



Fundação José Bonifácio Lafayette de Andrada

Faculdade de Medicina de Barbacena

Núcleo de Pesquisa e Extensão

Projeto de Pesquisa

Pesquisadora responsável Polyana Cury Marinho

Pesquisadora colaboradora Cristiane de Melo Cazal

Indução de injúria aguda na mucosa gástrica em modelo animal para estudo de efeito gastroprotetor do óleo essencial de *Schinus molle*

Barbacena

2021

RESUMO

O presente estudo será conduzido para investigar a atividade antiulcerogênica da administração oral prévia do óleo essencial extraído do fruto da árvore *Schinus molle*, conhecida popularmente como “aroeira”, em modelo animal para úlcera gástrica aguda induzida com etanol. Para o protocolo experimental serão estudados 15 ratos Wistar, divididos em 3 grupos (controle, controle + úlcera gástrica, tratado + úlcera gástrica). A úlcera gástrica será induzida através de administração oral única de etanol 96% através de gavagem, nos animais experimentais. O tratamento será realizado no grupo tratado + úlcera gástrica, a partir da administração oral através de gavagem do óleo essencial de *S. molle*, cinco dias antes da indução da úlcera, para análise do potencial efeito gastroprotetor do produto natural. Os animais serão eutanasiados uma hora após a administração do etanol. O estômago de cada animal será retirado, lavado e utilizado para análises macroscópicas e microscópicas. A avaliação macroscópica será baseada na hemorragia da mucosa gástrica, a partir da análise de três parâmetros: tamanho, número e local da hemorragia. Para análise histológica, um fragmento de estômago de cada animal será fixado em solução de formaldeído e processado de acordo com a rotina histológica para microscopia de luz. Para exame histopatológico, os parâmetros avaliados serão: profundidade de erosão tecidual, presença de hemorragia, inflamação e apoptose. Espera-se encontrar, no geral, ao final do experimento, um efeito protetor do óleo frente a condição patológica de úlcera no estômago. E isso inclui a diminuição do processo hemorrágico e inflamatório após a administração do etanol.

Palavras-chave: Modelo animal. Úlcera. Óleo essencial.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	04
2	JUSTIFICATIVA	05
3	HIPÓTESE	06
4	OBJETIVO	06
5	METODOLOGIA	06
5.1	Obtenção e análise do óleo essencial dos frutos de <i>Schinus molle</i>	06
5.2	Amostra e procedimentos	07
5.2.1	Indução da úlcera gástrica com etanol.....	08
5.2.2	Tratamento com óleo essencial.....	08
5.3	Análises	08
5.3.1	Avaliação macroscópica e microscópica.....	08
5.4	Análise estatística	09
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	09
7	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	11
8	ORÇAMENTO	12
9	SOLICITAÇÃO DE BOLSA PARA ACADÊMICOS	12
10	COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)	12

1 INTRODUÇÃO

A úlcera formada a partir da mucosa do estômago é um dos principais distúrbios gastrointestinais com aumento significativo na incidência e prevalência na população mundial. Essa condição está intimamente relacionada aos fatores exógenos capazes de desencadear este desequilíbrio, tais como bebidas alcóolicas em excesso, dietas pobres, estresse, tabagismo e ingestão prolongada de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (1).

O desequilíbrio entre fatores defensivos e agressivos está na base da formação das lesões ou ulcerações da mucosa gástrica. A diferença entre lesão e ulceração é que a primeira se limita a mucosa, enquanto a segunda penetra a camada muscular da mucosa (2).

Medicamentos utilizados para a proteger a mucosa gástrica de uma possível formação de úlcera deve ter a capacidade de reduzir o estresse oxidativo e inflamatório envolvidos na fisiopatologia da formação da úlcera gástrica (1). Nesse sentido, diversas plantas e ervas tem sido utilizadas no tratamento de desordens gastrointestinais com potencial atividade antioxidante e gastroprotetora.

O óleo essencial de folhas de *Hyptis martiussi*, conhecida popularmente como “cidreira-do-mato” ou “cidreira-brava”, tem atividade antiulcerogênica, evidenciada pela inibição significativa na formação de úlceras em vários modelos. O efeito pode estar relacionado com o aumento dos fatores de defesa da mucosa gástrica (3). O óleo essencial de *Apium graveolens* (4), *Pterodon emarginatus* (5) também possuem atividade antiulcerogênica em modelo animal, conforme comprovação em estudos científicos.

