



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS  
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



**JÚLIO CÉSAR PINHEIRO LÚCIO DE OLIVEIRA**

**A MICROEMULSÃO DE GALATO DE OCTILA EXERCE AÇÃO  
ANTITROMBÓTICA EM RATOS**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2024**

**JÚLIO CÉSAR PINHEIRO LÚCIO DE OLIVEIRA**

**A MICROEMULSÃO DE GALATO DE OCTILA EXERCE AÇÃO  
ANTITROMBÓTICA EM RATOS**

**Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.  
Área de concentração: **FARMACOLOGIA**

**Orientador: Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2024**



# PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos

Ata da 495ª (quadringentésima nonagésima quinta) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira**, candidato(a) ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e oito de agosto do ano de dois mil e vinte e quatro (28/08/2024), no Auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira**, candidato(a) ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Islania Giselia Albuquerque Gonçalves, Ph.D em Farmacologia, Francisco Humberto Xavier Júnior, Ph.D em Biotecnologia, e Robson Cavalcante Veras, Ph.D em Farmacologia. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Robson Cavalcante Veras, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "**A microemulsão de galato de octila exerce ação antitrombótica em ratos**". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira** legalmente habilitado(a) a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Islania Giselia Albuquerque Gonçalves (Examinadora)

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior (Examinador)

Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira (Discente)



**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

O48m Oliveira, Júlio César Pinheiro Lúcio de.  
A microemulsão de galato de octila exerce ação  
antitrombótica em ratos / Júlio César Pinheiro Lúcio de  
Oliveira. - João Pessoa, 2024.  
150 f. : il.

Orientação: Robson Cavalcante Veras.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Trombose. 2. Plaquetas. 3. Coagulação. I. Veras,  
Robson Cavalcante. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

**JÚLIO CÉSAR PINHEIRO LÚCIO DE OLIVEIRA**

**A MICROEMULSÃO DE GALATO DE OCTILA EXERCE AÇÃO  
ANTITROMBÓTICA EM RATOS**

**Dissertação de mestrado APROVADA em: 28/08/2024**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Orientador

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Islania Giselia Albuquerque**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinadora externa

**Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador interno

# DEDICATÓRIA

---

A minha família, meu irmão e minha  
mãe, os dedico esse trabalho. Sem o  
apoio deles essa dissertação não seria  
possível.

# AGRADECIMENTOS

---

Em um discurso da convenção do partido Democrata nos Estados Unidos, Michelle Obama, então primeira-dama americana, disse: “Nós aprendemos sobre gratidão e humildade. Que tantas pessoas participaram de nosso sucesso: desde o professor que nos ensina até os zeladores que mantêm a escola limpa”. Com esse espírito, **sou grato:**

À Deus pelo dom da vida, pela sabedoria e discernimento. A Nossa Senhora Aparecida, minha mãe celeste que sempre me acompanhou durante essa jornada;

Ao Povo brasileiro por me proporcionar até agora uma educação de qualidade, pública e gratuita. Acredito que a educação é a principal forma de transformar o mundo do nosso entorno.

Ao meu orientador Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras que me abriu as portas para o mundo científico. Por acreditar no meu potencial e por confiar em mim nas missões dadas. Um exemplo de professor, ser humano e profissional a ser seguido e que gera em mim o sentimento de gratidão;

Aos professores Dr. Isac Almeida de Medeiros, Dr<sup>a</sup>. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves e Dr<sup>a</sup> Maria do Socorro de França Galvão por todas as orientações, conversas e disposição em colaborar nos projetos. Ainda minha gratidão à Profa. Islania por aceitar de imediato em ser membro da banca examinadora;

Ao professor Francisco Humberto Xavier Júnior por todo apoio e disposição na colaboração do desenvolvimento da formulação e de aceitar prontamente em ser membro da banca;

Aos professores Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves e a Dr<sup>a</sup> Daniele Idalino Janeiro Ximenes pelo aceite como suplentes da banca examinadora;

Às ICs Hayaly, Amanda e Gabriel por toda colaboração e apoio. Pelos momentos vivenciados, alegrias, risos, descontração e experimentos vividos. Minha eterna gratidão;

Aos integrantes do laboratório de farmacologia cardiovascular: Ricardo, Viviane, Tays, Carol, Javanyr, Arthur, Larisse, Mathânia, Danilo, Aline e Rayane. Obrigado pelas conversas, auxílios, ensinamentos e todos os momentos compartilhados. Vocês tornaram essa jornada mais leve;

Aos alunos de iniciação científica do laboratório: Guilherme, Kawan, Camilly, Milena, Adhonias, Eyllen e Eduarda. Obrigado pelas trocas, auxílios e conversas tidas durante essa jornada. Vocês são essenciais para o funcionamento de tudo;

À minha turma de mestrado e em especial aos meus amigos de graduação e, agora, de mestrado: Heivila, Rubens e Larissa. Obrigado por tudo durante essa jornada, as disciplinas pagas, as conversas, os aperreios e as alegrias compartilhadas. Essa jornada seria mais difícil sem vocês;

À minha família, minha mãe, Inês, meu irmão, Itamar (que também é da equipe de iniciação científica do laboratório). Vocês são a razão da jornada, a motivação de acordar, viver, aprender, de eu dar meu melhor;

À minha avó, Nazaré, que sempre que eu sentia o peso do dia-a-dia, da rotina, buscava refúgio na sua casa e em meio a família em Dona Inês;

Ao meu namorado, Patrick, por todo apoio, conversas, descontração, paciência e compreensão. Sem você tudo seria mais chato e preto e branco;

A Mônica pelo auxílio e todo cuidado com nosso ambiente de trabalho e experimentação. Pela alegria contagiante de todas as manhãs, conversas e ajuda sempre;

Aos professores do Programa de Pós-graduação: Bagnólia, Isac, Fabiana, Marcus Túlius, Luís, Cíceiro, Ricardo, Mírian, Juan e Marianna. Vocês foram exemplos de profissionais e peças fundamentais para a minha formação;

A Dra. Roberta, Crispim, Adriano e Luís por todo apoio e disponibilidade para manter os animais de experimentação e ajudar sempre que necessário;

Às secretárias do programa de pós-graduação Carol e Nilmar pela disponibilidade, paciência e solicitude, sempre eficientes no trabalho que exercem;

À coordenadora do Programa de Pós-graduação: Prof<sup>a</sup>. Fabiana pela exímia condução do programa durante esse período;

A CAPES pelo apoio institucional e financeiro durante esse período e ao CNPq pelo apoio financeiro como bolsa durante essa vigência de mestrado;

A Universidade Federal da Paraíba pelo apoio institucional desde a minha graduação até o presente momento;

A todas as pessoas que de forma direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, para o meu crescimento humano e profissional.

*Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira*

THERE IS UNEXPECTED TRAFFIC AHEAD, BUT YOU'RE STILL ON  
THE RIGHT PATH

**Google Maps**

# RESUMO

---

OLIVEIRA, J. C. P L. **A microemulsão de galato de octila exerce ação antitrombótica em ratos**. 2024. Dissertação de mestrado (Pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB. 2024.

## Resumo

O galato de octila é um composto fenólico derivado do ácido gálico que possui ação anti-inflamatória e antagonista do ATP, além de ter uma baixa toxicidade. Contudo, não é descrito na literatura qualquer estudo dessa molécula sobre o sistema cardiovascular ou hemostático. No entanto, sua baixa solubilidade em água tem sido um obstáculo para sua aplicação e investigação farmacológica. Neste sentido, esse estudo visa, assim, desenvolver uma microemulsão de galato de octila (MEGO) para aplicação como antiagregante plaquetária, anticoagulante, vasorrelaxante e antitrombótica. A MEGO, produzida com Cremophor EL, triglicerídeos de cadeia média e água deionizada, seguindo um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken. A microemulsão otimizada apresentou gotículas com tamanho médio de  $40 \pm 6$  nm, potencial zeta de  $-15 \pm 0,48$  mV e índice de polidispersão (Pdl) de  $0,198 \pm 0,008$ , mantendo-se estável por um período de 6 meses quando armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$ . Testes de hemólise foram realizados para avaliar a segurança da MEGO para aplicação intravenosa, demonstrando que a microemulsão não provocou lise eritrocitária. Assim, foi investigada a ação antiagregante plaquetária e anticoagulante sobre as plaquetas e plasma de ratos. Com esses ensaios foi demonstrado pela primeira vez a ação antiagregante plaquetária da MEGO ( $E_{\text{máx}} = 37,59 \pm 1,49\%$  e  $CE_{50} = 0,68 \pm 0,04 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) frente a estimulação da agregação com ADP. Todavia, a microemulsão não demonstrou qualquer efeito sobre o tempo de protrombina (TP) ou tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) no plasma. Já na avaliação da ação vasorrelaxante da MEGO sobre aorta de ratos, foi observado que ela causava vasorrelaxamento nos anéis tanto ausente ( $E_{\text{máx}} = 98,84 \pm 1,4\%$  e  $CE_{50} = 20,99 \pm 1,13 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) quanto presente ( $E_{\text{máx}} = 100,1 \pm 3,6 \%$  e  $CE_{50} = 0,99 \pm 0,08 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) do endotélio, ficando sugerido que a ação dependente do endotélio foi devido a estimulação da produção de óxido nítrico, em vista da redução da potência da MEGO nas curvas construídas na presença do L-NAME, PTIO e ODQ. Em vista dessas atividades, foi avaliada a ação antitrombótica da MEGO em animais que a receberam pela via intravenosa. O tratamento com a MEGO  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  aumentou o tempo de obstrução da carótida por trombo estimulado por  $\text{FeCl}_3$  (tempo =  $1.619 \pm 40$  s) e, surpreendentemente, a associação da MEGO  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  com a enoxiparina  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (anticoagulante) aumentou o tempo de obstrução (tempo =  $3.627 \pm 19$  s) de forma superior aos tratamentos individualizados (nas doses de  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), indicando o sinergismo desses efeitos. Além disso, nos animais tratados com a MEGO e na associação com a enoxiparina o peso do trombo estimado e a área do trombo em relação à carótida foram menores. Também, observou-se que o tratamento com a MEGO reduzia a agregação plaquetária e o TP e o TTPa não eram alterados. Já a associação da MEGO  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  com a enoxiparina  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  aumentou o TTPa tanto em relação ao controle quanto ao grupo tratado apenas com enoxiparina  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . Esses resultados destacam o potencial terapêutico da MEGO como agente antitrombótico e sua possível utilidade em combinação com outros anticoagulantes para o tratamento de distúrbios trombóticos.

**Palavras-chave:** Trombose. Plaquetas. Coagulação. Planejamento fatorial. TTPa. TP. Carótida.

# ABSTRACT

---

### Abstract

Octyl gallate is a phenolic compound derived from gallic acid which has an anti-inflammatory and ATP antagonist action, as well as low toxicity. However, no studies of this molecule on the cardiovascular or hemostatic systems have been described in the literature. However, its low solubility in water has been an obstacle to its application and pharmacological research. In this sense, this study aims to develop a microemulsion of octyl gallate (MEGO) for application as a platelet antiaggregant, anticoagulant, vasorelaxant and antithrombotic. The MEGO was produced with Cremophor EL, medium-chain triglycerides and deionized water, following a Box-Behnken factorial design. The optimized microemulsion presented droplets with an average size of  $40 \pm 6$  nm, a zeta potential of  $-15 \pm 0,48$  mV and a polydispersity index (Pdl) of  $0,198 \pm 0,008$ , remaining stable for a period of 6 months when stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . Hemolysis tests were carried out to assess the safety of MEGO for intravenous application, showing that the microemulsion did not cause erythrocyte lysis. The antiplatelet and anticoagulant action on platelets and rat plasma was also investigated. These tests demonstrated for the first time the antiplatelet action of MEGO ( $E_{\max} = 37.59 \pm 1.49\%$  and  $EC_{50} = 0,68 \pm 0,04 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) when aggregation was stimulated with ADP. However, the microemulsion had no effect on prothrombin time (PT) or activated partial thromboplastin time (aPTT) in plasma incubated with MEGO. In the evaluation of the vasorelaxant action of MEGO on rat aorta, it was observed that it caused vasorelaxation in the rings both in the absence ( $E_{\max} = 98.84 \pm 1.4\%$  and  $CE_{50} = 20,99 \pm 1,13 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) and presence ( $E_{\max} = 100.1 \pm 3.6\%$  and  $CE_{50} = 0,99 \pm 0,08 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) of the endothelium, suggesting that the endothelium-dependent action was due to the stimulation of nitric oxide production, in view of the reduction in MEGO potency in the curves constructed in the presence of L-NAME, PTIO and ODQ. In view of these activities, the antithrombotic action of MEGO was evaluated in animals that received it intravenously. Treatment with MEGO  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  increased the time to carotid obstruction by  $\text{FeCl}_3$ -stimulated thrombus (time =  $1,619 \pm 40$  s) and, surprisingly, the combination of MEGO  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  with enoxiparin  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (anticoagulant) increased the time to obstruction (time =  $3,627 \pm 19$  s) more than the individual treatments (at doses of  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), indicating the synergism of these effects. In addition, in animals treated with MEGO and in combination with enoxiparin, the estimated thrombus weight and the thrombus area in relation to the carotid artery were lower. It was also observed that treatment with MEGO reduced platelet aggregation and that PT and TTPa were not altered. However, the combination of MEGO  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  with enoxiparin  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  increased TTPa both in relation to the control and the group treated with enoxiparin  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  alone. These results highlight the therapeutic potential of MEGO as an antithrombotic agent and its possible usefulness in combination with other anticoagulants for the treatment of thrombotic disorders.

**Keywords:** Thrombosis. Platelets. Coagulation. Factorial planning. aPTT. PT. Carotid artery.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1</b> - Mecanismos moleculares de ativação e agregação plaquetária e sua inibição e de contração e relaxamento da musculatura lisa vascular. ....                                      | 9   |
| <b>Figura 2</b> - Mecanismo de adesão e agregação plaquetária na matriz extracelular.....                                                                                                        | 11  |
| <b>Figura 3</b> - Modelo de coagulação sanguínea baseada nas superfícies celulares. ....                                                                                                         | 15  |
| <b>Figura 4</b> - Mecanismos de limitação da formação do trombo (a) e da fibrinólise (b). ....                                                                                                   | 16  |
| <b>Figura 5</b> - Alvos dos agentes antitrombóticos utilizados atualmente. ....                                                                                                                  | 18  |
| <b>Figura 6</b> - Ilustração da tríade de Virchow. ....                                                                                                                                          | 19  |
| <b>Figura 7</b> - Estrutura do ácido gálico e de seus derivados alquílicos. ....                                                                                                                 | 23  |
| <b>Figura 8</b> - Tamanhos das gotículas de emulsões do tipo óleo em água. ....                                                                                                                  | 32  |
| <b>Figura 9</b> - Ilustração do sistema de órgãos isolados para a montagem dos anéis de aorta. ....                                                                                              | 55  |
| <b>Figura 10</b> - Protocolo de estabilização e verificação da presença de endotélio funcional em anéis de aorta de rato. ....                                                                   | 56  |
| <b>Figura 11</b> - Protocolo experimental para investigar o efeito da MEGO sobre o tônus basal de anéis de aorta de rato isolada. ....                                                           | 57  |
| <b>Figura 12</b> - Protocolo experimental para investigar o efeito da MEGO sobre aorta isolada de rato com ou sem o endotélio e contraídas com FEN. ....                                         | 58  |
| <b>Figura 13</b> - Protocolo experimental para investigar o efeito da MEGO sobre aorta isolada de rato sem o endotélio e contraídas com Krebs modificado (KCl 60 mMol.L <sup>-1</sup> ). ....    | 59  |
| <b>Figura 14</b> - Protocolo experimental para investigar o efeito da MEGO sobre aorta isolada de rato com o endotélio e contraídas com FEN na presença de L-NAME, ou PTIO ou ODQ. ....          | 60  |
| <b>Figura 15</b> - Ilustração do layout do experimento de indução da trombose em artéria carótida comum de ratos por cloreto férrico (a) e ilustração do processo de obstrução arterial (b)..... | 62  |
| <b>Figura 16</b> - Esquema representativo dos procedimentos para as análises morfométricas da artéria carótida com o trombo induzido por FeCl <sub>3</sub> .....                                 | 64  |
| <b>Figura 17</b> - Microemulsões com o galato de octila para o planejamento fatorial Box-Behken. ....                                                                                            | 67  |
| <b>Figura 18</b> - Microemulsão de Galato de octila otimizada. ....                                                                                                                              | 70  |
| <b>Figura 19</b> - Representação da coloração da MEGO durante o teste de estabilidade.....                                                                                                       | 72  |
| <b>Figura 20</b> - Registros originais representativos dos efeitos do veículo sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de aorta sem (a) ou com (b) o endotélio funcional.....              | 77  |
| <b>Figura 21</b> - Registros originais representativos dos efeitos da MEGO sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de aorta sem (a) ou com (b) o endotélio funcional.....                 | 78  |
| <b>Figura 22</b> - Registro original representativo do efeito da MEGO sobre as contrações induzidas por Krebs KCl 60 mMol.L <sup>-1</sup> em anéis de aorta sem o endotélio funcional. ....      | 80  |
| <b>Figura 23</b> - Registro original representativo do efeito da MEGO sobre as contrações induzidas por FEN em anéis com o endotélio (a) e na presença do L-NAME (b).....                        | 82  |
| <b>Figura 24</b> - Registro original representativo do efeito da MEGO sobre as contrações induzidas por FEN em anéis com o endotélio na presença do PTIO (a) e ODQ (b). ....                     | 83  |
| <b>Figura 25</b> - Representação do registro original do tempo de obstrução da artéria carótida comum de ratos por trombo induzido por FeCl <sub>3</sub> .....                                   | 85  |
| <b>Figura 27</b> - Síntese de todos os principais achados para a MEGO. ....                                                                                                                      | 104 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfico 1</b> – Análise de Pareto para o tamanho (a) e potencial Zeta (b).                                                                                                       | 68 |
| <b>Gráfico 2</b> - Gráficos de superfície de resposta com a relação às variáveis dependentes.                                                                                       | 69 |
| <b>Gráfico 3</b> - Tamanho e potencial Zeta da MEGO por 180 dias.                                                                                                                   | 71 |
| <b>Gráfico 4</b> - pH da MEGO por 180 dias.                                                                                                                                         | 72 |
| <b>Gráfico 5</b> - Efeito da MEGO sobre hemácias lavadas de ratos.                                                                                                                  | 73 |
| <b>Gráfico 6</b> - Curva concentração-resposta construída para determinar os parâmetros farmacológicos sobre o efeito antiagregante da MEGO.                                        | 74 |
| <b>Gráfico 7</b> - Efeito da MEGO sobre o tempo de TP (a) e TTPa (b).                                                                                                               | 75 |
| <b>Gráfico 8</b> - Efeito da MEGO sobre o tônus basal de aorta com ou sem o endotélio funcional.                                                                                    | 76 |
| <b>Gráfico 9</b> - Efeito da MEGO e do veículo sobre os anéis de aorta com ou sem o endotélio funcional.                                                                            | 79 |
| <b>Gráfico 10</b> - Efeito da MEGO sobre anéis de aorta sem o endotélio funcional em contrações induzidas por FEN ou solução nutritiva de Krebs KCl 60 mMol.L <sup>-1</sup> .       | 80 |
| <b>Gráfico 11</b> - Efeito da MEGO sobre anéis de aorta com o endotélio funcional em contrações induzidas por FEN na presença de L-NAME, ou PTIO ou ODQ.                            | 84 |
| <b>Gráfico 12</b> - Efeito do tratamento com MEGO sobre o tempo de obstrução da carótida comum de ratos por trombo induzido por FeCl <sub>3</sub> .                                 | 86 |
| <b>Gráfico 13</b> - Efeito do tratamento da MEGO sobre a razão entre o peso do segmento da artéria carótida com o trombo e seu comprimento (a) e a área do trombo da carótida (b).  | 87 |
| <b>Gráfico 14</b> - Ação antiagregante plaquetária em animais tratados com a MEGO e ENOX no pico de agregação e no final da análise (a) e a diferença entre essas porcentagens (b). | 89 |
| <b>Gráfico 15</b> - Efeito do tratamento com a MEGO e ENOX em animais sobre o TP (a) e TTPa (b).                                                                                    | 90 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Composição das microemulsões da etapa de pré-formulação.....                                             | 45 |
| <b>Tabela 2</b> - Variáveis independentes de entrada e seus níveis.....                                                    | 47 |
| <b>Tabela 3</b> - Matriz do planejamento fatorial Box-Behken.....                                                          | 48 |
| <b>Tabela 4</b> - Resultados da etapa de pré-formulação da microemulsão com o galato de octila.<br>.....                   | 66 |
| <b>Tabela 5</b> - Dados de respostas (tamanho e potencial Zeta) obtidos para a realização do<br>planejamento fatorial..... | 67 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> - Solução fisiológica de Krebs.....                                           | 40 |
| <b>Quadro 2</b> - Solução fisiológica de Krebs modificada (KCl 60 mMol.L <sup>-1</sup> )..... | 40 |

## LISTA DE EQUAÇÕES E FÓRMULAS

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Equação 1</b> - Determinação da porcentagem de hemólise.....                                          | 53 |
| <b>Equação 2</b> - Determinação da porcentagem de endotélio nos anéis arteriais.....                     | 56 |
| <b>Equação 3</b> - Polinômio proposto para a predição dos tamanhos das gotículas da<br>microemulsão..... | 70 |

## LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                                      |                                                        |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| $\mu\text{L}$                        | Microlitro                                             |
| $\mu\text{m}$                        | Micrômetro                                             |
| $\mu\text{Mol.L}^{-1}$               | Micromol por litro                                     |
| 5-HT                                 | Serotonina                                             |
| 5-HT <sub>2A</sub>                   | Receptor da serotonina 2A                              |
| AA                                   | Ácido araquidônico                                     |
| ABCA1                                | Transportador ligado ao ATP                            |
| ABS                                  | Absorbância                                            |
| ACh                                  | Acetilcolina                                           |
| ADP                                  | Difosfato de adenosina                                 |
| Akt                                  | Proteína Serina/Treonina Cinase                        |
| AMP <sub>c</sub>                     | Monofosfato cíclico de adenosina                       |
| AMPK                                 | Cinase dependente do monofosfato de adenosina          |
| ANOVA                                | Análise de Variância Ordinária                         |
| ANVISA                               | Agência Nacional de Vigilância Sanitária               |
| AST                                  | Aspartato aminotransferase                             |
| AT                                   | Antitrombina                                           |
| ATP                                  | Trifosfato de adenosina                                |
| Ca <sup>2+</sup>                     | Cátion de cálcio                                       |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | Cloreto de cálcio bihidratado                          |
| CaM                                  | Calmodulina                                            |
| Ca <sub>v</sub>                      | Canal de cálcio controlado por voltagem                |
| CE <sub>50</sub>                     | Concentração que produz 50% do efeito máximo           |
| CEUA                                 | Comissão de ética no uso de animais                    |
| CO <sub>2</sub>                      | Dióxido de carbono                                     |
| CONCEA                               | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal |
| COX-1                                | Ciclo-oxigenase do tipo 1                              |
| CXCL-1                               | Motif ligante de quimiocinas 1                         |
| DAG                                  | Diacylglicerol                                         |
| DATASUS                              | Departamento de informática do Sistema Único de Saúde  |
| DL <sub>50</sub>                     | Dose letal 50                                          |

|                               |                                                |
|-------------------------------|------------------------------------------------|
| DLS                           | Espalhamento de luz dinâmico                   |
| DMSO                          | Dimetilsufóxido                                |
| E <sub>máx</sub>              | Efeito máximo                                  |
| eNOS                          | Sintase de óxido nítrico endotelial            |
| ENOX                          | Enoxiparina                                    |
| ET-1                          | Endotelina-1                                   |
| ETE                           | Evento tromboembólico                          |
| ETR <sub>A</sub>              | Receptor A da endotelina-1                     |
| ETR <sub>B</sub>              | Receptor B da endotelina-1                     |
| FeCl <sub>3</sub>             | Cloreto férrico                                |
| FEN                           | Fenilefrina                                    |
| FII/FIIa                      | Fator II/Fator II ativado (ou trombina)        |
| FIX/FIXa                      | Fator IX/Fator IX ativado                      |
| FT                            | Fator tecidual/tissular                        |
| FV/FVa                        | Fator V/Fator V ativado                        |
| FVII/FVIIa                    | Fator VII/ Fator VII ativado                   |
| FX/FXa                        | Fator X/Fator X ativado                        |
| FXI/FXIa                      | Fator XI/Fator XI ativado                      |
| FXII-FXIIa                    | Fator XII/Fator XII ativado                    |
| FXIII/FXIIIa                  | Fator XIII/Fator XIII ativado                  |
| FXVIII/FVIIIa                 | Fator XIII/Fator XIII ativado                  |
| Fyn                           | Tirosina cinase esplênica contendo domínio SH2 |
| GMP <sub>C</sub>              | Monofosfato cíclico de guanina                 |
| GP                            | Glicoproteína                                  |
| GPCR                          | Receptor acoplado à proteína G                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                         |
| HCl                           | Ácido clorídrico                               |
| HDL                           | Lipoproteína de alta densidade                 |
| Hz                            | Hertz                                          |
| i.p.                          | Intraperitoneal                                |
| IL-1 $\beta$                  | Interleucina 1-beta                            |
| IL-6                          | Interleucina 6                                 |
| iNOS                          | Sintase de óxido nítrico induzida              |
| IP <sub>3</sub>               | 1,4,5-trifosfato de Inositol                   |

|                                                    |                                                        |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| IP <sub>3</sub> R                                  | Receptor do 1,4,5-trifosfato de Inositol               |
| K <sup>+</sup>                                     | Cátion de potássio                                     |
| KCl                                                | Cloreto de potássio                                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | Fosfato de potássio monobásico                         |
| K <sub>v</sub>                                     | Canal de potássio controlado por voltagem              |
| LAT                                                | Ligação para ativação das células T                    |
| LDL                                                | Lipoproteína de baixa densidade                        |
| L-NAME                                             | N <sup>G</sup> -nitro- <i>L</i> -arginina-metil éster  |
| LPS                                                | Lipopolissacarídeo                                     |
| Lyn                                                | Tirosina cinase relacionada com o sarcoma de Yamaguchi |
| MCT                                                | Triglicerídeos de cadeia média                         |
| ME                                                 | Microemulsão                                           |
| MEGO                                               | Microemulsão de galato de octila                       |
| mg.kg <sup>-1</sup>                                | Miligramas por kilograma                               |
| mg.mL <sup>-1</sup>                                | Miligramas por mililitro                               |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O               | Cloreto de magnésio hexahidratado                      |
| MgSO <sub>4</sub>                                  | Sulfato de magnésio                                    |
| MLCK                                               | Cinase da cadeia leve da miosina                       |
| mMol.L <sup>-1</sup>                               | Milimol por litro                                      |
| NaCl                                               | Cloreto de sódio                                       |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O | Fosfato de sódio bibásico monohidratado                |
| NaHCO <sub>3</sub>                                 | Bicarbonato de sódio                                   |
| NaOH                                               | Hidróxido de sódio                                     |
| NFκB                                               | Fator nuclear <i>κ</i> B                               |
| NLRP3                                              | Família NLR com três domínios de pirina                |
| nm                                                 | Nanômetro                                              |
| NO                                                 | Óxido nítrico                                          |
| Nrf2                                               | Fator Nuclear E2 Relacionada ao Fator 2                |
| O/A                                                | Óleo em água                                           |
| O <sub>2</sub>                                     | Gás oxigênio                                           |
| ODQ                                                | 1H[1,2,3]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1ona           |
| P2X <sub>1</sub>                                   | Receptor purinérgico X1                                |
| P2Y <sub>1</sub>                                   | Receptor purinérgico Y1                                |
| P2Y <sub>12</sub>                                  | Receptor purinérgico Y12                               |

|                  |                                                          |
|------------------|----------------------------------------------------------|
| PAR1             | Receptor ativado por protease do tipo 1                  |
| PAR2             | Receptor ativado por protease do tipo 2                  |
| PdI              | Índice de polidispersão                                  |
| PGI <sub>2</sub> | Prostaglandina I <sub>2</sub> /Prostaciclina             |
| pH               | Potencial hidrogeniônico                                 |
| PI3K             | Cinase do 3-fosfatidil de inositol                       |
| PIP <sub>2</sub> | 4,5-bifosfatidil de inositol                             |
| PKA              | Proteína cinase A                                        |
| PKC              | Proteína cinase C                                        |
| PKG              | Proteína cinase G                                        |
| PLCβ1            | Fosfolipase C beta-1                                     |
| PLCγ2            | Fosfolipase C do tipo γ2                                 |
| PPP              | Plasma pobre em plaquetas                                |
| PRP              | Plasma Rico em plaquetas                                 |
| PTIO             | 2-fenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazolina-1-oxil-3-óxido    |
| Rap1B            | Proteína relacionado ao vírus do sarcoma <i>RAt</i>      |
| RE               | Retículo endoplasmático                                  |
| RyR              | Receptor da rianodina                                    |
| sCG              | Ciclase de guanilil solúvel                              |
| Src              | Proto-oncogene tirosina cinase                           |
| STD              | Sistema tubular denso                                    |
| Syk              | Tirosina cinase do baço                                  |
| TB               | Trombina                                                 |
| TMEM16F          | Proteína transmembranar 16F ativada por Ca <sup>2+</sup> |
| TNF-α            | Fator de necrose tumoral alfa                            |
| TP               | Tempo de protrombina                                     |
| t-PA             | Ativador do plasminogênio tecidual                       |
| TTPa             | Tempo de tromboplastina parcial ativada                  |
| TXA <sub>2</sub> | Tromboxano A2                                            |
| UFPB             | Universidade Federal da Paraíba                          |
| VASP             | Fosfoproteína estimulada por vasodilatador               |
| vWF              | Fator de von Willebrand                                  |
| XG               | Gravidade-força                                          |

## SUMÁRIO

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                 | 2  |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                  | 5  |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....                                                            | 5  |
| 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....                                                       | 5  |
| 2.2.1 <i>Tecnologia farmacêutica</i> .....                                          | 5  |
| 2.2.2 <i>Farmacologia</i> .....                                                     | 5  |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....                                                      | 7  |
| 3.1 A HEMOSTASIA E A FUNÇÃO VASCULAR .....                                          | 7  |
| 3.2 A TROMBOSE: ETIOLOGIA, TERAPÊUTICA E DESAFIOS .....                             | 17 |
| 3.3 OS EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÁCIDO GÁLICO E SEUS DERIVADOS ALQUILADOS .....         | 23 |
| 3.4 O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO GALATO DE OCTILA .....                               | 29 |
| 3.5 A MICROEMULSÃO COMO INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DE INTERESSA PARA A FARMACOLOGIA ..... | 31 |
| 4. MATERIAL .....                                                                   | 36 |
| 4.1 MATERIAL DO DESENVOLVIMENTO DA MICROEMULSÃO .....                               | 36 |
| 4.1.1 <i>Substância-teste: galato de octila</i> .....                               | 36 |
| 4.1.2 <i>Substâncias e reagentes</i> .....                                          | 36 |
| 4.1.3 <i>Soluções e água</i> .....                                                  | 36 |
| 4.1.4 <i>Equipamentos</i> .....                                                     | 37 |
| 4.1.5 <i>Softwares</i> .....                                                        | 37 |
| 4.2 MATERIAL DAS TÉCNICAS FARMACOLÓGICAS .....                                      | 39 |
| 4.2.1 <i>Substância-teste: microemulsão de galato de octila (MEGO)</i> .....        | 39 |
| 4.2.2 <i>Substâncias e reagentes</i> .....                                          | 39 |
| 4.2.3 <i>Soluções</i> .....                                                         | 40 |
| 4.2.4 <i>Equipamentos e softwares</i> .....                                         | 41 |
| 5. MÉTODOS .....                                                                    | 44 |
| 5.1 MÉTODOS DO DESENVOLVIMENTO DA MICROEMULSÃO .....                                | 44 |
| 5.1.1 <i>Aspectos experimentais</i> .....                                           | 44 |
| 5.1.2 <i>Pré-formulação: determinação dos componentes da fórmula</i> .....          | 44 |
| 5.1.3 <i>Preparação da microemulsão por sonicação</i> .....                         | 45 |
| 5.1.4 <i>Medida do tamanho das gotículas e do potencial Zeta</i> .....              | 46 |
| 5.1.5 <i>Medida do pH</i> .....                                                     | 46 |
| 5.1.6 <i>Planejamento Box-Behken para otimização da formulação</i> .....            | 47 |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.7 Teste de estabilidade.....                                                                                                     | 48 |
| 5.1.8 Análise estatística dos ensaios farmacotécnicos .....                                                                          | 49 |
| 5.2 MÉTODOS DAS TÉCNICAS FARMACOLÓGICAS .....                                                                                        | 51 |
| 5.2.1 Tipo de estudo .....                                                                                                           | 51 |
| 5.2.2 Aspectos éticos .....                                                                                                          | 51 |
| 5.2.3 Animais da experimentação.....                                                                                                 | 51 |
| 5.2.4 Experimentos <i>in vitro</i> .....                                                                                             | 52 |
| 5.2.4.1 Coleta e processamento do sangue.....                                                                                        | 52 |
| 5.2.4.2 Avaliação da atividade hemolítica da MEGO sobre hemácias de ratos .....                                                      | 53 |
| 5.2.4.3 Ensaio para avaliar a atividade antiagregante em plaquetas de ratos .....                                                    | 53 |
| 5.2.4.4 Ensaio para avaliar a ação anticoagulante em plasma de ratos ...                                                             | 54 |
| 5.2.4.5 Investigação do efeito vasorrelaxante da MEGO em aorta isolada de rato .....                                                 | 54 |
| 5.2.4.5.1 Preparo dos anéis de aorta torácica de ratos .....                                                                         | 54 |
| 5.2.4.5.2 Protocolo experimental para analisar a viabilidade dos anéis arteriais .....                                               | 55 |
| 5.2.4.5.3 Avaliação da atividade da MEGO sobre o tônus basal da aorta ...                                                            | 57 |
| 5.2.4.5.4 Avaliação da atividade da MEGO sobre a aorta com ou sem o endotélio funcional contraídas com fenilefrina .....             | 57 |
| 5.2.4.5.5 Avaliação da atividade da MEGO sobre a aorta sem o endotélio funcional contraída com solução despolarizante de Krebs ..... | 58 |
| 5.2.4.5.6 Avaliação da ação nitrérgica da MEGO em aorta com o endotélio funcional .....                                              | 59 |
| 5.2.5 Experimentos <i>in vivo</i> .....                                                                                              | 60 |
| 5.2.5.1 Delineamento experimental e tratamento agudo dos animais com a MEGO .....                                                    | 60 |
| 5.2.5.2 Avaliação da ação antitrombótica da MEGO .....                                                                               | 61 |
| 5.2.5.3 Coleta das amostras biológicas dos animais tratados e avaliação da ação antiagregante e anticoagulante do tratamento .....   | 63 |
| 5.2.5.4 Morfometria do trombo formado .....                                                                                          | 63 |
| 5.2.6 Análise estatística .....                                                                                                      | 64 |
| 6. RESULTADOS .....                                                                                                                  | 66 |
| 6.1 PRÉ-FORMULAÇÃO: COMPONENTES DA FÓRMULA. ....                                                                                     | 66 |
| 6.2 PLANEJAMENTO BOX-BEHKEN E DETERMINAÇÃO DA FÓRMULAÇÃO DE MICROEMULSÃO OTIMIZADA. ....                                             | 67 |

|                                                                                                                                                                                            |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>6.3 TESTE DE ESTABILIDADE DA MICROEMULSÃO DE GALATO DE OCTILA</b>                                                                                                                       | <b>71</b>  |
| <b>6.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO HEMOLÍTICA DA MEGO SOBRE ERITRÓCITOS DE RATOS</b>                                                                                                                 | <b>73</b>  |
| <b>6.5 EFEITO DA MEGO SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PLAQUETAS DE RATOS</b>                                                                                                              | <b>74</b>  |
| <b>6.6 AÇÃO DA MEGO SOBRE O TP E TTPA EM PLASMA DE RATOS</b>                                                                                                                               | <b>75</b>  |
| <b>6.7 RESULTADO DA AÇÃO DA MEGO SOBRE O TÔNUS BASAL DE ANÉIS DE AORTA DE RATO COM OU SEM O ENDOTÉLIO FUNCIONAL</b>                                                                        | <b>75</b>  |
| <b>6.8 EFEITO DA MEGO SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR FEN EM ANÉIS DE AORTA DE RATO COM OU SEM O ENDOTÉLIO FUNCIONAL</b>                                                                 | <b>76</b>  |
| <b>6.9 EFEITO DA MEGO SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR SOLUÇÃO DESPOLARIZANTE DE KREBS (KCl 60 mMol.L<sup>-1</sup>) EM ANÉIS DE AORTA DE RATO SEM O ENDOTÉLIO FUNCIONAL</b>               | <b>79</b>  |
| <b>6.10 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO NO SOBRE A AÇÃO VASORRELAXANTE DA MEGO EM ANÉIS DE AORTA DE RATO COM O ENDOTÉLIO VASCULAR CONTRAÍDOS COM FEN E NA PRESENÇA DE L-NAME, PTIO E ODQ.</b> | <b>81</b>  |
| <b>6.11 AÇÃO ANTITROMBÓTICA DA MEGO EM MODELOS DE TROMBOSE INDUZIDA POR FeCl<sub>3</sub> EM CARÓTIDA DE RATO</b>                                                                           | <b>85</b>  |
| <b>6.12 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TROMBO FORMADO</b>                                                                                                                                         | <b>86</b>  |
| <b>6.13 AÇÃO SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DA MEGO APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA EM RATOS</b>                                                                                           | <b>88</b>  |
| <b>6.14 AÇÃO SOBRE TP E TTPa DA MEGO APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA EM RATOS</b>                                                                                                         | <b>90</b>  |
| <b>7. DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                                                        | <b>92</b>  |
| <b>8. CONCLUSÃO</b>                                                                                                                                                                        | <b>104</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS</b>                                                                                                                                                                      | <b>106</b> |
| <b>10. ANEXOS</b>                                                                                                                                                                          | <b>125</b> |
| <b>10.1 ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA</b>                                                                                                                                                     | <b>125</b> |

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem um conjunto de condições que afetam os vasos sanguíneos e o coração, sendo responsáveis por uma grande taxa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Entre essas doenças, destacam-se a aterosclerose, os acidentes vasculares encefálicos e as arritmias cardíacas (Crea, 2024; Lutsey; Zakai, 2023).

Nesse sentido, as alterações dos processos normais da hemostasia devem ser vigiadas para se evitar a progressão das DCV. A hemostasia é um conjunto de mecanismos fisiológicos evocados tanto para manter o sangue em seu estado fluido como para estancar um sangramento quando um vaso sanguíneo é lesionado (Li *et al.*, 2010; Wu; Ngai, 2023).

Os fármacos usados para a prevenção e tratamento de eventos trombóticos são amplamente utilizados, contudo podem causar reações adversas significativas nos seus usuários e muitos não são eficazes em pacientes com alguma comorbidade pretérita. Por exemplo, agentes antiagregantes plaquetários parecem ser menos eficazes em pacientes com doenças crônicas como o diabetes do tipo II, ao passo que as pessoas que o utilizam como tratamento, aproximadamente metade delas, ainda desenvolveram um evento trombótico durante o uso. Já os anticoagulantes apresentam riscos maiores de sangramento e maiores custos para o usuário (Butalia *et al.*, 2011; Evans, 2022).

Estudos apontam que o ácido gálico é dotada de versatilidade nas suas atividades biológicas e além disso ele funciona como uma molécula-base para o desenvolvimento de derivados com potenciais atividades biológicas e aplicações químicas (Badhani *et al.*, 2015; Charlton *et al.*, 2023).

Já está descrito na literatura que o ácido gálico é dotado atividade antiagregante plaquetária, inibindo a ativação plaquetária estimulada pelo difosfato de adenosina (ADP) pela supressão das vias PKC $\alpha$ /p38/MAPK e Akt/GSK $\beta$  (Chang *et al.*, 2012). Além do mais, os derivados alquilados do ácido gálico apresentaram efeito antitrombótico em ratos (Yun-Choi *et al.*, 1996), o que desponta para a investigação do galato de octila como um possível agente antiagregante plaquetário e antitrombótico e que é dotado de atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, agente antagonista purinérgico, antidiabético e antilipidêmico e que, além

disso, apresenta uma baixa toxicidade (EFSA, 2015; Latha; Daisy, 2013; Park *et al.*, 2024; Summanen *et al.*, 2001).

Todavia, devido a sua baixíssima solubilidade em meio aquoso, sua investigação biológica é por vezes dificultada. Assim, o uso de tecnológicas farmacêuticas como a microemulsão vem contornar essa molécula desse empecilho, ao passo que permite que a molécula incorporada tenha melhores interações com as membranas biológica e biodisponibilidade quando usada por via oral. Também, os sistemas microemulssionados são dispersões translúcidas com maior estabilidade termodinâmica que uma emulsão e que é possível de ser administrada por diversas vias tanto enterais quanto parenterais (Sahu *et al.*, 2015).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma microemulsão com o galato de octila e testar a sua ação antiagregante plaquetária, anticoagulante, vasorrelaxante e antitrombótica em ratos.

# OBJETIVOS

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e caracterizar uma microemulsão com o galato de octila e avaliar o potencial vasorrelaxante, antiagregante plaquetário, anticoagulante e antitrombótico.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

#### **2.2.1 *Tecnologia farmacêutica***

- ◆ Realizar testes de pré-formulação dos componentes para a microemulsão contendo o galato de octila;
- ◆ Realizar o planejamento fatorial para avaliar como os componentes da formulação se comportam para obtenção da microemulsão;
- ◆ Determinar as concentrações ideais de cada componente da formulação de modo a obter gotículas microemulsionadas;
- ◆ Avaliar a estabilidade a longo prazo da microemulsão.

