A.; SINGH, S.; MUKERJEE, A. Antiulcer activity of ethanolic leaf extract of *Capparis zeylanica* against chemically induced ulcers. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2021. DOI: 10.1186/s43094-021-00357-6

VENTURINI, Claudio Luis et al. Antiulcer activity and mechanism of action of the hydroethanolic extract of leaves of *Terminalia argentea* Mart. In different in vivo and in vitro experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 318, p. 116972, 2024. DOI: 10.1016/j.jep.2023.116972

VIANA, Rodrigo da Silva; AQUINO, Fernanda Lima Torres de; BARRETO, Emiliano. Effect of trans-cinnamic acid and p-coumaric acid on fibroblast motility: a pilot comparative study of in silico lipophilicity measure. **Natural Product Research**, v. 35, n. 24, p. 5872-5878, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2020.1798664

WALLACE JL, SHARKEY KA. Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, editores. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH; 2012. p. 1309-1311.

WELAGE, Lynda S.; BERARDI, Rosemary R. Evaluation of omeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole in the treatment of acid-related diseases. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Wash)**, v. 40, n. 1, p. 52-62, 2000. DOI: 10.1016/s1086-5802(16)31036-1

WHEELER, Conrad R. et al. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. **Analytical biochemistry**, v. 184, n. 2, p. 193-199, 1990. DOI: 10.1016/0003-2697(90)90668-y

WHITE, C. Michael. Understanding and preventing (N-nitrosodimethylamine) NDMA contamination of medications. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 54, n. 6, p. 611-614, 2020. DOI: 10.1177/1060028019892222

WHO. Medication **Safety in Polypharmacy**. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/UHC/SDS/2019.11). Technical Report Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1235792/retrieve>. Acesso em: 02 fev. 2023.

WIKIPÉDIA. L-Ascorbic acid. 2009 Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:L-Ascorbic_acid.svg#/media/Ficheiro:L-Ascorbic_acid.svg. Acesso: 10 fev. 2023.

WIKIPÉDIA. Sicily in Italy. 2011. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sicily_in_Italy.svg#/media/Ficheiro:Sicily_in_Italy.svg. Acesso: 12 jan. 2023.

WIKIPÉDIA. Erosion excoriation ulcer 2. 2023. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Erosion_excoriation_ulcer_2.svg#/media/File:Erosion_excoriation_ulcer_2.svg. Acesso: 19 jun 2024.

WILSON, R. L.; STEVENSON, C. E. Anatomy and physiology of the stomach. In: **Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set**. Elsevier, 2019. p. 634-646. DOI: 10.1016/B978-0-323-40232-3.00056-X

WOŁCZUK K, NOWAKOWSKA J, PŁĄCHOCKI D, KAKAREKO T. Histological, histochemical and ultrastructural analysis reveals functional division of the oesophagogastric segment in freshwater tubenose goby *Proterorhinus semilunaris* Heckel, 1837. **Zoomorphology**, v. 134, p. 259-268, 2015. DOI: 10.1007/s00435-014-0250-7

XIAO, Shipeng et al. Anti-inflammatory effect of hesperidin enhances chondrogenesis of human mesenchymal stem cells for cartilage tissue repair. **Journal of inflammation**, v. 15, p. 1-8, 2018. DOI: 10.1186/s12950-018-0190-y

XU, Lianji et al. Anthocyanins from black soybean seed coat enhance wound healing. **Annals of Plastic Surgery**, v. 71, n. 4, p. 415-420, 2013. doi: 10.1097/SAP.0b013e31824ca62b.

YIBIRIN, Marcel et al. Adverse effects associated with proton pump inhibitor use. **Cureus**, v. 13, n. 1, 2021. DOI: 10.7759/cureus.12759

YOON, Minguen et al. Euodia daniellii Hemsl. Extract and Its Active Component Hesperidin Accelerate Cutaneous Wound Healing via Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 7134, 2022. DOI: 10.3390/molecules2720713