Alguns ensaios científicos acerca da planta *Schinus molle* estão disponíveis na literatura científica. Em ensaios por cromatografia já foi observado que algumas frações extraídas da semente de *S. molle* possuem efeitos anti-inflamatórios e analgésicos (6). O óleo essencial extraído da folha e fruto de *S. molle* possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sugerindo seu potencial uso em indústrias alimentares ou farmacêuticas (7).

Há três formas para se induzir úlcera gástrica aguda em modelo animal: indução por medicamento (ácido acetilsalicílico e indometina), indução por

estresse e indução por etanol. O consumo de álcool pode causar inflamação da mucosa gástrica a partir de uma única administração. O álcool 96% rapidamente penetra a mucosa gastrointestinal causando danos na membrana celular, exfoliação celular e erosão. O aumento da permeabilidade ao ácido clorídrico como resultado dessas agressões, em associação a liberação de substâncias vasoativas pelos mastócitos, macrófagos e eritrócitos desencadeiam necrose e subsequente formação de úlcera (8).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é investigar os efeitos do óleo essencial de *S. molle* em modelo de úlcera gástrica aguda induzida por etanol em ratos Wistar.

2 JUSTIFICATIVA

A contribuição da pesquisa com animais experimentais muito tem somado ao conhecimento e evolução das Ciências Biológicas (morfologia, fisiologia e farmacologia). Resultados obtidos de ações terapêuticas de diversas substâncias são extrapolados para a aplicação em seres humanos. A utilização da insulina, vacinas, soros e antibióticos são alguns exemplos de contribuições científicas advindas de estudos realizados em animais. Mesmo com o progresso de métodos alternativos, o modelo animal experimental possui certas vantagens no que tange o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo (2). A úlcera gástrica é uma condição patológica digestiva que envolve a injúria da mucosa do estômago com incidência alarmante nos últimos anos. Ocorre por um desequilíbrio entre os fatores agressivos como ácido, pepsina, refluxo de sais biliares, ingestão de drogas versus fatores protetores e defensivos como a barreira de muco e bicarbonato na mucosa e as ligações de superfície das células epiteliais. Algumas drogas, principalmente as que possuem ação antiácida, estão disponíveis comercialmente, mas se mostram muitas vezes limitadas e com sérios efeitos adversos (8). Na medicina popular, utiliza-se empiricamente substâncias de origem vegetal para os mais variados desequilíbrios orgânicos. Comprovadamente, na literatura científica, alguns compostos naturais tem sua efetividade antiulcerogênica, demonstrando o potencial das plantas medicinais

como fontes alternativas para o tratamento de úlceras gástricas. Confrontando com o desafiador tratamento convencional de úlceras gástricas no sistema de saúde, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos eficazes, menos tóxicos e de baixo custo se faz necessário (9).

3 HIPÓTESE

O óleo essencial extraído dos frutos selvagens de *S. molle* possui efeito protetor da mucosa gástrica, melhorando os aspectos macroscópicos e microscópicos da úlcera gástrica induzida em animais experimentais.

4 OBJETIVO

O trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da administração oral do óleo essencial extraído do fruto selvagem da planta *S. molle* em relação a injúria causada na mucosa do estômago induzida experimentalmente com a administração oral de etanol 96% em ratos Wistar, a partir de análises macroscópicas e microscópicas.

5 METODOLOGIA

5.1 Obtenção e análise do óleo essencial dos frutos de *Schinus molle*

Os frutos de *S. molle* foram coletados no município de Barbacena, Minas Gerais, no período matutino, entre 6:30 e 7:30 horas.

Para a extração do óleo essencial dos frutos de *S. molle* será empregado o método de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger. O hidrolato será extraído com diclorometano, em triplicata de 30 mL. Em seguida, a solução será seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para retirar o excesso de água e posteriormente filtrada. O solvente será removido por pressão reduzida por meio de um evaporador rotativo e o óleo será conservado em refrigerador até as análises e demais experimentos.

As análises dos constituintes químicos do óleo essencial serão realizadas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC – 17A, equipado com uma coluna capilar DB - 5 (30 m x 0,25 mm), filme = 0,25 µm e ionizado por impacto eletrônico (IE) (70 e. V).

Os componentes do óleo serão identificados por meio da comparação de seus espectros de massas e de seus índices de retenção com aqueles existentes na literatura do equipamento. Os índices de retenção linear (índice de Kovats) dos componentes serão calculados em relação aos tempos de retenção de uma série de *n*-alcanos.