#### **2.2.2 *Farmacologia***

- ◆ Determinar a ação hemolítica da microemulsão com galato de octila;
- ◆ Avaliar a ação antiagregante da microemulsão com o galato de octila em plaquetas de ratos;
- ◆ Investigar a ação anticoagulante da microemulsão com o galato de octila sobre o plasma de ratos;
- ◆ Avaliar a ação vasorrelaxante do galato de octila carregado na microemulsão e a ação nitrérgica da mesma em aorta de rato;
- ◆ Avaliar a ação antitrombótica da microemulsão com galato de octila em modelos de trombose induzida por cloreto férrico em artéria carótida comum de ratos;
- ◆ Determinar a ação antiagregante plaquetária e anticoagulante da microemulsão com o galato de octila após a administração intravenosa em ratos;

# FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 A HEMOSTASIA E A FUNÇÃO VASCULAR

A hemostasia é um mecanismo que tem as funções de cessar a perda de sangue por um vaso sanguíneo, manter a integridade do vaso por meio da formação do coágulo e o sangue em um estado fluídico e remover o coágulo após o processo de reparo (Versteeg *et al.*, 2013). Esse processo complexo consiste na interação entre as plaquetas, as células endoteliais, os fatores de coagulação, os fatores fibrinolíticos e todas as outras células que compõe o sangue. A hemostasia pode ser dividida em: hemostasia primária (formação do tampão plaquetário); hemostasia secundária (coagulação do sangue pela rede de fibrina e estabilização do tampão plaquetário); fibrinólise ou hemostasia terciária (consiste na degradação da fibrina no processo de reparo, sendo também incluído nesse processo os mecanismos de inibição da coagulação sanguínea) (Chapin; Hajjar, 2015; Versteeg *et al.*, 2013).

Quase que imediatamente quando um vaso sanguíneo é lesionado, ocorre uma vasoconstrição reflexa a esse dano que limita o fluxo sanguíneo para a área da lesão e impede, em parte, a hemorragia e favorece o contato das plaquetas com a área da lesão, iniciando o processo hemostático.

Em um dano vascular hemorrágico, o endotélio é destruído e dois eventos principais levam a vasoconstrição reflexa: A perda repentina da liberação basal de Óxido Nítrico (NO) pelo endotélio e o aumento de fatores vasoconstritores como a endotelina-1, o Difosfato de Adenosina (ADP) e a Trombina (TB) (Moore *et al.*, 2010; Schoenichen *et al.*, 2019).

Essas moléculas causam a contração da musculatura lisa por ativarem receptores acoplados à proteína G (GPCRs). A ET-1 ativa os receptores ETR<sub>A</sub> e ETR<sub>B</sub>, o ADP ativa os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> e a TB ativa os receptores PAR1. Esses receptores estão presentes na membrana celular da musculatura lisa vascular e plaquetária e são acoplados às proteínas heterotrimérica G<sub>q/11</sub> (Asada *et al.*, 2020; Bouchard; Freeman, 2021; Kevane *et al.*, 2018; Titus; Marappa-Ganeshan, 2019).

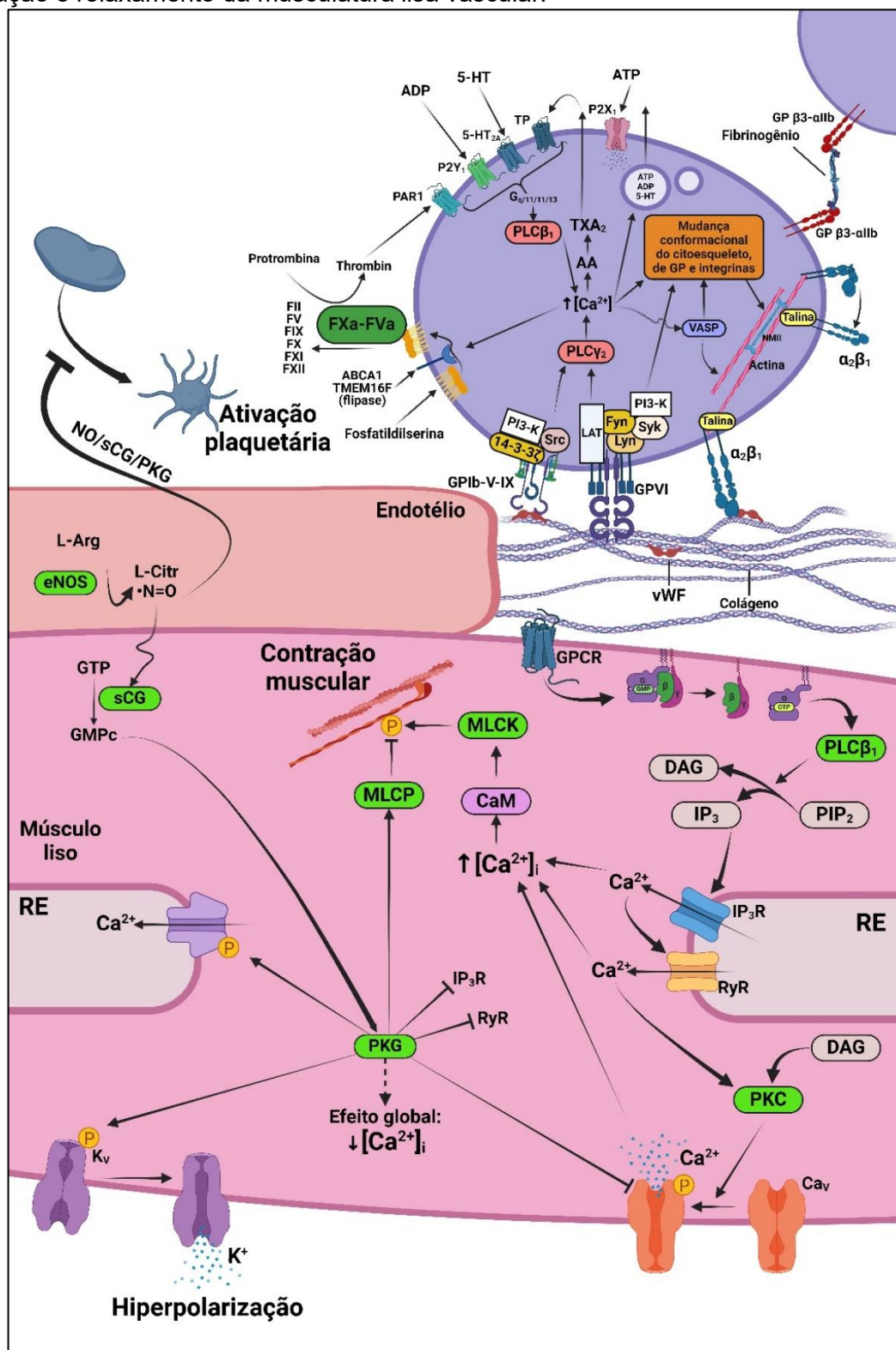
A ativação desses receptores leva ao aumento da concentração do íon Ca<sup>2+</sup> no interior celular, acarretando os processos de contração do músculo liso vascular e agregação plaquetária.

Quando esses receptores são ativados pelos respectivos agonistas, a terceira alça do GPCR liga-se à proteína  $G_{q/11}$  e essa ativa a fosfolipase C- $\beta 1$  (PLC-  $\beta 1$ ) que por sua vez quebra o 4,5-bifosfatidil de Inositol ( $PIP_2$ ) em 1,4,5-trifosfato de Inositol ( $IP_3$ ) e em diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  pode ativar receptores de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ), que são canais iônicos presentes no retículo endoplasmático (RE) celular, promovendo a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo para o citosol. Além disso, esse íon é capaz de ativar os receptores de rianodina (RyR) também presentes no RE e que ativos, por também serem canais iônicos, permite a saída de mais  $Ca^{2+}$  do RE para o citosol. O DAG junto com o  $Ca^{2+}$  é capaz de ativar a proteína cinase C (PKC) que fosforila e ativa Canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Cav$ ) ativando-os e permitindo que o cálcio flua do meio extracelular para o intracelular (Ottolini; Sonkusare, 2021). Esse íon, aumentado no citoplasma celular, liga-se ao calmodulina (CaM) em quatro sítios de ligação distintos entre si, formando complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM que é capaz de ligar-se a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK ligada a  $4Ca^{2+}$ -CaM torna-se ativa e fosforila a cadeia leve da miosina, que passa a interagir com a actina e promover o processo de contração da musculatura lisa (Ito *et al.*, 2022) (figura 1).

O processo que leva ao aumento de  $Ca^{2+}$  por meio da ativação de receptores é semelhante ao que ocorre no interior do endotélio e das plaquetas, mas com repercussões diferentes (Ottolini; Sonkusare, 2021; Versteeg *et al.*, 2013).

Outro mecanismo de contração da musculatura lisa vascular é o gerado pelo acoplamento eletromecânico, que é gerado quando as células musculares lisa da vasculatura sofre um processo de despolarização. Quando o potencial da membrana celular desse tipo celular sofre uma despolarização suficiente para ativar canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Cav$ ), o  $Ca^{2+}$  entra do meio extracelular por meio desse canal ativado para o citoplasma celular e também a ativação do  $Cav$  leva a saída de  $Ca^{2+}$  por meio dos receptores do tipo  $IP_3$  e de RyR (provavelmente por ativar a via da PLC) (Kirschstein *et al.*, 2009). Esses eventos atuam de modo que a concentração de  $Ca^{2+}$  no citosol aumenta significativamente e a contração muscular ocorra (Dixon; Trimmer, 2023).

**Figura 1** - Mecanismos moleculares de ativação e agregação plaquetária e sua inibição e de contração e relaxamento da musculatura lisa vascular.



Quando um vaso sanguíneo é lesionado, o endotélio danificado e as plaquetas liberam autacoides que atuam nos receptores presentes no músculo liso vascular e nas próprias plaquetas. O primeiro sinal para a ativação das plaquetas é o contato da GPIb-V-IX com a matriz extracelular. O óxido nítrico (NO) antagoniza a ativação plaquetária, e a contração vascular ao aumentar a concentração de GMPc no citosol.

FONTE: Autor (2024).

Esses mecanismos de contração estão alterados em diversas doenças que acometem o sistema cardiovascular e levam a mudanças do fluxo sanguíneo que podem precipitar a formação de trombos (Hutton *et al.*, 2023; Kim; Ku, 2022).

Paralelamente a uma resposta contraturante em um processo de lesão vascular (ou de forma constante em casos de doença cardiovascular) ocorre o processo de agregação plaquetária, iniciando a hemostasia sanguínea.

As plaquetas circulante são fragmentos celulares derivadas de megacariócitos e que não interagem com a parede vascular quando essa está íntegra. Apesar de serem diminutas em relação a outros componentes figurados do sangue, elas são complexas tanto na superfície da sua membrana quanto no seu interior.

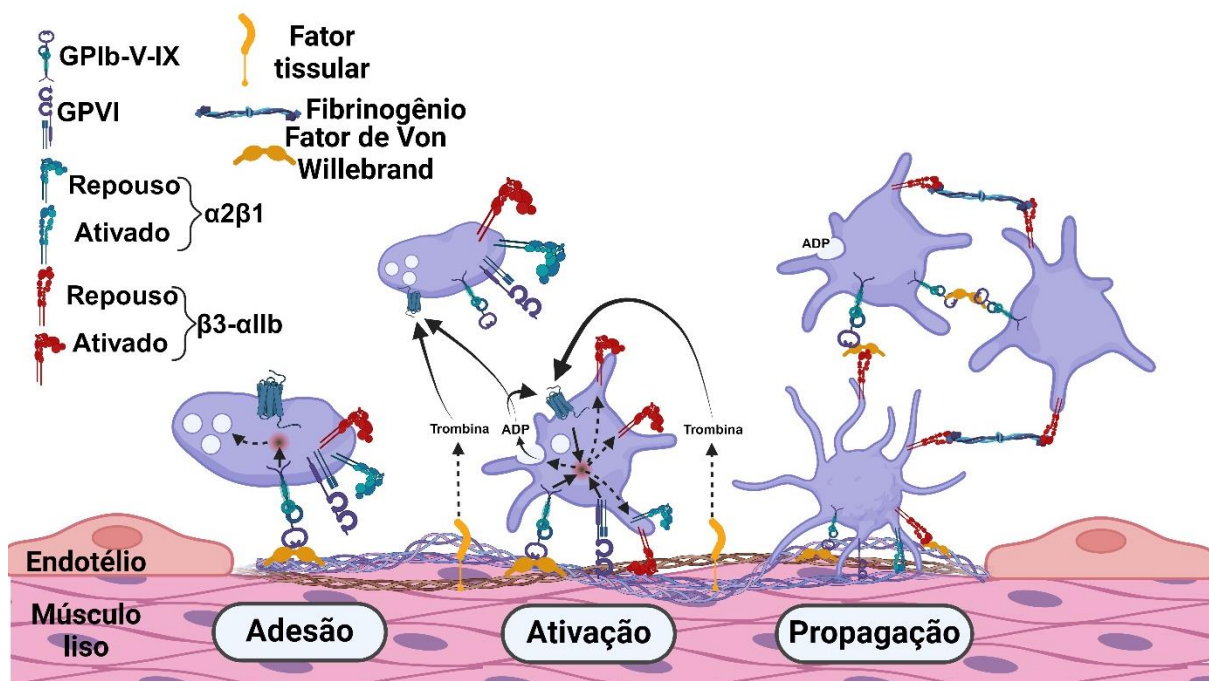
Uma das principais formas das plaquetas interagirem com seu exterior é por meio de glicoproteínas e integrinas presentes na membrana celular plaquetária, como as integrinas  $\beta 3$ - $\alpha$ IIb e a  $\alpha 2\beta 1$  e as glicoproteínas (GP) Ib-V-IX e a VI. Além disso, diversos GPCRs participam no processo de ativação e inibição plaquetária, como os receptores de trombina (PAR-1 e PAR-2, ambos ativadores das proteínas  $G_{q/11/12/13}$ ), os receptores do ADP ( $P2Y_1$  que acopla à  $G_{q/11}$  e o  $P2Y_{12}$  que acopla a  $G_{i/o}$ ), receptores do ATP ( $P2X_1$  que são receptores ionotrópicos permeáveis ao  $Ca^{2+}$ ), os receptores da adrenalina ( $\alpha_2$ , que ativa a proteína  $G_{i/o}$ ), o receptor do tromboxano A2 (TP, ativador da  $G_{q/11}$ ) e o receptor da prostaglandina I2 ( $PGI_2$ , agonista do receptor IP que ativa a proteína  $G_s$ ) (Thomas, 2019).

As plaquetas possuem duas organelas características e exclusivas delas que são os grânulos do tipo  $\alpha$  que são ricos em P-selectina, GPVI, GPIb-IX-V, Fator de Von Willebrand (vWF), fatores de coagulação (como o FV e o FVIII), antitrombina (AT), plasminogênio, proteína S, citocinas e quimiocinas e os grânulos densos que possuem altas concentrações de ADP, ATP, 5-HT, histamina,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ , pirofosfato e polifosfato (PoliP) (Harrison; Cramer, 1993; Thomas, 2019; Van Der Meijden; Heemskerk, 2019).

Uma vez a integridade da camada endotelial rompida, o vWF se ligará aos tecidos subjacentes e o colágeno ficará exposto. A plaqueta liga-se àquele principalmente através da GP-VI e a este via GP-Ib (figura 2) (Farndale *et al.*, 2003). Essa primeira interação permite a plaqueta aderir ao local da lesão e a resistir ao fluxo sanguíneo, permitindo, também, que as plaquetas rolem sobre o leito vascular e outras proteínas de suas membranas interajam com outros componentes da camada subendotelial (Broos *et al.*, 2011). Essas duas interações estabilizam as plaquetas no

local da lesão e são o pivô de sua ativação. Tanto a GP-Ib-V-IX quanto a GPVI ligadas levam ao recrutamento de diversas proteínas acessórias que se ligam ao domínio intracelular dessas glicoproteínas ativando, por fim, a  $PLC\gamma$  que leva ao aumento de  $Ca^{2+}$  intraplaquetário de modo semelhante ao gerado pela  $PLC\beta$ . Todavia, o  $IP_3$  atua nos seus receptores presente em um aparato plaquetário como uma forma rudimentar do retículo endoplasmático: o sistema tubular denso (STD). O  $IP_3$  se liga e ativa os  $IP_3R$  presentes no STD, permitindo a saída de  $Ca^{2+}$  desse e aumentando a concentração desse íon no citoplasma plaquetário. O DAG da membrana plasmática plaquetária em conjunto com o  $Ca^{2+}$  ativa a proteína cinase C (PKC), levando a ativação das integrinas  $\beta_3\text{-}\alpha_{IIb}$  e a  $\alpha_2\beta_1$  (que estão normalmente em uma conformação fechada e interagem fracamente com seus ligantes) fazendo que essa força de interação aumente consideravelmente.

**Figura 2** - Mecanismo de adesão e agregação plaquetária na matriz extracelular.



A GPIb-V-IX inicia o processo de adesão plaquetária nas artérias lesionadas, iniciando o processo de ativação plaquetária. Outras integrinas e GP passam a interagir com outros componentes da matriz extracelular e junto com os autacoides as plaquetas são ativadas. Por fim, o conteúdo granular plaquetário recruta outras plaquetas para o tampão, ampliando-o e levando a fase de propagação da agregação plaquetária.

FONTE: Autor (2024).

A PKC também promove a secreção dos grânulos plaquetários, mudança da conformação do citoesqueleto (por meio da fosforilação e ativação das proteínas VASP e talina), exposição para o folheto externo da membrana celular de

fosfatidilserina (ação mediada pela flipases ativas pela PKC e aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e ativação da fosfolipase A2 (levando a uma exarcebada produção localizada de  $\text{TXA}_2$ ) (Broos *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; Wentworth *et al.*, 2006). Vale ressaltar que os RyRs não participam dos mecanismos de ativação plaquetária (Chu *et al.*, 2006).

O ADP, o ATP, a 5-HT e o  $\text{TXA}_2$  liberados nessa fase inicial de adesão e a trombina proveniente da coagulação sanguínea que ocorre em paralelo atuam de forma autócrina e parácrina, ativando ainda mais as plaquetas já aderidas e recrutando outras plaquetas circulantes para o tampão que está em formação.

Na fase de propagação, através de um processo denominado agregação plaquetária, as plaquetas ativas podem ligar-se umas às outras por meio da integrina  $\beta 3\text{-}\alpha \text{IIb}$  que se liga ao fibrinogênio formando pontes (Nesbitt *et al.*, 2002; Shattil *et al.*, 2010).

Como forma de evitar a ativação plaquetária fora do local da lesão e limitar o processo hemostático, o endotélio produz autacoides que têm a capacidade de inibir a ativação e agregação plaquetária (figura 1).

Dentro os autacoides, a  $\text{PGI}_2$  é um que pode atuar tanto no músculo liso vascular causando o relaxamento desse, quanto nas plaquetas, impedindo a sua ativação. A  $\text{PGI}_2$  ativa os seus receptores IP presentes nas membranas celulares desses componentes, o que resulta no aumento intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), que ativa a proteína cinase A (PKA) a qual fosforila e inibe a VASP (impedindo a mudança da forma plaquetária), o  $\text{IP}_3\text{R}$  (impedindo o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma plaquetário), a Rap1B (impedindo a secreção dos componentes granulares plaquetários) e impede a expressão ativa da GP-Ib-V-IX e da  $\beta 3\text{-}\alpha \text{IIb}$  (diminuindo drasticamente o grau de agregação e adesão plaquetária) (Michelson *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 2001; Smolenski, 2012).

Já o NO pode ser produzido pelas plaquetas ou pelo endotélio vascular a partir da conversão da L-arginina na presença de  $\text{O}_2$  pela sintase de óxido nítrico (NOS) em L-citrulina e NO (Gkaliagkousi *et al.*, 2007). O NO inibe a agregação plaquetária por ativar, no citoplasma plaquetário, a ciclase de guanilil solúvel (sGC) e, em consequência, aumentar a concentração plaquetária de fosfato cíclico de guanilina (GMPc) e essa promover a ativação da proteína cinase G (PKG), a qual ativa, fosforila e inibe os mesmos alvos supracitados para a PKA (Russo *et al.*, 2023).

Além dessa ação sobre as plaquetas plaquetária, o NO é um potente vasorrelaxante que, para esse efeito, também ativa a via sGC/PKG nos miócitos

vasculares. Já a PKG nessa célula fosforila e ativa a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA) e canais de  $\text{K}^+$  da membrana celular, ao passo que fosforila e inativa a MLCK, os  $\text{Ca}_v$  e o  $\text{IP}_3\text{R}$ . Esses eventos irão acarretar na hiperpolarização celular e diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos, causando o relaxamento muscular (Asunción-Alvarez *et al.*, 2024; Lincoln *et al.*, 2001).

Paralelo aos processos de ativação e agregação plaquetária descritos, ocorre a coagulação sanguínea (figura 3) que culmina na formação da rede de fibrina entre e por volta do tampão plaquetário inicial, estabilizando-o.

Inicialmente, quando ocorre a lesão vascular, o fator tissular (FT) é exposto (normalmente está presente na membrana do músculo liso, de fibroblastos e de monócitos) ao sangue sendo, assim, permitida a ligação do fator VII ativo (FVIIa) ao FT, formando o complexo FT-FVIIa o qual rapidamente se liga ao fator X.

O complexo tripartícipe (FT-FVII-FX) é capaz de converter a protrombina (FII) em trombina (FIIa), que atua em diversos alvos de forma inespecífica, gerando por exemplo o Fator de Leiden ativo (Fator V) e os fatores IX e VIII ativos. Estes últimos, uma vez unidos em resíduos de fosfatidilserina (ricas em cargas negativas), atuam sobre o complexo tripartícipe potencializando sua ação. De forma similar se observa a ação da Trombina sobre o Fator de Leiden, que tende a se ligar ao Fator X e potencializa a ação enzimática do complexo tripartícipe.

Este mecanismo de feedback positivo uma vez intensificado faz com que a Trombina alcance ainda mais alvos e com maior avidéz, convertendo o fibrinogênio em fibrina e ativando o Fator XIII. A fibrina se polimeriza, ao passo que o FXIIIa é o responsável pelas ligações cruzadas formando uma estrutura mais rígida e compacta, denominada rede de fibrina (Alshehri *et al.*, 2021; Wu; Ngai, 2023).

Baseado nesse modelo de coagulação sanguínea, a via intrínseca de coagulação funciona como um mecanismo de amplificação do processo. O contato com a fosfatilserina das membranas plaquetárias, o PoliP, *traps* extracelulares de neutrófilos, a pré-caliceína e o cininogênio de alto peso molecular são as principais formas do fator XII torna-se ativo e esse ativar mais FXI (Schmaier, 2008; Schmaier; Stavrou, 2019). Assim, no modelo mais moderno para explicar o processo de coagulação do sangue, a via intrínseca não se torna importante. Isso já vinha sendo previsto há anos pois já foi observado que a deficiência desse fator não levava a quadros hemofílicos, mas a um prolongamento do tempo de coagulação do plasma

sanguíneo no teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (Schmaier; Stavrou, 2019).

Com isso, por alguns anos o FXII ficou sobre a ótica de ter função principal no mecanismo plasmático de produção de bradicinina. Entretanto, diversos estudos recentes apontam a importância desse fator como um mecanismo de defesa contra corpos estranhos no sangue (incluindo bactérias) (Renné; Stavrou, 2019). Também, já foi observado que pessoas deficientes de FXII tem um baixo risco de desenvolver um evento trombótico (Kleinschnitz *et al.*, 2006) e que a inibição seletiva desse fator reduz o risco de trombose sem aumentar o risco de sangramentos (Larsson *et al.*, 2014; Revenko *et al.*, 2011).

Nesse processo de coagulação do sangue, é possível imaginar que quando iniciado, o coágulo tomaria toda a luz possível dos vasos sanguíneos. Entretanto, o corpo possui mecanismos que limitam a coagulação à área da lesão. O inibidor da via do fator tecidual pode se ligar ao complexo FT-FVIIa e inibi-lo; a antitrombina (AT) é superativa quando está ligada ao sulfato de heparan (presente no glicocálix do endotélio são) e inibe fortemente o FIIa e o FXa; e a trombomodulina (expressada quando o endotélio é ativo por agentes como a 5-HT, ATP, trombina e a bradicinina) que sequestra o FIIa tornando inativo e junto com a proteína C e a proteína S inibe o FVa e o FVIIIa (Gruzdys *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2020; Versteeg *et al.*, 2013). No modelo de coagulação posto, esse processo é chamado de fase de finalização (figura 4).

Por fim, durante o processo de reparo da lesão e dissolução do trombo (figura 5), o endotélio secreta uma enzima denominada ativador do plasminogênio tecidual e também passa a expressar o receptor de ativação do ativador do plasminogênio do tipo urocinase (que ancora o ativador do plasminogênio do tipo urocinase e o torna ativo). Essas enzimas convertem o plasminogênio circulante em plasmina a qual cliva o fibrinogênio em peptídeos solúveis no sangue e, dessa forma, dissolve a rede de fibrina e libera a celularidade (hemáticas e leucócitos) aprisionada nela (Chapin; Hajjar, 2015).





### 3.2 A TROMBOSE: ETIOLOGIA, TERAPÊUTICA E DESAFIOS

A trombose é caracterizada como a formação de um coágulo sanguíneo no interior dos vasos como uma resposta excessiva à injúria vascular, que impede o fluxo normal do sangue, causando isquemia no caso do acometimento de artérias ou impedimento do retorno quando em veias.

Os eventos tromboembólicos (ETE) estão presentes em diversos quadros de doenças cardiovasculares (como trombose venosa profunda, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico isquêmico, embolismo pulmonar, fibrilação cardíaca, acamamento, infecções, etc.) e são os responsáveis por milhares de mortes em todo o mundo anualmente e por um grande número de morbidade e de custos para os sistemas de saúde. Em 2016, 31% de todas as mortes mundiais foram devidas a um ETE (Crea, 2024; Lutsey; Zakai, 2023; May; Moll, 2021).

Segundo os dados disponíveis no DATASUS, no Brasil, entre 2011 e 2021, aproximadamente 1,2 milhão de pessoas morreram devido a algum problema agudo decorrente de tromboembolismo. Ressalta-se que muitos pacientes acometidos por tal doença percorrem, também, a trilha de diversas condições crônicas como a hipertensão arterial sistêmica, a dislipidemia, aterosclerose, a diabetes, o tabagismo, a obesidade, o sedentarismo, o câncer e o envelhecimento (Lutsey; Zakai, 2023; Raskob *et al.*, 2014; Sodikov *et al.*, 2024).

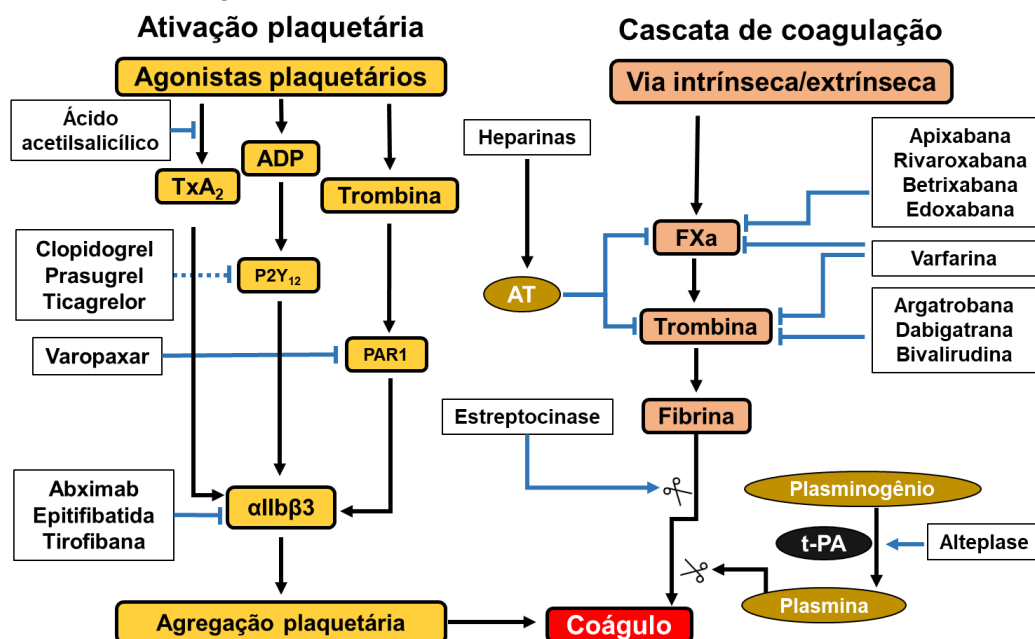
Apesar do grau de incidência de ETE ser ainda alarmante para a população e oneroso para os gastos em saúde, a taxa de mortalidade por essa condição (bem como por todas as doenças cardiovasculares) vem diminuindo consideravelmente aos longos das últimas décadas, mas ainda lideram com a maior parcela de mortalidade e morbidade em todo o globo (Roth *et al.*, 2017). Essa conquista é devida às variadas abordagens terapêuticas (figura 5) para tratar os ETE, ao diagnóstico precoce e adesão de pacientes aos tratamentos desenvolvidos pela comunidade científica (Lutsey; Zakai, 2023; Roth *et al.*, 2017).

O processo trombótico é iniciado nos vasos graças a interação de diversos fatores celulares e moleculares que induzem, de forma descontrolada, à coagulação sanguínea e à agregação plaquetária. Desde 1856 os fatores que reverberam em um ETE foram sistematizados por Rudolf Virchow em uma tríade (figura 6) que colocam a hipercoagulabilidade e a estase sanguínea e a lesão endotelial como tais (Bagot; Arya, 2008).

Também, as características morfológicas dos trombos são importantes para determinar os melhores tratamentos para a sua resolução. Eles podem ser de dois tipos principais: brancos ou vermelhos. Os trombos ditos brancos são ricos em plaquetas, NETs e são formados em artérias com altas velocidades de fluxo sanguíneo quando lesionadas ou quando placas ateroscleróticas são erodidas de forma superficial, sendo a exposição de colágeno o principal iniciador do evento

Os trombos vermelhos são mais ricos em fibrina e de hemácias e majoritariamente formados em leitos artérias com velocidades sanguínea mais elevada. Lesões ateroscleróticas que se rompem e expõe o centro lipídico e a estase sanguínea são as principais causas desses trombos. A exposição do fator tecidual é a principal forma de iniciar esse tipo de trombo e eles normalmente obstruem toda a luz arterial (Libby, 2017). Durante a fase de retração desse tipo de trombo, as hemácias tornam-se poliedrais, a rede de fibrina é fixada fortemente com a ação do FXIII e as plaquetas ativadas tendem a se retrair. Esses fatores reduzem a porosidade do trombo e aumenta sua densidade tornando-os mais resistentes a fibrinólise (Demsarh, 1992; Litvinov; Weisel, 2023; Rijken; Uitte de Willige, 2017; Tutwiler *et al.*, 2019)

**Figura 5** - Alvos dos agentes antitrombóticos utilizados atualmente.

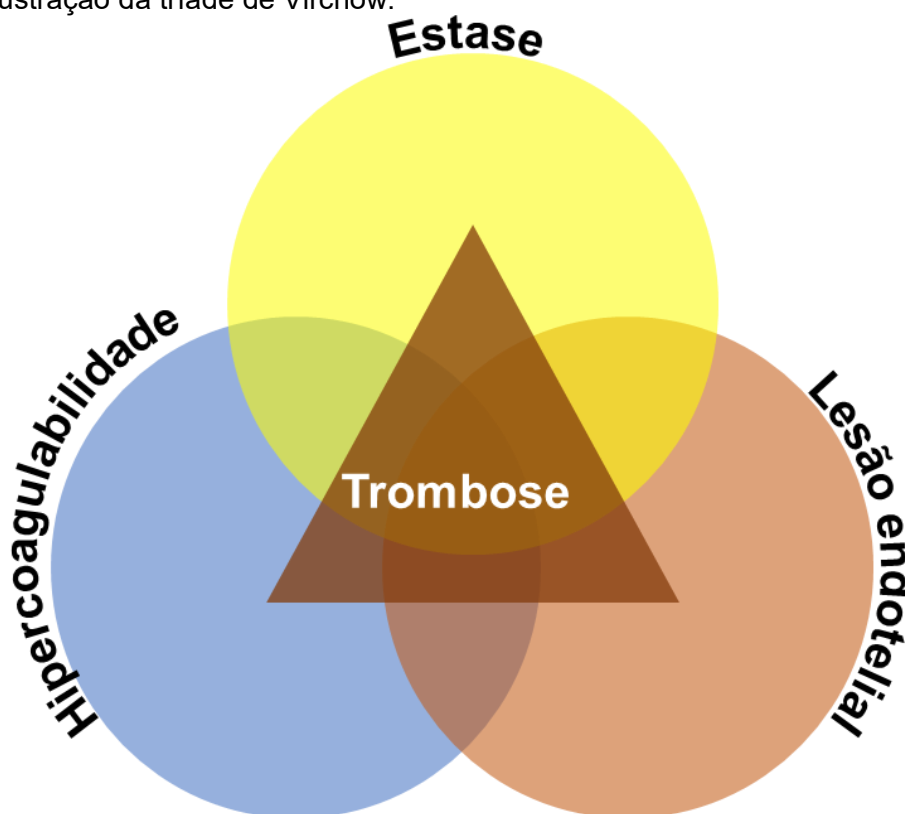


As setas apontam ativação, já as barras indicam inibição ou antagonismo. As tesouras apontam clivagem enzimática. t-PA: ativador do plasminogênio tecidual; AT: antitrombina.  
FONTE: Autor (2024)

A alteração do fluxo sanguíneo normal (laminar) e a parada do sangue afetam diretamente o estresse de cisalhamento sobre o leito vascular, o que leva à diminuição da produção de moléculas antitrombóticas como o NO, a prostaciclina e o ativador de plasminogênio, ao passo que a produção e secreção de moléculas de adesão e pró-trombóticas aumentam como: o fator tecidual, o vWF, a ET-1, o ICAM-1 e o VCAM-1 (Danesh *et al.*, 2004). Também, essas alterações vasculares decorrentes das mudanças do fluxo normal se relacionam com a disfunção endotelial.

Na disfunção endotelial (presente em diversas condições e doenças) esse desbalanço entre agentes antitrombóticos e pró-trombóticos está presente, causando, também, um processo de contração constante da musculatura lisa vascular (principalmente devido a perda da produção de NO pelo endotélio), remodelamento vascular e perda do estresse de cisalhamento pelo fluxo laminar do sangue (Costa *et al.*, 2019; Triggle *et al.*, 2012). Assim, a perda do fluxo laminar, a disfunção endotelial e a estase sanguínea fazem com que as hemácias, os leucócitos e as plaquetas circulantes se concentrem próximas às paredes vasculares, local que passam a aderir e formar microtrombos que servem de pivô para um ETE severo (Danesh *et al.*, 2004).

**Figura 6** - Ilustração da tríade de Virchow.



FONTE: Autor (2024)

A maior produção do fator tecidual e a perda do endotélio ou a sua disfuncionalidade leva ao aumento dos processos de coagulação e formação de fibrina (verificada pelo aumento da concentração do D-dímero, que é um subproduto da degradação da rede de fibrina (Cheng *et al.*, 2022) e o maior grau de agregação plaquetária frente a diversos ativadores favorecem o início da formação de um trombo de forma descontrolada. Somado a isso, o endotelial que outrora limitava a hemostasia e agora está em estado disfuncional colaboram com o crescimento desse trombo e ocorrência de um quadro possivelmente mortal para um paciente, como uma trombose venosa profunda, um infarto agudo do miocárdio ou um acidente vascular encefálico isquêmico (Crea, 2024; Kim *et al.*, 2013; Raskob *et al.*, 2014).

Assim, diversos pontos no processo de formação de um coágulo são alvos de fármacos utilizados na terapêutica e prevenção de ETE (figura 6). Todavia, estudos apontam problemáticas referentes ao uso desses agentes.

Atualmente, é visto que o uso de agentes antiagregantes plaquetários em pacientes que possuem as plaquetas hiper-reativas (como no diabetes tipo II, na obesidade e na hipertensão) não parece promover efeitos antitrombóticos (Angiolillo *et al.*, 2006; Lip *et al.*, 2011; Santilli *et al.*, 2012; Soodi *et al.*, 2020). Em vista disso, torna-se importante a pesquisa de novas substâncias antiagregantes plaquetárias que continuem eficazes mesmo em pessoas que tenham outras comorbidades.

Também, é sabido que aproximadamente 30% dos pacientes que usam antagonistas do ADP (como o clopidogrel ou o prasugrel) são irresponsivos, e esses medicamentos são contraindicados em pacientes com mais de 75 anos (Dayoub *et al.*, 2018; Mackman *et al.*, 2020). Na ótica de um bloqueio da atividade plaquetária, o ácido acetilsalicílico, o fármaco mais utilizado na prevenção primária e secundária de ETE, tem sido frequente, porém, observar que quase 58% dos pacientes ainda desenvolvem algum evento cardiovascular (Chen *et al.*, 2023), que o uso de doses maiores que 100 mg/dia aumenta o risco de morte por evento cardiovascular quando comparado a quem não usa ou a quem usa doses menores que 100 mg/dia (Butalia *et al.*, 2011) e que o uso na prevenção primária aumenta consideravelmente o risco do desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (Mujaj *et al.*, 2022).

Quando se olha para os agentes anticoagulantes, as problemáticas giram em torno do maior risco de hemorragias, toxicidade elevada de algumas classes (como as heparinas e os antagonistas da vitamina K), os elevados custos de tratamento a

longo prazo (o que gera descontinuidade da terapia), variações de responsividade aos tratamentos devido às variações genéticas inerentes das populações e também as interações medicamentosas (que também os agentes antiagregantes plaquetários não estão isentos) (Mackman *et al.*, 2020).

Em vista de todos esses fatores, é cristalina a necessidade do desenvolvimentos de novas abordagens terapêuticas medicamentosas para a prevenção e tratamento de ETE. Também, entender que a trombose é um evento complexo que envolve tantos as alterações presentes na tríade de Virchow como também a participação do processo inflamatório (o que classifica a trombose como um evento vascular trombo-inflamatório), das hemácias, dos leucócitos, da musculatura lisa vascular e das fontes dos componentes da hemostasia (megacariócitos e fígado) (Bettioli *et al.*, 2022; Davizon-Castillo *et al.*, 2019; Swystun; Liaw, 2016; Viswanathan *et al.*, 2023). Assim, as novas moléculas visadas são postas não apenas como meras agentes antiagregantes plaquetárias ou anticoagulantes, mas como fármacos multifacetados. Isto é, capazes de ter ação antitrombótica, mas também ação antidiabética, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, etc., por atuar nas plaquetas, no endotélio, nos megacariócitos e na coagulação de modo a modular a hemostasia, impedindo o sangramento como efeito adverso, mas prevenindo a trombose (como ocorre nos pacientes que possuem mutação no FXII da coagulação).

Tais desafios na procura de novos fármacos antitrombóticos são postos por alguns autores e se somam a outros [desafios] como, por exemplo, atuar em diferentes pontos no processo de formação do trombo, ser eficaz na prevenção primária com baixo risco ao paciente, não inibir completamente o processo hemostático e resolver o ambiente de hiperreatividade plaquetária e pró-coagulante desencadeada por um fundo inflamatório presente em muitas doenças crônicas (muitos autores colocam esse último ponto como primordial. Remover o “resquício” de risco cardiovascular gerado pelo ambiente pró-inflamatório após sanados os riscos tratáveis como obesidade, hiperlipidemias, pressão alta, etc., é um dos maiores desafios das novas terapias para as doenças cardiovasculares) (Aday; Ridker, 2019; Butalia *et al.*, 2011; Evans, 2022; Ten Cate, 2021).

Frente ao exposto, destaca-se o potencial do galato de octila, um derivado do ácido gálico, como um agente antioxidante, antagonista do ATP, bloqueador da entrada de cálcio em diversas linhagens celulares e anti-inflamatório e com ampla aplicação como agente conservante pela indústria alimentícia e cosmética devido a

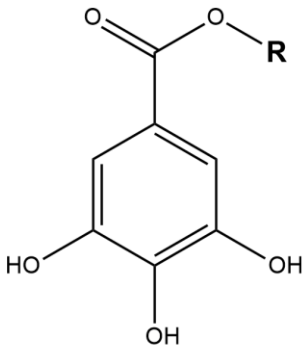
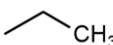
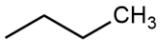
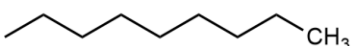
sua baixa toxicidade, mas que não há evidências de sua ação como agente antitrombótico e vasorrelaxante, atividades já demonstradas para o ácido gálico e alguns derivados alquílicos. Sendo, por fim, necessários estudos para avaliar o potencial dessa molécula. Também, é esperado que carregado em uma microemulsão, o galato de octila sua biocompatibilidade seja melhorada.

### 3.3 OS EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÁCIDO GÁLICO E SEUS DERIVADOS ALQUILADOS

O ácido gálico (figura 7) é um produto natural da classe dos compostos fenólicos simples. Com origem em vegetais a partir da rota biossintética do ácido chiquímico, essa molécula é largamente distribuída nas espécies vegetais (Morton *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2016).

Essa molécula é precursora, por rotas biológicas, de diversas outras substâncias em plantas, fungos e animais (Marmouzi *et al.*, 2021; Sarioezlue; Kivanc, 2009). Em destaque, os derivados alquilados (a partir da condensação de álcoois com o grupamento ácido carboxílico do ácido gálico) são um desses derivados do ácido gálico. Esses derivados (como o galato de octila) já foram identificados em espécies vegetais e animais (Latha; Daisy, 2013; Lu *et al.*, 2022).

**Figura 7** - Estrutura do ácido gálico e de seus derivados alquílicos.

|  | R                                                                                                   | Nome comum        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|                                                                                     | —H                                                                                                  | Ácido gálico      |
|                                                                                     | —CH <sub>3</sub>                                                                                    | Galato de metila  |
|                                                                                     |  CH <sub>3</sub> | Galato de etila   |
|                                                                                     |  CH <sub>3</sub> | Galato de propila |
|                                                                                     |  CH <sub>3</sub> | Galato de octila  |

O R corresponde ao grupamento químico que caracteriza a substância.  
 FONTE: Autor (2024).

Esse composto fenólico demonstrou, primeiramente, atividade antioxidante ainda nos anos 40 do século XX (Golumbic; Mattill, 1942). Entretanto, apenas no final desse século e principalmente nas primeiras décadas do século XXI o ácido gálico passa a ser estudado como uma molécula com bioatividade promissora sobre o sistema cardiovascular, bem como os seus derivados (Badhani *et al.*, 2015; Morton *et al.*, 2000).