ANEXOS

ANEXO A - Triagem prévia com o teste de viabilidade celular MTT

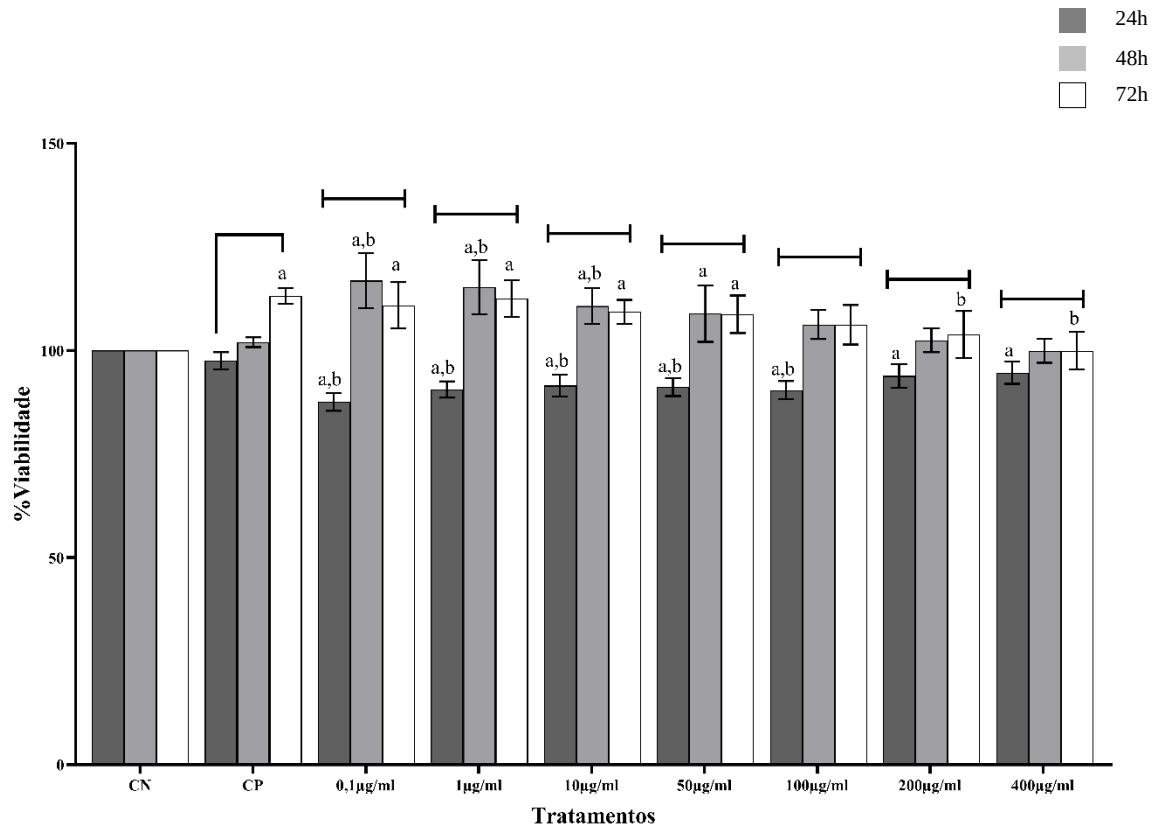


Gráfico da viabilidade celular. Concentrações do ECS: **0,1µg/ml; 1µg/ml; 10µg/ml; 50µg/ml; 100µg/ml; 200µg/ml; 400µg/ml**. **a** = diferença significativa em relação ao **CN** (controle negativo). **b** = diferença significativa em relação ao **CP** (controle positivo). **barra** = diferença significativa em relação ao longo dos 3 tempos de exposição. **arco**: diferença significativa apenas entre 24 e 72 horas de exposição. Valores significativos para ANOVA pós-teste Tukey $p < 0,05$. Média $\pm$ Desvio Padrão.

ANEXO B - Certificado de aprovação pela Comissão De Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA)



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Belém, 03 de agosto de 2023
CEUA N [5220271022](#)
(ID 001438)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Vanessa Joia De Mello
Área: Farmacologia

Título da proposta: "EFEITO GASTROPROTETOR E CICATRIZANTE DO EXTRATO PADRONIZADO DE CITRUS SINENSIS (MOROSIL®)".

CERTIFICADO (Emenda versão de 03/agosto/2023)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 03/agosto/2023) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto inicialmente solicitou machos e fêmeas. Solicito a mudança para um sexo único, totalizando apenas animais FEMEAS (180-210 g -8 semanas aproximadamente 60 dias).".