5.2 Amostra e procedimentos

Os procedimentos serão realizados em conformidade com a Resolução Normativa nº 01, de 09 de julho de 2010, constante no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo experimental será encaminhado para apreciação e autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Barbacena (CEUA-FAME).

Serão estudados 15 ratos Wistar machos (7-8 semanas de idade), pesando 200-250 g, obtidos de colônias do Biotério do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e mantidos no biotério do Núcleo de Pesquisa e Extensão (NUPE) da FAME, sob condições controladas (temperatura 21±2 °C, umidade 60±10%, ciclo de luz invertido de 12 horas - claro/escuro e ciclo de reposição de ar 15 min/h). Os animais serão alimentados com ração balanceada padrão e água *ad libitum*.

Os animais serão divididos em três grupos com 05 animais cada: grupo 01- Controle (animais saudáveis e sem tratamento), grupo 02 – Controle + úlcera gástrica (animais que receberão etanol 96% e não receberão tratamento), grupo 03- Tratado com óleo essencial + úlcera gástrica (animais que receberão etanol 96% e administração oral de óleo essencial).

5.2.1 Indução da úlcera gástrica com etanol

Para indução da úlcera gástrica aguda nos animais experimentais, etanol (96%, 0,5 ml/100g) será administrado oralmente através de gavagem. Os animais serão eutanasiados uma hora após a administração do álcool.

5.2.2 Tratamento com óleo essencial

Os animais do grupo 03- Tratado com óleo essencial + úlcera gástrica receberão oralmente óleo essencial (50mg/Kg) da planta *Schinus molle* através de gavagem, durante 05 dias antes da indução da úlcera gástrica. Uma hora após a indução da úlcera com etanol, os animais serão eutanasiados, como descrito anteriormente.

5.3 Análises

5.3.1 Avaliação macroscópica e microscópica

O estômago de cada animal será removido imediatamente após a eutanásia. O órgão será aberto na curvatura maior e lavado com solução salina (NaCl 0,9%). A mucosa do estômago aberto será avaliada macroscopicamente e fotografada para comparação. Um fragmento do órgão será retirado e fixado em formaldeído para preparação histológica de rotina.

O escore da avaliação macroscópica será baseada na hemorragia da mucosa gástrica. Serão três parâmetros avaliados: tamanho, número e local da hemorragia. Escores em relação ao tamanho: escore 1- tamanho puntiforme (menor que 2mm; escore 2- médio (entre 2 e 5mm); escore 3- intenso ou em bandas (maior que 5mm). Escores em relação ao número: escore 1- de 0 a 4; escore 2- de 5 a 6; escore 3- mais que 6. Escores em relação ao local: escore 1- unilateral; escore 2- bilateral. A soma das pontuações para os diferentes parâmetros permite o cálculo do escore macroscópico total, com máximo possível de 8 (8).

Para exame histopatológico, o fragmento de estômago será preparado em lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Os parâmetros avaliados serão: profundidade de erosão tecidual, presença de hemorragia, inflamação e apoptose. Escores em relação a profundidade de erosão tecidual: escore 1- até 1/3 da profundidade total da mucosa; escore 2- até 1/3 da profundidade total da mucosa; escore 3- mucosa total. Escores em relação a hemorragia: escore 1- focal; escore 2- média; escore 3- severa. Escores em relação a inflamação: escore 1- leve; escore 2- média; escore 3- severa. Escores em relação a apoptose: escore 1- leve; escore 2- média; escore 3- severa. A soma das pontuações para os diferentes parâmetros permite o cálculo do escore microscópico total, com máximo possível de 12 (8).

5.4 Análise estatística

Os dados serão apresentados como média e erro padrão da média. As análises estatísticas serão realizadas pela comparação entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes. As análises serão calculadas com o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA) pelo Teste t ou análise de variância, conforme permitirem a distribuição dos resultados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SHEN, Y.; SUN, J.; NIU, C.; YU, D.; CHEN, Z.; CONG, W.; GENG, F. **Mechanistic evaluation of gastroprotective effects of Kangfuxin on ethanol-induced gastric ulcer in mice.** Chemico-Biological Interactions 273, 115-124, 2017.
2. CARVALHO, C. A.; FERNANDES, K. M.; MATTA, S. L.; FONSECA, C. C.; PINTO, R.; OLIVEIRA, L. L. **Aspectos macroscópicos e histológicos da mucosa gástrica de ratos wistar e sua utilização em modelo de úlceras gástricas.** Archives of Veterinary Science, v.16, n.1, p.44-53, 2011.