O ácido gálico e seus derivados parecem atuar como agentes antioxidantes de duas maneiras: a primeira como um neutralizador de radicais livres e a segunda por

aumentar as defesas antioxidantes celulares. Ressalta-se que a maioria dos efeitos biológicos desses produtos naturais em modelos de doenças são atribuídos a sua ação antioxidante. Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes diretos doando prótons para os radicais livres, neutralizando-os, ou doando elétrons, tornando o radical livre em uma forma iônica ou neutra estável (Wright *et al.*, 2001). Aparentemente, os compostos fenólicos simples (como o ácido gálico e seus derivados alquilados) parecem atuar como antioxidantes doadores de elétrons (Charlton *et al.*, 2023). Esse mecanismo, apesar de ter pouca ou nenhuma repercussão sobre a atividade biológica dos galatos, explica o extenso uso na indústria alimentícia e de cosméticos como antioxidantes (Badhani *et al.*, 2015).

Além dessa forma, os efeitos antioxidantes mais proeminentes e com maiores repercussões biológicas do ácido gálico e derivados parece ser por aumentar as defesas antioxidantes celulares. Em modelos de diabetes em ratos, o tratamento com o ácido gálico foi capaz de aumentar a quantidade e atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e a glutathione transferase no fígado, rins e sangue desses animais (Huang *et al.*, 2016; Ramkumar *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2021). Achados semelhantes foram observados em modelos de doenças cardiovasculares como a hipertensão, a hipertrofia cardíaca, o infarto, a senescência cardíaca (Ogunsanwo *et al.*, 2017; Prince *et al.*, 2009; Shaik *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2020; Zarei *et al.*, 2023). Efeitos antioxidantes por aumentar as defesas celulares já foram relatados para o galato de metila (Liang *et al.*, 2023; Whang *et al.*, 2005), de etila (Fan *et al.*, 2023; Mehla *et al.*, 2013), de octila (Mori *et al.*, 2017) e para o galato de dodecila (Kubo *et al.*, 2002) em modelos de doenças do coração e pulmonares.

Avaliando estudos publicados mais recentemente sobre a ação antioxidante dessas moléculas, a indução do aparato antioxidante celular é mediada pela ativação da proteína Fator Nuclear E2 Relacionada ao Fator 2 (Nrf2). Esse fator nuclear induz o aumento da expressão das enzimas antioxidantes citoprotetoras supracitadas (Hammad *et al.*, 2023).

Parte dos efeitos sobre o Nrf2 desses compostos fenólicos são explicados por eles poderem se oxidar em quinonas ou quinolonas e nesse processo gerar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual é capaz de ativar o Nrf2 e o aparato enzimático antioxidante (Akagawa *et al.*, 2003; Erlank *et al.*, 2011; Gil-Longo; González-Vázquez, 2010). Apesar disso, há autores que indicam uma interação e ativação direta do ácido

gálico com o Nrf2 (Diniyah *et al.*, 2023; Feng *et al.*, 2018). Assim, é possível que esses dois mecanismos expliquem os efeitos benéficos do ácido gálico e seus derivados alquilados, mediados pelo aumento da defesa antioxidante, em diversos modelos de doença em roedores (Lin *et al.*, 2020; Mehla *et al.*, 2013; Mojadami *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2019).

Além da clara ação antioxidante desses compostos, outros efeitos e mecanismos de ação já são bem relatados na literatura. Todavia, o ácido gálico é muito mais estudado do que seus derivados alquilados. Dessa maneira, é evidente a necessidade de mais investigações sobre esses derivados – uma das motivações do presente trabalho – tendo em vista essa escassez e, também, a falta de linearidade dos seus efeitos (conforme observado nessa revisão). Por exemplo: enquanto o ácido gálico e o galato de metila são antiagregantes plaquetários, o galato de propila é um proeminente agente pró-agregante plaquetário (apesar de haver relato desse ter efeito antitrombótico) (Xiao *et al.*, 2004). Outro exemplo que ilustra a dualidade de efeitos desses compostos é no tocante a responsividade vascular, na qual há uma ação vasoconstritora do ácido gálico quando em baixas concentrações e uma ação vasorrelaxante em concentrações maiores (de Oliveira *et al.*, 2016).

Em aorta em banho de órgãos isolado, o ácido gálico induz, em baixas concentrações, efeito vasoconstritor de forma dependente do endotélio vascular pré-contráídos com FEN ou prostaglandina F2 $\alpha$  (Sanae *et al.*, 2003). É relatado que tal processo é desencadeado devido a autooxidação do ácido gálico e formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nesse processo. Em meio oxigenado e aquoso, o ácido gálico é capaz de se transformar em hidroquinonas, semiquinonas e em ácido elárgico. Nessas transformações, radicais livres são formados (Gil-Longo; González-Vázquez, 2010; Tulyathan *et al.*, 1989). Assim, esse aumento repentino de espécie reativa de oxigênio leva a: depleção de NO endotelial e ativação da ciclo-oxigenase na musculatura lisa vascular (o que induz contração arterial de forma independente do endotélio). Esses efeitos são revertidos pela remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da adição de N-acetil-cisteína e catalase ao meio (Gil-Longo; González-Vázquez, 2010).

Já em concentrações mais elevadas, em concentrações acima de 1 mmol.L<sup>-1</sup>, o ácido gálico induz efeito vasorrelaxante tanto na presença quanto na ausência de endotélio em aorta de rato montada em banho de órgãos isolado. Tal efeito é relatado por de Oliveira *et al.* (2016). Aparentemente, esse efeito parece não ser dependente da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tendo em vista que o uso de um inibidor da PI3K (o wortmannin)

não teve efeito sobre o relaxamento induzido pelo ácido gálico, já que é relatado que o aumento de  $H_2O_2$  induz a fosforilação e ativação da eNOS por levar a ativação da PI3K (Cai *et al.*, 2001; Tejero *et al.*, 2019).

Além desse efeito arterial, o ácido gálico é dotado de ação antiagregante plaquetário. Sobre plaquetas humanas, o ácido gálico inibe a ação agregante induzida pelo ADP, pelo U46619 (um análogo sintético do  $TXA_2$ ) e pela trombina (Chang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2022). O efeito antiagregante plaquetário do ácido gálico é exercido por reduzir a ação da PKC e da Akt e por diminuir a concentração intraplaquetárias de  $Ca^{2+}$  (Chang *et al.*, 2012).

Em modelos de ratos hipertensos o tratamento com o ácido gálico atua reduzindo a pressão arterial e também o estresse oxidativo, a hipertrofia cardíaca e vascular, o quadro inflamatório associado e melhora a função endotelial e muscular nas artérias desses animais. Essas ações parecem estar associadas a redução da angiotensina II circulante e aumento da biodisponibilidade de NO por reduzir a degradação ou desacoplamento da eNOS (Jin *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2020). A ação diurética do ácido gálico em ratos também contribui com o efeito hipotensor (Schlickmann *et al.*, 2018). A diurese relatada é devido a proeminente excreção de sódio e cloreto com o tratamento oral dos animais com o ácido gálico. Também, a produção de eicosanoides parece participar desse efeito, já que o tratamento prévio dos animais com indometacina reverte esse efeito.

Outros efeitos sobre o sistema cardiovascular já foram observados para o ácido gálico, tais como: cardioprotetor (Jin *et al.*, 2017; Prince *et al.*, 2009; Priscilla; Prince, 2009; Shackebaei *et al.*, 2022), antiarrítmico (Akbari *et al.*, 2020; Jin *et al.*, 2017), antiaterosclerótico (Clark *et al.*, 2022) e antitrombótico (Yun-Choi *et al.*, 1996).

O galato de metila é um dos derivados alquílicos do ácido gálico mais estudado. Os derivados etila e propila apresentam uma boa bibliografia sobre os efeitos biológicos. Entretanto, a partir dos galatos com cadeia de carbono alquílicos de quatro a sete membros (galato de butila até o pentila) os estudos sobre as atividades biológicas no sistema cardiovascular ou sobre outros grandes sistemas fisiológicos ficam escassos, sendo limitados a investigação de ação antibiótica ou anticâncer ou, ainda, a nenhuma atividade biológica relatada. Todavia, o galato de octila volta a ser mais amplamente estudado, enquanto os galatos com cadeia carbônica maior que oito membros são também pouco estudados.

Depois do galato de etila, o galato de metila parece ser um dos mais estudados e de interesse biológico. Essa molécula tem ação diurética, natriurética e caliurética em ratos normotensos e hipertensos tratados por via oral em uma dose de 1 ou 3 mg.Kg<sup>-1</sup> (Schlickmann *et al.*, 2017). Além disso, em modelo de colite em ratos, o galato de metila diminuiu a inflamação, o estresse oxidativo e o quadro de diarreia. Em tiras de jejuno montadas em banho de órgãos isolado, essa molécula antagoniza o efeito espasmódico da ACh e da serotonina provavelmente por bloquear a entrada de Ca<sup>2+</sup> nos miócitos intestinais (Anzoise *et al.*, 2018). Além disso, o efeito anti-inflamatório é corroborado em modelos de animais tratados com ligantes ativadores dos receptores Toll, o galato de metila exerce ação anti-inflamatória e antinociceptiva, reduzindo a quantidade de IL-6, do TNF- $\alpha$ , da IL-1 $\beta$  e do CXCL-1 no sangue desses animais e a atividade do NF $\kappa$ B (Correa *et al.*, 2020).

O galato de etila tem esse efeito anti-inflamatório (diminuindo, também, a atividade do NF $\kappa$ B) demonstrado em modelos de infarto intestinal em camundongos, além de preservar as células da apoptose durante a isquemia e reduzir o estresse oxidativo gerado durante a reperfusão (Fan *et al.*, 2023). Esse efeito antagônico do NF $\kappa$ B é corroborado com outros estudos que apontam a inibição da translocação desse fator nuclear em células endoteliais estimuladas com citocinas pró-inflamatórias (Murase *et al.*, 1999). Também, outro efeito proeminente do galato de etila sobre as células endoteliais é o estímulo para que produzam prostaglandina E<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 2018). Tais achados subsidiam a ação cardioprotetora demonstrada para essa molécula (Ahmed *et al.*, 2021; Khurana *et al.*, 2014).

Outros estudos apontam que parte do mecanismo molecular do galato de etila seria por estimular o Nrf2, aumentando as defesas antioxidantes celulares e reduzindo, também, a ação do NF $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2019; Mehla *et al.*, 2013).

No choque séptico em cães, o tratamento (prévio e durante o quadro de choque) dos animais levou a maior recuperação em relação aos animais não tratados, prevenindo a morte como desfecho e sendo os achados comparáveis ao uso da noradrenalina (Gotes *et al.*, 2012; Mink *et al.*, 2011).

Outra ação dessa molécula é sobre o metabolismo de lipoproteínas, reduzindo a absorção de lipoproteína de baixa densidade oxidada e lipídeos por células endoteliais, levando a atividade antiaterosclerótica (Liu *et al.*, 2021). Nesse sentido, Ahn *et al.* (2022) apontam que o galato de etila é capaz de ativar a AMPK, o que levaria a ação antidiabética e antiobesidade.

O galato de propila tem efeitos que divergem do que seria esperado em vista, principalmente, da ação antiagregante plaquetária e bradicárdica do ácido gálico. Esse galato tem uma proeminente ação agregante plaquetária por estimular a fosforilação de proteínas, ativação da COX-1 nas plaquetas (e produção de TXA<sub>2</sub>) e expressão da glicoproteína IIb/IIIa (Speck, 1969; Xiao *et al.*, 2004). Controversamente a isso, um autor aponta que o galato de propila tem ação antitrombótica em modelos de trombose induzida em carótida de rato, não por atuar nas plaquetas mas sim na coagulação, aumentando a formação do ativador de plasminogênio tecidual (Jiang *et al.*, 2008).

Já o efeito sobre o tecido cardíaco consiste em aumentar a sensibilidade dos miofilamentos da musculatura do coração ao Ca<sup>2+</sup>, aumentando a força de contração (Tadano *et al.*, 2009). Com isso, essa molécula foi utilizada como agente para tratar animais com cardiomiopatia dilatada, aumentando consideravelmente a força de contração, diminuindo o remodelamento cardíaco e a progressão da doença nos camundongos (Du *et al.*, 2014). Também, o efeito sobre o músculo cardíaco é demonstrado por Karthikeyan *et al.* (2005). Nesse trabalho, o tratamento com o galato de propila preveniu os danos oxidativos induzidos pelo isoproterenol sobre o coração em ratos. Esse efeito ocorre provavelmente devido ao aumento da maquinaria celular antioxidante.

### 3.4 O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO GALATO DE OCTILA

O galato de octila já é utilizado há décadas pela indústria alimentícia e de cosmético como antioxidante de misturas ricas em gorduras (EFSA, 2015). Também já foi identificado como metabólito secundário nas frutas da *Terminalia bellarica* e em esponjas e algas marinhas (Latha; Daisy, 2013; Lu *et al.*, 2022)

Os estudos toxicológicos para essa molécula apontam para uma boa segurança para o seu uso. No teste oral de toxicidade aguda feito em ratos foi estimado a  $DL_{50}$  de  $4.700 \text{ mg.Kg}^{-1}$  em ratos albinos, a de  $2.710 \text{ mg.Kg}^{-1}$  em ratos da linhagem Sprague-Dawley e a de  $1.960 \text{ mg.Kg}^{-1}$  quando administrado, nessa linhagem, em uma emulsão (EFSA, 2015; Van der Heijden *et al.*, 1986).

A avaliação dos efeitos toxicológicos subcrônicos do uso do galato de octila em ratos, porcos e cachorros também foi realizada. Em ratos, o uso de doses acima de  $150 \text{ mg.Kg}^{-1}/\text{dia}$ , por três meses, induziram anemia hipocrômica (Van der Heijden *et al.*, 1986; Van Esch, 1955). Apesar disso, outros estudos não mostraram que o tratamento mais longo e em doses mais elevadas levavam a alterações mais significativas, com exceção do aumento discreto dos níveis séricos da enzima aspartato aminotransferase (AST) (Depner *et al.*, 1982; Van der Heijden *et al.*, 1986; Van Esch, 1955).

Em cachorros o aumento da AST também foi observado quando esses animais foram tratados com  $380 \text{ mg.Kg}^{-1}/\text{dia}$  por treze semanas, já em porcos tratados com doses de  $80 \text{ mg.Kg}^{-1}/\text{dia}$  não foram observados quaisquer efeitos tóxicos (EFSA, 2015). Em vista disso, a boa margem de segurança e resultados concluídos em triagens farmacológicas motivaram alguns estudos não-clínicos com o galato de octila.

Essa substância inibiu em aproximadamente 92% a entrada de cálcio mediada por  $Cav$  presente em células pituitárias da linhagem GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>, estimuladas com solução nutritiva despolarizante contendo  $50 \text{ mMol.L}^{-1}$  de  $K^+$ . Também foi visto que  $20 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de galato de octila no meio bloqueia completamente as correntes de  $Ca^{2+}$  nessa linhagem celular (Summanen *et al.*, 2001; Tammela; Vuorela, 2004).

Em células da linhagem PC12, o galato de octila também foi capaz de antagonizar as correntes de  $Ca^{2+}$  geradas pela estimulação dessas células por ATP ou solução nutritiva despolarizante (Guo *et al.*, 2010). Outrossim, essa substância leva a redução do aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  estimulado pelo ATP por antagonizar a ação da PKC (Guo *et al.*, 2010).

Para além dessas ações, o galato de octila é capaz de inibir de forma reversível a lipoxigenase e impedir a peroxidação lipídica (Ha *et al.*, 2004). Essas funções indicam que esse galato poderia ter ação anti-inflamatória. Tal premissa foi comprovada com estudos que mostram essa ação em animais.

Em modelos de dano pulmonar gerado pela inação de lipopolissacarídeo, o tratamento prévio com 0,75 mg.Kg<sup>-1</sup> com o galato de octila reduziu o infiltrado de células inflamatório nos pulmões e a quantidade de TNF- $\alpha$  e iNOS nesse tecido (Haute *et al.*, 2020). Já em modelos de endometriose em ratas, os níveis de TNF- $\alpha$  no útero não foram alterados com o tratamento com o galato de octila, ao passo que a lesão nos animais tratados e a ativação do NF $\kappa$ B estavam significativamente reduzidos (Bustami *et al.*, 2020).

Em consonância com os efeitos anti-inflamatórios dessa substância, Haute *et al.* (2022) apontou que ela reduz a ativação linfocitária e também impede a liberação dos *traps* por neutrófilos quando estimulados com LPS. Já Park *et al.* (2024) demonstra que o tratamento em camundongos com 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> de galato de octila reduz consideravelmente a inflamação de pata induzido com urato e também que o tratamento prévio com 12,5 mg.Kg<sup>-1</sup> de galato de octila reduz a mortalidade em dois modelos de sepse (um induzido por LPS e outro por punção cecal). O autor aponta que esses efeitos anti-inflamatórios são mediados pela inibição direta do galato de octila sobre o NLRP3, impedindo a formação do inflamossomo.

O galato de octila também desponta como um forte candidato para o tratamento da diabetes. Em modelos animais de diabetes induzida por estreptozotocina, o tratamento com 20 mg.Kg<sup>-1</sup> foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos aos comparáveis do tratamento com insulina. Tal efeito foi gerado pois o tratamento aumentou os níveis de insulina sérica nos animais e a glicogênese e reduziu o consumo de ração e a resistência à insulina nos animais diabéticos tratados (Latha; Daisy, 2013). Além disso, interessante, o tratamento dos animais diabéticos, além de melhorar o quadro hiperglicêmico, levou a uma mudança do perfil lipídico dos animais: reduziu o colesterol total, os triglicerídeos e o LDL, ao passo que aumentou a concentração séria de HDL (Latha; Daisy, 2013).

### 3.5 A MICROEMULSÃO COMO INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DE INTERESSA PARA A FARMACOLOGIA

Uma microemulsão (ME) tem como características principais a presença de gotículas dispersas com tamanhos que vão de 1 até 100 nanômetros, possuem excelente estabilidade física e química (estabilidade termodinâmica), terem aspecto translúcido e birrefringente e também serem isotrópicas (Mitra, 2023) (figura 8).

O termo “microemulsão” foi introduzido ainda nos anos 40 do século XX por Hoar e Schulman (1943), baseado na formação de uma solução monofásica por meio da titulação de uma emulsão de aspecto leitoso em hexanol. Posteriormente, com a caracterização desse fenômeno, o termo foi cunhado (Schulman *et al.*, 1959).

De uma forma geral, o preparo desse sistema consiste na mistura de dois líquidos imiscíveis (como triglicerídeos e água) com um surfactante e um co-surfactante para que a tensão interfacial entre as fases imiscíveis seja quebrada e as gotículas sejam formadas. Também, o uso de surfactantes não-iônicos (como o Cremophor EL) dispensam o uso de co-surfactantes para a formação de sistemas microemulsionados, além de serem amplamente utilizados pela indústria cosmética e farmacêutica (Callender; Wettig, 2021; Warisnoicharoen *et al.*, 2000).

Outrossim, esses agentes emulsificantes apresentam como vantagem a menor toxicidade às membranas biológicas, menor grau de irritação sobre as mucosas e epitélios, promoção de maior permeabilidade celular das moléculas carregadas e a possibilidade de ser administrada, uma mesma fórmula, tanto pela via enteral quanto de forma parenteral (Alves *et al.*, 2020).

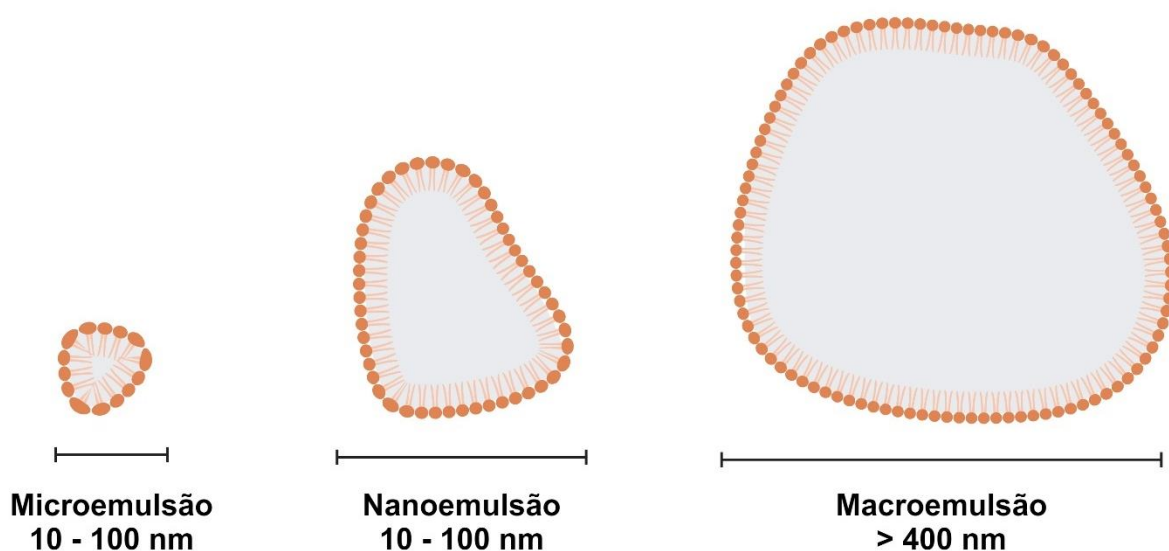
Também, por ser um sistema com a presença de dois líquidos imiscíveis e de características químicas particulares, é possível desenvolver uma microemulsão que carregue moléculas polares e apolares. Inclusive, a ME proporciona à moléculas mais hidrofóbicas maior solubilidade em meio aquoso, maior rapidez de dissolução, previne a degradação enzimática e o tamanho das gotículas proporciona uma maior superfície de contato com as membranas biológicas, o que favorece a absorção e aumento da biodisponibilidade e interações com as proteínas presentes nas membranas celulares (Ke *et al.*, 2005; Mitra, 2023; Sahu *et al.*, 2015).

De acordo com as características de polaridade da fase dispersa (lipofílica ou hidrofílica), é possível separar as ME em três tipos principais: Água/Óleo (A/O), Óleo/Água (O/A) e a forma bicontínua.

O que determina a formação de cada um tipo desses sistemas de ME são dois principais fatores: a proporção dos componentes e as características do surfactante utilizado.

Quando a quantidade de óleo é superior à de água e as moléculas incorporadas são hidrofílicas e estão presente nas gotículas de água que são rodeadas pelo surfactante em uma fase lipídica contínua, sendo essa fase aquosa descontínua, existe, assim, uma ME A/O. Esse tipo de emulsão tem limitações quanto ao uso (por exemplo, sendo incompatível com a via intravenosa). Já nos casos que a proporção de água é maior do que a de óleo e as moléculas ativas incorporadas são lipofílicas e ficam presentes em gotículas oleosas descontínuas rodeadas pelas moléculas surfactantes e dispersas no meio aquoso contínuo, diz que essa ME é do tipo O/A. Por fim, quando a quantidade de fase aquosa e oleosa são proporcionais, dificilmente um sistema de gotículas será formado, mas sim uma ME do tipo bicontínua (Alves *et al.*, 2020).

**Figura 8** - Tamanhos das gotículas de emulsões do tipo óleo em água.



FONTE: Autor (2024)

Além disso, o surfactante contribui significativamente para a formação do tipo de ME em vista do balanço hidrofílico-lipofílico (para o surfactante, essa característica exprime o grau de hidrofiliicidade ou lipofiliicidade do mesmo): Valores baixos desse balanço favorecem a formação de ME do tipo A/O, enquanto surfactantes com valores mais elevados favorecem a formação de ME do tipo O/A (Lawrence; Rees, 2012).

Dessarte, as ME passaram a ter grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos pelos benefícios citados. Em consequência, dezenas de fármacos que tinham suas aplicações limitadas a via oral ou intramuscular passaram a ser desenvolvidos em ME para ampliar as aplicações terapêuticas e clínicas (Callender *et al.*, 2017; Chavda *et al.*, 2023)

Todavia, o escalonamento desses processos para uma planta industrial ainda demanda muitos desafios como equipamentos e de custos. Além disso, as ME podem demandar uma elevada quantidade de surfactantes para estabilizar quantidades elevadas de fármacos carregados, o que leva a dois grandes problemas: maior risco de reações alérgicas e tóxicas (como hemólise, trombose e dores localizadas), desencadeadas por surfactantes da ME; ou uma formulação que tenha quantidades de fármacos insuficientes para os efeitos biológicos. Também, mudanças bruscas de temperatura, de pH ou de salinidade da ME podem desestabilizar o sistema (Chavda *et al.*, 2023).

As microemulsões são amplamente desenvolvidas para aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares (como infarto do miocárdio, hipertensão, trombose e aterosclerose). Callender *et al.* (2017) aponta que por volta de 15% dos estudos sobre ME publicados entre 2011 e 2016 foram voltadas para tratar doenças desse sistema. Dentre as vantagens desse sistema, os autores citam a menor quantidade de doses ou menor quantidade administrada para alcançar a faixa terapêutica, redução de efeitos colaterais associados, possibilidade de associar fármacos em uma única administração e administrar fármacos por vias diversas (Araújo *et al.*, 2021; Chavda *et al.*, 2023; Yadav *et al.*, 2023; Zuo *et al.*, 2022).

**MATERIAL**

---

**MATERIAL**

**DO DESENVOLVIMENTO DA MICROEMULSÃO**

---

## 4. MATERIAL

### 4.1 MATERIAL DO DESENVOLVIMENTO DA MICROEMULSÃO

#### 4.1.1 *Substância-teste: galato de octila*

O galato de octila foi obtido da Sigma-Aldrich (Merk® – Alemanha), com o n°: de referência: 48700. A pureza do produto é de >99%, sua massa molecular é de 282,33 g.mol<sup>-1</sup> e sua forma é de um pó amorfo de coloração bege clara. (dados obtidos do *datasheet* publicizado pela fornecedora). O galato de octila possui uma solubilidade em solução tampão fosfato tamponado de 5,7.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> (Takai *et al.*, 2011).

#### 4.1.2 *Substâncias e reagentes*

Para os experimentos e preparos referentes ao desenvolvimento da microemulsão foram utilizados as seguintes substâncias e reagentes: Água deionizada produzida no laboratório por meio do filtro de osmose reversa e deionização (Filterinter, Campinas, São Paulo – Brasil). O Kolliphor EL® (óleo de rícino etoxilado), o Kollisolv® (triglicerídeos de cadeia média, MCT) e o Lipoid S100® (fosfatidilcolina de soja) foram provenientes da BASF (Ludwigshafen, Renânia – Alemanha). O Cloreto de sódio (NaCl) foi obtido da Dinâmica Química (Indaiatuba, São Paulo – Brasil).

#### 4.1.3 *Soluções e água*

Foi utilizada para os processos de desenvolvimento tecnológico a solução de NaCl na concentração de 1 mMol.L<sup>-1</sup> em água. Depois de preparada, antes de ser usada, a solução foi filtrada em filtros de seringa com poros no tamanho de 0,45 µm e sonicada por 10 minutos em banho ultrassônico na temperatura ambiente. A solução foi armazenada em garrafa de vidro para uso posterior. O tempo de armazenamento não foi superior a 15 dias. Além disso, toda a água utilizada nos experimentos de formulação foi proveniente do filtro de osmose reversa seguido de deionizador e foi filtrada com filtro de seringa com poros de 0,45 µm e sonicada em banho ultrassônico por 10 minutos. Essa água foi armazenada em garrafas de vidro para o uso posterior.

#### **4.1.4 Equipamentos**

Para a medida dos tamanhos das gotículas da microemulsão e do potencial Zeta foi utilizado o equipamento DLS ZetaSizer Lab (Malvern Panalytical, Grovewood – Reino Unido) acoplado a um computador para a aquisição de dados e o processamento dos mesmos. O pH foi medido utilizando um pHmetro Simpla PH140 (ASA instrumentos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul – Brasil), uma estufa para o teste de estabilidade foi a SPLabor Estufa (SPLabor, Presidente Prudente, São Paulo -Brasil) e o vortex (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná – Brasil). O sonicador de ponteira ultrassônico é da marca Eco-sonics (Curitiba, Paraná – Brasil). As substâncias foram pesadas em balança analítica (Discovery DV214c, OHAUS. Parsippany, New Jersey – Estados Unidos).

#### **4.1.5 Softwares**

Para a análise e obtenção dos dados do DLS foi utilizado o programa ZS explorer (Malvern Panalytical, Grovewood – Reino Unido). Os dados foram tratados estatisticamente por meio do programa Statistica 12 (StatSoft – Dell, Round Rock, Texas – Estados Unidos) e o Excel (Microsoft Office – Microsoft, Redmont, Washington – Estados Unidos).

**MATERIAL**

**DAS TÉCNICAS FARMACOLÓGICAS**

---

## 4.2 MATERIAL DAS TÉCNICAS FARMACOLÓGICAS

### 4.2.1 Substância-teste: microemulsão de galato de octila (MEGO)

A MEGO foi preparada e utilizada, enquanto não se sabia a estabilidade da mesma, em até 24 horas após o preparo. A microemulsão foi testada levando em consideração concentração do galato de octila na mesma. Para os testes *in vitro* ou *in vivo* a MEGO foi diluída em solução salina ou em Krebs para atingir as concentrações necessárias para os testes.

O veículo, quando utilizado, continha todos os componentes da fórmula (com exceção do galato de octila) e foi preparado da mesma forma. Quando usado, foram aplicados os volumes de veículo correspondente aos usados para a MEGO.

### 4.2.2 Substâncias e reagentes

As soluções que usaram sais foram preparadas utilizando os seguintes produtos: o NaCl, o KCl, o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , o  $\text{FeCl}_3$  e o  $\text{MgSO}_4$  provenientes da Dinâmica Química (São Paulo, SP – Brasil); o  $\text{NaHCO}_3$ , o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , o HCl e o  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foram fornecidos pela empresa Neon Química (São Paulo, SP – Brasil); o  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e o NaOH da Vetec Química (Rio de Janeiro, RJ – Brasil).

A glicose, o citrato trissódico e o ácido cítrico foram adquiridos da Dinâmica Química (São Paulo, SP – Brasil). A solução de formol a 10% foi proveniente da Êxodo Científica (Sumaré, SP – Brasil). A mistura de gás carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ) foi fornecida pela White Martins Gases industriais (João pessoa, PB – Brasil).

A enoxiparina sódica foi adquirida da Eurofarma (São Paulo, SP – Brasil). A acetilcolina (ACh), o cloridrato de fenilefrina (FEN), O  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), o 2-fenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazolina-1-oxil-3-oxido (PTIO), o 1H[1,2,3]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1ona (ODQ) e o difosfato de adenosina (ADP) e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merk®, Darmstadt – Alemanha). A cetamina 10% e a xilazina 2% foram obtidas da Syntec do Brasil (Santana do Parnaíba, São Paulo – Brasil). Os kits comerciais de Tempo de Protrombina (TP) e de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) foram adquiridos da Wama Diagnósticos (São Carlos, São Paulo – Brasil).

O ODQ foi dissolvido em DMSO. As demais soluções usando as substâncias citadas foram preparadas em água deionizada e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas (com exceção das soluções nutritivas e a de  $\text{FeCl}_3$ ).

#### 4.2.3 Soluções

As soluções fisiológicas utilizadas (quadros 1, 2 e 3) na experimentação foram preparadas com água de osmose reversa, filtradas em filtro de papel e o pH foi verificado (e, se necessários ajustados com solução de HCl ou NaOH) para 7,4. A seguir estão detalhadas nos quadros a composição dessas soluções utilizadas.

**Quadro 1** - Solução fisiológica de Krebs.

| Substância                                | Concentração ( $\text{mMol.L}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| NaCl                                      | 118                                   |
| KCl                                       | 4,6                                   |
| $\text{MgSO}_4$                           | 5,7                                   |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 1,1                                   |
| $\text{NaHCO}_3$                          | 25                                    |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,5                                   |
| Glicose                                   | 11                                    |

FONTE: Krebs e Henseleit (1932) com modificações de Rameshrad *et al.* (2016).

A solução despolarizante de Krebs com KCl  $60 \text{ mMol.L}^{-1}$  foi preparada a partir da solução de Krebs, ajustando a concentração de NaCl pela de KCl para que a osmolaridade fosse mantida pela solução (quadro 2).

**Quadro 2** - Solução fisiológica de Krebs modificada (KCl  $60 \text{ mMol.L}^{-1}$ ).

| Substância               | Concentração ( $\text{mMol.L}^{-1}$ ) |
|--------------------------|---------------------------------------|
| NaCl                     | 58                                    |
| KCl                      | 60                                    |
| $\text{MgSO}_4$          | 5,7                                   |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 1,1                                   |

(continua)

**Quadro 2** – Solução fisiológica de Krebs modificada (KCl 60 mMol.L<sup>-1</sup>).

(continuação)

| Substância                           | Concentração (mMol.L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 25                                   |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 2,5                                  |
| Glicose                              | 11                                   |

#### 4.2.4 Equipamentos e softwares

As substâncias foram pesadas em balança analítica (Discovery DV214c, OHAUS. Parsippany, New Jersey – Estados Unidos). O pH foi medido com pHmetro da empresa Hanna Instruments (Smithfield, Rhode Island – Estados Unidos). O agregômetro AgreGo (AgreGo. São Paulo, São Paulo – Brasil), o coagulômetro usado foi o HumanClot Junior (InVitro Diagnósticos. Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil) e a centrífuga refrigerada Hermle (Franklin, Wisconsin – Estados Unidos).

Para o registro das tensões isométricas nos ensaios em banho de órgãos isolados (ML0146/10, PanLab. Austrália) foram utilizados os transdutores de força (MLT0201, PanLab, ADInstruments. Austrália) acoplados a um amplificador de ponte (ML224, ADInstruments. Austrália) e esse ligado a um amplificador de sinal (ML224. ADInstruments. Austrália). A temperatura do banho de órgãos foi mantida através do termostato PanLab (LE 13206, ADInstruments. Austrália). Esse sistema ficou ligado a um computador com o software LabChart versão 8.1 (ADInstruments. Austrália).

A agregômetro ficou acoplado a um computador que possuía o software AgreGo (AgreGo. São Paulo, São Paulo – Brasil).

Para a medida do fluxo sanguíneo na análise de formação do trombo (ensaio de trombose) foi utilizado um fluxômetro (T106, Transonic System. Ithaca, New York – Estados Unidos) acoplado a uma sonda ultrassônica X1 do mesmo aparelho e empresa. O fluxômetro foi acoplado a um computador com o sistema de aquisição de dados LabChart versão 8.1. Durante os experimentos, o filtro de saída do fluxômetro foi de 30 Hz.

Para a morfometria dos trombos, foi utilizado um estereomicroscópio da empresa Nikon (SMZ745. Nikon Company. Tokyo – Japão).

# MÉTODOS

---

**MÉTODOS**

**DO DESENVOLVIMENTO DA MICROEMULSÃO**

---

## 5. MÉTODOS

### 5.1 MÉTODOS DO DESENVOLVIMENTO DA MICROEMULSÃO

#### 5.1.1 Aspectos experimentais

A primeira parte desse processo de desenvolvimento consistiu na determinação do melhor agente emulsificante da fórmula para a formação da microemulsão de galato de octila do tipo O/A, doravante abreviada como MEGO. Além da determinação desse componente da fórmula nessa fase de pré-formulação, o ponto central do planejamento Box-Behken também é determinado para que essa fase siga.

O referido planejamento seguiu após essa primeira fase com o intuito de determinar a concentração ótima da fase oleosa e de emulsificante para uma determinada concentração de galato de octila para que a microemulsão seja formada.

Após determinar a concentração ideal de todos os componentes, com a MEGO foram realizados testes de estabilidade de formulação, conforme preconiza a ANVISA.

#### 5.1.2 Pré-formulação: determinação dos componentes da fórmula

Uma emulsão consiste na formação de um preparo com dois líquidos imiscíveis com um surfactante. No desenvolvimento da MEGO, pensando na administração dela pela via intravenosa e oral para estudos em animais, foi apensado o uso de componentes menos tóxicos e irritantes. Dessa forma, a fase aquosa foi água de osmose deionizada; a fase oleosa foi o MCT (triglicerídeos de cadeia média), que possui baixa toxicidade quando aplicado de forma parenteral e confere uma excelente estabilidade às gotículas de sistemas microemulsionados (Lawrence; Rees, 2012; Warisnoicharoen *et al.*, 2000); Como surfactantes testados foram escolhidos o Cremophor EL® e o Lipoid S100®. Esses emulsificantes não-iônicos são um dos menos tóxicos que existem por interagirem menos com os lipídeos das membranas celulares, causar menos irritações e alergias, proporcionar uma maior estabilidade química ao sistema e promover uma maior absorção por aumentar a permeabilidade pelas mucosas e pele (Alves *et al.*, 2020).

Essa fase do desenvolvimento da MEGO foi importante para deduzir qual seria o surfactante ideal, dentre os dois, para incorporar o galato de octila no sistema de

microemulsão. Além disso, a fase de pré-formulação foi necessária para determinar um ponto central no planejamento Box-Behken para otimizar a microemulsão e chegar em concentrações ideais dos componentes da fórmula.

Assim, doze fórmulas iniciais foram produzidas por sonicação e caracterizadas (tamanho das gotículas e potencial Zeta). A concentração de galato de octila ficou fixa para todas as doze fórmulas ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), os emulsificantes foram testados em concentrações de 3 a 6% e o MCT variou a concentração de 4 a 8% (tabela 1). A fórmula que apresentou um menor tamanho de gotícula foi escolhida como ponto central para o refinamento da formulação.

**Tabela 1** - Composição das microemulsões da etapa de pré-formulação.

|                   | <b>Cremophor EL</b><br>(%) | <b>MCT</b><br>(%) | <b>Lipoid S100</b><br>(%) | <b>Galato de octila</b><br>(mg/mL) |
|-------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|------------------------------------|
| <b>Fórmula 1</b>  | 3                          | 4                 | 0                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 2</b>  | 6                          | 4                 | 0                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 3</b>  | 3                          | 8                 | 0                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 4</b>  | 6                          | 8                 | 0                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 5</b>  | 0                          | 4                 | 3                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 6</b>  | 0                          | 4                 | 6                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 7</b>  | 0                          | 8                 | 3                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 8</b>  | 0                          | 8                 | 6                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 9</b>  | 3                          | 4                 | 3                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 10</b> | 6                          | 4                 | 3                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 11</b> | 3                          | 4                 | 6                         | 20                                 |
| <b>Fórmula 12</b> | 6                          | 4                 | 6                         | 20                                 |

FONTE: Autor (2024).

### **5.1.3 Preparação da microemulsão por sonicação**

O método adotado para a formação do sistema de microemulsão foi o de formação das gotículas por ultrassom. Para isso, todos os componentes foram pesados em balança analítica e em tubos de vidro. Antes de serem levados ao sonicador ultrassônico, o conteúdo dos tubos foi previamente homogeneizado em

vortex por aproximadamente 5 minutos. Após isso, os tubos foram levados para o sonificador dotado de ponteira micro. Para a formação das emulsões, todos os tubos foram submetidos a uma sonicação constante, por 3 minutos e a 70% de potência do aparelho. Tal método fornece energia suficiente para que as gotículas na escala dos nanômetros sejam formadas (Delmas *et al.*, 2011). Após isso, as amostras foram deixadas em repouso por aproximadamente 15 minutos para que a temperatura se igualasse com a do ambiente.

#### **5.1.4 Medida do tamanho das gotículas e do potencial Zeta**

O tamanho (nm) hidrodinâmico das gotículas e a sua distribuição da microemulsão foi determinado utilizando o método de dispersão dinâmica da luz em cubetas de poliestireno retangulares a 25°C utilizando o DLS Malvern. O índice de polidispersão (Pdl) é calculado a partir da largura da curva de distribuição do tamanho das gotículas. Assim, quando menor esse índice, mais uniforme as gotículas estão no sistema. Para essa medida, a MEGO foi diluída na proporção de 1:100 de água deionizada filtrada e sonicada e imediatamente analisada.

A medida do potencial Zeta ocorreu por mobilidade eletroforética medida por eletroforese de laser Doppler utilizando para tal o DLS Mavern com as cubetas adequadas para essa metodologia. Essa determinação dar-nos o grau de repulsão ou atração eletroestática entre as gotículas e reflete a carga elétrica dos componentes utilizados na formulação. Para a realização desse ensaio, a MEGO foi diluída na proporção 1:100 em solução de NaCl a 1 mMol.L<sup>-1</sup> e imediatamente realizada a leitura no equipamento a uma temperatura de 25°C. Todas essas medições foram realizadas em triplicata.

#### **5.1.5 Medida do pH**

As medidas do pH das formulações ocorreram em temperatura ambiente (25 ± 3 °C) pela imersão direta da sonda do pHmetro. Antes disso, a MEGO foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente para as análises de pH. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

### 5.1.6 Planejamento Box-Behken para otimização da formulação

O planejamento experimental foi realizado com o intuito de minorar os erros no processo de encontrar, de forma empírica, uma proporção ideal entre os componentes da fórmula pela tentativa-erro (Box; Behnken, 1960). Nesse planejamento fatorial, o nível central (zero, 0) foi definido como as concentrações da fórmula que levou ao menor tamanho das gotículas obtida na fase de pré-formulação com mais dois níveis, totalizando três níveis para a matriz de planejamento (-1, 0, +1) (tabela 2). As variáveis independentes de entrada foram: concentração de Cremophor EL, MCT e galato de octila, todos em mg.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 2** - Variáveis independentes de entrada e seus níveis.

| <b>Variáveis independentes</b> | <b>Níveis</b> |          |           |
|--------------------------------|---------------|----------|-----------|
| <b>(mg/mL)</b>                 | <b>-1</b>     | <b>0</b> | <b>+1</b> |
| <b>Cremophor EL</b>            | 20            | 60       | 100       |
| <b>MCT</b>                     | 20            | 85       | 150       |
| <b>Galato de octila</b>        | 6             | 23       | 40        |

FONTE: Autor (2024).

As variáveis dependentes de saída observadas para cada fórmula da matriz de planejamento foram o tamanho das gotículas. Assim, foram realizadas 15 formulações de forma aleatória, combinando os níveis das variáveis independentes, sendo 3 formulações do ponto central dos níveis e 12 combinações aleatórias dos níveis (tabela 3).

Todas as fórmulas do planejamento foram produzidas por sonicação (conforme descrito anteriormente) e o tamanho das gotículas foram analisados em até 6 horas.

A partir dos dados do planejamento, gráficos de superfície e de Pareto foram confeccionados para avaliar a influência de cada componente da fórmula sobre o tamanho das partículas. Além disso, para obter as concentrações ideais de surfactante e da fase oleosa para que a emulsão apresentasse gotículas na escala desejada para ser considerada uma microemulsão, uma equação polinomial foi obtida.