Comentário da CEUA: *APROVADO - Solicitação aceita mediante justificativa apresentada.*

Profa. Dra. Barbarella de Matos Macchi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. James Tony Lee
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

ANEXO C - Tabela para cálculo do índice de ulceração

ANIMAL	COR H=1 D=2	PREGAS s/ perda=0 c/ PERDA=1	PETÉQUIAS Leve=1 Moderada= 2 Intensa=3	EDEMA Leve=1 Moderada= 2 Intensa=3	HEMORRAGIA Leve=1 Moderada= 2 Intensa=3	PERDA DE MUCO Leve=1 Moderada= 2 Intensa=3	Nº ÚLCERA S <1mm	Nº ÚLCERAS >1mm x tamanho*	ÍNDICE DE ULCERAÇÃO

H= hiperemia (mucosa)

D= descoloração (mucosa)

*úlceras medindo mais de 1 mm: multiplicar pelo respectivo tamanho



Received: 27 September 2023 | Revised: 22 March 2024 | Accepted: 30 March 2024

DOI: 10.1002/fsn.3.4162

ORIGINAL ARTICLE

Food Science & Nutrition
WILEYHypoglycemic and hypolipidemic effects of *Lippia origanoides* Kunth in diabetic rats

Vinicius Carvalho Miranda¹ | Yago Luis Gonçalves Pereira¹ |
 Allane Patricia Santos da Paz¹ | Keyla Rodrigues de Souza¹ |
 Márcia Cristina Freitas da Silva² | Nilton Akio Muto³ | Patrick Romano Monteiro⁴ |
 Agenor Valadares Santos⁴ | Moises Hamoy⁵ |
 Maria das Graças Freire de Medeiros⁶ | Iolanda Souza do Carmo⁷ |
 Maria Eduarda Moraes Silva⁷ | José de Sousa Lima Neto⁸ | Vanessa Jóia de Mello¹

¹Research, Teaching and Extension Laboratory in Clinical Analysis, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil

²Human and Environmental Toxicology, Tropical Medicine Nucleus, Federal University of Pará, Belém, Brazil

³Center for the Valorization of Bioactive Compounds from the Amazon, Federal University of Pará, Belém, Brazil

⁴Laboratory of Biotechnology of Enzymes and Biotransformation, Federal University of Pará, Belém, Brazil

⁵Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Natural Products, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil

⁶Laboratory of Technological Innovation and Entrepreneurship in Drug-LITE, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

⁷Laboratory of Organic Geochemistry-LAGO, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

⁸Department of Biology, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

Correspondence

Vanessa Jóia de Mello, Research, Teaching and Extension Laboratory in Clinical Analysis (LACPEE), Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Augusto Corrêa St., 01, Belém, Pará 66075-110, Brazil.
 Email: vanessajolia@ufpa.br

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder commonly associated with atherosclerosis. Plants with therapeutic potential, such as *Lippia origanoides* Kunth, emerge as effective alternatives for treating these diseases. Therefore, this work aims to analyze the antihyperglycemic and antidiabetic potential of the hydroalcoholic extract of *Lippia origanoides* Kunth (ELO) in alloxan-diabetic rats. Animals were treated orally: normal control, hyperglycemic control, positive control glibenclamide (5 mg/kg), and groups treated with ELO (75, 150, and 250 mg/kg). Preclinical evaluation of ELO showed hypoglycemic, hypolipidemic, hepatic, and renal protective effects. At all doses, ELO significantly reduced hyperglycemia, triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein, atherogenic index, atherogenic coefficient, and cardiovascular risk index ($p < .05$). ELO at different doses promoted an increase in insulin release compared to untreated animals ($p < .05$) and showed α -glucosidase inhibitory activity ($p < .05$). Also, ELO (250 mg/kg group) showed maximum reduction of hyperglycemia, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, malonaldehyde, and urea compared to the hyperglycemic and glibenclamide groups, and creatinine only compared to the hyperglycemic groups ($p < .05$). The promising action of ELO in the context of diabetes may be related to the synergistic action of flavonoid compounds identified in liquid chromatography, whose pharmacological capabilities have already been documented in previous studies. The mechanisms may be the stimulation of insulin release; the inhibitory activity of α -glucosidase; improving general clinical conditions; and the antioxidant effects of the extract. These findings pave the way for the future development of an herbal presentation of *L. origanoides* Kunth as a hypoglycemic and cardiovascular protector with a lipid-lowering effect.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2024 The Authors. *Food Science & Nutrition* published by Wiley Periodicals LLC.