3. CALDAS, G. F.; COSTA, I. M.; SILVA, J. B.; NÓBREGA, R. F.; RODRIGUES, F. F.; COSTA, J. G; WANDERLEY, A. G. **Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae)**. Journal of Ethnopharmacology 137, 886–892, 2011.
4. BAANANOU, S.; BOUFTIRA, I.; MAHMOUD, A.; BOUKEF, K.; MARONGIUDE, B.; BOUGHATTAS, N. A. **Antiulcerogenic and antibacterial activities of *Apium graveolens* essential oil and extract**. Natural Product Research, Vol. 27, No. 12, 1075–1083, 2013.
5. DUTRA, R. C.; FAVA, M. B.; ALVES, C. C.; FERREIRA, A. P.; BARBOSA, N. R. **Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds**. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 61: 243–250, 2009.
6. TAYLOR, A.; OYEDEJI, O. O.; AREMU, O.; et al. **Assessment of the analgesic, anti-inflammatory and sedative effects of the dichloromethanol extract of *Schinus mole***. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 20(2):372-80, 2016.
7. MARTINS, M. R.; ARANTES, S.; CANDEIAS, F. et al. **Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils**. *J Ethnopharmacol*, v. 151(1):485-92, 2014.
8. SIMÕES, S.; LOPES, R.; CAMPOS, M. C.; MARRUZ, M. J.; CRUZ, M. E.; CORVO, L. **Animal models of acute gastric mucosal injury: Macroscopic and microscopic evaluation**. *Animal Model Exp Med.*, 2:121–126, 2019.
9. DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B.; BACCHI, E. M. **Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae)**. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(1A): 89-94, 2009.

7 CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

MÊS	PRINCIPAIS ATIVIDADES SEMANAIS
Feveiro 2022	<ul style="list-style-type: none">✓ Início do PIC✓ Apresentação do projeto✓ Discussão de artigos científicos (todos os meses)✓ Abordagem do manual de práticas em animais de laboratório✓ Conhecendo o biotério do NUPE
Março	<ul style="list-style-type: none">✓ Capacitação do aluno para o uso de animais de laboratório
Abril	<ul style="list-style-type: none">✓ Protocolo experimental✓ Tratamento com óleo essencial✓ Eutanásia dos animais✓ Preparação do material a ser analisado
Mai	<ul style="list-style-type: none">✓ Processamento histológico do fragmento da lesão✓ Realização de técnicas histológicas (coloração de Hematoxilina e Eosina)
Junho	<ul style="list-style-type: none">✓ Análise do material em microscopia óptica
Julho	<ul style="list-style-type: none">✓ Análise do material em microscopia óptica✓ Férias coletivas
Agosto	<ul style="list-style-type: none">✓ Análise estatística✓ Escrita dos resultados
Setembro	<ul style="list-style-type: none">✓ Escrita dos resultados e discussão✓ Desenvolvimento do artigo científico
Outubro	<ul style="list-style-type: none">✓ Desenvolvimento do artigo científico
Novembro	<ul style="list-style-type: none">✓ Desenvolvimento do artigo científico✓ Submissão do artigo científico
Dezembro	<ul style="list-style-type: none">✓ Férias coletivas
Janeiro	<ul style="list-style-type: none">✓ Participação em eventos científicos
Fevereiro	<ul style="list-style-type: none">✓ Finalização do PIC

8 ORÇAMENTO

Itens de almoxarifado / biotério *	Quantidade
Material cirúrgico	1
Prancha de plástico	2
Esparadrapo	1
Seringa e agulha (5ml)	30
Gaze	1
Luvras (tamanho M e G)	5

* Itens disponíveis para uso do pesquisador no biotério ou no almoxarifado.

Itens para compra	Quantidade	Valor (R\$)	Total (R\$)
Animais (Ratos Wistar)	15	13,00	195,00
Seringa 1ml	100	30,00	30,00
Xilazina	2	35,00	70,00
Cetamina	1	180,00	180,00
Diluyente	20	1,00	20,00

- **Total do orçamento: R\$ 495,00**
- Além dos itens listados para compra será necessário a disponibilização de transporte até o biotério da UFV para buscar os animais experimentais.

9 SOLICITAÇÃO DE BOLSA PARA ACADÊMICOS

Para a execução do presente projeto proposto, são solicitados dois alunos / duas bolsas de estudo através do programa de iniciação científica da Faculdade de Medicina de Barbacena (PIC - FAME).

10 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

O projeto será encaminhado para apreciação junto à CEUA da FAME e será executado após parecer da comissão, em caso de aprovação.