**Tabela 3** - Matriz do planejamento fatorial Box-Behken.

| <div>Variáveis independentes</div> <div>Fórmula</div> | Cremophor EL | MCT | Galato de octila |
|-------------------------------------------------------|--------------|-----|------------------|
| <b>FA1</b>                                            | -1           | -1  | 0                |
| <b>FA2</b>                                            | 0            | 0   | 0                |
| <b>FA3</b>                                            | -1           | 1   | 0                |
| <b>FA4</b>                                            | 0            | 1   | 1                |
| <b>FA5</b>                                            | 0            | -1  | 1                |
| <b>FA6</b>                                            | 0            | 1   | -1               |
| <b>FA7</b>                                            | 0            | 0   | 0                |
| <b>FA8</b>                                            | -1           | 0   | -1               |
| <b>FA9</b>                                            | 1            | 0   | -1               |
| <b>FA10</b>                                           | -1           | 0   | 1                |
| <b>FA11</b>                                           | 1            | 1   | 0                |
| <b>FA12</b>                                           | 0            | -1  | -1               |
| <b>FA13</b>                                           | 1            | -1  | 0                |
| <b>FA14</b>                                           | 0            | 0   | 0                |
| <b>FA15</b>                                           | 1            | 0   | 1                |

FONTE: Autor (2024).

**5.1.7 Teste de estabilidade**

Para o teste de estabilidade, foi seguido o Guia de Estabilidade de Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) e a resolução 318/2019 da ANVISA. 10 mL de MEGO foram preparadas e aliquotadas em três recipientes de vidro de borossilicato com vedação de pressão e vedados com Parafilm® para evitar o contato da MEGO com o ar externo do recipiente e a evaporação. Um recipiente foi condicionado em estufa com temperatura controlada em  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , outro ficou armazenado em um ambiente protegido da luz em temperatura ambiente  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e outro em freezer a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  (ANVISA, 2004; González-González *et al.*, 2022).

Os seguintes parâmetros foram analisados: Coloração, pH, tamanho das gotículas e potencial Zeta. Esses parâmetros foram analisados 24 após a formulação

da MEGO. Além disso, as análises foram feitas nos dias: 3, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 após o dia zero (o qual foi feita a MEGO para os testes de estabilidade).

#### **5.1.8 *Análise estatística dos ensaios farmacotécnicos***

As análises foram feitas em triplicatas e os dados foram plotados em planilha no Excel e calculada a média aritmética e o erro padrão (sendo expressos esses dados nas representações gráficas e tabelas). Os gráficos de superfície e o de Pareto e o polinômio foram feitos utilizando o programa Statistica 12. O grau de significância dos resultados foi medido por Análise de Variância Ordinária (ANOVA) e quando o valor de  $p$  foi menor que 0,05, considerou-se um resultado significativo.

**MÉTODOS**

**DAS TÉCNICAS FARMACOLÓGICAS**

---

## 5.2 MÉTODOS DAS TÉCNICAS FARMACOLÓGICAS

### 5.2.1 Tipo de estudo

Esse trabalho tratou-se de um estudo não-clínico, com técnicas *in vitro* e *in vivo* que foram realizadas no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (IPeFarM, UFPB, campus I, João Pessoa)

### 5.2.2 Aspectos éticos

Para a realização do presente trabalho, o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, seguindo as recomendações dessa comissão e obedecendo aos preceitos da lei 11.794/2008 e da resolução nº 879/2008. Então, todos os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA (anexo I) sob nº: 4129280422 (ID 001638).

### 5.2.3 Animais da experimentação

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com idade de 12 semanas, pesando entre 250 e 350 gramas, sendo os animais provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba. Esses foram mantidos na Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água filtrada e a dieta apropriada feita com ração (Nuvilab®). Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas micro-isoladoras de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), cada uma com no máximo 4 ratos, a depender do tamanho dos mesmos.

Para os experimentos *in vivo*, os animais foram anestesiados com cetamina, um anestésico dissociativo, (75 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p) e xilazina, agonista dos adrenorreceptores alfa-2 (10 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p..) aplicados pela via intraperitoneal

Ao final do experimento *in vivo* e nos protocolos *in vitro*, os animais foram eutanasiados com três vezes a dose para anestesia. Nos casos em que a morte não ocorria, fora realizado o exsanguinamento dos animais, método aprovado pelo CONCEA.

## **5.2.4 Experimentos *in vitro***

### **5.2.4.1 Coleta e processamento do sangue**

Para a coleta do sangue, os animais foram anestesiados e colocados em decúbito dorsal para que a veia cava inferior pudesse ser localizada e dissecada. Assim, o sangue foi coletado em seringas de 10 mL com agulhas de 22G. Uma parte do sangue foi condicionado em tubos de coleta a vácuo com citrato de sódio a 3,2% e a outra parte do sangue foi colocada em tubos plásticos cônicos de 15 mL e gentilmente misturados com solução de citrato de sódio 4% na proporção de 9 partes de sangue para uma parte de citrato 4% (Gibbins; Mahaut-Smith, 2008).

Para obter o plasma rico em plaquetas (PRP) foi adotada a metodologia descrita por Gibbins e Mahaut-Smith (2008) e Pennings *et al.* (2021) com modificações. Assim, o sangue com citrato 4% foi centrifugado a 2.300 XG, em 25°C, por um tempo de 12 segundos para cada mL de sangue no tubo de 15 mL. Após isso, o sobrenadante – PRP – foi coletado e condicionado em tubos plástico de 2 mL a 37°C e a quantidade de plaquetas foi ajustada contando-as em um citômetro de fluxo e ajustando a quantidade com o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) para uma concentração de final de  $3 \times 10^9$  plaquetas por mL. O PRP foi usado em até 2 horas após o preparo e durante esse período foi mantido a 37°C em banho-maria.

O PPP foi obtido a partir da centrifugação dos tubos de sangue com citrato a 1.500 XG por 15 minutos a uma temperatura de 25°C. Após isso, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e condicionado em tubos de 2 mL para performar os ensaios de agregometria e coagulometria. O PPP foi usado em até 2 horas e durante esse tempo foram mantidos a temperatura ambiente (25°C).

Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL do sangue coletado foi diluído em 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) e centrifugada a 1.000 XG por 5 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em solução salina para um novo ciclo de centrifugação. Após o terceiro ciclo, as hemácias lavadas precipitadas foram ressuspensas em 5 mL de solução salina para serem utilizadas no ensaio de hemólise.

#### 5.2.4.2 Avaliação da atividade hemolítica da MEGO sobre hemácias de ratos

A atividade da MEGO sobre os eritrócitos lavados de ratos foi realizada conforme descrito por Tabassum *et al.* (2022) com modificações. As hemácias lavadas de ratos foram aliqüotadas em tubos plásticos e incubadas por 1 hora a 37°C com diferentes concentrações da MEGO ou seu veículo ou com Triton-X (como controle positivo). Foi utilizado um controle negativo consistiu apenas das hemácias em suspensão em solução salina. Decorrido esse tempo, 100 µL de cada tubo foi transferido para uma placa de 96 poços de fundo chato e foi realizada a leitura no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm para quantificar a hemoglobina do meio através da absorbância (ABS), assim, quanto maior a ABS, maior foi o grau de hemólise. Os dados foram normalizados seguindo a fórmula (equação 1):

**Equação 1** - Determinação da porcentagem de hemólise.

$$\% \text{Hemólise} = [(ABS_A - ABS_B) \times 100] / ABS_T \quad \text{Eq (1)}$$

Onde:

$ABS_A$  corresponde a ABS da amostra;

$ABS_B$  corresponde a ABS do controle negativo;

$ABS_T$  corresponde a ABS encontrada para a maior concentração de Triton-X usado

#### 5.2.4.3 Ensaio para avaliar a atividade antiagregante em plaquetas de ratos

Para esse experimento, primeiramente o agregômetro foi calibrado com o PPP (sendo a transmissão luminosa desse correspondente a 100% de agregação plaquetária e a transmissão luminosa do PRP a 0%). O PRP foi aliqüotado nas cubetas de quartzo do gregômetro (300 µL/cubeta) a 37°C e sob constante agitação (Irfan *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2017). Para testar a ação antiagregante da MEGO, o PRP nas cubetas foi encubado com a MEGO em diversas concentrações de modo que o efeito máximo ( $Emáx$ ) e a potência (concentração que gera 50% do  $Emáx$ ,  $CE_{50}$ ) pudessem ser calculados.

Após 30 minutos de incubação, a agregação foi estimulada com o ADP  $17 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (agonista dos receptores P2Y presentes nas plaquetas). A percentagem de agregação foi analisada por 10 minutos.

#### **5.2.4.4 Ensaio para avaliar a ação anticoagulante em plasma de ratos**

Para avaliar a atividade anticoagulante da MEGO foi adotada a medida dos efeitos dela sobre o TP e TTPa no PPP preparado dos sangues de ratos usando kits comerciais (Ogbuagu *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022). Antes do ensaio, um pool de plasma do tipo PPP de diferentes ratos foi preparado e usado para calibrar o coagulômetro com o kit utilizado e para a espécie animal. O mesmo lote do kit foi utilizado em todos os experimentos desse trabalho.

A MEGO foi adicionada ao PPP aliqotado nas cubetas (50  $\mu\text{L}$  para os ensaios de TP e 100  $\mu\text{L}$  para os ensaios de TTPa) próprias do coagulômetro por um tempo de 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o tempo de incubação, o reagente do TP foi imediatamente adicionado e o tempo de coagulação foi medido pelo equipamento. Já para o TTPa, após o período de 10 minutos a encefalina do reagente comercial foi adicionada às cubetas e aguardado mais 1 minuto e 30 segundos. Decorrido esse tempo, a segunda solução do Kit ( $\text{CaCl}_2$ ) foi adicionada e o tempo de coagulação foi medido pelo equipamento.

Nesse ensaio, pôde ser avaliado se a MEGO interagia com os fatores da via extrínseca (TP) e/ou intrínseca (TTPa) da coagulação sanguínea.

#### **5.2.4.5 Investigação do efeito vasorrelaxante da MEGO em aorta isolada de rato**

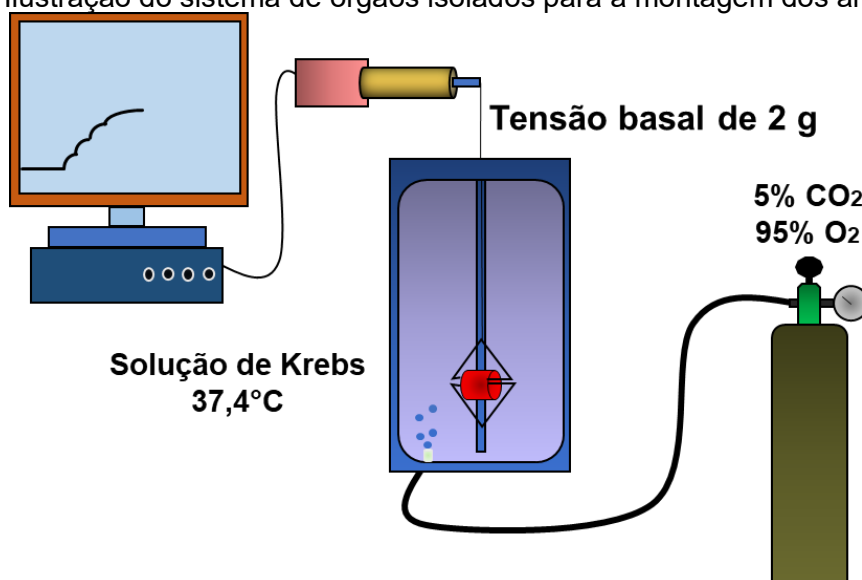
##### **5.2.4.5.1 Preparo dos anéis de aorta torácica de ratos**

Após a eutanásia dos animais, a caixa torácica deles foi aberta e a aorta cuidadosamente removida com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas. Depois, a aorta foi colocada em uma placa de Petri com solução de Krebs e o excesso de sangue foi removido por meio da troca da solução até a completa clarificação da mesma. Todo o tecido conectivo da artéria foi removido e dela foram feitos anéis de 3 mm de comprimento. Para o registro das respostas arteriais, os anéis foram montados verticalmente em um sistema de banho de órgão (Figura 9) isolados com cubas de 10

mL, ligados ao transdutor de força por meio de fio de algodão e mantidos em solução de Krebs a 37,4°C aerada com mistura carbogênica para que o pH fosse constante. A tensão basal passiva adotada foi a de 2 gramas e para que essa se estabilizasse, a cada 15 minutos a solução de Krebs foi trocada para que os metabólitos não se acumulassem (Altura; Altura, 1970; Rameshrad *et al.*, 2016).

Após a estabilização, os protocolos experimentais foram iniciados.

**Figura 9** - Ilustração do sistema de órgãos isolados para a montagem dos anéis de aorta.

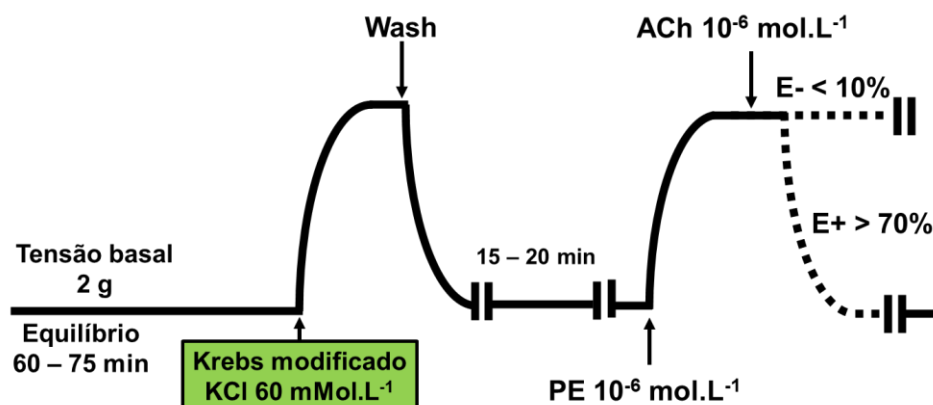


FONTE: Autor, 2024.

#### 5.2.4.5.2 Protocolo experimental para analisar a viabilidade dos anéis arteriais

Após a estabilização dos anéis da aorta de rato, a solução de nutritiva foi trocada por uma despolarizante (com KCl 60 mMol.L<sup>-1</sup>) para que verificar a viabilidade arterial (figura 10). Apenas os anéis que contraíram dentro de uma amplitude de 1 a 1,5 gramas foram usados (Kirschstein *et al.*, 2009; Rameshrad *et al.*, 2016). 10 minutos após essa primeira estimulação, o Krebs despolarizante foi removido e os anéis arteriais foram lavados com a solução de Krebs até a tensão basal ser reestabelecida.

**Figura 10** - Protocolo de estabilização e verificação da presença de endotélio funcional em anéis de aorta de rato.



FONTE: Autor (2024).

15 a 20 minutos após isso, para verificar a viabilidade do endotélio vascular, uma contração foi gerada com FEN (agonista dos receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos da musculatura lisa vascular) com uma concentração de  $10^{-6}$  mol.L $^{-1}$ . No componente tônico dessa contração foi adicionada a cuba  $10^{-6}$  mol.L $^{-1}$  de ACh, agonista dos receptores muscarínicos ( $M_3$ ) presentes no endotélio vascular (Furchgott; Zawadzki, 1980). Após isso, o relaxamento dos anéis foi observado e medidos por meio da seguinte fórmula matemática (equação 2):

**Equação 2** - Determinação da porcentagem de endotélio nos anéis arteriais

$$\% \text{ de endotélio} = \left\{ \left( \frac{EST - ACh}{EST - FEN} \right) \times 100 \right\} - 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Na qual:

EST: tensão basal antes da adição da FEN;

ACh: Menor tensão alcançada após a adição da ACh;

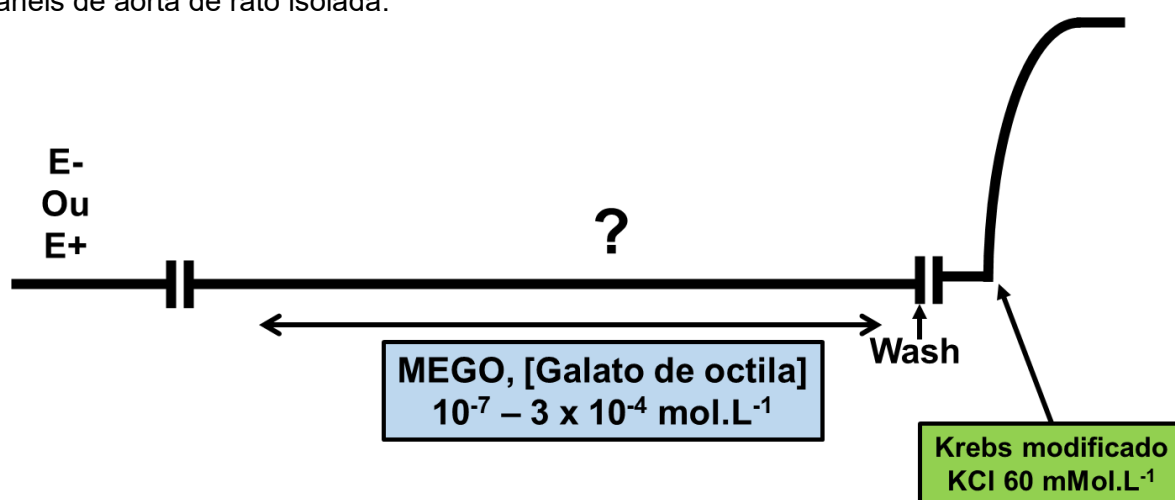
FEN: Maior tensão alcançada após a adição de FEN.

Os anéis que apresentaram mais de 70% de endotélio funcional foram considerados com endotélio e os que tinham valores igual ou menor que 10% foram considerados sem endotélio funcional. O endotélio foi removido por atrito com haste de aço inoxidável.

#### 5.2.4.5.3 Avaliação da atividade da MEGO sobre o tônus basal da aorta

Nos anéis de aorta isolados de rato com e sem o endotélio funcional e mantidos sobre a tensão basal, após a estabilização, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas da MEGO ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>) para as curvas concentração-respostas serem construídas (figura 11). Ao final do protocolo, os anéis foram lavados por no mínimo três vezes com solução de Krebs e, após 30 minutos, foi realizada a troca da solução nutritiva pela de Krebs despolarizante com o intuito de observar a reversibilidade do efeito da MEGO.

**Figura 11** - Protocolo experimental para investigar o efeito da MEGO sobre o tônus basal de anéis de aorta de rato isolada.



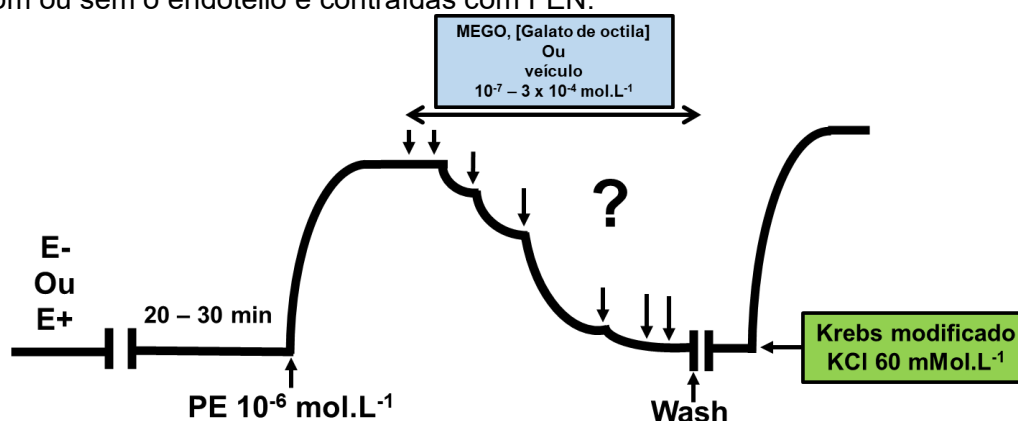
FONTE: Autor, 2024.

#### 5.2.4.5.4 Avaliação da atividade da MEGO sobre a aorta com ou sem o endotélio funcional contraídas com fenilefrina

Após a fase de estabilização, os anéis com e sem o endotélio foram contraídos com FEN ( $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) e na fase tônica da contração (aproximadamente 30 minutos após a adição de FEN) concentrações crescentes e cumulativas da MEGO ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>) ou do veículo foram adicionadas às cubas (figura 12) para que a curva concentração-resposta fosse construída. Ao final do experimento, os anéis foram lavados de forma abundante com solução de Krebs e após 30 minutos uma nova contração foi feita com solução de Krebs despolarizante para avaliar a reversibilidade do experimento. Com esse ensaio, pôde-se avaliar a participação do endotélio do

endotélio no efeito vasorrelaxante do galato de octila na MEGO e descartar qualquer efeito do veículo sobre a reatividade vascular.

**Figura 12** - Protocolo experimental para investigar o efeito da MEGO sobre aorta isolada de rato com ou sem o endotélio e contraídas com FEN.

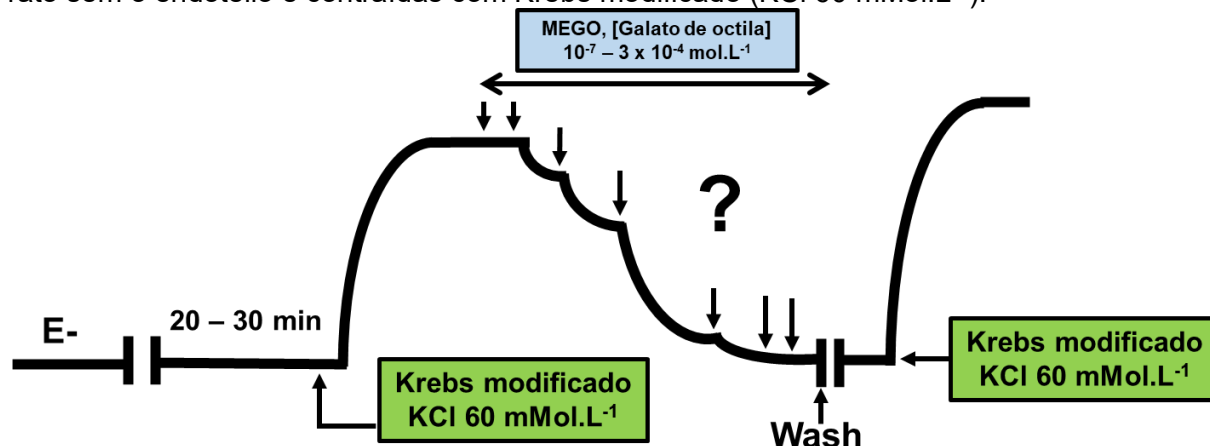


FONTE: Autor, 2024.

#### 5.2.4.5.5 Avaliação da atividade da MEGO sobre a aorta sem o endotélio funcional contraída com solução despolarizante de Krebs

Com o intuito de avaliar o efeito vasorrelaxante da MEGO sobre a contração vascular induzida por agente despolarizante, foi realizada a construção de uma curva concentração-resposta com a MEGO ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em anéis de aorta sem o endotélio vascular (figura 13), após a estabilização, com a solução de Krebs modificada (despolarizante) com  $\text{KCl } 60 \text{ mMol.L}^{-1}$  (Simplicio *et al.*, 2014). Após atingir o platô de contração (aproximadamente 30 minutos depois da troca da solução de Krebs normal pela solução de Krebs despolarizante) iniciou-se a adição da MEGO para a avaliação do efeito. Após a curva, os preparos foram lavados com a solução de Krebs e pós 30 minutos uma nova contração foi feita com solução de Krebs despolarizante para avaliar a reversibilidade do experimento. A maior concentração maior de  $\text{K}^+$  no meio nutritivo leva a despolarização da membrana plasmática. Esse fenômeno elétrico desencadeia a abertura de  $\text{Ca}_v$ , resultando na entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol celular e na contração desse músculo (Kirschstein *et al.*, 2009).

**Figura 13** - Protocolo experimental para investigar o efeito da MEGO sobre aorta isolada de rato sem o endotélio e contraídas com Krebs modificado (KCl 60 mMol.L<sup>-1</sup>).



FONTE: Autor, 2024.

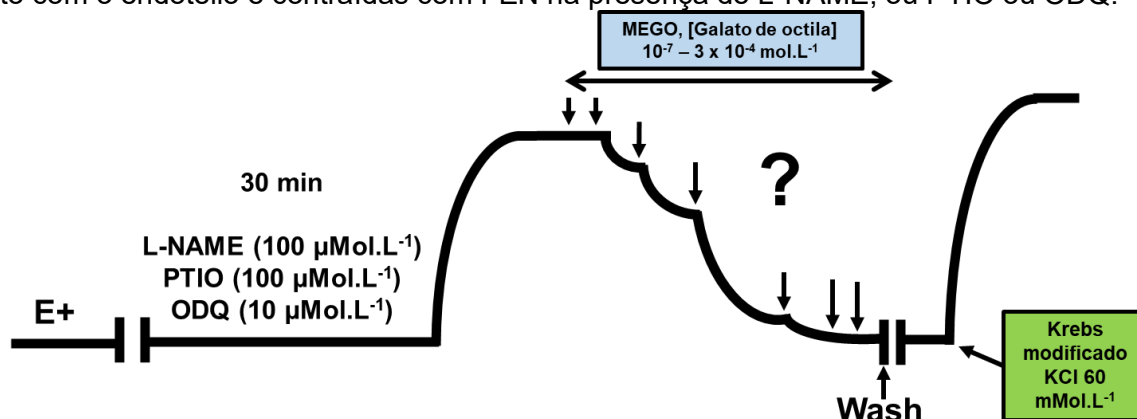
#### 5.2.4.5.6 Avaliação da ação nitrérgica da MEGO em aorta com o endotélio funcional

Dessa maneira, o intuito desses ensaios foi avaliar a participação da via eNOS/NO/CGs no efeito vasorrelaxante dependente do endotélio da MEGO. Para isso, após o período de estabilização e verificação da presença do endotélio vascular, os anéis de aorta foram incubados com a L-NAME (100 µMol.L<sup>-1</sup>), um inibidor competitivo não-seletivo das enzimas Sintase de Óxido Nítrico (Rameshrad *et al.*, 2016); ou com PTIO (100 µMol.L<sup>-1</sup>), um sequestrador de NO que é permeável às membranas celulares (Yoshida *et al.*, 1997); ou com ODQ (10 µMol.L<sup>-1</sup>), um inibidor seletivo da CGs (Rameshrad *et al.*, 2016).

O tempo de incubação com cada uma das ferramentas farmacológicas citadas foi de 30 minutos. Cada um desses ensaios foi realizado de forma individual, isto é, cada um em uma cuba com um preparo de aorta isolado no banho de órgãos.

Decorridos os 30 minutos, uma contração com FEN (10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup>) foi realizada e após a formação do platô, no componente tônico da contração (aproximadamente 30 minutos depois da adição da FEN), a curva concentração-resposta com a MEGO (10<sup>-7</sup> – 3x10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>) foi realizada (figura 14). Finalizados os protocolos, os anéis foram lavados de forma abundante com solução de Krebs e após 30 minutos uma contração foi feita trocando a solução fisiológica normal pela solução de Krebs despolarizante, para avaliar a reversibilidade do efeito observado.

**Figura 14-** Protocolo experimental para investigar o efeito da MEGO sobre aorta isolada de rato com o endotélio e contraída com FEN na presença de L-NAME, ou PTIO ou ODQ.



FONTE: Autor, 2024.

### 5.2.5 Experimentos *in vivo*

#### 5.2.5.1 Delineamento experimental e tratamento agudo dos animais com a MEGO

Para avaliar a ação antitrombótica da MEGO, foi realizado o ensaio de trombose induzida por  $\text{FeCl}_3$  na artéria carótida comum esquerda de ratos. Para isso, os animais foram randomicamente separados em cinco grupos: um grupo controle (CTL), que recebeu apenas o veículo; um grupo que recebeu a MEGO na dose de  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ; um grupo que recebeu a MEGO na dose de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ; um grupo que recebeu a enoxiparina (ENOX) como controle positivo na dose de  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ; e um grupo que recebeu  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  enoxiparina e  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  MEGO de forma concomitante.

A aplicação nos animais foi feita pela via intravenosa, aproximadamente 45 minutos antes de iniciar o protocolo de indução da trombose. Para isso, os animais foram anestesiados com cetamina ( $35 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , i.p) e xilazina ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p) com o intuito de gerar apenas um torpor breve nos animais durante o processo de aplicação das substâncias e diminuir o grau de estresse nos mesmos.

Com os animais anestesiados, as caudas dos mesmos foram limpas de forma cuidadosa com etanol a 70% e, depois, colocadas em um béquer com água aquecida a  $40^\circ\text{C}$  para que a veia caudal fosse dilatada e a visualização da mesma facilitada.

Localizada a veia caudal, as substâncias foram administradas utilizando uma seringa de 1 mL com uma agulha de 27 G ( $0,38 \times 13 \text{ mm}$ ) na forma de bolus. Após isso, os animais foram colocados em gaiolas com maravalha e a recuperação da

anestesia foi acompanhada (ocorrendo por volta de 15 minutos após a aplicação). Decorridos 45 minutos depois da aplicação das substâncias nas veias caudais, com os animais recuperados da primeira anestesia, uma nova anestesia foi aplicada com cetamina e xilazina (conforme a descrição no tópico 5.2.3) para que o protocolo de indução da trombose fosse iniciado.

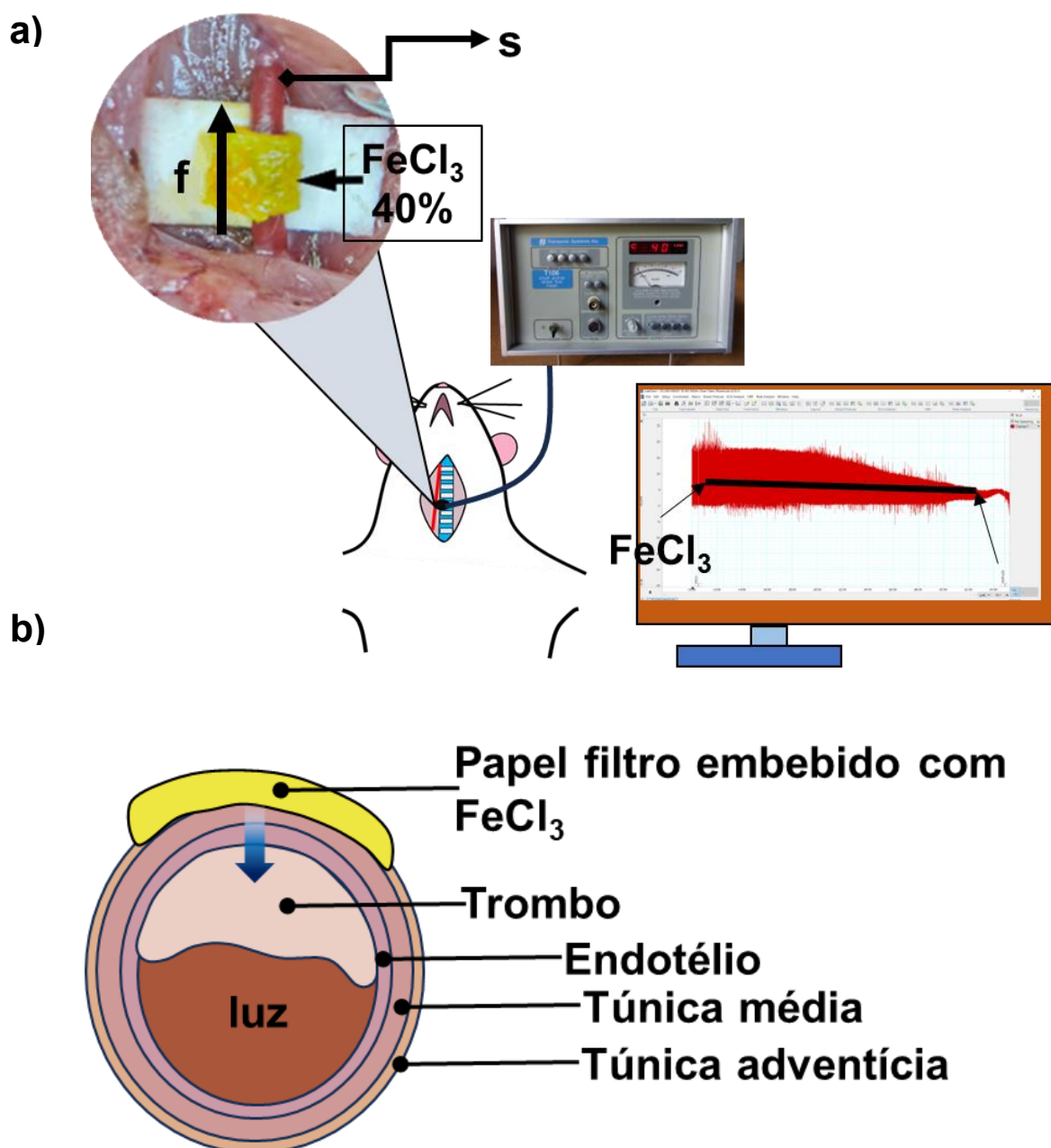
#### **5.2.5.2 Avaliação da ação antitrombótica da MEGO**

Após a aplicação das substâncias e da anestesia nos animais, esses foram colocados em decúbito dorsal e com uma tesoura cirúrgica uma incisão foi feita aproximadamente a 4 mm à esquerda da parte medial dos animais (localizando a traqueia para o corte), iniciando a dissecação dos tecidos subjacentes (glândula salivar e músculo esquelético) até localizar a artéria carótida comum (figura 15). Todo o tecido nervoso ao redor da artéria foi cuidadosamente limpo, conservando-os íntegros durante o processo, de modo que a artéria fosse totalmente isolada e limpa.

Com a artéria dissecada, uma base de polipropileno de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup> foi colocada (figura 14b) na parte anterior à artéria para que essa fosse isolada dos tecidos subjacentes (Lin *et al.*, 2022; Radomski *et al.*, 2005).

Na região mais distal da artéria a sonda ultrassônica (modelo X1, acoplada ao fluxômetro e ao sistema de aquisição de dados) foi colocada para medida do fluxo sanguíneo continuamente pelo software LabChart. Após 5 minutos de registro do fluxo basal, um papel-filtro de 2 mm<sup>2</sup> embebido com 10 microlitros de solução de FeCl<sub>3</sub> a 40% (Surin *et al.*, 2010) foi posto sobre a superfície do vaso e o tempo de oclusão monitorado: O tempo da retirada do papel filtro até o tempo em que o fluxo sanguíneo registrado fosse igual a zero foi entendido como o tempo de obstrução (ou seja, o tempo que o trombo levou para se formar e ocluir totalmente a artéria) (Zakrzeska *et al.*, 2015).

**Figura 15** - Ilustração do layout do experimento de indução da trombose em artéria carótida comum de ratos por cloreto férrico (a) e ilustração do processo de obstrução arterial (b).



A figura **a** representa o experimento de medida de fluxo com uma fotografia representativa da artéria carótida isolada com o papel com cloreto férrico. A figura **b** representa o processo de obstrução. Quando o papel com o cloreto férrico é adicionado, o endotélio é lesionado e o trombo começa a ser formado e a luz arterial diminui e, com ela, o fluxo de sangue.  $f$  = sentido do fluxo sanguíneo;  $S$  = local de colocação da sonda ultrassônica.

FONTE: Autor (2024)

#### **5.2.5.3 Coleta das amostras biológicas dos animais tratados e avaliação da ação antiagregante e anticoagulante do tratamento**

Após finalizado o experimento de avaliação da ação antitrombótica nos animais, o grau de anestesia dos mesmos foi verificado e, confirmado, procedeu os procedimentos experimentais. O sangue dos animais foi coletado e processado para a obtenção do PRP e do PPP do mesmo modo descrito no tópico 5.3.2.1, com os quais foram realizados testes de agregação e de coagulação, através do TP eTTPa.

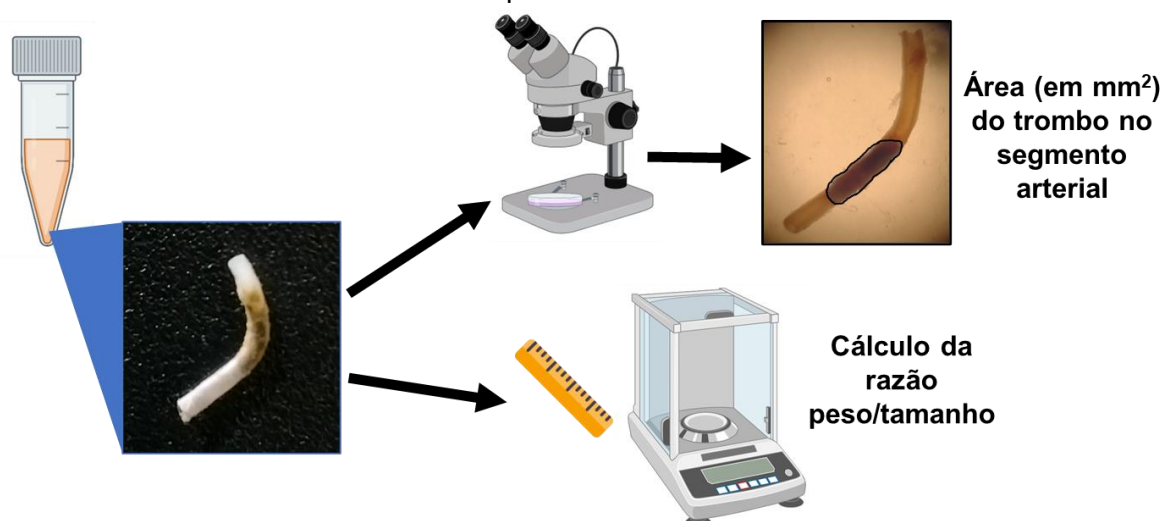
Após o exsanguinamento dos animais e confirmada a eutanásia, todo o segmento da artéria carótida com o trombo foi retirado, o conteúdo sanguíneo intravascular e o tecido perivascular foram cuidadosamente removidos e o segmento limpo foi colocado em solução de formol a 10% para ocorrer a fixação da peça e posteriores análises morfométricas do trombo.

#### **5.2.5.4 Morfometria do trombo formado**

As análises morfométricas consistiram no cálculo da razão peso da artéria com o trombo pelo tamanho do segmento arterial (figura 16). Para o cálculo da razão peso/tamanho, os segmentos da artéria carótida com o trombo que estavam em formol foram colocados em placa de Petri coberta com um papel-filtro para que todo o líquido presente no vaso fosse transferido para o papel. A artéria seca, foi presa pelas extremidades em uma placa de parafina para que ficassem o mais retas possível e com o auxílio de uma régua milimetrada o tamanho delas (em cm) foi medido. Após isso, o peso (em mg) de todo o segmento foi aferido em uma balança analítica. Por fim, a razão entre o peso do trombo e o tamanho do segmento foi calculada para cada segmento. Finalizado o processo, os segmentos foram realocados para os frascos com formol a 10% (Silva-Luis *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2023).

Para calcular a área do trombo, os anéis foram colocados em uma placa de Petri com formol a 10% e colocadas em um estereomicroscópio para que fotografias do segmento com o trombo fossem tiradas (figura 15). Todas as imagens foram feitas no mesmo zoom. Para calcular a área, na mesma ampliação uma lâmina de vidro milimetrada foi fotografada para fins de calibração do software ImageJ. Por fim, por esse software, a área dos trombos nas artérias foi mensurada.

**Figura 16** - Esquema representativo dos procedimentos para as análises morfométricas da artéria carótida com o trombo induzido por  $\text{FeCl}_3$ .



FONTE: Autor (2024).

### 5.2.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média mais ou menos erro padrão da média (e.p.m.) e analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 10.0. Para avaliar a diferença entre dois grupos utilizou-se o teste *t* de Student, já para três ou mais grupos foi utilizada a Análise de Variância Ordinária (ANOVA) *one-way* ou *two-way* (análise de duas variáveis independentes) seguida de pós-teste de Tukey. Como referência significativa para a diferença estatística entre os grupos adotou-se um  $p < 0,05$  (isto é, para rejeitar a hipótese nula e acatar a alternativa).

O  $\text{CE}_{50}$  e  $p E_{\text{máx}}$  foram calculados utilizando regressão não linear. A área sobre a curva foi calculada utilizando a regra dos trapezoides.

Para os experimentos de TP, TTPa, hemólise e agregação plaquetária um 'n' foi considerado como a média da triplicata de um experimento realizado a partir da amostra de um animal.

# RESULTADOS

---

## 6. RESULTADOS

### 6.1 PRÉ-FORMULAÇÃO: COMPONENTES DA FÓRMULA.

A etapa de pré-formulação apontou a fórmula 2 (tabela 4) como tendo as gotículas com o tamanho menor que 100  $\mu\text{m}$ , encaixando-se no critério de microemulsão, além de ter um bom potencial Zeta. Apesar do uso do Lipoid S100 como surfactante conceder um potencial Zeta menor, foi observado o maior tamanho das gotículas. Dessa maneira, foi adotado o Cremophor EL como o agente surfactante para o desenvolvimento da microemulsão com o galato de octila. Além disso, as concentrações usadas para obter essa fórmula foram adotadas – com leve modificação, para que as faixas de previsibilidade do tamanho das gotículas fossem maiores – para o planejamento Box-Behnken.

**Tabela 4** - Resultados da etapa de pré-formulação da microemulsão com o galato de octila.

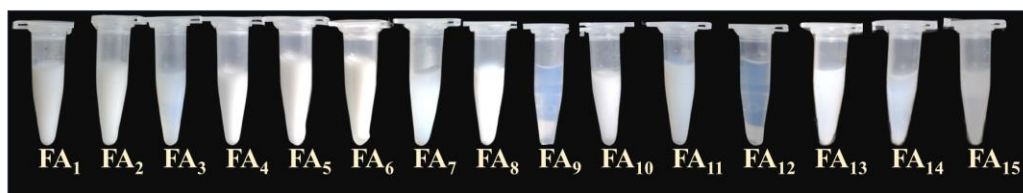
|                   | Kolliphor EL<br>(%) | MCT<br>(%) | Lipoid S100<br>(%) | Galato de octila<br>(mg/mL) | Tamanho          | Potencial Zeta    |
|-------------------|---------------------|------------|--------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| <b>Fórmula 1</b>  | 3                   | 4          | 0                  | 20                          | 221,3 $\pm$ 1,6  | -3,58 $\pm$ 1,03  |
| <b>Fórmula 2</b>  | 6                   | 4          | 0                  | 20                          | 23,1 $\pm$ 2,2   | -9,35 $\pm$ 4,25  |
| <b>Fórmula 3</b>  | 3                   | 8          | 0                  | 20                          | 972,2 $\pm$ 3,6  | -3,5 $\pm$ 0,36   |
| <b>Fórmula 4</b>  | 6                   | 8          | 0                  | 20                          | 102,4 $\pm$ 1,4  | -13,1 $\pm$ 3,58  |
| <b>Fórmula 5</b>  | 0                   | 4          | 3                  | 20                          | 569,2 $\pm$ 3,5  | -3,56 $\pm$ 1,2   |
| <b>Fórmula 6</b>  | 0                   | 4          | 6                  | 20                          | 221,3 $\pm$ 1,2  | -7,25 $\pm$ 3,14  |
| <b>Fórmula 7</b>  | 0                   | 8          | 3                  | 20                          | 1125,1 $\pm$ 4,2 | -10,32 $\pm$ 1,29 |
| <b>Fórmula 8</b>  | 0                   | 8          | 6                  | 20                          | 725,3 $\pm$ 1,6  | -7,69 $\pm$ 2,21  |
| <b>Fórmula 9</b>  | 3                   | 4          | 3                  | 20                          | 354,1 $\pm$ 8,2  | -8,47 $\pm$ 3,21  |
| <b>Fórmula 10</b> | 6                   | 4          | 3                  | 20                          | 172,3 $\pm$ 3,4  | -9,73 $\pm$ 1,87  |
| <b>Fórmula 11</b> | 3                   | 4          | 6                  | 20                          | 532,4 $\pm$ 6,2  | -11,65 $\pm$ 0,98 |
| <b>Fórmula 12</b> | 6                   | 4          | 6                  | 20                          | 291,2 $\pm$ 3,2  | -16,32 $\pm$ 0,12 |

FONTE: Autor (2024).

## 6.2 PLANEJAMENTO BOX-BEHKEN E DETERMINAÇÃO DA FÓRMULAÇÃO DE MICROEMULSÃO OTIMIZADA.

As formulações produzidas no planejamento fatorial estão ilustradas na figura 17 e os dados obtidos para as análises estatísticas realizadas estão presentes na tabela 5.

**Figura 17** - Microemulsões com o galato de octila para o planejamento fatorial Box-Behken.



FONTE: Autor, 2022

**Tabela 5** - Dados de respostas (tamanho e potencial Zeta) obtidos para a realização do planejamento fatorial.

|      | Variáveis independentes |     |                  | RESPOSTA       |
|------|-------------------------|-----|------------------|----------------|
|      | Cremophor EL            | MCT | Galato de octila | Tamanho        |
| FA1  | -1                      | -1  | 0                | 291,9 ± 5,71   |
| FA2  | 0                       | 0   | 0                | 353,3 ± 6,54   |
| FA3  | -1                      | 1   | 0                | 1037,0 ± 170,1 |
| FA4  | 0                       | 1   | 1                | 2370,0 ± 124,8 |
| FA5  | 0                       | -1  | 1                | 593,0 ± 26,3   |
| FA6  | 0                       | 1   | -1               | 137,0 ± 1,2    |
| FA7  | 0                       | 0   | 0                | 389,7 ± 47,5   |
| FA8  | -1                      | 0   | -1               | 143,8 ± 1,2    |
| FA9  | 1                       | 0   | -1               | 40,0 ± 0,13    |
| FA10 | -1                      | 0   | 1                | 507,9 ± 125,3  |
| FA11 | 1                       | 1   | 0                | 68,4 ± 0,7     |
| FA12 | 0                       | -1  | -1               | 37,7 ± 0,14    |
| FA13 | 1                       | -1  | 0                | 189,9 ± 0,7    |
| FA14 | 0                       | 0   | 0                | 243,1 ± 5,9    |
| FA15 | 1                       | 0   | 1                | 1058,0 ± 14,5  |

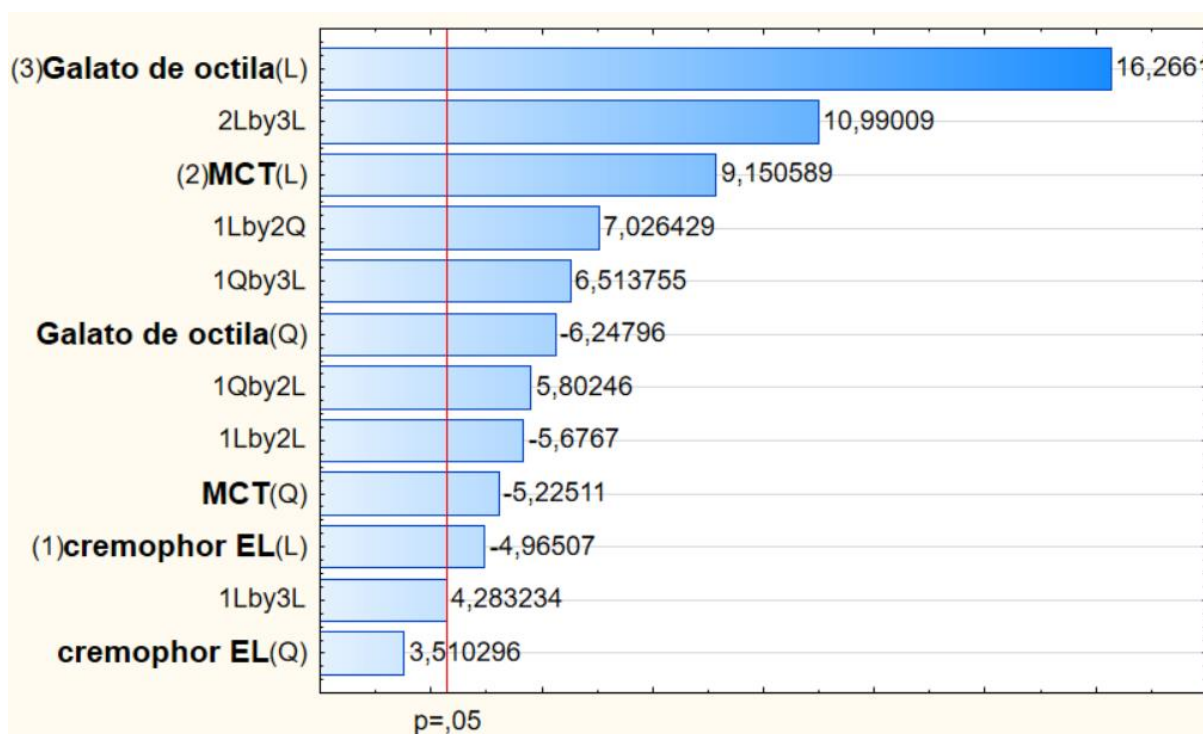
Os dados de tamanho e potencial zeta estão expressos como a média de triplicata experimental ± o desvio padrão.

FONTE: Autor (2024).

Com a variação dos componentes da formulação, foram obtidas microemulsões com tamanhos de gotículas entre 37 até 2.370 nm de diâmetro. As interações das variáveis independentes sobre a variável dependente (tamanho) foram investigadas a partir do gráfico de Pareto (gráfico 1) e de superfície (gráfico 2).

O gráfico de Pareto mostra a relação das variáveis dependentes com as variáveis independentes. Quando as barras das variáveis de entrada ultrapassam a reta que limita o grau de confiança ( $p < 0,05$ ), a variável de entrada é considerada significativa para modificar os parâmetros tamanho das gotículas (gráfico 1). Assim, foi observado que o galato de octila e o MCT contribuem de forma significativamente em aumentar os tamanhos das gotículas, ao passo que o Cremophor EL contribui em reduzir o tamanho das gotículas.

**Gráfico 1** – Análise de Pareto para o tamanho (a) e potencial Zeta (b).

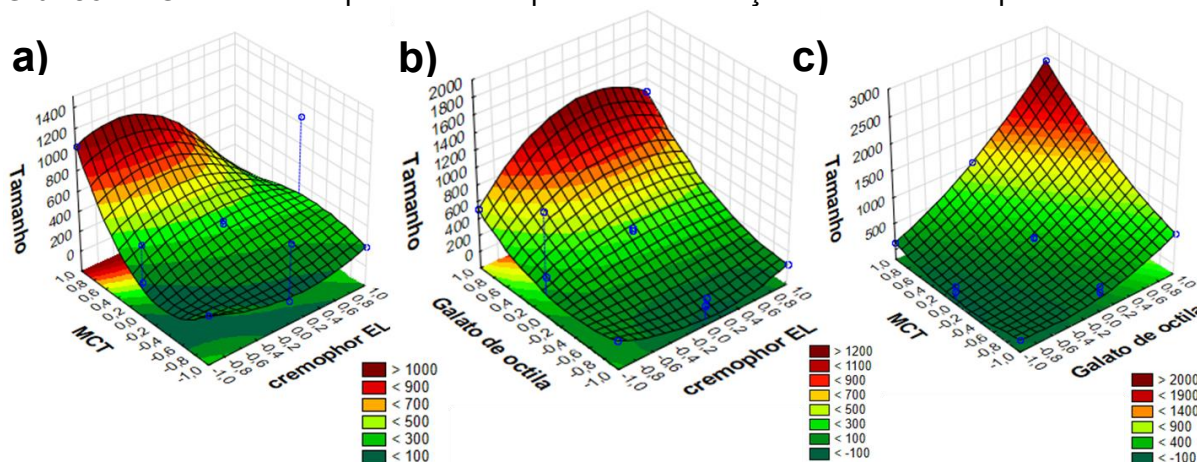


FONTE: Autor, 2024

Os gráficos de superfície de resposta estão presentes no gráfico 2. A partir da análise dos gráficos para o tamanho das gotículas é visto que o MCT e o galato de octila sendo usados em concentrações mais baixas promovem a formação de

gotículas menores na microemulsão, ao passo que o Cremophor EL quando nas concentrações próximas do nível central contribuem para as gotículas menores.

**Gráfico 2** - Gráficos de superfície de resposta com a relação às variáveis dependentes.



A variável tamanho está nos gráficos **a – c**, com as variáveis independentes de entrada ‘MCT’ e ‘Cremophor EL’ (**a**), ‘Galato de octila’ e ‘Cremophor EL’ (**b**) e ‘MCT’ e ‘galato de octila’ (**c**).  
 FONTE: Autor, 2024

Assim, com o intuito de chegar em proporções ideais dos componentes da formulação foi proposto um modelo matemático a partir do tratamento estatístico por regressão linear múltipla sobre os resultados da matriz do planejamento fatorial. O  $R^2$  do modelo polinomial de segunda ordem proposto foi de 99,7%, ou seja, o modelo proposto explicaria 99,7% da variabilidade experimental e, também, a predição correta a partir do polinômio proposto (equação 3), na qual:  $y$  é o tamanho das partículas (nm);  $x_1$  é o Cremophor EL (variável independente codificada, -1 até +1);  $x_2$  é o MCT (variável independente codificada, -1 até +1);  $x_3$  é o Galato de octila (variável independente codificada, -1 até +1).

**Equação 3** - Polinômio proposto para a predição dos tamanhos das gotículas da microemulsão.

$$y = 359 + x_1 - 112x_1^2 + 469x_2 + 235 + 697x_3 + 275x_3^2 - 217x_1x_2 - 379x_1x_2^2 - 313x_1^2x_2 + 164x_1x_3 - 352x_1^2x_3 + 419x_1x_3 \quad \text{Eq. (3)}$$

Para obter a formulação definitiva, foi definido um valor de  $y$  ideal que ficasse entre valores de 0 e 100 nm, fixou-se um valor de  $x_3$  em um valor que correspondesse a 10 mg.mL<sup>-1</sup> e variou-se os valores de  $x_1$  e  $x_2$  até o  $y$  ficar na faixa proposta.

Assim, obtivemos uma formulação ideal de microemulsão de galato de octila (MEGO) com 80 mg.mL<sup>-1</sup> de Cremophor EL, 20 mg.mL<sup>-1</sup> de MCT e 10 mg.mL<sup>-1</sup> de galato de octila, utilizando quantidade de água deionizada suficiente para completar 1 mL. A MEGO está representada na figura 18 e ela apresenta tamanhos das gotículas por volta de  $40 \pm 6$  nm, o potencial zeta de  $-15 \pm 48$  mV e com o Pdl igual a  $0,198 \pm 0,008$ . A MEGO com essas proporções foi usada em todos os experimentos biológicos e para o teste de estabilidade.

**Figura 18** - Microemulsão de Galato de octila otimizada.



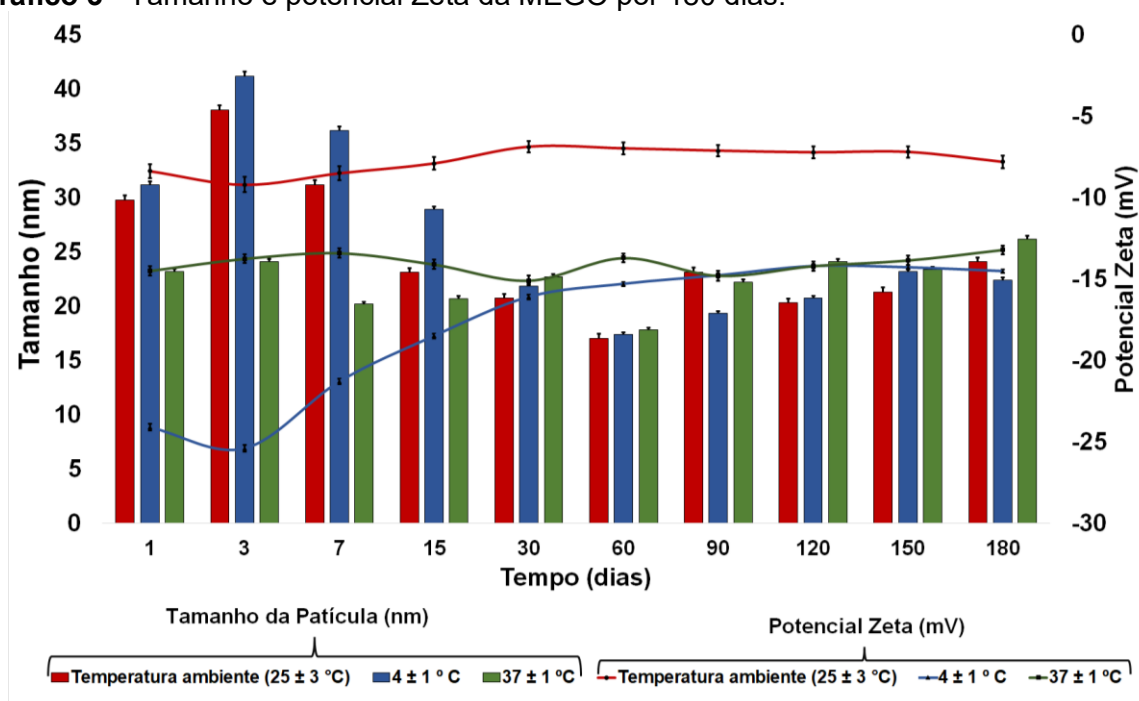
FONTE: Autor, 2024.

### 6.3 TESTE DE ESTABILIDADE DA MICROEMULSÃO DE GALATO DE OCTILA

No teste de estabilidade realizados durante seis meses, foi observado que a MEGO mantida a 37°C teve menor estabilidade durante esse período (gráfico 3). Nessa temperatura, a microemulsão apresentou variação de tamanho das gotículas e, principalmente, de pH e de coloração (gráfico 4; figura 18). Tais fatores indicam a desestruturação do sistema. A MEGO mantida em temperatura ambiente também apresentou variabilidade de tamanho das gotículas, do potencial Zeta, do pH e coloração, sendo as duas últimas em menor grau que a mantida a 37°C. Em contrapartida, a MEGO mantida sob refrigeração (a 4°C), apesar de ter variação de tamanho e potencial Zeta nos primeiros dias, a coloração e o pH não foram alterados durante os dias de análise.

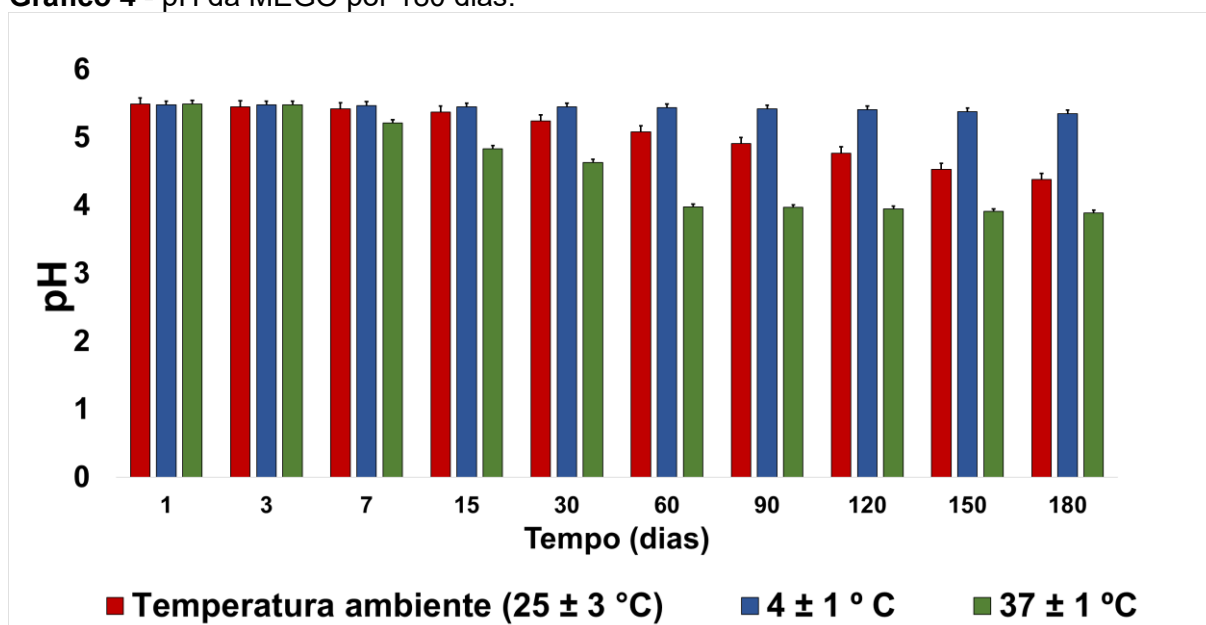
Dessa maneira, a manutenção da MEGO em refrigeração é necessária para que a estabilidade química e física dessa seja mantida.

**Gráfico 3** - Tamanho e potencial Zeta da MEGO por 180 dias.



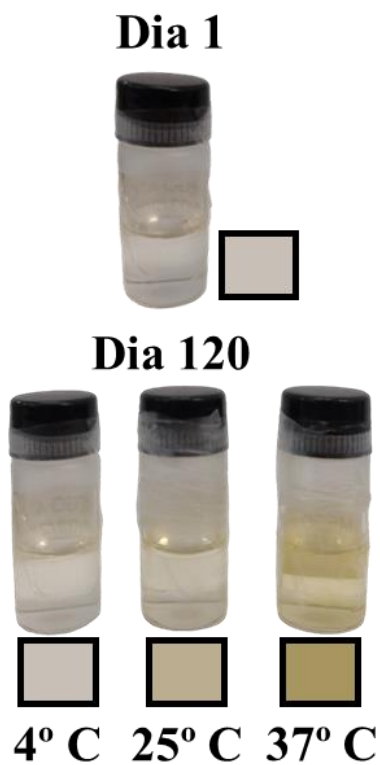
O gráfico ilustra as variações de tamanho e do potencial Zeta da MEGO durante 180 dias. As barras (tamanho) expressam a média ± o desvio padrão, os pontos nas linhas (potencial Zeta) representam as médias ± o desvio padrão.

FONTE: Autor, 2024.

**Gráfico 4** - pH da MEGO por 180 dias.

O gráfico ilustra as variações de pH MEGO durante 180 dias. As barras (pH) expressão a média ± o desvio padrão.

FONTE: Autor, 2024.

**Figura 19** - Representação da coloração da MEGO durante o teste de estabilidade.

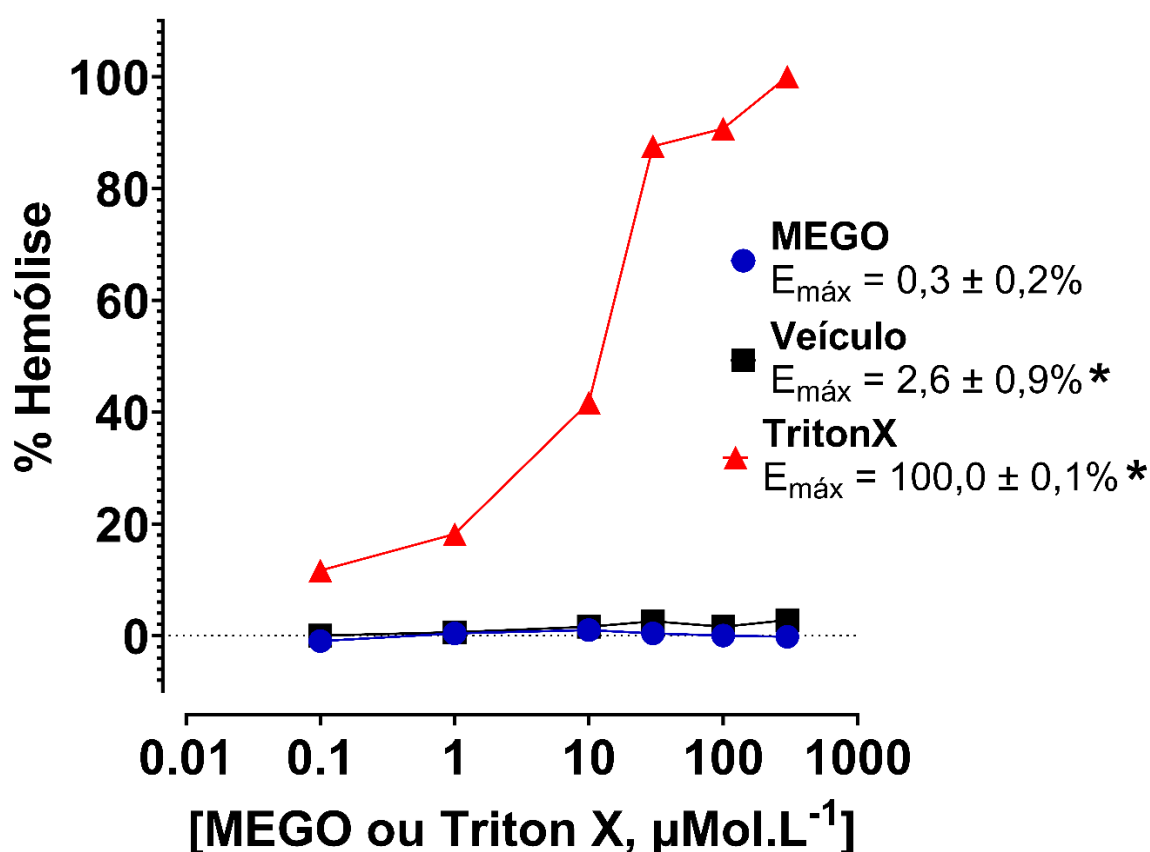
Representação da coloração da MEGO, em diferentes condições, durante o teste de estabilidade no dia 1 e no dia 120

FONTE: Autor, 2024.

## 6.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO HEMOLÍTICA DA MEGO SOBRE ERITRÓCITOS DE RATOS

A MEGO não demonstrou ação hemolítica relevante em eritrócitos de ratos. Todavia, o veículo apresentou discreta ação hemolítica ( $E_{\text{máx}} = 2,6 \pm 0,9\%$ ) quando comparada a MEGO ( $E_{\text{máx}} = 0,3 \pm 0,2\%$ ) (Gráfico 5). Também, foi observada a ação hemolítica do TritonX (controle positivo).

**Gráfico 5** - Efeito da MEGO sobre hemácias lavadas de ratos.



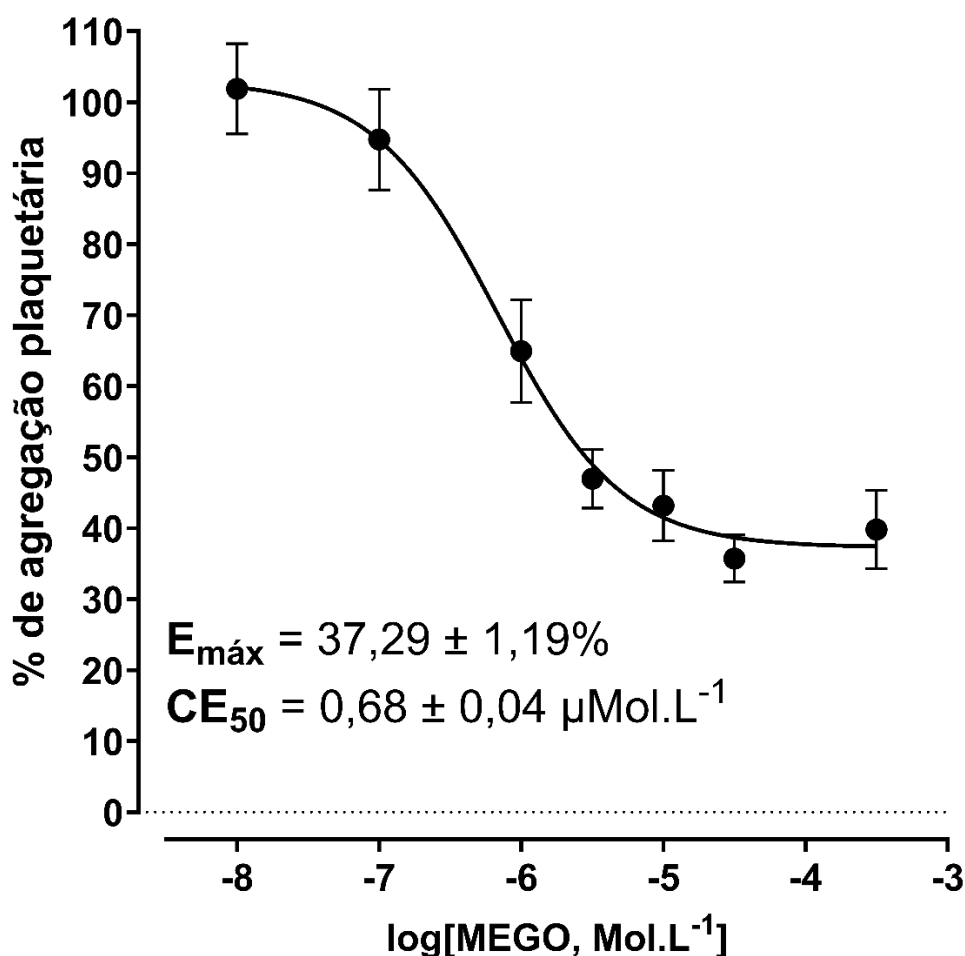
Os símbolos da MEGO (●), ou Veículo (■) ou TritonX (▲) representam a média  $\pm$  e.p.m. Os dados estão normalizados pelo  $E_{\text{máx}}$  gerado pelo TritonX.  $n = 3$ .  $*p < 0,05$  versus MEGO. ANOVA *one-way* seguido de pós-teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024)

## 6.5 EFEITO DA MEGO SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PLAQUETAS DE RATOS

A MEGO foi capaz de inibir a agregação plaquetária de plaquetas isoladas de ratos induzida pelo ADP ( $17 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ), um ativador plaquetário agonista dos receptores P2Y, de forma dependente da concentração, conforme analisado na curva concentração-resposta (gráfico 6) feita, sendo possível determinar um  $E_{\text{máx}} = 37,29 \pm 1,49\%$  e uma  $CE_{50} = 0,68 \pm 0,04 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ .

**Gráfico 6** - Curva concentração-resposta construída para determinar os parâmetros farmacológicos sobre o efeito antiagregante da MEGO.

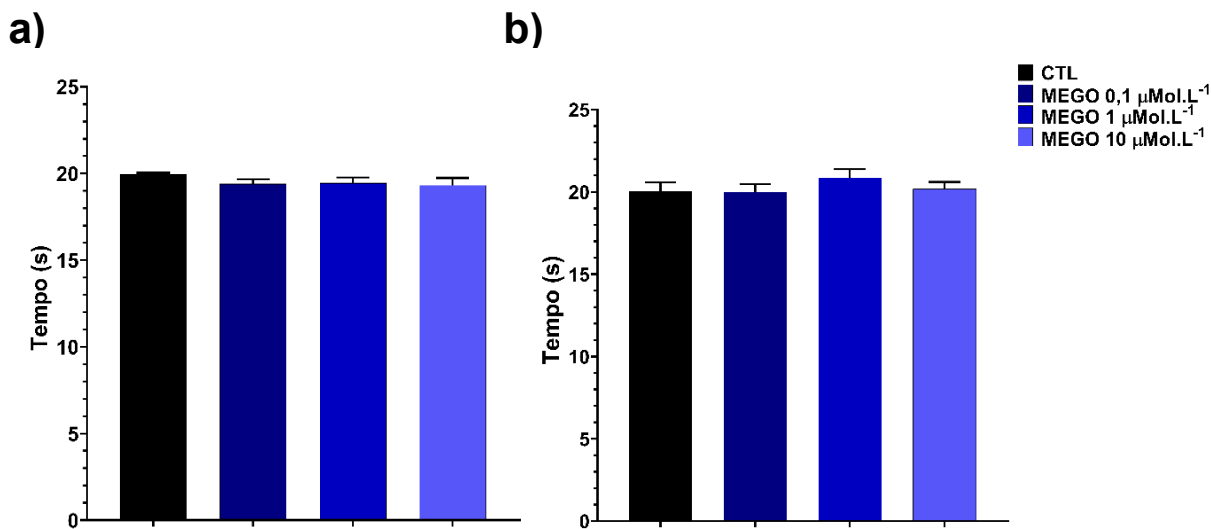


As barras verticais no gráfico (a) e os símbolos (●) no gráfico (b) representam a média e o e.p.m, respectivamente.  $n = 7 - 8$ . \* $p < 0,05$  vs ADP  $17 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ; # $p < 0,05$  vs MEGO  $0,1 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ; & $p < 0,05$  vs MEGO  $1 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ . ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey.  
FONTE: Autor, 2024.

## 6.6 AÇÃO DA MEGO SOBRE O TP E TTPa EM PLASMA DE RATOS

A MEGO em contato com o PPP de ratos e em diferentes concentrações não foi capaz de alterar o tempo (em segundos) do TP (a) ou TTPa (b), conforme observado nos gráficos 7-a e 7-b.

**Gráfico 7** - Efeito da MEGO sobre o tempo de TP (a) e TTPa (b).



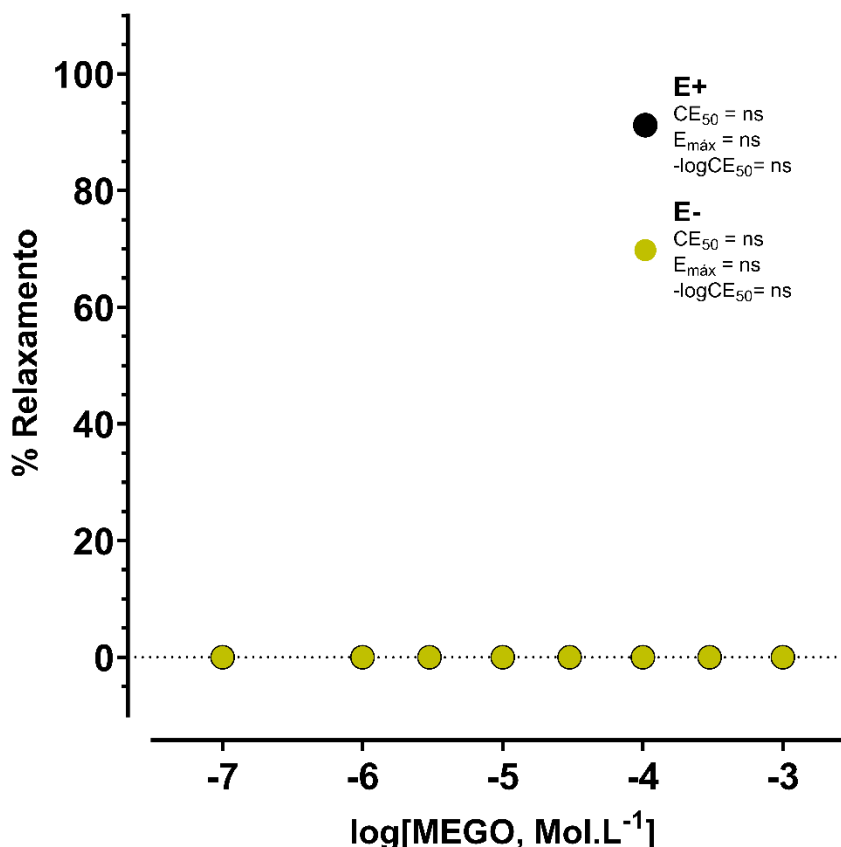
As barras verticais no gráfico (a e b) representam a média e o e.p.m. n = 9 – 12. ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey.

FONTE: Autor, 2024.

## 6.7 RESULTADO DA AÇÃO DA MEGO SOBRE O TÔNUS BASAL DE ANÉIS DE AORTA DE RATO COM OU SEM O ENDOTÉLIO FUNCIONAL

Em anéis de aorta de rato isolados, na ausência e na presença de endotélio vascular funcional e sob o tônus basal do experimento (2 g) a MEGO não exerceu qualquer efeito relaxante ou contraturante (gráfico 8).

**Gráfico 8** - Efeito da MEGO sobre o tônus basal de aorta com ou sem o endotélio funcional.



O símbolos (● e ●) representam a média e o e.p.m. E+ (anéis com endotélio funcional,  $n = 2$ ); E- (anéis sem o endotélio funcional,  $n = 3$ ). ns: sem efeito.

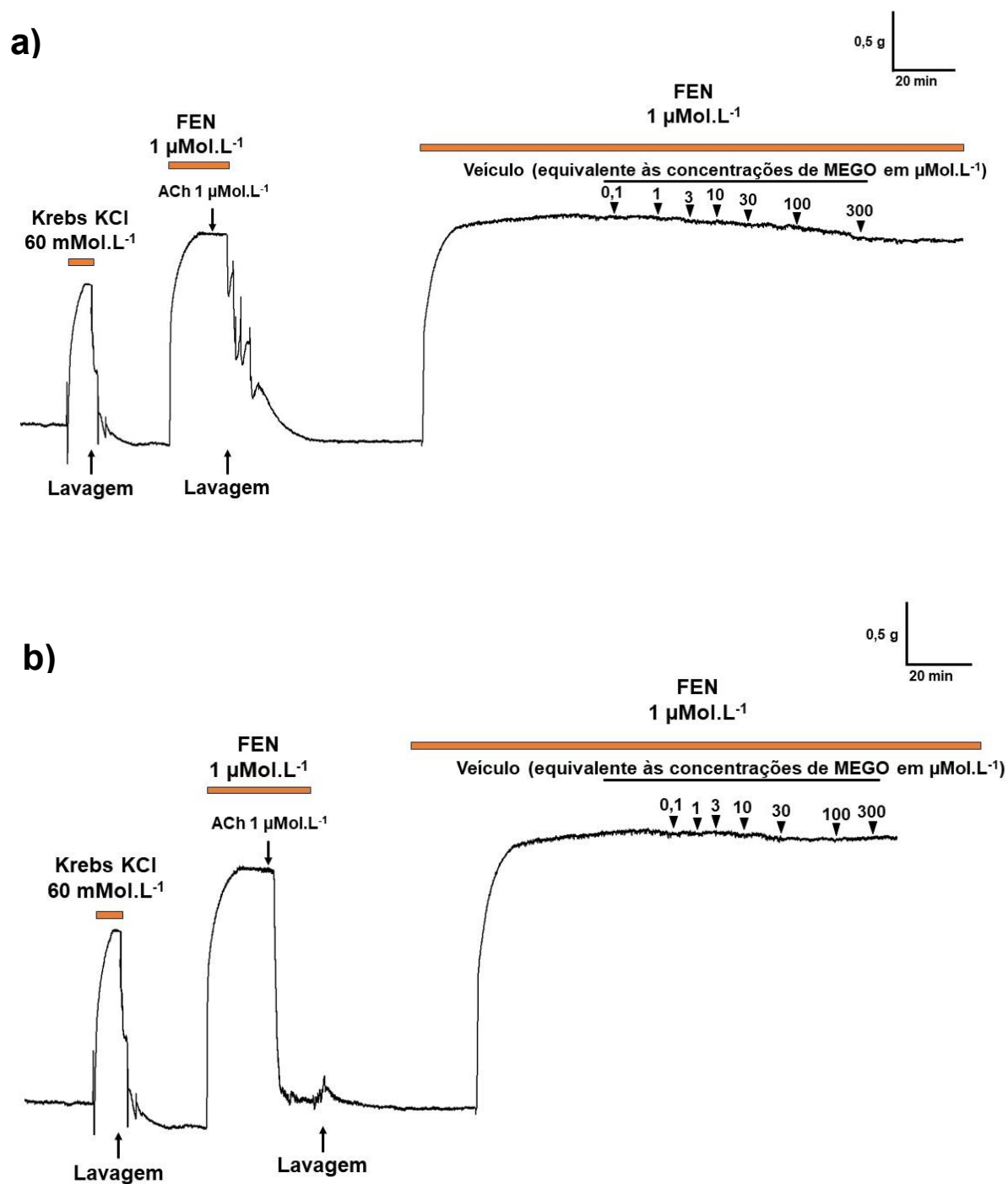
FONTE: Autor (2024).

## 6.8 EFEITO DA MEGO SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR FEN EM ANÉIS DE AORTA DE RATO COM OU SEM O ENDOTÉLIO FUNCIONAL

Em anéis de aorta isolada de ratos e contraídas com FEN a MEGO apresentou efeito vasorrelaxante de maneira concentração-dependente (figura 21 e gráfico 9), sendo produzido um  $E_{máx} = 98,84 \pm 1,4\%$  nos anéis sem o endotélio, com um  $CE_{50} = 20,99 \pm 1,13 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ . Já o relaxamento proporcionado pela MEGO nos anéis com o endotélio apresentou  $E_{máx} = 100,1 \pm 3,6\%$ , não sendo estatisticamente diferente do  $E_{máx}$  dos anéis sem o endotélio, ao passo que a  $CE_{50} = 0,99 \pm 0,08 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ , sendo esse maior do que o observado nos anéis sem o endotélio. Dessa maneira, a MEGO apresenta efeito vasorrelaxante em aorta de rato tanto na presença quanto na ausência do endotélio funcional, mas o efeito gerado na presença do endotélio é significativamente mais potente, em vista da menor  $CE_{50}$ , e do deslocamento da curva

concentração-resposta para a esquerda (gráfico 9). Além disso, não foi observado qualquer efeito do veículo sobre os anéis de aorta contraídos com FEN (figura 20 e gráfico 9).

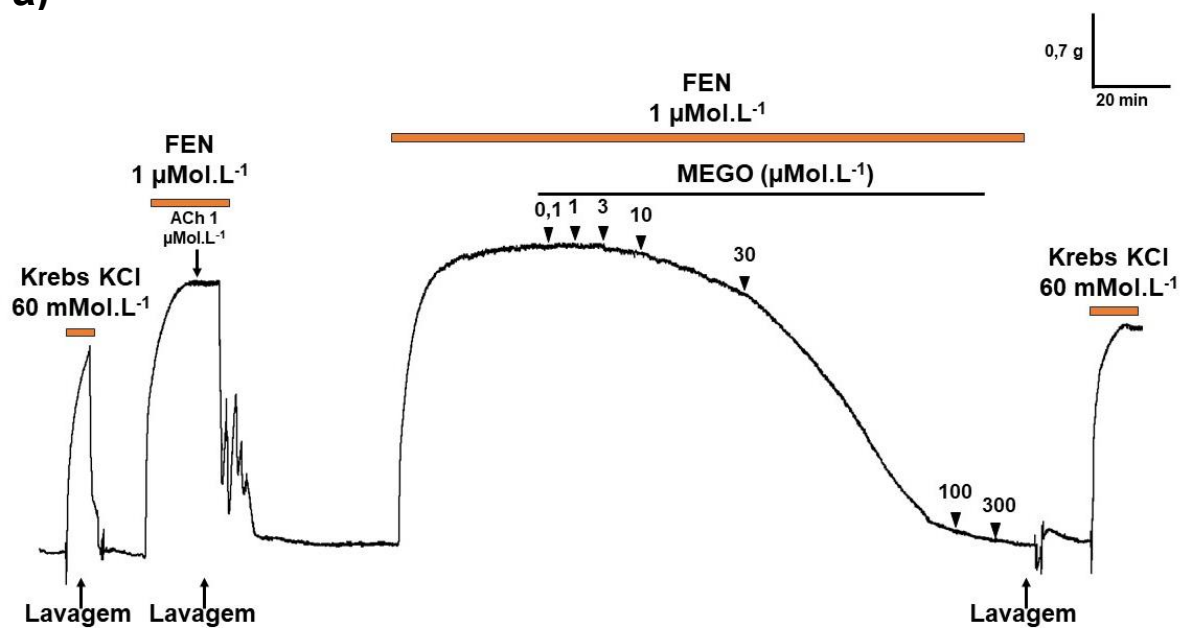
**Figura 20** - Registros originais representativos dos efeitos do veículo sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de aorta sem (a) ou com (b) o endotélio funcional.



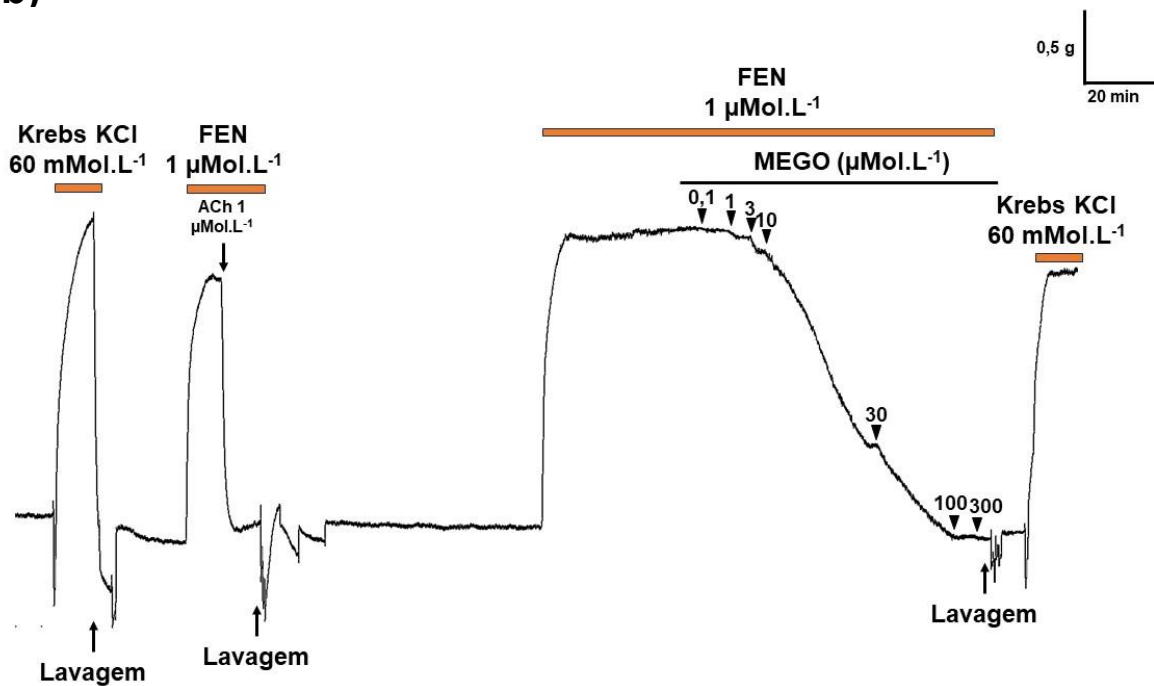
FONTE: Autor (2024).

**Figura 21** - Registros originais representativos dos efeitos da MEGO sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de aorta sem (a) ou com (b) o endotélio funcional.

**a)**

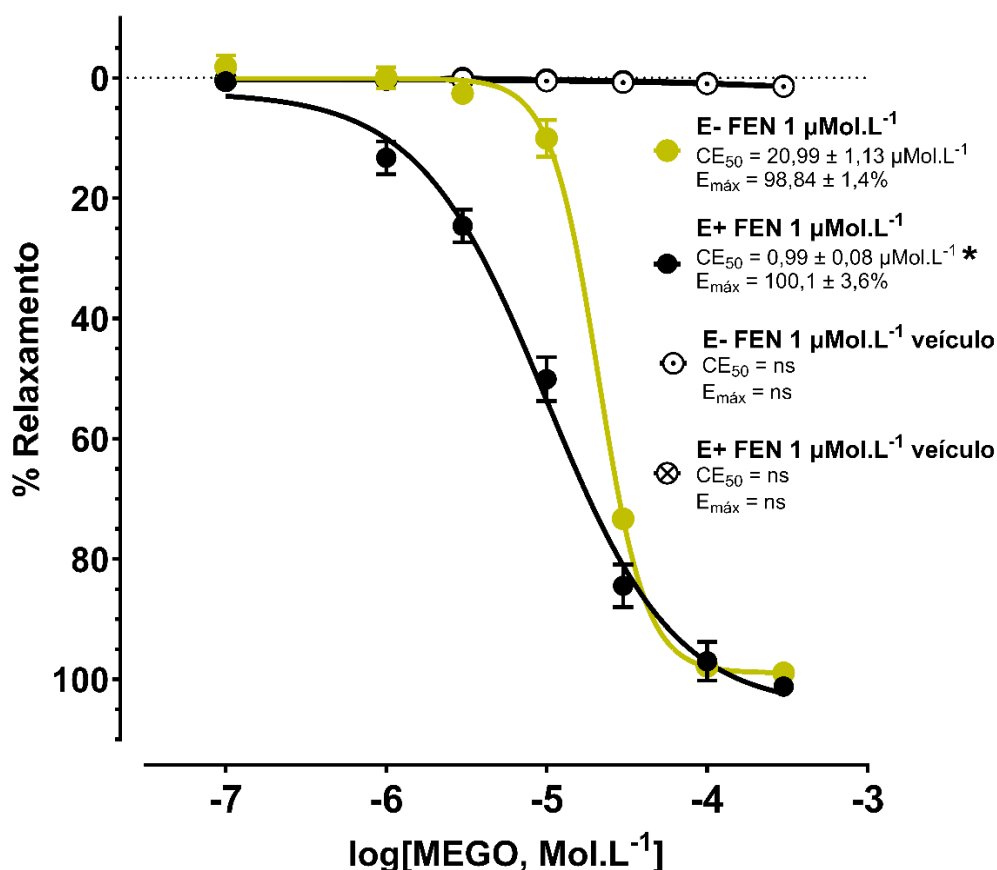


**b)**



FONTE: Autor (2024).

**Gráfico 9** - Efeito da MEGO e do veículo sobre os anéis de aorta com ou sem o endotélio funcional.



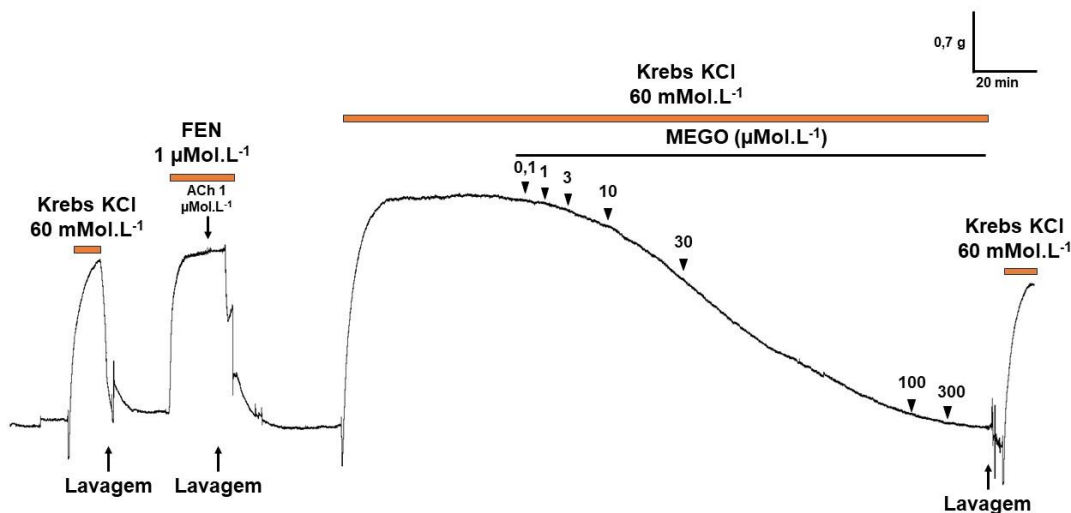
Os anéis foram contraídos com FEN 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na ausência (●, curva feitas com a MEGO e ○, curva com o veículo) e na presença (●, curva feitas com a MEGO e ⊗, curva com o veículo) de endotélio funcional.  $n = 6 - 7$ . Os símbolos representam a média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  versus E- FEN. 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Teste t-Student.

FONTE: Autor (2024)

## 6.9 EFEITO DA MEGO SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR SOLUÇÃO DESPOLARIZANTE DE KREBS (KCl 60 $\text{mMol.L}^{-1}$ ) EM ANÉIS DE AORTA DE RATO SEM O ENDOTÉLIO FUNCIONAL

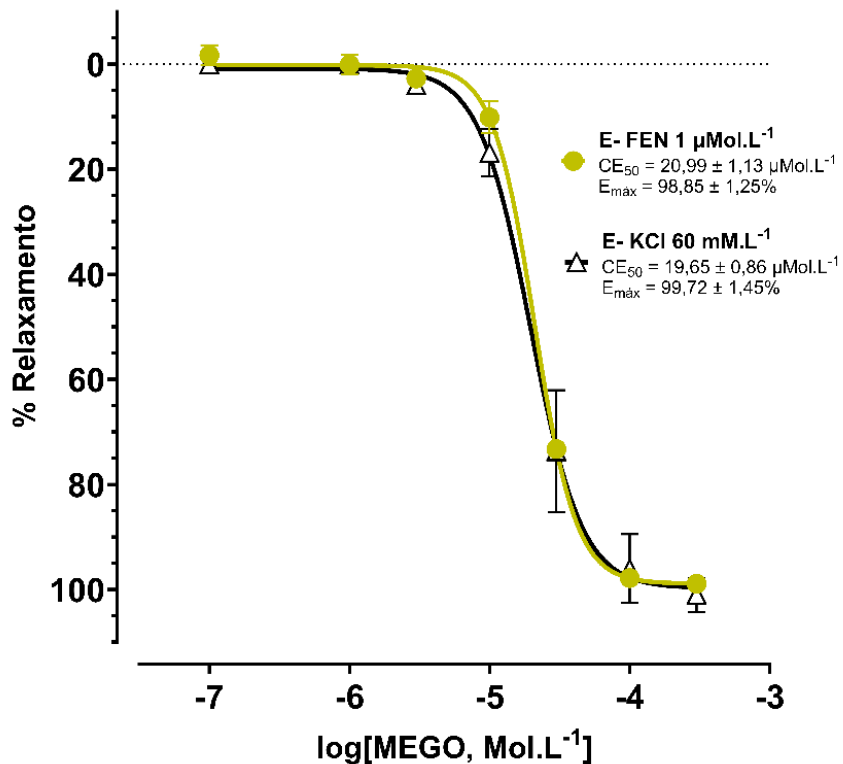
Em preparos de anéis de aorta sem o endotélio funcional contraídos por solução de Krebs despolarizante com 60  $\text{mMol.L}^{-1}$  de  $\text{K}^+$ , a MEGO demonstrou efeito vasorrelaxante (figura 22 e gráfico 10) de forma concentração-dependente ( $E_{\text{máx}} = 99,72 \pm 1,45\%$  e a  $\text{CE}_{50} = 19,65 \pm 0,86 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ). Também, foi observado que a resposta da MEGO nas contrações induzidas pela solução de Krebs despolarizante foi semelhante a resposta frente a contrações induzida por FEN ( $E_{\text{máx}} = 98,85 \pm 1,25\%$  e a  $\text{CE}_{50} = 20,99 \pm 1,13 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ).

**Figura 22** - Registro original representativo do efeito da MEGO sobre as contrações induzidas por Krebs KCl 60 mM.L<sup>-1</sup> em anéis de aorta sem o endotélio funcional.



FONTE: Autor (2024)

**Gráfico 10** - Efeito da MEGO sobre anéis de aorta sem o endotélio funcional em contrações induzidas por FEN ou solução nutritiva de Krebs KCl 60 mM.L<sup>-1</sup>.



Os anéis foram contraídos com FEN 1 μmol L<sup>-1</sup> (●) ou com solução de Krebs despolarizante (▲) na ausência de endotélio funcional. n = 6 – 7. Os símbolos representam a média ± e.p.m. Teste t-Student.

FONTE: Autor (2024)

#### **6.10 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO NO SOBRE A AÇÃO VASORRELAXANTE DA MEGO EM ANÉIS DE AORTA DE RATO COM O ENDOTÉLIO VASCULAR CONTRAÍDOS COM FEN E NA PRESENÇA DE L-NAME, PTIO E ODQ.**

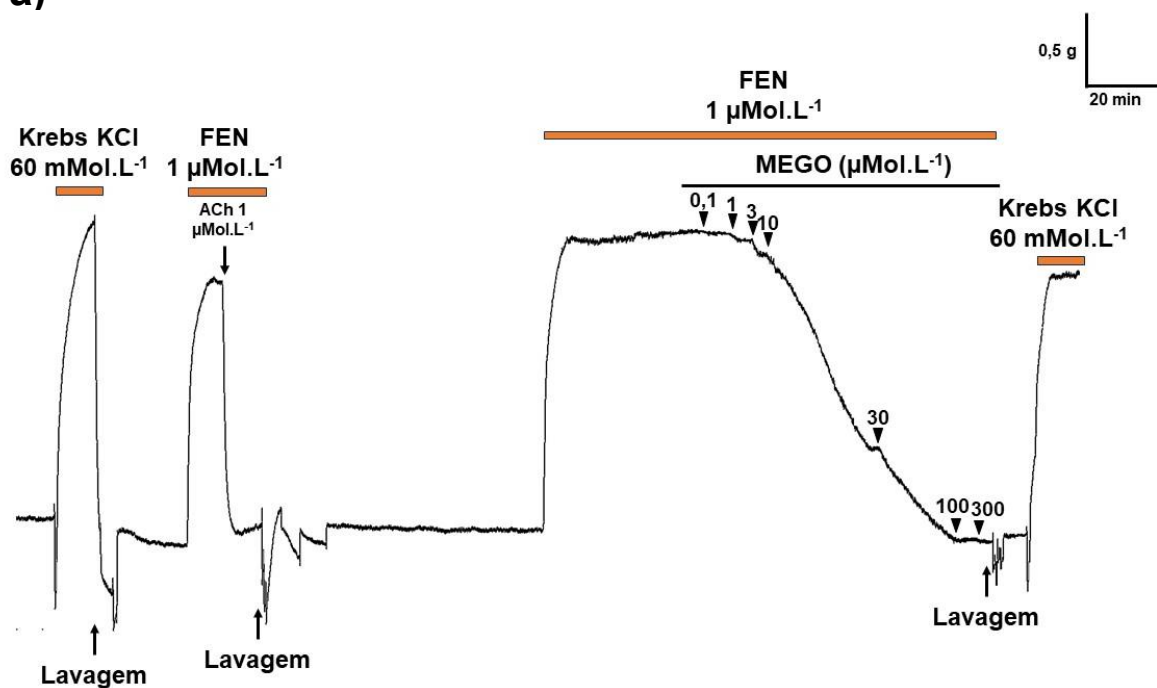
Os anéis com o endotélio funcional que foram pré-incubadas com L-NAME, um inibidor da eNOS, o parâmetro  $E_{\text{máx}}$  não foi alterado em relação ao controle E+ (gráfico 11 e figura 23). Além disso, a pré-incubação com o PTIO, um sequestrador do NO, ou com o ODQ, um inibidor da sCG, não alterou o  $E_{\text{máx}}$  da MEGO em comparação ao grupo E+ (gráfico 11 e figura 24).

Todavia, foi observado que a  $CE_{50}$  foi alterada na presença de todas essas ferramentas. Na presença do L-NAME, a MEGO apresentou um  $CE_{50} = 20,88 \pm 0,97 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ , sendo esse valor significativamente diferente do observado no grupo E+ ( $CE_{50} = 0,99 \pm 0,08 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ). De maneira semelhante, na presença de PTIO a potência também foi reduzida ( $CE_{50} = 26,46 \pm 3,91 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) em relação ao grupo E+ (gráfico 11).

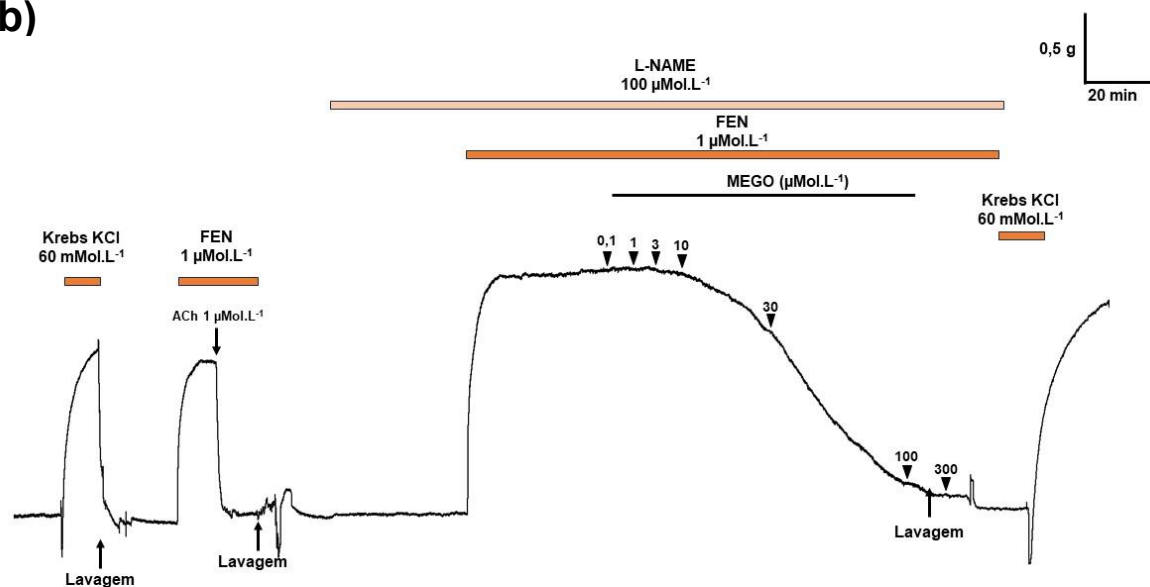
Curiosamente, a curva concentração-resposta da MEGO em anéis de aorta na presença do ODQ teve uma potência menor ( $CE_{50} = 13,12 \pm 1,17 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) em relação a curva feita com a MEGO nos anéis apenas com o endotélio funcional (E+), mas esse parâmetro para o ODQ foi significantemente diferente, também, para os encontrados para o L-NAME e PTIO.

**Figura 23** - Registro original representativo do efeito da MEGO sobre as contrações induzidas por FEN em anéis com o endotélio (a) e na presença do L-NAME (b).

a)

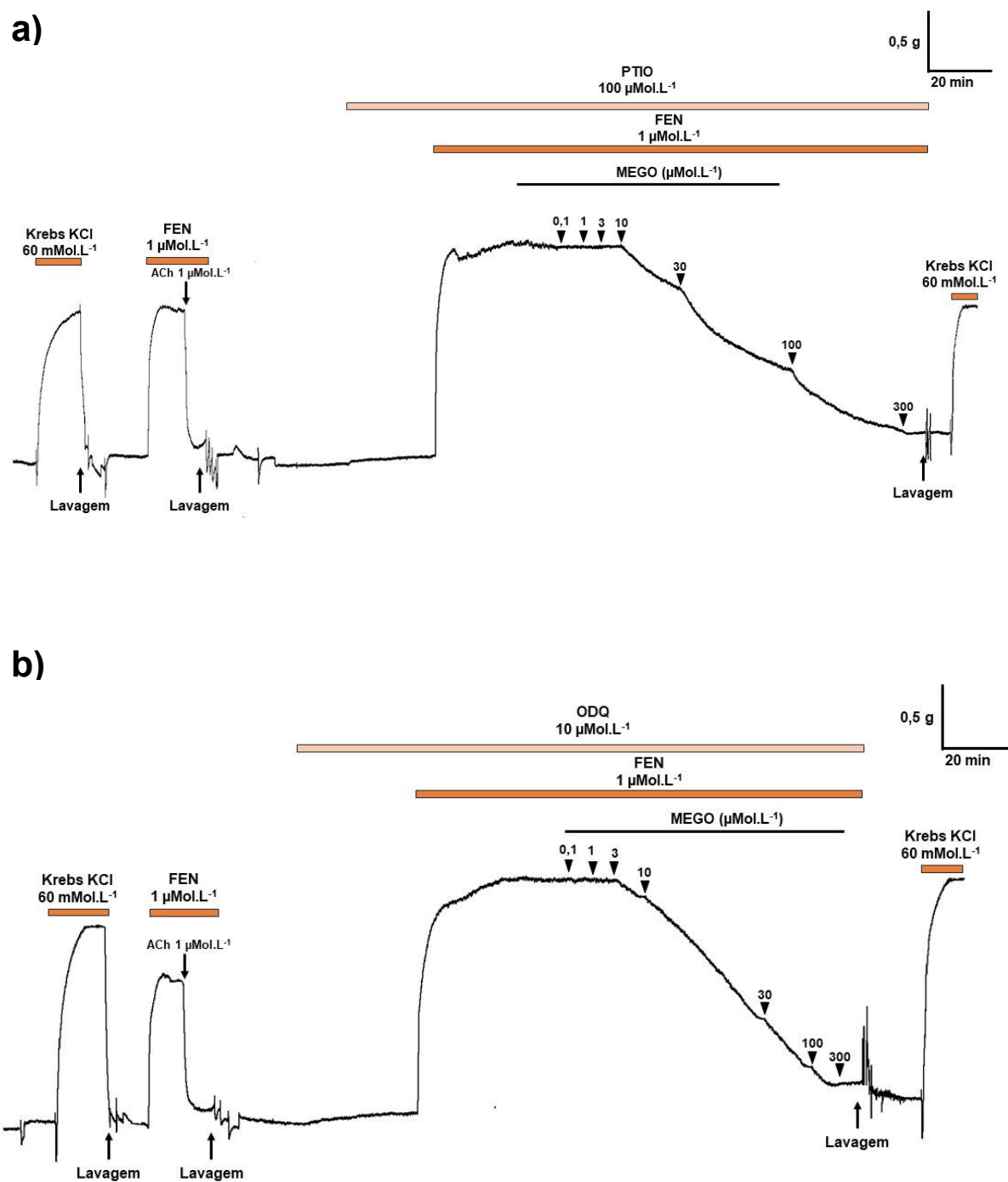


b)



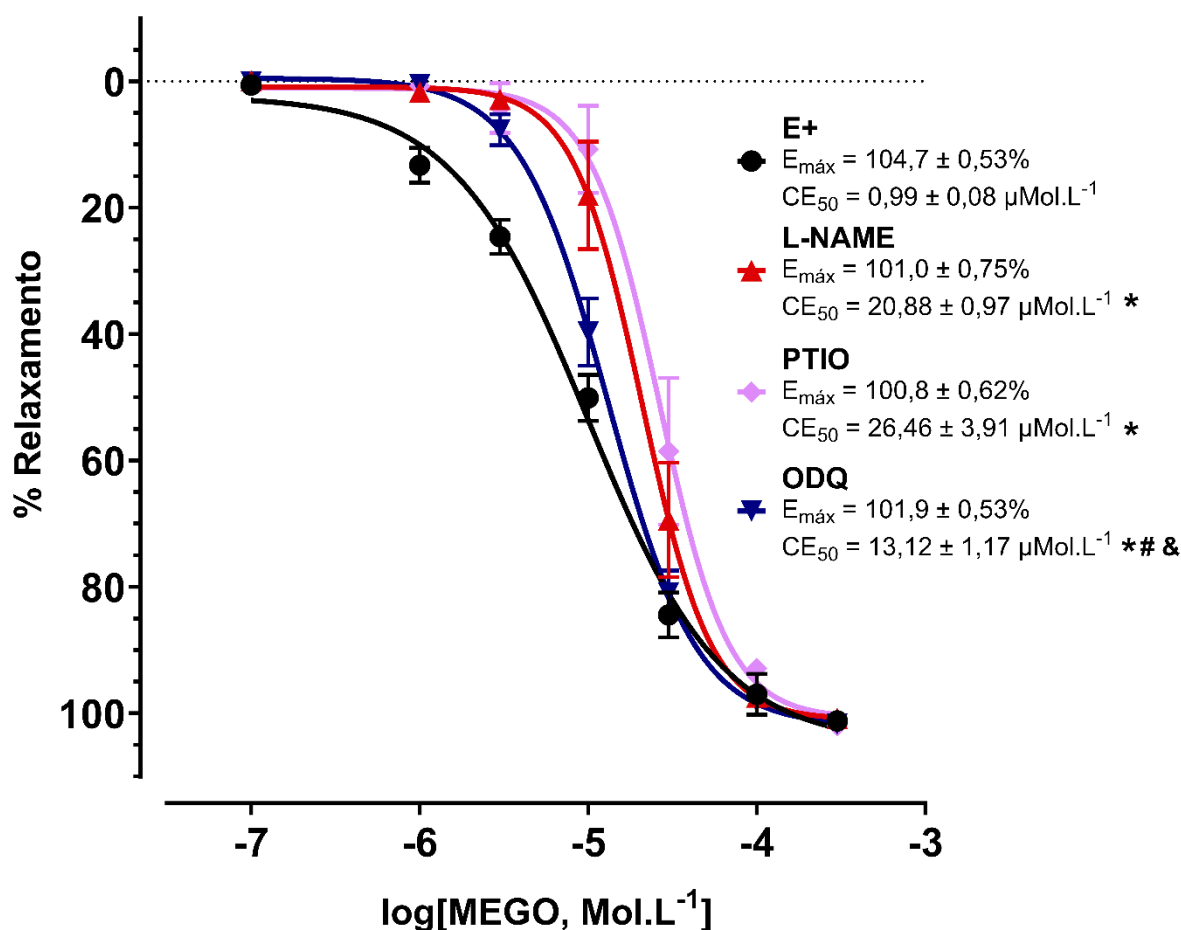
FONTE: Autor (2024)

**Figura 24** - Registro original representativo do efeito da MEGO sobre as contrações induzidas por FEN em anéis com o endotélio na presença do PTIO (a) e ODQ (b).



FONTE: Autor (2024)

**Gráfico 11** - Efeito da MEGO sobre anéis de aorta com o endotélio funcional em contrações induzidas por FEN na presença de L-NAME, ou PTIO ou ODQ.



Os anéis com endotélio funcional (E+) foram contraídos com FEN  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  (●) ou incubados com L-NAME (▲), ou PTIO (◆), ou ODQ (▼).  $n = 7 - 10$ . Os símbolos representam a média  $\pm$  e.p.m.  $*p < 0,05$  versus E+;  $\#p < 0,05$  versus L-NAME;  $\&p < 0,05$  versus PTIO. ANOVA *one-way* seguido de pós-teste de Tukey.

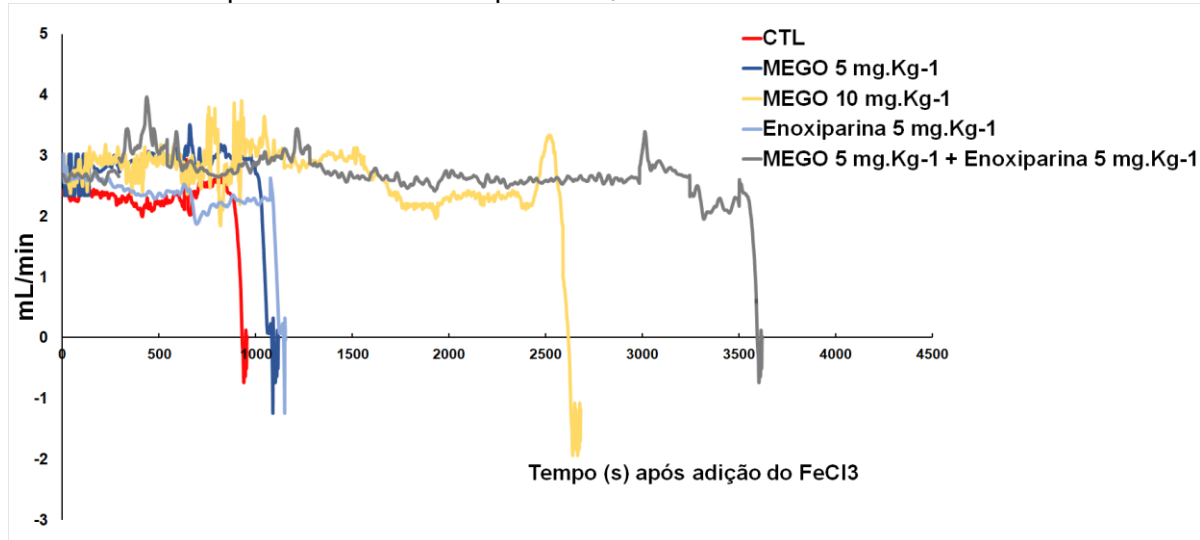
FONTE: Autor (2024)

### 6.11 AÇÃO ANTITROMBÓTICA DA MEGO EM MODELOS DE TROMBOSE INDUZIDA POR $\text{FeCl}_3$ EM CARÓTIDA DE RATOS

No modelo de trombose induzida por  $\text{FeCl}_3$  (figura 25 e gráfico 12) na artéria carótida comum de ratos, os animais que receberam previamente a MEGO pela via intravenosa na dose de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  tiveram o tempo de obstrução ( $t = 1.619 \pm 40 \text{ s}$ ) superior aos animais do grupo controle ( $706 \pm 26 \text{ s}$ ). Além disso, os animais que receberam a ENOX obtiveram um tempo de obstrução ( $1.010 \pm 47 \text{ s}$ ) superior ao controle, ao passo que a MEGO na dose de  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  não alterou de forma significativa o tempo de obstrução arterial ( $863 \pm 72 \text{ s}$ ).

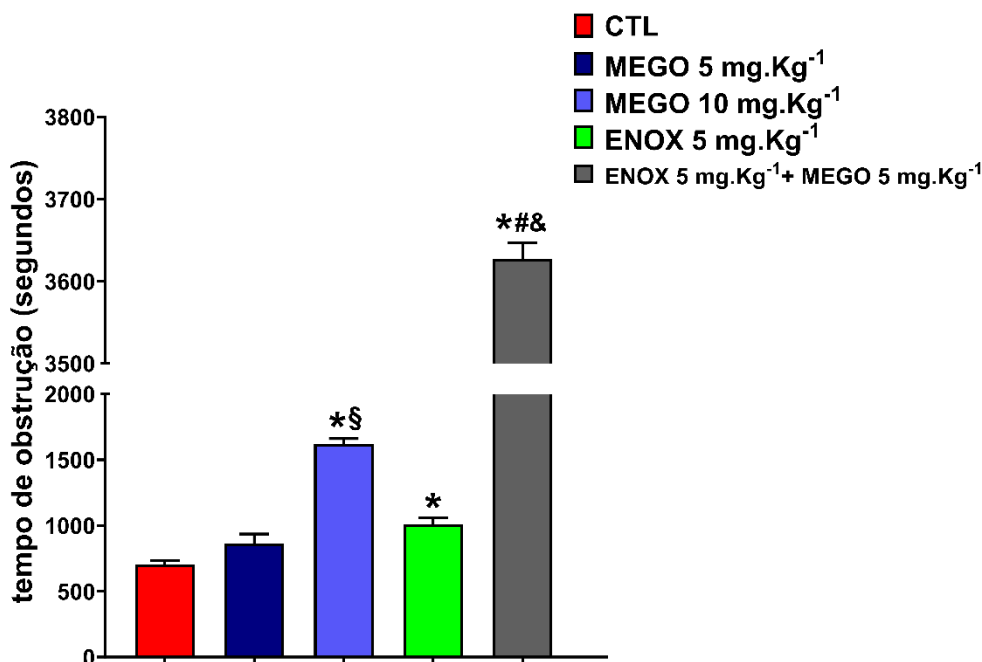
Interessantemente, o uso da MEGO em conjunto com a ENOX levou a uma forte ação antitrombótica ( $3.627 \pm 19 \text{ s}$ ), com o tempo de obstrução de alguns animais ocorrendo após 1 hora, ou ainda não ocorrendo a obstrução arterial. Para fins de análise estatística estipulou-se a valor de 3600 segundos (correspondendo a 1 hora).

**Figura 25** - Representação do registro original do tempo de obstrução da artéria carótida comum de ratos por trombo induzido por  $\text{FeCl}_3$ .



FONTE: Autor (2024)

**Gráfico 12** - Efeito do tratamento com MEGO sobre o tempo de obstrução da carótida comum de ratos por trombo induzido por  $\text{FeCl}_3$ .



As barras verticais no gráfico representam a média e o e.p.m.  $n = 3 - 6$ . \* $p < 0,05$  vs CTL; § $p < 0,05$  vs MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup>; # $p < 0,05$  vs ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup>; & $p < 0,05$  vs MEGO 10 mg.Kg<sup>-1</sup>. ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024)

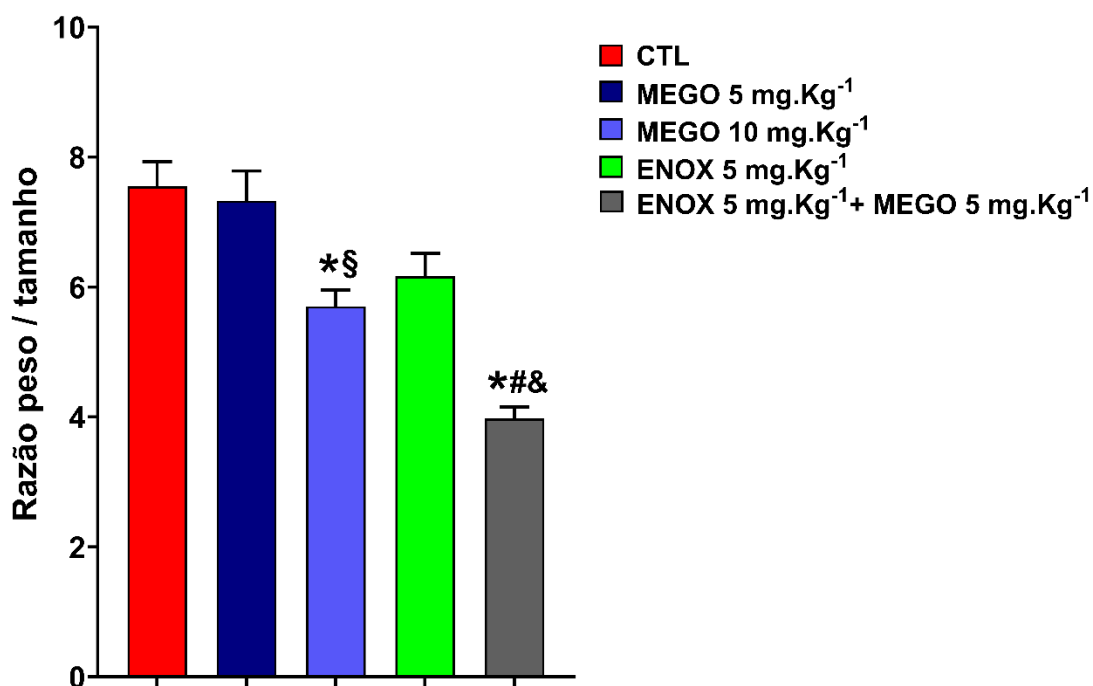
## 6.12 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TROMBO FORMADO

O cálculo de razão entre o peso do segmento da artéria carótida com o trombo e seu comprimento (gráfico 13-a) apontou que a MEGO na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> gerou uma diminuição dessa razão ( $5,70 \pm 0,25$  mg.cm<sup>-1</sup>) em relação ao grupo CTL ( $7,55 \pm 0,38$  mg.cm<sup>-1</sup>) e ao grupo MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup> ( $7,33 \pm 0,46$  mg.cm<sup>-1</sup>). Foi observado, também, que a associação da ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup> com a MEGO de 5 mg.Kg<sup>-1</sup> reduziu essa razão ( $3,98 \pm 0,17$  mg.cm<sup>-1</sup>) quando comparado com o grupo CTL, ao MEGO 10 mg.Kg<sup>-1</sup> e ao ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup> ( $6,17 \pm 0,36$  mg.cm<sup>-1</sup>).

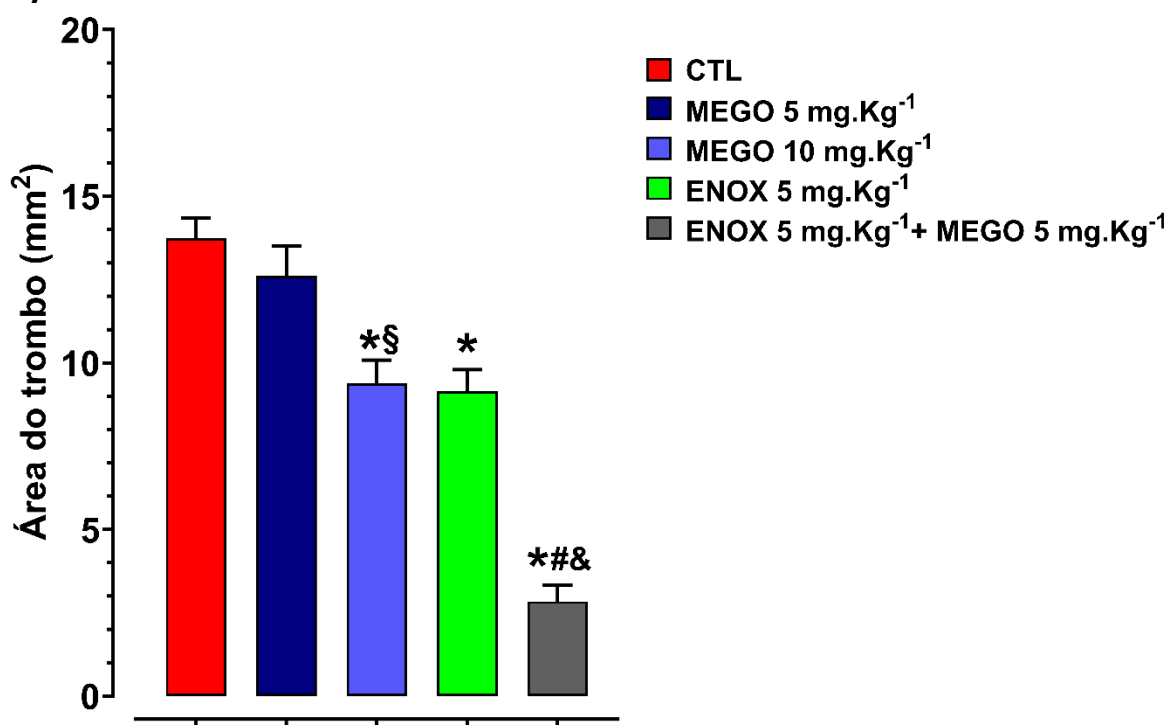
Já na análise da área do trombo por microscopia (gráfico 13-b), o tratamento com MEGO 10 mg.Kg<sup>-1</sup> reduziu significativamente a área dos trombos ( $9,39 \pm 0,70$  mm<sup>2</sup>) quando comparado aos grupos CTL ( $13,74 \pm 0,60$  mm<sup>2</sup>) e MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup> ( $12,61 \pm 0,89$  mm<sup>2</sup>). Também, a associação entre MEGO e ENOX levou a redução da área ( $2,83 \pm 0,49$  mm<sup>2</sup>) em comparação aos grupos CTL, MEGO 10 mg.Kg<sup>-1</sup> e ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup> ( $9,14 \pm 0,65$  mm<sup>2</sup>). Não foi observada diferença estatística entre os grupos MEGO 10 mg.Kg<sup>-1</sup> e ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup> para a análise da área do trombo

**Gráfico 13** - Efeito do tratamento da MEGO sobre a razão entre o peso do segmento da artéria carótida com o trombo e seu comprimento (a) e a área do trombo da carótida (b).

a)



b)



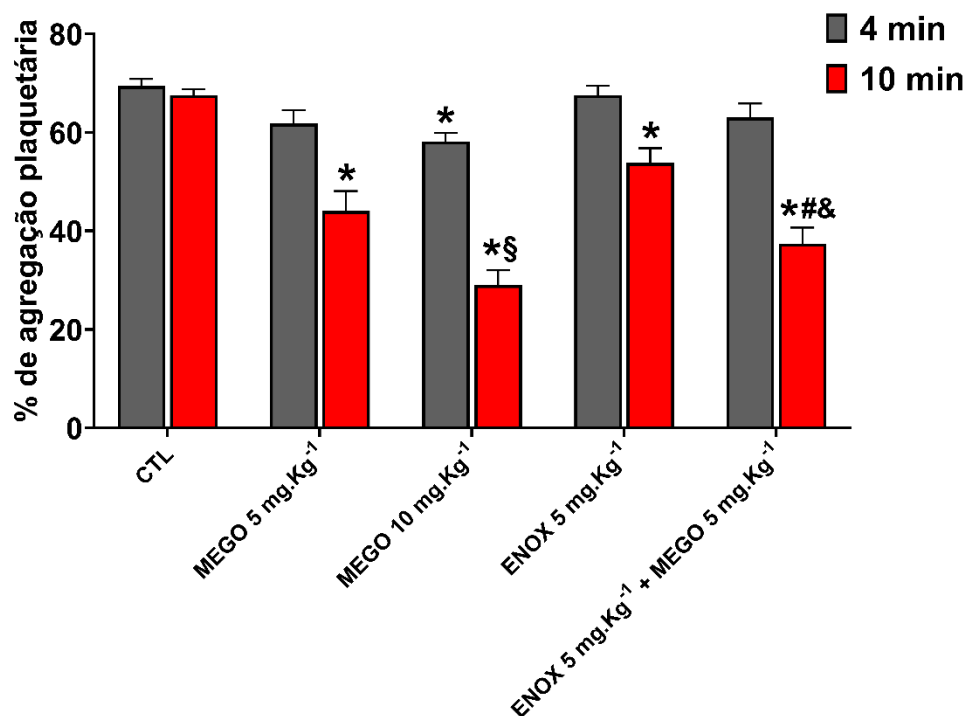
As barras verticais nos gráficos representam a média e o e.p.m.  $n = 6 - 7$ . \* $p < 0,05$  vs CTL; §  $p < 0,05$  vs MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup>; #  $p < 0,05$  vs ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup>; &  $p < 0,05$  vs MEGO 10 mg.Kg<sup>-1</sup>. ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey.  
 FONTE: Autor (2024)

### 6.13 AÇÃO SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DA MEGO APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA EM RATOS

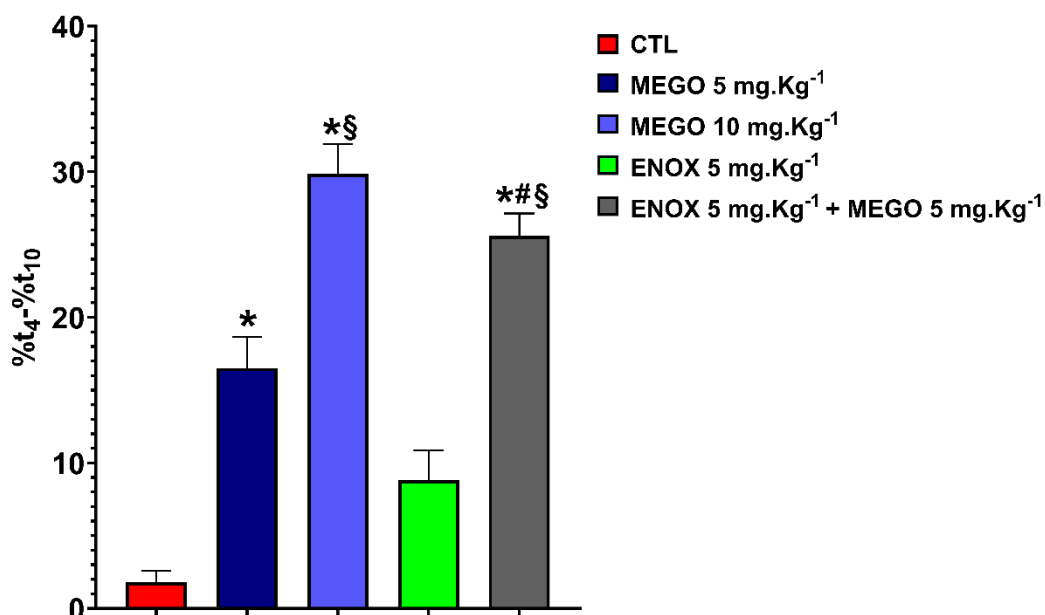
A MEGO usada, na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> de forma agudo nos animais levou a menor taxa de ativação plaquetária frente ao ADP (gráfico 14), observando a diferença entre a agregação de t<sub>4</sub> e t<sub>10</sub> (29,85 ± 2,05%) e a % de agregação plaquetária no pico da curva (t<sub>4</sub> = 58,4 ± 2,07%) em relação ao grupo CTL (t<sub>4</sub>-t<sub>10</sub> = 1,8 ± 0,8; t<sub>4</sub> = 69,4 ± 1,43%). A diferença t<sub>4</sub>-t<sub>10</sub> para a dose de MEGO de 5 mg.Kg<sup>-1</sup> foi de 16,5 ± 2,14%, sendo esse parâmetro para essa dose significativamente menor que o CTL. Também, a ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup> obteve a t<sub>4</sub>-t<sub>10</sub> = 8,8 ± 2,06% e apenas esse parâmetro foi significativamente menor comparado ao CTL. Já a associação de MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup> com ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup> não levou a redução da % de agregação máxima gerada em relação ao controle, ao passo que o duplo tratamento reduziu a diferença t<sub>4</sub>-t<sub>10</sub> (t<sub>4</sub>-t<sub>10</sub> = 25,6 ± 1,7) tanto em comparação ao CTL, quanto em relação a dose a MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup> e a ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup>.

**Gráfico 14** - Ação antiagregante plaquetária em animais tratados com a MEGO e ENOX no pico de agregação e no final da análise (a) e a diferença entre essas porcentagens (b).

a)



b)



O gráfico (a) representa o ponto máximo de agregação (4 min) e a agregação final (10 min). \* $p < 0,05$  vs barra correspondente do CTL; §  $p < 0,05$  vs barra correspondente do MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup>; #  $p < 0,05$  vs barra correspondente do ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup>; &  $p < 0,05$  vs barra correspondente da MEGO 10 mg.Kg<sup>-1</sup>. ANOVA two-way seguido de pós-teste de Tukey. (b) representa a diferença entre esses percentuais. As barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.  $n = 6 - 7$ . \* $p < 0,05$  vs CTL; §  $p < 0,05$  vs MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup>; #  $p < 0,05$  vs ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup>; &  $p < 0,05$  vs MEGO 10 mg.Kg<sup>-1</sup>. ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey.

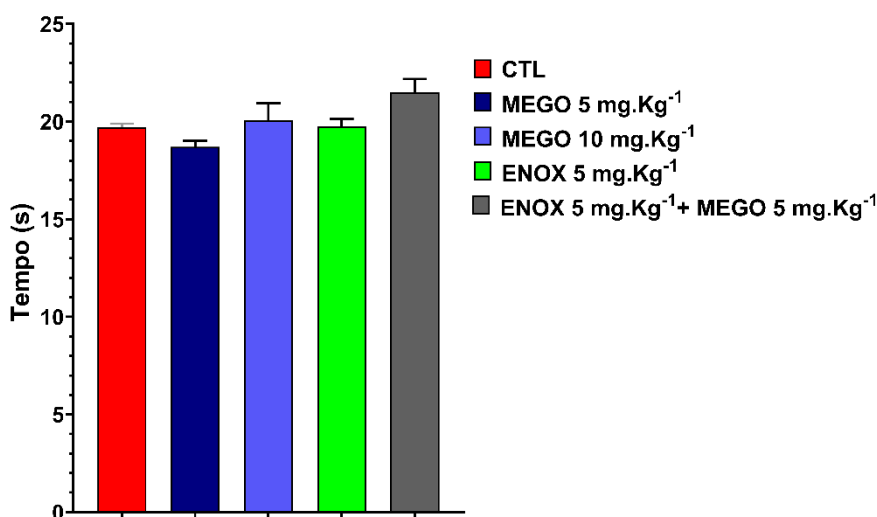
FONTE: Autor (2024)

## 6.14 AÇÃO SOBRE TP E TTPa DA MEGO APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA EM RATOS

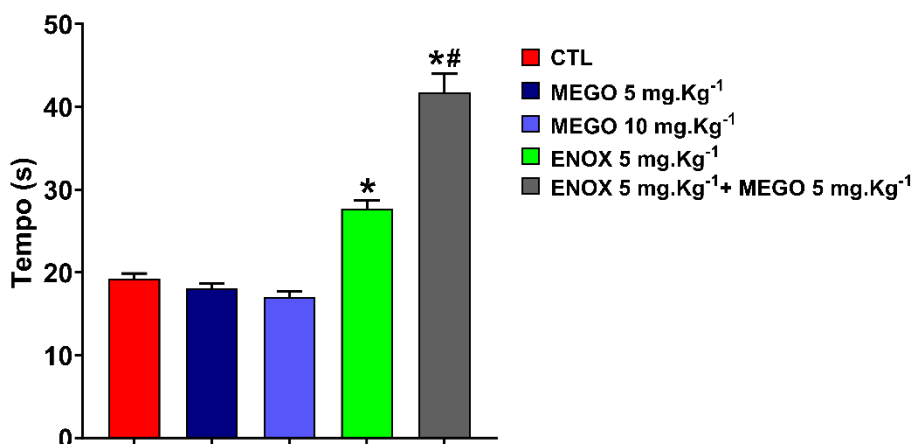
O uso da MEGO ou da ENOX, em separado ou em conjunto, não levou a qualquer alteração no tempo do TP (gráfico 15-a), ao passo que o tratamento com a ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup> levou a um TTPa = 27,65 ± 1,1 s, que é significativamente maior do que o observado no CTL (TTPa = 19,20 ± 0,7 s) (gráfico 15-b). Ainda, o uso da MEGO 5 mg.Kg<sup>-1</sup> com ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup> levou a um aumento do tempo de TTPa (41,72 ± 2,3 s) em relação ao grupo controle e ao ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup>.

**Gráfico 15** - Efeito do tratamento com a MEGO e ENOX em animais sobre o TP (a) e TTPa (b).

a)



b)



As barras verticais no gráfico representam a média e o e.p.m. n = 5 – 6. \**p* < 0,05 vs CTL; # *p* < 0,05 vs ENOX 5 mg.Kg<sup>-1</sup>. ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024).

# DISCUSSÃO

---

## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma microemulsão com o galato de octila e avaliar seu potencial vasorrelaxante e antitrombótico em ratos.

O galato de octila é uma molécula que apresenta baixa solubilidade em água, o que dificulta a sua utilização em meio aquoso. Experimentos anteriores no laboratório de farmacologia cardiovascular da UFPB utilizando o galato de octila simplesmente emulsionado em água com dimetilsulfóxido ou Cremophor EL em experimentos de banho de órgãos isolados exemplificou essa dificuldade com a precipitação da molécula após a adição no banho de órgãos (dados não publicados). Contudo, mesmo com esse contratempo, nos experimentos preliminares a atividade vasorrelaxante do galato de octila em artéria mesentérica superior isolada de rato já era demonstrada.

Com isso em mente, para avaliar todo o potencial farmacológico dessa molécula e termos um produto que permitisse que fosse administrado por via oral ou parenteral, inicialmente buscou-se desenvolver um sistema tecnológico para carrear o galato de octila.

Assim, fora adotado a microemulsão para o galato de octila. Esse sistema propicia uma maior solubilidade para a molécula, aumenta a superfície de contato com as membranas biológicas e permeabilidade por essas membranas e também permite que a formulação final possa ser administrada por todas as vias disponíveis (Alves *et al.*, 2020; Ke *et al.*, 2005; Mitra, 2023).

Primeiramente, para determinar o melhor emulsificante da fórmula e os pontos centrais para o planejamento fatorial foi realizada um pré-formulação. Essa fase é uma importante ferramenta para economia de tempo, recursos e melhoria do custo-benefício do processo final. Assim, nessa etapa, a microemulsão que apresentou o menor tamanho das gotículas com o emulsificante foi a escolhida, sendo, então, o Cremophor EL o agente selecionado e a fase oleosa composta pelo MCT. A partir disso e da determinação do ponto central necessário para o planejamento fatorial do tipo Box-Behken foi feito.

Também, nessa etapa já foi notado um potencial zeta negativo para as gotículas da ME (aproximadamente -9,35 mV) um valor perto da neutralidade e com

valores negativos. Tal parâmetro pode auxiliar em um rápido transporte pelas membranas celulares quando administrado por via oral (Wang *et al.*, 2020).

No planejamento fatorial as variáveis independentes foram definidas como o Cremophor EL, o MCT e o galato de octila e o tamanho das gotículas obtidas foram as variáveis dependentes. Assim, os tamanhos das gotículas obtidas nos preparos para o planejamento fatorial variaram entre 37,7 até 2.370 nm, mas para analisar detalhadamente como os componentes da fórmula influenciavam essa variável foi feito o gráfico de Pareto.

De acordo com ele, tanto o galato de octila quanto o MCT contribuem significativamente em aumentar os tamanhos das gotículas da ME. Tal relação entre o MCT e o tamanho das gotículas já foi observada em outros estudos no desenvolvimento de ME (Roohinejad *et al.*, 2015). Já o Cremophor EL contribui para a redução dos tamanhos das gotículas.

Assim, a partir da equação proposta pela análise dos dados do planejamento fatorial foram construídos os gráficos de superfície nos quais observa-se as relações entre os componentes das fórmulas e a análise deles é possível ver que menores concentrações de MCT e de galato de octila e maiores concentrações de Cremophor EL são necessários para criar gotículas em tamanhos menores que 100 nm.

Com essas correlações obteve-se a fórmula da ME final com concentrações ideais para as gotículas fossem formadas em tamanhos menores que 100 nm – a MEGO. Também, com a polinômio obtido pôde-se fixar uma meta de tamanho para as gotículas e para a concentração de galato de octila na MEGO (10 mg.mL<sup>-1</sup>) e variar as concentrações de MCT e Cremophor EL para obter os valores correspondentes para o menor tamanho possível para a MEGO.

Essas características do produto final apontam para uma estabilidade do sistema microemulsionado devido ao potencial zeta observado e também mostra uma fórmula translúcida e que permanece estável mesmo após forte centrifugação (5.000 XG por 10 minutos, dados não publicados).

Contudo, para elucidar a estabilidade a longo o prazo da MEGO foi realizado o testes de estabilidade preconizados pela ANVISA por um período de 180 dias. Nos primeiro dia do teste de estabilidade foi observada um variação nos parâmetros: tamanho das gotículas e potencial zeta, principalmente na MEGO condicionada na temperatura de 4°C e em temperatura ambiente (25°C). Apesar dessa variação ocorrer e ser notada nos resultados gráficos, as variações de tamanho para a MEGO

a 4°C é de 20 nm e estabiliza-se, ao passo que o potencial zeta varia em até 10 mV, mas também se torna estável com o tempo. Para a MEGO armazenada em 37°C esses parâmetros são constantes. Apesar disso, as características visuais permaneceram estáveis até certo ponto do teste e, principalmente, não foi observada o aumento dos tamanhos das gotículas, o que poderia indicar a coalescência da MEGO.

Diversos outros artigos publicados apontam essas pequenas variações de tamanho e potencial zeta nos primeiros dias do teste de estabilidade para preparos de ME, sendo relevantes quando essas mudanças são mais abruptas e perceptíveis a olho nu (Das *et al.*, 2020; Şahin *et al.*, 2023).

Todavia, a partir do 15º dia do teste de estabilidade, fora observado uma redução do pH da MEGO armazenada a 37°C e no 60º dia a redução do pH passou a ser observada também na MEGO armazenada na temperatura ambiente. Acompanhada dessa variação, no 120º dia a variação de coloração era perceptível entre as MEGOs armazenadas a 25°C e 37°C comparadas com a armazenada a 4°C.

Esse achado aponta para uma degradação dos componentes da MEGO quando armazenados nessas condições. Possivelmente a oxidação e hidrólise do galato de octila e a quebra do MCT são capazes de reduzir o pH por liberarem H<sup>+</sup> para o meio da ME. A degradação de derivados do ácido gálico ou oxidação desses já é bem relatada (Charlton *et al.*, 2023; Gil-Longo; González-Vázquez, 2010; Melo *et al.*, 2009) e nesses processos ocorre a formação de radicais livres, quinonas e íons H<sup>+</sup> que alteram a coloração e o pH do meio, bem como são capazes de degradar outros componentes. Além desse fator, o MCT pode espontaneamente, quando em um meio aquoso, hidrolisar-se e liberar ácidos graxos (Salentinig *et al.*, 2015). Assim, é preferível o armazenamento a longo prazo da MEGO sob refrigeração para contornar a degradação e mudança das características físico-químicas e organolépticas da fórmula.

Para obter uma ME estável, já é sabido que as quantidades de surfactantes utilizadas elevadas e isso pode associar a administração ou uso de ME com efeitos tóxicos consideráveis associados aos excipientes, mas não o princípio ativo. O uso de surfactante não-iônicos como o Cremophor EL diminuem a necessidade de utilizar co-surfactante, mas aumenta a possibilidade do uso gerar uma reação alérgica, dolorosa e até mesmo causar hemólise e trombose quando utilizadas pela via intravenosa (Chavda *et al.*, 2023). Também, na formulação final da MEGO, a concentração de

Cremophor EL necessário para estabilizar a ME foi de 8%, mas para dirimir os efeitos mais graves que poderia a MEGO desencadear quando administrada pela via intravenosa nos animais, foi realizado o ensaio da atividade hemolítica.

Quando incubada com a MEGO, as hemácias lavadas dos ratos não apresentaram hemólise. Contudo, o veículo sozinho gerou um grau de hemólise no último volume utilizado igual a 2,6%. Interessantemente, a presença do galato de octila foi capaz de inibir essa taxa de hemólise.

Além disso, vale salientar que o volume de veículo que gera esse grau de hemólise corresponde ao volume usado da MEGO para uma concentração de 1.000  $\mu\text{Mol.L}^{-1}$  e nos ensaios *in vitro* com a MEGO a maior concentração utilizada foi de 300  $\mu\text{Mol.L}^{-1}$  (experimentos em aorta em banho de órgãos isolados).

Os derivados do ácido gálico e ele próprio são apontados como potenciais agentes antiagregantes plaquetários e, por conseguinte, antitrombóticos (Chang *et al.*, 2012; Yun-Choi *et al.*, 1996). Esse efeito do ácido gálico sobre as plaquetas de ratos ocorre tanto por antagonizar a agregação desencadeada pela ADP quanto por outros agentes pró-agregantes como o  $\text{TXA}_2$  e a trombina, sendo relatado que a diminuição da atividade da PKC e da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citoplasma das plaquetas, o que reduz o grau de ativação das mesmas (Appeldoorn *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2022).

O  $\text{Ca}^{2+}$  é um íon fundamental para o processo de contração vascular (de Oliveira *et al.*, 2016) e agregação plaquetária e os indícios que o ácido gálico e os seus derivados poderiam interferir nesses processos por antagonizar o aumento da concentração plasmática desse íon foi uma das premissas para investigar as ações do galato de octila. Também, outras evidências apontavam a capacidade do ácido gálico em diminuir a ação purinérgica de moléculas como o ADP e ATP sobre plaquetas de ratos (Chang *et al.*, 2012; da Silva Pereira *et al.*, 2018), moléculas que são importantes para a agregação plaquetária.

Além disso, já foi demonstrado que o galato de octila é capaz de antagonizar a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios tanto por inibir o  $\text{Ca}_v$  quando essas células eram despolarizadas por uma solução despolarizante com altas concentrações de  $\text{K}^+$  (Summanen *et al.*, 2001; Tammela; Vuorela, 2004) como também por antagonizar a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  quando ocorria o estímulo por ATP (Guo *et al.*, 2010), sendo parte da atividade do antagonismo ao ATP atribuída a redução da ativação da PKC.

Tendo isso em vista, avaliou-se a ação antiagregante plaquetária e anticoagulante da MEGO sobre o plaqueta e sangue dos ratos, sendo observada a ação antiagregante plaquetária, mas não a ação anticoagulante por meio dos testes de TP e TTPa.

Frente a agregação estimulada pelo ADP em plaquetas de ratos, a MEGO reduziu em aproximadamente 37% a agregação plaquetária, com uma  $CE_{50}$  observada de  $0,68 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Chang *et al.* (2012) aponta que apenas com  $1.000 \mu\text{mol.L}^{-1}$  o ácido gálico é capaz em reduzir pela metade a agregação estimulada pelo ADP. Assim, o galato de octila no sistema de ME demonstrar ser aproximadamente 1.470 vezes mais potente como antiagregante do que o ácido gálico, apontando para o potencial dos derivados alquílicos dessa molécula em serem antiagregantes plaquetários.

Apesar dos testes de coagulação TP e TTPa não refletirem toda a complexidade do processo de coagulação *in vivo*, eles são sensíveis o suficiente para apontar a alteração de um ou mais fatores de coagulação e as mudanças que um tratamento ou substância poderia ter com esses. No novo modelo de coagulação baseado nas superfícies celulares o TP reflete os fatores envolvidos na fase de iniciação, ao passo que o TTPa avalia os níveis dos fatores envolvidos na produção de trombina nas superfícies celulares (Ferreira *et al.*, 2010). Dessa maneira, o TP e o TTPa são boas ferramentas adotadas para avaliar se a MEGO exerceria efeito sobre o processo de coagulação. Contudo, não observamos quaisquer efeito da MEGO nas concentrações adotadas sobre o TP e TTPa no plasma de ratos com ela – a MEGO – incubado.

Assim, tínhamos evidência para conjecturar que a MEGO usada de forma aguda poderia exercer ação antitrombótica. Mas para além da ação antiagregante plaquetária, estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa apontavam que o galato de octila exercia ação relaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato e também de Oliveira *et al.* (2016) já apontara que o ácido gálico exercia ação vasorrelaxante em aorta de rato tanto por estimular a produção de NO pelo endotélio vascular quanto por bloquear  $Ca_v$  presentes na musculatura lisa vascular. Todavia, esses efeitos só eram observados em concentrações acima de  $1.000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Investigar a ação vasorrelaxante e indutora da produção de NO pela MEGO em aorta de rato passou a ser um objetivo e que posicionaria essa molécula como um agente antitrombótico que exerceria sua ação tanto por impedir a fase inicial da

hemostasia por ser antiagregante plaquetário quanto também por impedir a propagação e ampliação do trombo como um todo por aumentar o aporte de NO arterial.

O NO é um dos mais potentes vasodiladores e antiagregantes plaquetário. Tanto no citosol da musculatura lisa vascular quanto plaquetário o NO ativa a CGs o que leva ao aumento de GMPc citosólico. O GMPc ativa a PKG e essa fosforila diversos alvos para gerar seus efeitos citados (Lincoln *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2023).

Apesar de não ser disponibilizado para o uso humano qualquer agente antitrombótico que tenha como principal forma de ação a produção de NO, diversos autores apontam que o aumento de aporte de NO vascular pode ser um objetivo para reduzir os danos e a quantidade de eventos trombóticos (Eguchi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2010).

Para investigar essa ação e avaliar o potencial vasorrelaxante da MEGO fora realizado experimentos em aorta de rato montada em banho de órgãos isolado. A artéria aorta foi adotada por ser nela o NO o fator relaxante derivado do endotélio majoritário (Garland *et al.*, 1995).

Assim, foi observado que a MEGO promove efeito vasorrelaxante tanto na presença quanto na ausência do endotélio funcional nos anéis de aorta. Todavia, a presença do endotélio vascular potencializa esse efeito quando é comparada o CE<sub>50</sub> desse grupo com esse parâmetro do grupo de anéis sem o endotélio. Esses dados indicam que o galato de octila é dotado de ação vasorrelaxante tanto por atuar sobre o endotélio quanto por atuar sobre a musculatura lisa vascular.

O processo de contração vascular pode ser induzido tanto de uma forma farmacomecânica quanto eletromecânica. Apesar das duas estarem interconectadas (Kirschstein *et al.*, 2009), essa forma de separá-las permite estudar algumas vias de ação de moléculas e hipotetizar sobre a participação dos canais do tipo K<sub>v</sub> e Ca<sub>v</sub> no efeito vasorrelaxante de uma substância, já que a contração induzida por uma solução despolarizante é capaz de ativar os Ca<sub>v</sub> (Catterall *et al.*, 2020) e a ativação dos K<sub>v</sub> é capaz de causar relaxamento da musculatura lisa por hiperpolarizar esse tecido (Dixon; Trimmer, 2023). Ou seja, as substâncias que ativam K<sub>v</sub> exercem seu efeito observável quando a concentração extracelular do K<sup>+</sup> é suficiente para permitir que esse íon saia do interior celular para causar hiperpolarização, ao passo que as substâncias que bloqueiam os Ca<sub>v</sub> são mais eficazes quando esses canais estão abertos e são os maiores responsáveis pela entrada de Ca<sup>2+</sup> no citoplasma celular, o

que ocorre quando a musculatura lisa é contraída por uma solução despolarizante, por exemplo (Gurney, 1994; Lamounier-Zepter *et al.*, 2003).

Assim, avaliando a ação vasorrelaxante da MEGO sobre contrações induzidas por solução despolarizante de KCl com 60 mMol.L<sup>-1</sup>. Esse ensaio apontou que a MEGO promovia o relaxamento frente a contração induzida por essa solução semelhante ao relaxamento quando as artérias foram contraídas com FEN. Dessa maneira, pode-se hipotetizar que esse efeito vasorrelaxante da MEGO independente do endotélio funcional parece ser mediado por um ponto em comum às duas formas de contração vascular utilizada: a ativação dos Ca<sub>v</sub>.

Essa ideia é corroborada com os estudos de Summanen *et al.* (2001) e de Tammela e Vuorela (2004) que apontam o galato de octila como um forte antagonista à entrada de Ca<sup>2+</sup> mediada pelo Ca<sub>v</sub>.

Também foi verificado a influência do endotélio vascular do efeito vasorrelaxante da MEGO. As artérias foram incubadas com o L-NAME, um bloqueador das isoformas das sintases de óxido nítrico (Rameshrad *et al.*, 2016), podendo ser observado que o relaxamento promovido pela MEGO nesses anéis teve uma eficácia semelhante, porém com potência reduzida, sendo idêntica à potência frente aos anéis desnudos de endotélio. Tal achado apontou-nos que esse potenciação da ação vasorrelaxante da MEGO nos anéis com o endotélio cursava com a ativação da eNOS. Assim sendo, fora utilizado o PTIO, um sequestrador do NO (Yoshida *et al.*, 1997), para avaliar se esse gás estava de fato sendo produzido.

Assim, confirmando nossa hipótese, a presença do PTIO reduziu a potência vasorrelaxante da MEGO ao nível similar gerado nos anéis desnudos de endotélio e contraídos com FEN ou nos anéis com endotélio funcional e incubados com L-NAME. Confirmada a estimulação da produção de NO endotelial, fora realizada curvas concentração-resposta em anéis com o endotélio intacto na presença de um inibidor seletivo da CGs: o ODQ.

Supreendentemente, a presença do ODQ reduziu a potência do efeito vasorrelaxante da MEGO em comparação aos anéis desnudos de endotélio, mas essa redução de potência não foi estatisticamente semelhante aos anéis com endotélio e incubados com o L-NAME ou com o PTIO, sugerindo que o NO estaria ativando a CGs, mas também ativando outras vias de sinalização para gerar seu efeito.

Esse achado pode indicar um efeito da própria substância, mas, além disso, evidencia outros efeitos que o NO pode desencadear para gerar vasorrelaxamento

que independem da participação da formação de GMPc, como a estimulação da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático e ativação de canais de potássio (Bolotina *et al.*, 1994; Van Hove *et al.*, 2009). Além disso, Lies *et al.* (2013) demonstra em seus achados que altos aportes de NO podem sobrepujar a inibição do ODQ sobre a CGs. Essas colocações podem indicar duas ações principais da MEGO com a participação do NO: estaria o galato de octila aumentando a sensibilidade dos canais de potássio ou da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático ao NO? A produção de NO foi tão proeminente que o aporte dele sobre a CGs sobrepõe a ação inibitória do ODQ?

Apesar dessas hipóteses não serem respondidas no presente trabalho, duas formas poderiam responder esses questionamentos: O primeiro poderia ser sanado com ensaio de afinidade por *docking* molecular entre o canal de potássio e a bomba de cálcio com o galato de octila como essa molécula interfere na finidade do NO por essas proteínas. A segunda questão seria dada realizando o doseamento da concentração de GMPc ou NO formados. Lies *et al.* (2013) demonstra que para a concentração de ODQ adotada nos ensaios experimentais desse estudo ( $10 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ), concentrações de NO acima de  $0,1 \mu\text{Mol.L}^{-1}$  já sobrepõe a ação inibitória do ODQ, induzindo a produção de GMPc pela CGs.

Com os efeitos *in vitro* que descrevem a bioatividade da MEGO e apontam para uma ação antitrombótica possível, passou-se a avaliar esse efeito em modelos de trombose induzida por  $\text{FeCl}_3$  em ratos. Nesse modelo de trombose, a aplicação tópica do  $\text{FeCl}_3$  na artéria carótida induz a formação do trombo por duas maneiras principais: (i) remoção da camada endotelial e formação de corpos contendo íons férricos capazes de ativar a coagulação e a agregação plaquetária (Eckly *et al.*, 2011); (ii) aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que causam danos no endotélio e recruta o sistema complemento (La Bonte *et al.*, 2012; Woollard *et al.*, 2009).

Nesse experimento, fora observado que a dose de MEGO de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  foi capaz de aumentar o tempo de obstrução da carótida em relação ao grupo CTL e a dose de MEGO de  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . Tal resultado aponta a MEGO como um agente antitrombótico que exerce esse efeito de forma dose-dependente.

A dose inicial do galato de octila utilizada para elucidar esse efeito após a administração intravenosa foi a de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , sendo essa escolha feita levando em consideração às doses que esse derivado levou a efeitos farmacológicos em animais.

Por exemplo Latha e Daisy (2013) apontaram que a dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> de galato de octila por dia e por 28 dias de tratamento foi suficiente para gerar efeito hipoglicemiante semelhante ao grupo tratado com insulina em ratos diabéticos. Por outro lado, Bustami *et al.* (2020) descreveu que o tratamento com 20 mg.Kg<sup>-1</sup> por dia e por 30 dias era capaz de reduzir a inflamação do endométrio em ratas com endometriose, ao passo que outros efeitos anti-inflamatórios do galato de octila em modelos de inflamação pulmonar foram alcançados em camundongos tratados com uma dose única de 0,75 mg.Kg<sup>-1</sup> pela via nasal 30 minutos após a indução do dano pulmonar (Haute *et al.*, 2020). Além desses, em modelo de inflamação de pata em camundongo, uma dose única e local de galato de octila de 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> foi suficiente para reduzir consideravelmente a inflamação, enquanto uma dose intraperitoneal de 12,5 mg.Kg<sup>-1</sup> reduziu em quase 90% a mortalidade de camundongos submetidos a dois modelos de sepse (por lipopolissacarídeo e punção cecal) distintos (Park *et al.*, 2024).

Com esses dados em mente e em vista da via adotada para avaliar a ação antitrombótica da MEGO, a dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> foi usada como ponto de partida e já nessa dose sendo observado efeito antitrombótico. Assim, foi investigada o mesmo efeito com a metade da dose (não observando nessa a ação desejada).

A enoxiparina foi adotada como controle por ser um dos agentes antitrombótico anticoagulante mais utilizado ambulatorialmente por apresentar baixo risco ao paciente quando comparada a outros anticoagulantes (Kramme *et al.*, 2023), adotando uma dose semelhante a menor dose utilizada da MEGO, mas cuja a enoxiparina apresenta efeitos antitrombóticos e anticoagulantes (Daykin *et al.*, 2006).

De forma curiosa, observamos que a administração concomitante da dose de MEGO de 5 mg.Kg<sup>-1</sup> com a mesma dose de enoxiparina resultou em um efeito antitrombótico muito superior ao observado nos grupos tratados com cada dose em separado. Esse sinergismo de efeitos entre os dois agentes antitrombóticos (um possível antiagregante plaquetário e o outro um anticoagulante) é um efeito de interesse para o tratamento e prevenção de ETEs. Diversos estudos clínicos que se valem desse efeito sinérgico entre agentes antitrombóticos de classes distintas apontam benefícios como diminuição da mortalidade e menor risco de sangramentos em comparação aos usos individuais de cada agente e em doses eficazes para a prevenção (Agewall, 2024; Holmes *et al.*, 2009). Como exemplo, a combinação de dose única intravenosa de ácido acetilsalicílico de 10 mg.kg<sup>-1</sup> em ratos é ineficaz para

aumentar o tempo de formação de trombo na carótida, ao passo que a mesma dose de enoxiparina aumenta o tempo de formação de trombo em quase duas vezes. Todavia, a combinação de enoxiparina com ácido acetilsalicílico,  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$  de cada, aumenta em mais de duas vezes o tempo de obstrução da carótida por um trombo (Daykin *et al.*, 2006).

Corroborando com os efeitos antitrombóticos encontrados, a massa do trombo nos vasos foi estimada e a área dos mesmos foi medida. Quando fora feito a estimativa da massa do trombo em relação à massa vascular, apenas o grupo tratado com  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de MEGO e o tratamento combinado obtiveram diferenças estatística significativas em relação ao grupo controle. Apesar do grupo tratado apenas com enoxiparina também ter um maior tempo de oclusão arterial pelo trombo em relação ao controle, esse dado não foi reverberado nessa análise. Isso é explicado pela sensibilidade do método para distinguir entre a massa do trombo e a do tecido vascular, sendo necessárias outra técnica complementar. Tendo isso em vista, fora feita a análise da área do trombo por microscopia.

Nessa análise, pôde-se observar que a maior dose da MEGO e a dose de ENOX levaram a formação de um trombo menor em relação ao trombo medido no grupo controle. Também, o tratamento combinado reduziu consideravelmente o tamanho desses trombos. Nesse ponto, pode-se questionar: como a dose combinada em alguns animais impediu qualquer tipo de obstrução (conforme descrito no resultado), mas a área do trombo é quantificada nesse ensaio? Tal questionamento é respondido com base na forma que os trombos se dispõem no interior das artérias do grupo tratado tanto com MEGO quanto com enoxiparina: houve a formação de um trombo em todos os animais conforme fora medida a área, mas em alguns animais é clara a visão de que o trombo não cresceu o suficiente para obstruir a totalidade da luz vascular, permitindo a passagem do sangue e ficando limitado ao lado vascular que recebeu o  $\text{FeCl}_3$ .

Para avaliar se o tratamento com a MEGO estaria gerando ação antitrombótica por ser antiagregante ou anticoagulante, o sangue dos animais tratados foi colhido e os ensaios de agregação e coagulação foram realizados. Assim, fora observado que ambas as doses da MEGO utilizadas reduziram a agregação plaquetária em relação ao grupo controle e também se observou que a agregação provocada pelo ADP, o tampão plaquetário, era desfeito ao passar do tempo experimental, evento que se evidenciou por meio da análise de variação da taxa de agregação entre a porcentagem

máxima de agregação alcançada (ocorreu em 4 minutos) e o final do tempo de aquisição (em 10 minutos), conforme observado (gráficos 14-a e 14-b).

A queda da porcentagem de agregação durante o experimento indica que o agregado de plaquetas está frouxamente unido. É sabido que esse efeito é um forte indício da atuação da MEGO sobre o processo de ligação interplaquetária mediada pela integrina  $\beta 3$ - $\alpha IIb$  utilizando o fibrinogênio como ponte (Akram *et al.*, 2024; Gao *et al.*, 2023).

Já na avaliação da coagulação do sangue dos animais tratados, não fora observado qualquer alteração sobre o TP, todavia, a associação entre a MEGO e a enoxiparina resultou no aumento do TTPa significativamente superior ao observado no grupo tratado apenas com enoxiparina (que é um anticoagulante que se espera alterar o TTPa). Esse achado nos indica que pode haver outro mecanismo que relacione o galato de octila com a função dos fatores de coagulação durante a fase de propagação da coagulação, interferindo na confecção das formas ativas desses e refletindo tal fenômeno no TTPa, bem como no tempo de formação de trombo.

Por fim, concluímos que a MEGO consiste em uma ME do galato de octila estável e segura, podendo ser administrada por via intravenosa e que é dotada de ação antiagregante plaquetária, vasorrelaxante e antitrombótica.

# CONCLUSÃO

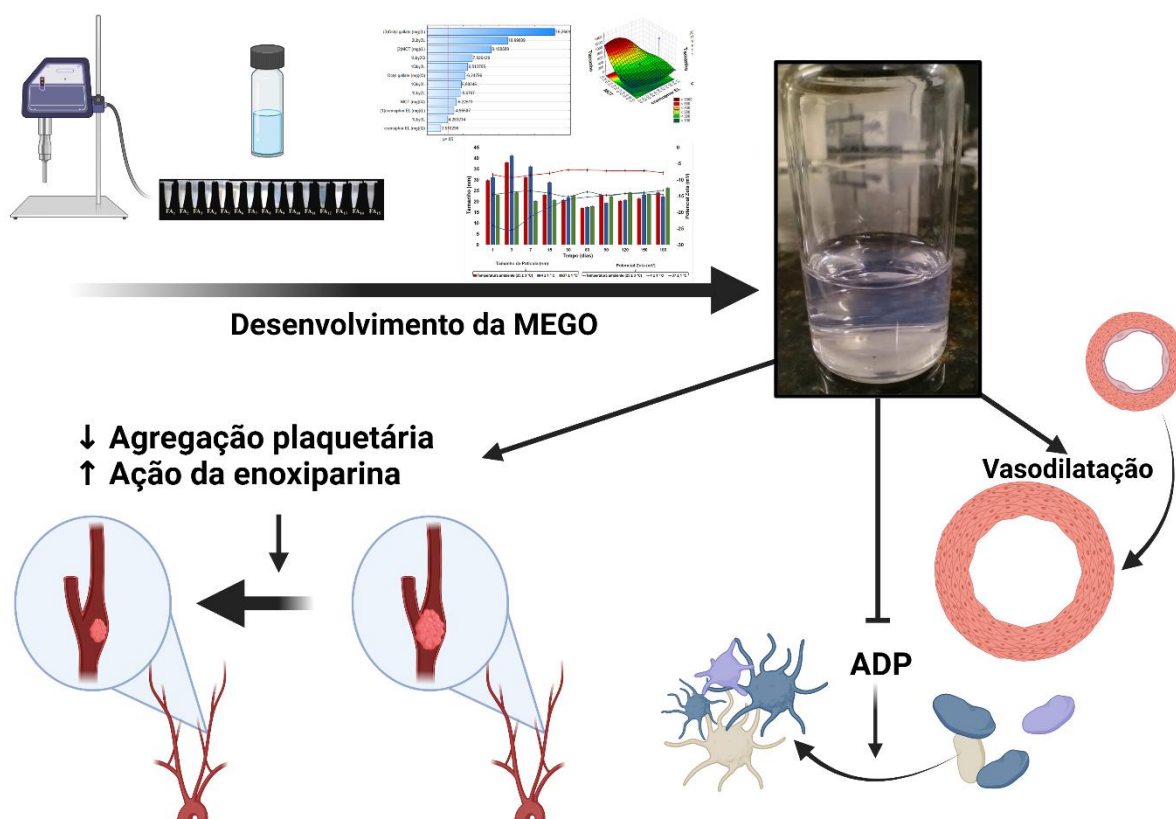
---

## 8. CONCLUSÃO

A partir da análise do desenvolvimento de uma microemulsão com o galato de octila e determinação de sua ação vasorrelaxante, antiagregante plaquetária e antitrombótica conclui-se que a MEGO formulada usando o planejamento fatorial possui uma boa estabilidade físico-química quando mantida à 4°C.

Também, é possível concluir que a MEGO é dotada de ação antiagregante plaquetária, vasorrelaxante (tanto de forma independente quanto dependente do endotélio funcional, sendo a segunda forma mediada pela produção de NO) e antitrombótica (quando aplicada de forma intravenosa) em ratos submetidos a trombose induzida por cloreto férrico. Além disso, foi observado que o tratamento concomitante da MEGO e enoxiparina exerce ação antitrombótica nos animais de forma superior a administração separada de cada molécula.

**Figura 26** - Síntese de todos os principais achados para a MEGO.



FONTE: Autor (2024).

## REFERÊNCIAS

---

## 9. REFERÊNCIAS

ADAY, A. W.; RIDKER, P. M. Targeting residual inflammatory risk: a shifting paradigm for atherosclerotic disease. **Frontiers in cardiovascular medicine**, 6, p. 16, 2019.

AGEWALL, S. Oral anticoagulants and antiplatelet treatment in different settings. : Oxford University Press: pvae 021 p. 2024.

AHMED, A. Z.; SATYAM, S. M.; SHETTY, P.; D'SOUZA, M. R. Methyl gallate attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by suppressing oxidative stress. **Scientifica**, 2021, 2021.

AHN, D.; KIM, J.; NAM, G.; ZHAO, X. *et al.* Ethyl gallate dual-targeting PTPN6 and PPAR $\gamma$  shows anti-diabetic and anti-obese effects. **International Journal of Molecular Sciences**, 23, n. 9, p. 5020, 2022.

AKAGAWA, M.; SHIGEMITSU, T.; SUYAMA, K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 67, n. 12, p. 2632-2640, 2003.

AKBARI, G.; DIANAT, M.; BADAVIDI, M. Effect of gallic acid on electrophysiological properties and ventricular arrhythmia following chemical-induced arrhythmia in rat. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 23, n. 2, p. 167, 2020.

AKRAM, A. W.; SABA, E.; RHEE, M. H. Antiplatelet and Antithrombotic Activities of *Lespedeza cuneata* via Pharmacological Inhibition of Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , MAPK, and PI3K/AKT Pathways and FeCl<sub>3</sub>-Induced Murine Thrombosis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2024, 2024.

ALSHEHRI, F. S.; WHYTE, C. S.; MUTCH, N. J. Factor XIII-A: an indispensable "factor" in haemostasis and wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 6, p. 3055, 2021.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.

ALVES, L. P.; OLIVEIRA, K. D. S.; SANTOS, J. A. D. P.; LEITE, J. M. D. S. *et al.* A review on developments and prospects of anti-inflammatory in microemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 60, p. 102008, 2020.

ANGIOLILLO, D. J.; BERNARDO, E.; RAMÍREZ, C.; COSTA, M. A. *et al.* Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. **Journal of the American College of Cardiology**, 48, n. 2, p. 298-304, 2006.

ANVISA, A. N. D. V. S. **Guia de estabilidade de cosméticos**. 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt->

br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf/view. Acesso em: 13 de fevereiro de 2024.

ANZOISE, M. L.; BASSO, A. R.; DEL MAURO, J. S.; CARRANZA, A. *et al.* Potential usefulness of methyl gallate in the treatment of experimental colitis. **Inflammopharmacology**, 26, p. 839-849, 2018.

APPELDOORN, C. C.; BONNEFOY, A.; LUTTERS, B. C.; DAENENS, K. *et al.* Gallic acid antagonizes P-selectin-mediated platelet-leukocyte interactions: Implications for the French paradox. **Circulation**, 111, n. 1, p. 106-112, 2005.

ARAÚJO, C. D. C. B.; SIMON, A.; DA SILVA HONÓRIO, T.; DA SILVA, S. V. C. *et al.* Development of rivaroxaban microemulsion-based hydrogel for transdermal treatment and prevention of venous thromboembolism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 206, p. 111978, 2021.

ASADA, Y.; YAMASHITA, A.; SATO, Y.; HATAKEYAMA, K. Pathophysiology of atherothrombosis: Mechanisms of thrombus formation on disrupted atherosclerotic plaques. **Pathology International**, 70, n. 6, p. 309-322, 2020.

ASUNCIÓN-ALVAREZ, D.; PALACIOS, J.; YBAÑEZ-JULCA, R. O.; RODRIGUEZ-SILVA, C. N. *et al.* Calcium signaling in endothelial and vascular smooth muscle cells; sex differences and the influence of estrogens and androgens. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 2024.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **Rsc Advances**, 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015.

BAGOT, C. N.; ARYA, R. Virchow and his triad: a question of attribution. **British journal of haematology**, 143, n. 2, p. 180-190, 2008.

BETTIOL, A.; GALORA, S.; ARGENTO, F. R.; FINI, E. *et al.* Erythrocyte oxidative stress and thrombosis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 24, p. e31, 2022.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BOUCHARD, B. A.; FREEMAN, K. Thrombin Formation. **Trauma Induced Coagulopathy**, p. 77-84, 2021.

BOX, G.; BEHNKEN, D. Some new three-level designs for the study of quantitative variables *Technometrics* 2: 455-475. 1960.

BROOS, K.; FEYS, H. B.; DE MEYER, S. F.; VANHOORELBEKE, K.; DECKMYN, H. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood reviews**, 25, n. 4, p. 155-167, 2011.

BUSTAMI, A.; LESTARI, W. P.; HAYUNINGRUM, C. F.; WUYUNG, P. E. *et al.* The anti-inflammatory effect of octyl gallate through inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

pathway in rat endometriosis model. **Journal of reproduction & infertility**, 21, n. 3, p. 169, 2020.

BUTALIA, S.; LEUNG, A. A.; GHALI, W. A.; RABI, D. M. Aspirin effect on the incidence of major adverse cardiovascular events in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Cardiovascular diabetology**, 10, p. 1-11, 2011.

CAI, H.; DAVIS, M. E.; DRUMMOND, G. R.; HARRISON, D. G. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 21, n. 10, p. 1571-1576, 2001.

CALLENDER, S. P.; MATHEWS, J. A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S. D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.

CALLENDER, S. P.; WETTIG, S. D. Phase Behavior of Non-Ionic Surfactant-Medium Chain Triglyceride-Water Microemulsion Systems. **Journal of Surfactants and Detergents**, 24, n. 4, p. 603-629, 2021.

CATTERALL, W. A.; LENAUEUS, M. J.; GAMAL EL-DIN, T. M. Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 60, p. 133-154, 2020.

CHANG, S.-S.; LEE, V. S.; TSENG, Y.-L.; CHANG, K.-C. *et al.* Gallic acid attenuates platelet activation and platelet-leukocyte aggregation: Involving pathways of Akt and GSK3 $\beta$ . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012, 2012.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood reviews**, 29, n. 1, p. 17-24, 2015.

CHARLTON, N. C.; MASTYUGIN, M.; TÖRÖK, B.; TÖRÖK, M. Structural features of small molecule antioxidants and strategic modifications to improve potential bioactivity. **Molecules**, 28, n. 3, p. 1057, 2023.

CHAVDA, V. P.; GOGOI, N.; VAGHELA, D. A.; BALAR, P. C. *et al.* Parenteral microemulsion for drug delivery: Advances and update. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 104991, 2023.

CHEN, L.; WU, X.; SHEN, T.; WANG, X. *et al.* Protective effects of ethyl gallate on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial dysfunction in PC12 cells. **Metabolic brain disease**, 34, p. 545-555, 2019.

CHEN, Y.; CHEN, F.; LIAO, J.; ZHOU, L. Low-or high-dose preventive aspirin use and risk of death from all-cause, cardiovascular disease, and cancer: A nationally representative cohort study. **Frontiers in Pharmacology**, 14, p. 1099810, 2023.

CHENG, L.; FU, Q.; ZHOU, L.; FAN, Y. *et al.* D-dimer as a predictor of cardiovascular outcomes in patients with diabetes mellitus. **BMC Cardiovascular Disorders**, 22, n. 1, p. 82, 2022.

CHU, W. F.; SUN, H. L.; DONG, D. L.; QIAO, G. F.; YANG, B. F. Increasing Intracellular calcium of guinea pig ventricular myocytes induced by platelet activating factor through IP3 pathway. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, 98, n. 1, p. 104-109, 2006.

CLARK, M.; CENTNER, A. M.; UKHANOV, V.; NAGPAL, R.; SALAZAR, G. Gallic acid ameliorates atherosclerosis and vascular senescence and remodels the microbiome in a sex-dependent manner in ApoE<sup>-/-</sup> mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 110, p. 109132, 2022.

CORREA, L. B.; SEITO, L. N.; MANCHOPE, M. F.; VERRI, W. A. *et al.* Methyl gallate attenuates inflammation induced by Toll-like receptor ligands by inhibiting MAPK and NF-Kb signaling pathways. **Inflammation Research**, 69, p. 1257-1270, 2020.

COSTA, D.; BENINCASA, G.; LUCCHESI, R.; INFANTE, T. *et al.* Effect of nitric oxide reduction on arterial thrombosis. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, 53, n. 1, p. 1-8, 2019.

CREA, F. The key role of thrombosis: focus on acute coronary syndrome, venous thrombo-embolism, and atrial fibrillation. **European Heart Journal**, 45, n. 1, p. 1-4, 2024.

DA SILVA PEREIRA, A.; DE OLIVEIRA, L. S.; LOPES, T. F.; BALDISSARELLI, J. *et al.* Effect of gallic acid on purinergic signaling in lymphocytes, platelets, and serum of diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 101, p. 30-36, 2018.

DANESH, J.; WHEELER, J. G.; HIRSCHFIELD, G. M.; EDA, S. *et al.* C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. **New England journal of medicine**, 350, n. 14, p. 1387-1397, 2004.

DAS, S.; LEE, S. H.; CHIA, V. D.; CHOW, P. S. *et al.* Development of microemulsion based topical ivermectin formulations: Pre-formulation and formulation studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 189, p. 110823, 2020.

DAVIZON-CASTILLO, P.; MCMAHON, B.; AGUILA, S.; BARK, D. *et al.* TNF- $\alpha$ -driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, 134, n. 9, p. 727-740, 2019.

DAYKIN, H. J.; STURGEON, S. A.; JONES, C.; WRIGHT, C. E. Arterial antithrombotic effects of aspirin, heparin, enoxaparin and clopidogrel alone, or in combination, in the rat. **Thrombosis research**, 118, n. 6, p. 755-762, 2006.

DAYOUB, E. J.; SEIGERMAN, M.; TUTEJA, S.; KOBAYASHI, T. *et al.* Trends in platelet adenosine diphosphate P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitor use and adherence among

antiplatelet-naïve patients after percutaneous coronary intervention, 2008-2016. **JAMA internal medicine**, 178, n. 7, p. 943-950, 2018.

DE OLIVEIRA, L. M.; DE OLIVEIRA, T. S.; DA COSTA, R. M.; DE SOUZA GIL, E. *et al.* The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and-independent mechanisms. **Vascular Pharmacology**, 81, p. 69-74, 2016.

DELMAS, T.; PIRAUX, H.; COUFFIN, A.-C.; TEXIER, I. *et al.* How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. **Langmuir**, 27, n. 5, p. 1683-1692, 2011.

DEMSARH, F. Magnetic resonance imaging of retracted and nonretracted blood clots during fibrinolysis in vitro. **Haemostasis**, 22, p. 195-201, 1992.

DEPNER, M.; KAHL, G.; KAHL, R. Influence of gallic acid esters on drug-metabolizing enzymes of rat liver. **Food and Chemical Toxicology**, 20, n. 5, p. 507-511, 1982.

DINIYAH, N.; ALAM, M. B.; JAVED, A.; ALSHAMMARI, F. H. *et al.* In silico and docking studies on the binding activities of Keap1 of antioxidant compounds in non-oilseed legumes. **Arabian Journal of Chemistry**, 16, n. 1, p. 104414, 2023.

DIXON, R. E.; TRIMMER, J. S. Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Junctions as Sites of Depolarization-Induced Ca<sup>2+</sup> Signaling in Excitable Cells. **Annual review of physiology**, 85, p. 217-243, 2023.

DU, C.-K.; ZHAN, D.-Y.; MORIMOTO, S. In vivo effects of propyl gallate, a novel Ca<sup>2+</sup> sensitizer, in a mouse model of dilated cardiomyopathy caused by cardiac troponin T mutation. **Life sciences**, 109, n. 1, p. 15-19, 2014.

ECKLY, A.; HECHLER, B.; FREUND, M.; ZERR, M. *et al.* Mechanisms underlying FeCl<sub>3</sub>-induced arterial thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 9, n. 4, p. 779-789, 2011.

EFSA, P. O. F. A. A. N. S. A. T. F. Scientific Opinion on the re-evaluation of octyl gallate (E 311) as a food additive. **EFSA Journal**, 13, n. 10, p. 4248, 2015.

EGUCHI, Y.; TAKAHARI, Y.; HIGASHIJIMA, N.; ISHIZUKA, N. *et al.* Nicorandil attenuates FeCl<sub>3</sub>-induced thrombus formation through the inhibition of reactive oxygen species production. **Circulation Journal**, 73, n. 3, p. 554-561, 2009.

ERLANK, H.; ELMANN, A.; KOHEN, R.; KANNER, J. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, semiquinones, and quinones. **Free Radical Biology and Medicine**, 51, n. 12, p. 2319-2327, 2011.

EVANS, C. E. Highlights in Thrombosis: 2021. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, 9, p. 863030, 2022.

FAN, S.; FENG, X.; LI, K.; LI, B.; DIAO, Y. Protective Mechanism of Ethyl Gallate against Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice by in Vivo and in Vitro Studies

Based on Transcriptomics. **Chemistry & Biodiversity**, 20, n. 1, p. e202200643, 2023.

FARNDAL, R. W.; SILJANDER, P. R.; ONLEY, D. J.; SUNDARESAN, P. *et al.*, 2003, **Collagen-platelet interactions: recognition and signalling**. Portland Press Limited. 81-94.

FENG, R.-B.; WANG, Y.; HE, C.; YANG, Y.; WAN, J.-B. Gallic acid, a natural polyphenol, protects against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity by activating ERK-Nrf2-Keap1-mediated antioxidative response. **Food and Chemical Toxicology**, 119, p. 479-488, 2018.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. D. O.; DUSSE, L. M. S. A.; CARVALHO, M. D. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 32, p. 416-421, 2010.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **nature**, 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GAO, D.; SUN, C. W.; WOODLEY, A. B.; DONG, J.-F. Clot Retraction and Its Correlation with the Function of Platelet Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . **Biomedicines**, 11, n. 9, p. 2345, 2023.

GARLAND, C. J.; PLANE, F.; KEMP, B. K.; COCKS, T. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. **Trends in pharmacological sciences**, 16, n. 1, p. 23-30, 1995.

GIBBINS, J. M.; MAHAUT-SMITH, M. P. **Platelets and Megakaryocytes: Volume 1: Functional Assays**. Springer Science & Business Media, 2008. 1592597823.

GIL-LONGO, J.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta. **The Journal of nutritional biochemistry**, 21, n. 4, p. 304-309, 2010.

GKALIAGKOUSI, E.; RITTER, J.; FERRO, A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. **Circulation research**, 101, n. 7, p. 654-662, 2007.

GOLUMBIC, C.; MATTILL, H. The antioxidant properties of gallic acid and allied compounds. **Oil & Soap**, 19, p. 144-145, 1942.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, O.; RAMIREZ, I. O.; RAMIREZ, B. I.; O'CONNELL, P. *et al.* Drug stability: ich versus accelerated predictive stability studies. **Pharmaceutics**, 14, n. 11, p. 2324, 2022.

GOTES, J.; KASIAN, K.; JACOBS, H.; CHENG, Z.-Q.; MINK, S. N. Benefits of ethyl gallate versus norepinephrine in the treatment of cardiovascular collapse in *Pseudomonas aeruginosa* septic shock in dogs. **Critical care medicine**, 40, n. 2, p. 560-572, 2012.

GRUZDYS, V.; WANG, L.; WANG, D.; HUANG, R.; SUN, X.-L. Investigation of cofactor activities of endothelial microparticle-thrombomodulin with liposomal surrogate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 651, p. 79-84, 2023.

GUO, Y.; HONG, Y. J.; JANG, H.-J.; KIM, M.-J. *et al.* Octyl gallate inhibits ATP-induced intracellular calcium increase in PC12 cells by inhibiting multiple pathways. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, 14, n. 1, p. 21-28, 2010.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 46, n. 4, p. 242-251, 1994.

HA, T. J.; NIHEI, K.-I.; KUBO, I. Lipoyxygenase inhibitory activity of octyl gallate. **Journal of agricultural and food chemistry**, 52, n. 10, p. 3177-3181, 2004.

HAMMAD, M.; RAFTARI, M.; CESÁRIO, R.; SALMA, R. *et al.* Roles of oxidative stress and Nrf2 signaling in pathogenic and non-pathogenic cells: a possible general mechanism of resistance to therapy. **Antioxidants**, 12, n. 7, p. 1371, 2023.

HARRISON, P.; CRAMER, E. M. Platelet  $\alpha$ -granules. **Blood reviews**, 7, n. 1, p. 52-62, 1993.

HAUTE, G. V.; LUFT, C.; ANTUNES, G. L.; SILVEIRA, J. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of octyl gallate in alveolar macrophages cells and mice with acute lung injury. **Journal of cellular physiology**, 235, n. 9, p. 6073-6084, 2020.

HAUTE, G. V.; LUFT, C.; PEDRAZZA, L.; DONADIO, M. V. F.; DE OLIVEIRA, J. R. Octyl gallate decrease lymphocyte activation and regulates neutrophil extracellular traps release. **Molecular Biology Reports**, p. 1-7, 2022.

HOAR, T.; SCHULMAN, J. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, 152, n. 3847, p. 102-103, 1943.

HOLMES, D. R.; KEREIAKES, D. J.; KLEIMAN, N. S.; MOLITERNO, D. J. *et al.* Combining antiplatelet and anticoagulant therapies. **Journal of the American College of Cardiology**, 54, n. 2, p. 95-109, 2009.

HUANG, D.-W.; CHANG, W.-C.; WU, J. S.-B.; SHIH, R.-W.; SHEN, S.-C. Gallic acid ameliorates hyperglycemia and improves hepatic carbohydrate metabolism in rats fed a high-fructose diet. **Nutrition research**, 36, n. 2, p. 150-160, 2016.

HUTTON, M.; FRAZER, M.; LIN, A.; PATEL, S.; MISRA, A. New targets in atherosclerosis: vascular smooth muscle cell plasticity and macrophage polarity. **Clinical Therapeutics**, 2023.

IRFAN, M.; JEONG, D.; SABA, E.; KWON, H.-W. *et al.* Gintonin modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired glycoprotein VI signaling. **Platelets**, 30, n. 5, p. 589-598, 2019.

ITO, M.; OKAMOTO, R.; ITO, H.; ZHE, Y.; DOHI, K. Regulation of myosin light-chain phosphorylation and its roles in cardiovascular physiology and pathophysiology. **Hypertension Research**, 45, n. 1, p. 40-52, 2022.

JIANG, Y.-R.; YIN, H.-J.; LIU, J.-G.; MA, L.; CHEN, K.-J. Effects of propyl gallate on carotid artery thrombosis and coagulation/fibrinolysis system in rats. **Chinese journal of integrative medicine**, 14, p. 42-45, 2008.

JIN, L.; PIAO, Z. H.; SUN, S.; LIU, B. *et al.* Gallic acid reduces blood pressure and attenuates oxidative stress and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 15607, 2017.

KARTHIKEYAN, K.; BAI, B. S.; GAUTHAMAN, K.; DEVARAJ, S. N. Protective effect of propyl gallate against myocardial oxidative stress-induced injury in rat. **Journal of pharmacy and pharmacology**, 57, n. 1, p. 67-73, 2005.

KE, W.-T.; LIN, S.-Y.; HO, H.-O.; SHEU, M.-T. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. **Journal of Controlled Release**, 102, n. 2, p. 489-507, 2005.

KEVANE, B.; ALLEN, S.; WALSH, K.; EGAN, K. *et al.* Dual endothelin-1 receptor antagonism attenuates platelet-mediated derangements of blood coagulation in Eisenmenger syndrome. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 16, n. 8, p. 1572-1579, 2018.

KHURANA, S.; HOLLINGSWORTH, A.; PICHE, M.; VENKATARAMAN, K. *et al.* Antiapoptotic actions of methyl gallate on neonatal rat cardiac myocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2014, 2014.

KIM, D.-S.; IRFAN, M.; SUNG, Y.-Y.; KIM, S. H. *et al.* Schisandra chinensis and Morus alba synergistically inhibit in vivo thrombus formation and platelet aggregation by impairing the glycoprotein VI pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017, 2017.

KIM, D. A.; KU, D. N. Structure of shear-induced platelet aggregated clot formed in an in vitro arterial thrombosis model. **Blood Advances**, 6, n. 9, p. 2872-2883, 2022.

KIM, J. H.; BAE, H. Y.; KIM, S. Y. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolism Journal**, 37, n. 6, p. 423, 2013.

KIRSCHSTEIN, T.; REHBERG, M.; BAJORAT, R.; TOKAY, T. *et al.* High K<sup>+</sup>-induced contraction requires depolarization-induced Ca<sup>2+</sup> release from internal stores in rat gut smooth muscle. **Acta Pharmacologica Sinica**, 30, n. 8, p. 1123-1131, 2009.

KLEINSCHNITZ, C.; STOLL, G.; BENDSZUS, M.; SCHUH, K. *et al.* Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. **The Journal of experimental medicine**, 203, n. 3, p. 513-518, 2006.

KRAMME, K.; SARRAF, P.; SHEBRIN, S.; MUNENE, G. Safety and efficacy of prophylactic enoxaparin adjusted by anti-factor xa peak levels in pancreatic surgery. **The American Surgeon**, 89, n. 2, p. 300-308, 2023.

KREBS, H. A.; HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. 1932.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; XIAO, P.; HARAGUCHI, H. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **Journal of agricultural and food chemistry**, 50, n. 12, p. 3533-3539, 2002.

LA BONTE, L. R.; PAVLOV, V. I.; TAN, Y. S.; TAKAHASHI, K. *et al.* Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to coagulation in a murine model of occlusive thrombosis. **The Journal of Immunology**, 188, n. 2, p. 885-891, 2012.

LAMOUNIER-ZEPTE, V.; BALTAS, L. G.; MORANO, I. Distinct contractile systems for electromechanical and pharmacomechanical coupling in smooth muscle. *In*: **Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction**: Springer, 2003. p. 417-426.

LARSSON, M.; RAYZMAN, V.; NOLTE, M. W.; NICKEL, K. F. *et al.* A factor XIIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk. **Science translational medicine**, 6, n. 222, p. 222ra217-222ra217, 2014.

LATHA, R. C. R.; DAISY, P. Therapeutic potential of octyl gallate isolated from fruits of *Terminalia bellerica* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, 51, n. 6, p. 798-805, 2013.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, 64, p. 175-193, 2012.

LI, X.; SIM, M. M.; WOOD, J. P. Recent insights into the regulation of coagulation and thrombosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 40, n. 5, p. e119-e125, 2020.

LI, Z.; DELANEY, M. K.; O'BRIEN, K. A.; DU, X. Signaling during platelet adhesion and activation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 30, n. 12, p. 2341-2349, 2010.

LIANG, H.; HUANG, Q.; ZOU, L.; WEI, P. *et al.* Methyl gallate: Review of pharmacological activity. **Pharmacological Research**, p. 106849, 2023.

LIBBY, P. Superficial erosion and the precision management of acute coronary syndromes: not one-size-fits-all. : Oxford University Press. 38: 801-803 p. 2017.

LIES, B.; GRONEBERG, D.; GAMBARYAN, S.; FRIEBE, A. Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase. **British journal of pharmacology**, 170, n. 2, p. 317-327, 2013.

LIN, X.; ZHAO, P.; LIN, Z.; CHEN, J. *et al.* Establishment of a modified and standardized ferric chloride-induced rat carotid artery thrombosis model. **ACS omega**, 7, n. 10, p. 8919-8927, 2022.

LIN, Y.; LUO, T.; WENG, A.; HUANG, X. *et al.* Gallic acid alleviates gouty arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis through enhancing Nrf2 signaling. **Frontiers in immunology**, 11, p. 580593, 2020.

LINCOLN, T. M.; DEY, N.; SELLAK, H. Signal Transduction in Smooth Muscle: Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **J Appl Physiol**, 91, n. 3, p. 1421-1430, 2001.

LIP, G. Y.; FELMEDEN, D. C.; DWIVEDI, G. Antiplatelet agents and anticoagulants for hypertension. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 12, 2011.

LITVINOV, R. I.; WEISEL, J. W. Blood clot contraction: mechanisms, pathophysiology, and disease. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, 7, n. 1, p. 100023, 2023.

LIU, W.; LIU, J.; XING, S.; PAN, X. *et al.* The benzoate plant metabolite ethyl gallate prevents cellular-and vascular-lipid accumulation in experimental models of atherosclerosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 556, p. 65-71, 2021.

LIU, Y.; OH, S.-J.; CHANG, K.-H.; KIM, Y.-G.; LEE, M.-Y. Antiplatelet effect of AMP-activated protein kinase activator and its potentiation by the phosphodiesterase inhibitor dipyridamole. **Biochemical pharmacology**, 86, n. 7, p. 914-925, 2013.

LU, D.; ZHANG, N.-Z.; YAO, Y.; WANG, T. *et al.* Investigation of Antiparasitic Activity of Two Marine Natural Products, Estradiol Benzoate, and Octyl Gallate, on *Toxoplasma gondii* In Vitro. **Frontiers in Pharmacology**, 13, p. 841941, 2022.

LUTSEY, P. L.; ZAKAI, N. A. Epidemiology and prevention of venous thromboembolism. **Nature Reviews Cardiology**, 20, n. 4, p. 248-262, 2023.

MACKMAN, N.; BERGMEIER, W.; STOUFFER, G. A.; WEITZ, J. I. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. **Nature reviews Drug discovery**, 19, n. 5, p. 333-352, 2020.

MARMOUZI, I.; EZZAT, S. M.; MOSTAFA, E. S.; EL JEMLI, M. *et al.* Isolation of secondary metabolites from the mediterranean sponge species; *Hemimyscale columella* and its biological properties. **SN Applied Sciences**, 3, p. 1-13, 2021.

MAY, J. E.; MOLL, S. Unexplained arterial thrombosis: approach to diagnosis and treatment. **Hematology**, 2021, n. 1, p. 76-84, 2021.

MEHLA, K.; BALWANI, S.; AGRAWAL, A.; GHOSH, B. Ethyl gallate attenuates acute lung injury through Nrf2 signaling. **Biochimie**, 95, n. 12, p. 2404-2414, 2013.

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

MICHELSON, A. D.; BENOIT, S. E.; FURMAN, M. I.; BRECKWOLDT, W. L. *et al.* Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 270, n. 5, p. H1640-H1648, 1996.

MINK, S. N.; JACOBS, H.; GOTES, J.; KASIAN, K.; CHENG, Z.-Q. Ethyl gallate, a scavenger of hydrogen peroxide that inhibits lysozyme-induced hydrogen peroxide signaling in vitro, reverses hypotension in canine septic shock. **Journal of Applied Physiology**, 110, n. 2, p. 359-374, 2011.

MITRA, D. Microemulsion and its application: An inside story. **Materials Today: Proceedings**, 83, p. 75-82, 2023.

MOJADAMI, S.; AHANGARPOUR, A.; MARD, S. A.; KHORSANDI, L. Diabetic nephropathy induced by methylglyoxal: gallic acid regulates kidney microRNAs and glyoxalase1–Nrf2 in male mice. **Archives of Physiology and Biochemistry**, 129, n. 3, p. 655-662, 2023.

MOORE, C.; TYMVIOS, C.; MICHAEL, E. Functional regulation of vascular and platelet activity during thrombosis by nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase. **Thrombosis and haemostasis**, 104, n. 08, p. 342-349, 2010.

MORI, T.; KOYAMA, N.; TAN, J.; SEGAWA, T. *et al.* Combination therapy with octyl gallate and ferulic acid improves cognition and neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Biological Chemistry**, 292, n. 27, p. 11310-11325, 2017.

MORTON, L. W.; CACCETTA, R. A. A.; PUDDEY, I. B.; CROFT, K. D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, 27, n. 3, p. 152-159, 2000.

MUJAJ, B.; ZHANG, Z. Y.; YANG, W. Y.; THIJS, L. *et al.* Aspirin use is associated with increased risk for incident heart failure: a patient-level pooled analysis. **ESC heart failure**, 9, n. 1, p. 685-694, 2022.

MURASE, T.; KUME, N.; HASE, T.; SHIBUYA, Y. *et al.* Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 19, n. 6, p. 1412-1420, 1999.

NESBITT, W. S.; KULKARNI, S.; GIULIANO, S.; GONCALVES, I. *et al.* Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. **Journal of Biological Chemistry**, 277, n. 4, p. 2965-2972, 2002.

OGBUAGU, E. O.; AIRAODION, A. I.; UCHE, C. L.; OGBUAGU, U. *et al.* Xylopia aethiopica Fruit Increased Prothrombin Time, Activated Partial Thromboplastin Time and Erythrocyte Sedimentation Rate of Wistar Rats. **International Journal of Research and Reports in Hematology**, 5, n. 2, p. 99-106, 2022.

OGUNSANWO, O. R.; OYAGBEMI, A. A.; OMOBOWALE, T. O.; ASENUGA, E. R.; SABA, A. B. Biochemical and electrocardiographic studies on the beneficial effects of gallic acid in cyclophosphamide-induced cardiorenal dysfunction. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 14, n. 3, p. 20160161, 2017.

OTTOLINI, M.; SONKUSARE, S. K. The calcium signaling mechanisms in arterial smooth muscle and endothelial cells. **Comprehensive Physiology**, 11, n. 2, p. 1831, 2021.

PARK, H.; KO, R.; SEO, J.; AHN, G. Y. *et al.* Octyl gallate has potent anti-inflammasome activity by directly binding to NLRP3 LRR domain. **Journal of Cellular Physiology**, 2024.

PENNINGS, G.; REDDEL, C.; TRAINI, M.; CAMPBELL, H. *et al.* Colchicine inhibits ROS generation in response to glycoprotein VI stimulation. **Scientific Reports**, 11, n. 1, p. 11965, 2021.

PRINCE, P. S. M.; PRISCILLA, H.; DEVIKA, P. T. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. **European journal of pharmacology**, 615, n. 1-3, p. 139-143, 2009.

PRISCILLA, D. H.; PRINCE, P. S. M. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. **Chemico-biological interactions**, 179, n. 2-3, p. 118-124, 2009.

RADOMSKI, A.; JURASZ, P.; ALONSO-ESCOLANO, D.; DREWS, M. *et al.* Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. **British journal of pharmacology**, 146, n. 6, p. 882-893, 2005.

RAMESHRAD, M.; BABAEI, H.; AZARMI, Y.; FOULADI, D. F. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. **Life sciences**, 145, p. 190-204, 2016.

RAMKUMAR, K.; VIJAYAKUMAR, R.; VANITHA, P.; SUGANYA, N. *et al.* Protective effect of gallic acid on alloxan-induced oxidative stress and osmotic fragility in rats. **Human & experimental toxicology**, 33, n. 6, p. 638-649, 2014.

RASKOB, G. E.; ANGCHAIKSUKSIRI, P.; BLANCO, A. N.; BULLER, H. *et al.* Thrombosis: a major contributor to global disease burden. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 34, n. 11, p. 2363-2371, 2014.

RENNÉ, T.; STAVROU, E. X. Roles of factor XII in innate immunity. **Frontiers in immunology**, 10, p. 2011, 2019.

- REVENKO, A. S.; GAO, D.; CROSBY, J. R.; BHATTACHARJEE, G. *et al.* Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, 118, n. 19, p. 5302-5311, 2011.
- RIJKEN, D. C.; UITTE DE WILLIGE, S. Inhibition of fibrinolysis by coagulation factor XIII. **BioMed research international**, 2017, 2017.
- ROOHINEJAD, S.; OEY, I.; WEN, J.; LEE, S. J. *et al.* Formulation of oil-in-water  $\beta$ -carotene microemulsions: Effect of oil type and fatty acid chain length. **Food chemistry**, 174, p. 270-278, 2015.
- ROTH, G. A.; JOHNSON, C.; ABAJOBIR, A.; ABD-ALLAH, F. *et al.* Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. **Journal of the American college of cardiology**, 70, n. 1, p. 1-25, 2017.
- RUSSO, I.; BARALE, C.; MELCHIONDA, E.; PENNA, C.; PAGLIARO, P. Platelets and Cardioprotection: the role of nitric oxide and carbon oxide. **International Journal of Molecular Sciences**, 24, n. 7, p. 6107, 2023.
- ŞAHİN, D.; ÇAĞLAR, E. Ş.; BORAN, T.; KARADAĞ, A. E. *et al.* Development, characterization of naringenin-loaded promising microemulsion formulations, and demonstration of anti-aging efficacy by in vitro enzyme activity and gene expression. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 84, p. 104422, 2023.
- SAHU, G. K.; SHARMA, H.; GUPTA, A.; KAUR, C. D. Advancements in microemulsion based drug delivery systems for better therapeutic effects. **International journal of pharmaceutical sciences and developmental research**, 1, n. 1, p. 008-015, 2015.
- SALENTINIG, S.; YEPURI, N. R.; HAWLEY, A.; BOYD, B. J. *et al.* Selective deuteration for molecular insights into the digestion of medium chain triglycerides. **Chemistry and Physics of Lipids**, 190, p. 43-50, 2015.
- SANAE, F.; MIYAICHI, Y.; HAYASHI, H. Endothelium-dependent contraction of rat thoracic aorta induced by gallic acid. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, 17, n. 2, p. 187-189, 2003.
- SANTILLI, F.; VAZZANA, N.; LIANI, R.; GUAGNANO, M. T.; DAVI, G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. **Obesity reviews**, 13, n. 1, p. 27-42, 2012.
- SARIOEZLUE, N. Y.; KIVANC, M. Isolation of gallic acid-producing microorganisms and their use in the production of gallic acid from gall nuts and sumac. **African Journal of Biotechnology**, 8, n. 6, 2009.
- SCHLICKMANN, F.; BOEING, T.; MARIANO, L. N. B.; DA SILVA, R. D. C. M. V. D. A. F. *et al.* Gallic acid, a phenolic compound isolated from *Mimosa bimucronata* (DC.)

Kuntze leaves, induces diuresis and saluresis in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 391, p. 649-655, 2018.

SCHLICKMANN, F.; DE SOUZA, P.; BOEING, T.; MARIANO, L. N. *et al.* Chemical composition and diuretic, natriuretic and kaliuretic effects of extracts of *Mimosa bimucronata* (DC.) Kuntze leaves and its majority constituent methyl gallate in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 69, n. 11, p. 1615-1624, 2017.

SCHMAIER, A. H. The elusive physiologic role of Factor XII. **The Journal of clinical investigation**, 118, n. 9, p. 3006-3009, 2008.

SCHMAIER, A. H.; STAVROU, E. X. Factor XII—What's important but not commonly thought about. **Research and practice in thrombosis and haemostasis**, 3, n. 4, p. e12235, 2019.

SCHOENICHEN, C.; BODE, C.; DUERSCHMIED, D. Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, 24, n. 3, p. 514-526, 2019.

SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **The Journal of physical chemistry**, 63, n. 10, p. 1677-1680, 1959.

SCHWARZ, U. R.; WALTER, U.; EIGENTHALER, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. **Biochemical pharmacology**, 62, n. 9, p. 1153-1161, 2001.

SHACKEBAEI, D.; HESARI, M.; RAMEZANI-ALIAKBARI, S.; HOSEINKHANI, Z.; RAMEZANI-ALIAKBARI, F. Gallic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Human & experimental toxicology**, 41, p. 09603271211064532, 2022.

SHAIK, A. H.; RASOOL, S.; REDDY, A. V. K.; KAREEM, M. A. *et al.* Cardioprotective effect of HPLC standardized ethanolic extract of *Terminalia pallida* fruits against isoproterenol-induced myocardial infarction in albino rats. **Journal of ethnopharmacology**, 141, n. 1, p. 33-40, 2012.

SHATTIL, S. J.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. **Nature reviews Molecular cell biology**, 11, n. 4, p. 288-300, 2010.

SILVA-LUIS, C. C.; DE BRITO ALVES, J. L.; DE OLIVEIRA, J. C. P. L.; DE SOUSA LUIS, J. A. *et al.* Effects of Baru Almond Oil (*Dipteryx alata* Vog.) Treatment on Thrombotic Processes, Platelet Aggregation, and Vascular Function in Aorta Arteries. **Nutrients**, 14, n. 10, p. 2098, 2022.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016. 8582713657.

SIMPLICIO, J. A.; PERNOMIAN, L.; SIMAO, M. R.; CARNIO, E. C. *et al.* Mechanisms underlying the vascular and hypotensive actions of the labdane ent-3-

acetoxy-labda-8 (17), 13-dien-15-oic acid. **European Journal of Pharmacology**, 726, p. 66-76, 2014.

SMOLENSKI, A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 10, n. 2, p. 167-176, 2012.

SODIKOV, S. S.; DOVURBOYEV, F.; OBLOQULOV, H.; QAHRAMONOV, D. Body Conditions in women with obesity and metabolic syndrome. **Educational Research in Universal Sciences**, 3, n. 4 SPECIAL, p. 147-155, 2024.

SOODI, D.; VANWORMER, J. J.; REZKALLA, S. H. Aspirin in primary prevention of cardiovascular events. **Clinical Medicine & Research**, 18, n. 2-3, p. 89-94, 2020.

SPECK, R. E. Substances relating to testing of blood-coagulation. : Google Patents 1969.

SUMMANEN, J.; VUORELA, P.; RAUHA, J.-P.; TAMMELA, P. *et al.* Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca<sup>2+</sup> fluxes in rat pituitary GH4C1 cells. **European journal of pharmacology**, 414, n. 2-3, p. 125-133, 2001.

SURIN, W.; PRAKASH, P.; BARTHWAL, M.; DIKSHIT, M. Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, 61, n. 3, p. 287-291, 2010.

SWYSTUN, L. L.; LIAW, P. C. The role of leukocytes in thrombosis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, 128, n. 6, p. 753-762, 2016.

TABASSUM, S.; AHMAD, S.; REHMAN KHAN, K. U.; TABASSUM, F. *et al.* Phytochemical profiling, antioxidant, anti-inflammatory, thrombolytic, hemolytic activity in vitro and in silico potential of *Portulacaria afra*. **Molecules**, 27, n. 8, p. 2377, 2022.

TADANO, N.; MORIMOTO, S.; TAKAHASHI-YANAGA, F.; MIWA, Y. *et al.* Propyl gallate, a strong antioxidant, increases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of cardiac myofilament. **Journal of pharmacological sciences**, 109, n. 3, p. 456-458, 2009.

TAKAI, E.; HIRANO, A.; SHIRAKI, K. Effects of alkyl chain length of gallate on self-association and membrane binding. **The journal of biochemistry**, 150, n. 2, p. 165-171, 2011.

TAMMELA, P.; VUORELA, P. Miniaturisation and validation of a cell-based assay for screening of Ca<sup>2+</sup> channel modulators. **Journal of biochemical and biophysical methods**, 59, n. 3, p. 229-239, 2004.

TEJERO, J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. **Physiological reviews**, 99, n. 1, p. 311-379, 2019.

TEN CATE, H. Thrombosis: Grand Challenges Ahead! : *Frontiers Media SA*. 8: 637005 p. 2021.

THOMAS, S. G. The structure of resting and activated platelets. **Platelets**, p. 47-77, 2019.

TITUS, A.; MARAPPA-GANESHAN, R. Physiology, endothelin. 2019.

TRIGGLE, C. R.; SAMUEL, S. M.; RAVISHANKAR, S.; MAREI, I. *et al.* The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, 90, n. 6, p. 713-738, 2012.

TULYATHAN, V.; BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L. Oxygen uptake by gallic acid as a model for similar reactions in wines. **Journal of agricultural and food chemistry**, 37, n. 4, p. 844-849, 1989.

TUTWILER, V.; PESHKOVA, A. D.; LE MINH, G.; ZAITSEV, S. *et al.* Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 17, n. 2, p. 361-370, 2019.

VAN DER HEIJDEN, C.; JANSSEN, P.; STRIK, J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, 24, n. 10-11, p. 1067-1070, 1986.

VAN DER MEIJDEN, P. E.; HEEMSKERK, J. W. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, 16, n. 3, p. 166-179, 2019.

VAN ESCH, G. Studies on the toxicity of propyl, octyl and dodecyl gallate. **Voeding**, 16, p. 683, 1955.

VAN HOVE, C.; VAN DER DONCKT, C.; HERMAN, A.; BULT, H.; FRANSEN, P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. **British journal of pharmacology**, 158, n. 3, p. 920-930, 2009.

VERSTEEG, H. H.; HEEMSKERK, J. W.; LEVI, M.; REITSMA, P. H. New fundamentals in hemostasis. **Physiological reviews**, 93, n. 1, p. 327-358, 2013.

VISWANATHAN, G.; KIRSHNER, H. F.; NAZO, N.; ALI, S. *et al.* Single-cell analysis reveals distinct immune and smooth muscle cell populations that contribute to chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 207, n. 10, p. 1358-1375, 2023.

WANG, D.; WANG, T.; LI, Z.; GUO, Y.; GRANATO, D. Green tea polyphenols upregulate the Nrf2 signaling pathway and suppress oxidative stress and inflammation markers in D-galactose-induced liver aging in mice. **Frontiers in Nutrition**, 9, p. 836112, 2022.

WANG, H. R.; SUI, H. C.; DING, Y. Y.; ZHU, B. T. Stimulation of the production of prostaglandin E2 by ethyl gallate, a natural phenolic compound richly contained in Longan. **Biomolecules**, 8, n. 3, p. 91, 2018.

WANG, Y.; LI, D.; LIN, H.; JIANG, S. *et al.* Enhanced oral bioavailability and bioefficacy of phloretin using mixed polymeric modified self-nanoemulsions. **Food Science & Nutrition**, 8, n. 7, p. 3545-3558, 2020.

WARISNOICHAROEN, W.; LANSLEY, A.; LAWRENCE, M. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. **International journal of pharmaceutics**, 198, n. 1, p. 7-27, 2000.

WENTWORTH, J. K.; PULA, G.; POOLE, A. W. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and-independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. **Biochemical Journal**, 393, n. 2, p. 555-564, 2006.

WHANG, W. K.; PARK, H. S.; HAM, I.; OH, M. *et al.* Methyl gallate and chemicals structurally related to methyl gallate protect human umbilical vein endothelial cells from oxidative stress. **Experimental & Molecular Medicine**, 37, n. 4, p. 343-352, 2005.

WOOLLARD, K. J.; STURGEON, S.; CHIN-DUSTING, J. P.; SALEM, H. H.; JACKSON, S. P. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. **Journal of Biological Chemistry**, 284, n. 19, p. 13110-13118, 2009.

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, 123, n. 6, p. 1173-1183, 2001.

WU, J.; NGAI, T. In-vitro fibrin assembly: From the bulk to the interface. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 63, p. 101661, 2023.

XIAO, H.; KOVICS, R.; JACKSON, V.; REMICK, D. G. Effects of platelet inhibitors on propyl gallate-induced platelet aggregation, protein tyrosine phosphorylation, and platelet factor 3 activation. **Blood coagulation & fibrinolysis**, 15, n. 3, p. 199-206, 2004.

XU, S.; PIAO, L.; WAN, Y.; HUANG, Z. *et al.* CTSS (Cathepsin S) Modulates Stress-Related Carotid Artery Thrombosis in a Mouse FeCl3 Model. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2023.

XU, Y.; TANG, G.; ZHANG, C.; WANG, N.; FENG, Y. Gallic acid and diabetes mellitus: its association with oxidative stress. **Molecules**, 26, n. 23, p. 7115, 2021.

YADAV, K. S.; SONI, G.; CHOUDHARY, D.; KHANDURI, A. *et al.* Microemulsions for enhancing drug delivery of hydrophilic drugs: Exploring various routes of administration. **Medicine in Drug Discovery**, p. 100162, 2023.

YAN, X.; ZHANG, Q.-Y.; ZHANG, Y.-L.; HAN, X. *et al.* Gallic acid attenuates angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction by inhibiting the degradation of endothelial nitric oxide synthase. **Frontiers in Pharmacology**, 11, p. 1121, 2020.

YANG, Z.; YE, T.; MA, F.; ZHAO, X. *et al.* Preparation of Chitosan/Clay Composites for Safe and Effective Hemorrhage Control. **Molecules**, 27, n. 8, p. 2571, 2022.

YOSHIDA, M.; AKAIKE, T.; GOTO, S.; TAKAHASHI, W. *et al.* Effect of the NO scavenger carboxy-PTIO on endothelium-dependent vasorelaxation of various blood vessels from rabbits. **Life sciences**, 62, n. 3, p. 203-211, 1997.

YUN-CHOI, H. S.; KIM, M. H.; JUNG, K. H. Esters of substituted benzoic acids as anti-thrombotic agents. **Archives of Pharmacal Research**, 19, p. 66-70, 1996.

ZAKRZESKA, A.; GROMOTOWICZ-POPLAWSKA, A.; SZEMRAJ, J.; SZOKA, P. *et al.* Eplerenone reduces arterial thrombosis in diabetic rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, 16, n. 4, p. 1085-1094, 2015.

ZAREI, M.; SARIHI, A.; ZAMANI, A.; RAOUFI, S. *et al.* Mitochondrial biogenesis and apoptosis as underlying mechanisms involved in the cardioprotective effects of Gallic acid against D-galactose-induced aging. **Molecular Biology Reports**, 50, n. 10, p. 8005-8014, 2023.

ZHANG, Y.; WANG, X.; LU, B.; GAO, Y. *et al.* Functional and binding studies of gallic acid showing platelet aggregation inhibitory effect as a thrombin inhibitor. **Chinese Herbal Medicines**, 14, n. 2, p. 303-309, 2022.

ZHOU, Y.; JIN, H.; WU, Y.; CHEN, L. *et al.* Gallic acid protects against ethanol-induced hepatocyte necroptosis via an NRF2-dependent mechanism. **Toxicology in vitro**, 57, p. 226-232, 2019.

ZUO, Z.; LI, M.; HAN, T.; ZHENG, X. *et al.* A platelet-cloaking tetramethylprazine-loaded microemulsion for improved therapy of myocardial ischaemia/reperfusion injury. **Journal of Drug Targeting**, 30, n. 6, p. 646-656, 2022.



## 10. ANEXOS

### 10.1 ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p><b>Universidade<br/>Federal da<br/>Paraíba</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  <p>CEUA</p> | <p>Universidade Federal da Paraíba</p> <p><b>Comissão de Ética no<br/>Uso de Animais</b></p>                                                                                                                                                                 |
| <p><b>CERTIFICADO</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>Certificamos que a proposta intitulada "Estudo pré-clínico da atividade cardiovascular e hemostática do galato de octila em ratos", protocolada sob o CEUA nº 4129280422 (ID 001638), sob a responsabilidade de <b>Robson Cavalcante Veras e equipe; Julio Cesar Pinheiro Lúcio de Oliveira</b> - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi <b>APROVADA</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 20/05/2022.</p>                      |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>We certify that the proposal "Preclinical study of the cardiovascular and hemostatic activity of octyl gallate in rats", utilizing 126 Heterogenics rats (126 males), protocol number CEUA 4129280422 (ID 001638), under the responsibility of <b>Robson Cavalcante Veras and team; Julio Cesar Pinheiro Lúcio de Oliveira</b> - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was <b>APPROVED</b> by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/20/2022.</p> |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>Vigência da Proposta: de 07/2022 a 12/2024    Área: Ciências Farmacêuticas</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>Origem: Biotério Convencional de Roedores do Departamento de Fisiologia e Patologia (UFPE)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>Espécie: Ratos heterogênicos    sexo: Machos    idade: 12 a 15 semanas    Quantidade: 126</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>Linhagem: Rattus Norvegicus - Wistar    Peso: 250 a 300 g</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>João Pessoa, 25 de outubro de 2022</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p><br/> <b>Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos</b><br/>         Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais<br/>         Universidade Federal da Paraíba</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <p><br/> <b>Profa. Dra. Ivila Carmem Talleri</b><br/>         Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais<br/>         Universidade Federal da Paraíba</p> |
| <p style="font-size: small;">Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III Prédio da Reitoria - Gabinete da Vice-reitoria - CEP 58051-085 - João Pessoa/PB - tel: 55 (83) 3216-7155<br/>         Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 14 às 17h : e-mail: ceua@ufpb.br<br/>         CEUA N 4129280422</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |