



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO (PRPG)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO  
E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DE MEDICAMENTOS (PPgDITM)



RICARDO CARTAXO RAMALHO

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO GALATO DE ETILA SOBRE A REATIVIDADE  
VASCULAR, COAGULAÇÃO SECUNDÁRIA E ATIVIDADE AGREGANTE DE  
PLAQUETAS EM RATOS**

JOÃO PESSOA

2025

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA  
DIGITAL DA UFPB**

--

RICARDO CARTAXO RAMALHO

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO GALATO DE ETILA SOBRE A REATIVIDADE  
VASCULAR, COAGULAÇÃO SECUNDÁRIA E ATIVIDADE AGREGANTE DE  
PLAQUETAS EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação tecnológica em Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação tecnológica em Medicamentos.

**Área de concentração:** Inovação tecnológica em medicamentos

**Linha de pesquisa:** Ensaios pré-clínicos e clínicos

**Orientadora:** Professora Dr<sup>a</sup> Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (Universidade Federal da Paraíba/UFPB).

**Coorientador:** Professor Dr. Robson Cavalcante Veras (Universidade Federal da Paraíba/UFPB).

JOÃO PESSOA

2025




## ATA DE DEFESA


Ata da quadragésima nona defesa de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos **RICARDO CARTAXO RAMALHO**, candidato ao Título de “**Doutor**” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos/UFPB.

Às quatorze horas do dia vinte e cinco de abril do ano de dois mil e vinte cinco (25/04/2025), na sala virtual, reuniram-se em caráter de Solenidade pública os membros da Comissão designada para examinar o aluno **RICARDO CARTAXO RAMALHO**, candidato ao Título de “**Doutor**” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Foram componentes da Banca Examinadora os Professores Doutores: (orientadora), Hilzeth De Luna Freire Pessoa (examinadora interna), Maria de Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz Fatima Vanderlei De Souza (examinadora interna), Cinthia Rodrigues Melo (examinadora externa) e Joelmir Lucena Veiga da Silva (examinador externo). Esteve presente também o seu Coorientador, Robson Cavalcante Veras. Dando início aos trabalhos a presidente da banca, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato, **Ricardo Cartaxo Ramalho**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO GALATO DE ETILA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR, COAGULAÇÃO SECUNDÁRIA E ATIVIDADE AGREGANTE DE PLAQUETAS EM RATOS**”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, o candidato foi arguido 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. Em face da aprovação declarou a presidente achar-se o examinado, **Ricardo Cartaxo Ramalho**, legalmente habilitado a receber o Título de “Doutor” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, área Farmácia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Os trabalhos foram encerrados determinando a leitura para fins de aprovação e a lavratura da presente ata devidamente assinada por todos os membros da Banca Examinadora.


João Pessoa, em 25 de abril de 2025.

Documento assinado digitalmente  
 **MARGARETH DE FATIMA FORMIGA MELO DINIZ**  
Data: 28/04/2025 18:00:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz (presidente)

Documento assinado digitalmente  
 **HILZETH DE LUNA FREIRE PESSOA**  
Data: 30/04/2025 07:03:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hilzeth De Luna Freire Pessoa mes (Examinador Interno)

Documento assinado digitalmente  
 **MARIA DE FATIMA VANDERLEI DE SOUZA**  
Data: 29/04/2025 08:44:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Fatima Vanderlei De Souza (Examinador Interno)

Documento assinado digitalmente  
 **CINTHIA RODRIGUES MELO**  
Data: 28/04/2025 20:41:24-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cinthia Rodrigues Melo (Examinador Externo)

Documento assinado digitalmente  
 **JOELMIR LUCENA VEIGA DA SILVA**  
Data: 28/04/2025 18:46:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva (Examinador Externo)

**DEDICATÓRIA**

---

**Dedico este trabalho ao meu admirado e  
saudosos pai Brunet Ramalho Crisanto, minha  
mãe Honorina Maria Cartaxo Ramalho, minha  
amada esposa Paula Andréa Cartaxo, meus  
filhos Gabriel e Miguel Brunet, às minhas irmãs  
Adriana, Andrea e Flávia Cartaxo Ramalho e ao  
meu irmão Adriano Duarte Quintans, sem o  
estímulo, apoio e amor da minha família nada  
disso seria possível.**



## **AGRADECIMENTOS**

---

Aos meus Orientadores: professora Dr<sup>a</sup> Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e professor Dr. Robson Cavalcante Veras, exemplo de profissionais a serem seguidos no qual **sou eternamente grato**;

A professora Dr<sup>a</sup> Leônia Maria Batista que me apoiou e acreditou junto com meus orientadores na campanha do Doutorado;

A professora Dr<sup>a</sup> Daniele Idalino Janebro Ximenes pela orientação e ajuda na conclusão da Tese;

Ao Professor Isac Almeida de Medeiros pela ajuda e colaboração nos projetos e experimentos;

A professora de graduação da disciplina de Química Analítica DQ/UFPB, hoje aposentada, Professora Dr<sup>a</sup> Maria Elizabeth Cartaxo Patriota, que me ajudou no meu ensino e que também tenho como exemplo de educadora e de Tia;

A coordenadora de programa de Programa DITM, professora Dr<sup>a</sup> Hilzeth de Luna Pessoa pelo apoio e confiança em seus alunos nos momentos mais difíceis;

Aos Técnicos administrativos do PgDITM: Adriana Ura e Juliana pela paciência, eficiência e disponibilidade no seu trabalho;

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Felipe Gabriel, Hayaly, Tays Amanda, Javanyr, Arthur, Mathânia, Danilo, Carol, Júlio César, Viviane, Larisse, Rayane e Eduarda;

A Universidade Federal da Paraíba – UFPB, no qual me graduei e sou Servidor desde 1995, ou seja, nunca saí efetivamente da Instituição o que soma mais de 35 anos.

E a todos que direta e indiretamente proporcionaram a conclusão deste Doutorado.

“Todo amor é compaixão, e todo amor que não  
é compaixão é egoísmo”

**Arthur Schopenhauer**



Ramalho, R.C. **Estudo pré-clínico do galato de etila sobre a reatividade vascular, coagulação secundária e atividade agregante de plaquetas em ratos**. 2025. Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em desenvolvimento e inovação tecnológica de medicamentos – PPgDITM/CCS/UFPB).

## Resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) são estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um grupo de condições que afetam os vasos sanguíneos e o coração. As DCVs representam a principal causa de morte global, e o Brasil não foge à regra. Dados do DATASUS de 2024 indicam que cerca de 27% dos óbitos totais, ou seja, mais de 400 mil pessoas, foram causados por problemas do sistema circulatório no ano em questão. Atualmente o sistema de saúde dispõe de vários fármacos utilizados nas DCV, mas o quantitativo disponível para as doenças hemostáticas ainda é pequeno. Portanto, decidiu-se realizar uma análise farmacológica pré-clínica com derivados do ácido gálico, um importante precursor de moléculas bioativas, e verificar suas ações a nível vascular e sistema hemostático, tomando por base o possível efeito vasorrelaxante e antioxidante do galato de etila em anéis isolados de artéria mesentérica superior de ratos, bem como, avaliar sua ação anticoagulante, antiagregante plaquetária. O Galato de etila demonstrou um efeito vasorrelaxante e antioxidante dependente de endotélio que foi inibido pela presença do NG-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) - ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou pelo 1H[1,2,3]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1ona (ODQ) - ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Anéis arteriais estimulados com angiotensina II ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) tiveram a formação de ânions superóxidos, analisados por microscopia de fluorescência, reduzida pela presença do derivado gálico. Esses resultados demonstram a capacidade do galato de etila causar vasorrelaxamento pela ativação da via eNOS/NO/CGs e antagonizar o efeito pró-oxidante da angiotensina II em artéria mesentérica isolada de rato. Na avaliação da atividade anticoagulante e antiagregante plaquetária do galato de etila, os ratos foram distribuídos em cinco diferentes grupos: grupo controle, grupo galato de etila  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , grupo galato de etila  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , grupo enoxaparina  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , grupo galato de etila  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  + enoxaparina  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Os dados demonstram que o galato de etila possui um efeito antiplaquetário por inibir a agregação frente ao estímulo com ADP e apesar dele não demonstrar efeito direto sobre a coagulação plasmática, consegue potencializar a ação da enoxaparina. Corroborando esses resultados, o galato de etila reduz de forma significativa o tempo de oclusão em artéria carótida tratada com cloreto férrico, bem como apresenta efeito sinérgico nos animais tratados concomitantemente com enoxaparina. Em conclusão pode-se ressaltar que o galato de etila mostrou relevante potencial vasorelaxante e antioxidante e mostrou ter ação antitrombótica e sua possível utilidade em combinação com outros anticoagulantes para o tratamento de distúrbios trombóticos. Também foi possível demonstrar sua promissora atividade antiagregante de possível aplicação terapêutica.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares. Angiotensina II. Artéria mesentérica. Antioxidante. Coagulação.

## ABSTRACT

---

Ramalho, R.C. **Preclinical study of ethyl gallate on vascular reactivity, secondary coagulation and platelet aggregation activity in rats.** 2025. Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em desenvolvimento e inovação tecnológica de medicamentos – PPgDITM/CCS/UFPB).

## Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are established by the World Health Organization (WHO) as a group of conditions that affect blood vessels and the heart. CVDs represent the main cause of death globally, and Brazil is no exception. Data from DATASUS from 2022 indicate that approximately 27% of total deaths, that is, more than 400 thousand people, were caused by problems in the circulatory system in the year in question. Currently, the health system has several drugs used in CVD, but the quantity available for hemostatic diseases is still small. Therefore, it was decided to carry out a preclinical pharmacological analysis with derivatives of gallic acid, an important precursor of bioactive molecules, and verify their actions at the vascular level and hemostatic system, based on the possible vasorelaxant and antioxidant effect of ethyl gallate in isolated rings of superior mesenteric artery of rats, as well as to evaluate its anticoagulant and antiplatelet action. Ethyl gallate demonstrated an endothelium-dependent vasorelaxant and antioxidant effect that was inhibited by the presence of NG-nitro-*L*-arginine-methyl ester (L-NAME) - (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) or 1H[1,2,3]-oxadiazolo-[4,3-*a*]-quinoxalin-1-one (ODQ) - (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Arterial rings stimulated with angiotensin II (0.1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) had the formation of superoxide anions, analyzed by fluorescence microscopy, reduced by the presence of the gallic derivative. These results demonstrate the ability of ethyl gallate to cause vasorelaxation by activating the eNOS/NO/CGs pathway and to antagonize the pro-oxidant effect of angiotensin II in isolated rat mesenteric artery. In the evaluation of the anticoagulant and antiplatelet activity of ethyl gallate, the rats were distributed into five different groups: control group, ethyl gallate 5 mg.kg<sup>-1</sup> group, ethyl gallate 50 mg.kg<sup>-1</sup> group, enoxaparin 5 mg.kg<sup>-1</sup> group, and ethyl gallate 5 mg.kg<sup>-1</sup> + enoxaparin 5 mg.kg<sup>-1</sup> group. The data demonstrate that ethyl gallate has an antiplatelet effect by inhibiting aggregation upon stimulation with ADP and, although it does not demonstrate a direct effect on plasma coagulation, it can potentiate the action of enoxaparin. Corroborating these results, ethyl gallate significantly reduces the occlusion time in the carotid artery treated with ferric chloride, as well as presenting a synergistic effect in animals treated concomitantly with enoxaparin. In conclusion, it can be highlighted that ethyl gallate showed relevant vasorelaxant and antioxidant potential and showed antithrombotic action and its possible usefulness in combination with other anticoagulants for the treatment of thrombotic disorders. It was also possible to demonstrate its promising antiplatelet activity with possible therapeutic application.

**Keywords:** Cardiovascular diseases. Angiotensin II. Mesenteric artery. Antioxidant. Coagulation.

## LISTA DE ABREVIATURAS , SÍMBOLOS E SIGLAS

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
AMPC	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
CaM	Calmodulina
CaV	Canal de cálcio controlado por voltagem
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CE <sub>50</sub>	Concentração que produz 50% do efeito máximo
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
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	Dimetilsulfóxido
E <sub>máx</sub>	Efeito máximo
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
ENOX	Enoxaparina
ET-1	Endotelina-1



Et-Ga	Galato de etila
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	Fator tecidual/tissular
FV/FVa	Fator V/Fator V ativado
FVII/FVIIa	Fator VII/ Fator VII ativado
FX/FXa/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
GAETIL	Galato de etila
GMP <sub>c</sub>	Monofosfato cíclico de guanina
GP	Glicoproteína
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HDL	Lipoproteína de alta densidade
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 <sub>v</sub>	Canal de potássio controlado por voltagem
LAT	Ligação para ativação das células T
L-NAME	NG-nitro-L-arginina-metil éster
Lyn	Tirosina cinase relacionada com o sarcoma de Yamaguchi
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
NF $\kappa$ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B

NLRP3	Família NLR com três domínios de pirina
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator Nuclear E2 Relacionada ao Fator 2
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
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub> /Prostaciclina
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

VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador
vWF	Fator de von Willebrand
XG	Gravidade-força

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura do ácido gálico e de seus derivados alquílicos.....	29
<b>Figura 2</b>	Resumo esquemático dos processos pró-coagulantes e anticoagulantes.....	34
<b>Figura 3</b>	Cascata da coagulação; vias: intrínseca, extrínseca e comum.....	38
<b>Figura 4</b>	Tríade da formação do trombo.....	40
<b>Figura 5</b>	Obstrução arterial (visão frontal e corte em perfil).....	50
<b>Figura 6</b>	Esquema do experimento de indução do trombo com cloreto férrico em artéria carótida de ratos.....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Curva de relaxamento de artéria com endotélio (●) e sem endotélio (○) induzida com FEN.....	53
<b>Gráfico 2</b>	Gráfico das curvas concentração-resposta do galato de etila em anéis de artéria mesentérica superior de rato com endotélio funcional na presença e ausência de L-NAME.....	54
<b>Gráfico 3</b>	Gráfico das curvas concentração-resposta do galato de etila em anéis de artéria mesentérica superior de rato com endotélio funcional na presença e ausência de ODQ.....	55
<b>Gráfico 4</b>	Gráfico e imagens do efeito antioxidante do galato de etila em artéria mesentérica de rato frente à ang. II.....	56
<b>Gráfico 5</b>	Galato de etila reduz a agregação plaquetária e estabilidade do tampão plaquetário.....	58
<b>Gráfico 6</b>	Galato de etila não gera prejuízo à coagulação.....	59
<b>Gráfico 7</b>	Galato de etila potencializa o efeito anticoagulante da enoxaparina.....	61
<b>Gráfico 8</b>	Efeito do tratamento com Galato de Etila sobre o tempo médio de obstrução da carótida comum de ratos por trombo induzido por FeCl <sub>3</sub> .....	63

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Tempos médios de oclusão induzida por cloreto férrico nos grupos estudados.....	64
-----------------	---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>29</b>
2.1 ÁCIDO GÁLICO E SEU DERIVADO GALATO DE ETILA.....	29
2.2 HEMOSTASIA SANGUÍNEA: RESPOSTA VASCULAR, ADESÃO E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	32
2.3 HEMOSTASIA SANGUÍNEA: COAGULAÇÃO SANGUÍNEA .....	35
2.3.1 Via Intrínseca .....	36
2.3.2 Via Extrínseca .....	37
2.3.4 Via Comum da coagulação.....	37
2.4 HEMOSTASIA SANGUÍNEA: TROMBOSE .....	38
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS .....	44
4.2 ANIMAIS .....	44
4.3 REATIVIDADE VASCULAR .....	45
4.4 ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO.....	46
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO GALATO DE ETILA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA ANGIOTENSINA II EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATO. ....	46
4.6 AVALIAÇÃO SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E COAGULAÇÃO PLASMÁTICA .....	47
4.7 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITROMBÓTICA DO GALATO DE ETILA INDUZIDO PELO CLORETO FÉRRICO (FeCl <sub>3</sub> ) EM CARÓTIDA ISOLADA DE RATO.....	49
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1 EFEITOS DO GALATO DE ETILA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR .....	53
5.2 EFEITO ANTIOXIDANTE DO GALATO DE ETILA NA PRESENÇA DE ANG II EM ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR DE RATOS.....	56
5.3 ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E ANTICOAGULANTE DO GALATO DE ETILA IN VIVO EM RATOS TRATADOS .....	57

5.4 AVALIAÇÃO DE TROMBOSE INDUZIDA POR FeCl <sub>3</sub> .....	62
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>9 ANEXOS .....</b>	<b>83</b>
9.1 ANEXO 1 – CERTIDÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL DA UFPB SOB CERTIDÃO DE NÚMERO 9106020519.....	83





## 1 INTRODUÇÃO

A integridade da função vascular e a manutenção de uma hemostasia equilibrada são fundamentais para o funcionamento adequado do sistema cardiovascular. A disfunção endotelial, alterações na reatividade vascular, hipercoagulabilidade e ativação excessiva de plaquetas estão implicadas em diversas doenças cardiovasculares (Xu *et al.*, 2021). Dentre as condições mais prevalentes, destacam-se a hipertensão arterial, a doença arterial coronariana, o infarto agudo do miocárdio e os acidentes vasculares cerebrais, todas fortemente associadas à disfunção vascular e desequilíbrios nos mecanismos de regulação da hemostasia (Pablo-Moreno *et al.*, 2022; Bkaily, Jacques, 2023).

A hemostasia é um processo fisiológico fundamental para a manutenção da integridade vascular, envolvendo a interação coordenada entre o endotélio, as plaquetas e os fatores da coagulação. Entretanto, alterações nesse sistema, como hiperatividade plaquetária, disfunção endotelial e estado de hipercoagulabilidade, podem desencadear eventos trombóticos e contribuir significativamente para o desenvolvimento e progressão das DCV (Pablo-Moreno *et al.*, 2022; Rajput *et al.*, 2023).

A formação patológica de trombos em vasos sanguíneos pode obstruir o fluxo sanguíneo e levar à isquemia tecidual, sendo um dos principais mecanismos subjacentes a infartos e acidentes vasculares cerebrais. Dessa forma, compreender e modular os mecanismos hemostáticos é essencial para prevenir complicações cardiovasculares de origem trombótica (Pablo-Moreno *et al.*, 2022; Rajput *et al.*, 2023).

As doenças cardiovasculares permanecem como a principal causa de mortalidade no mundo, sendo responsáveis por aproximadamente 17,9 milhões de mortes anuais, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (OPAS/OMS, 2024). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, cerca de 30% dos óbitos estão associados a complicações cardiovasculares, muitas delas decorrentes de alterações na função vascular e no equilíbrio hemostático. Esses dados reforçam a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que visem à regulação da função endotelial e dos mecanismos de coagulação (Oliveira *et al.*, 2024).

Nesse cenário, a problemática envolvendo alterações na reatividade vascular, ativação plaquetária exacerbada e distúrbios na coagulação sanguínea tem recebido atenção crescente tanto em nível nacional quanto internacional. Tais alterações estão na base fisiopatológica de eventos trombóticos e inflamatórios, para o controle desses eventos, a terapêutica atual baseia-se no uso de fármacos anticoagulantes, antiagregantes plaquetários e fibrinolíticos, amplamente utilizados na prática clínica (Litvinov, Weisel, 2023; Schulman *et al.*, 2024).

Apesar de sua eficácia comprovada, esses medicamentos apresentam limitações significativas, como risco elevado de sangramentos, variabilidade na resposta entre pacientes, efeitos adversos e interações medicamentosas. Essas limitações, somadas à crescente prevalência das DCV, têm impulsionado a busca por novas moléculas bioativas que atuem de forma mais segura e eficaz na modulação da função vascular e da hemostasia (Lorga Filho *et al.*, 2013).

O ácido gálico e seus derivados, como os galatos de metila e etila, são metabólitos secundários encontrados amplamente em plantas, vegetais, nozes e frutas, sendo reconhecidos por sua atuação como antioxidantes naturais. Além da atividade antioxidante, o ácido gálico tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios, anti-hipertensivos e cardioprotetores, conforme evidenciado por diversos estudos (BAdhanI; Sharma; Kakkar, 2015).

Especificamente, o galato de etila tem se destacado por sua capacidade de inibir a agregação plaquetária, atuando na supressão das vias de sinalização PKC $\alpha$ /p38/MAPK e Akt/GSK3 $\beta$  em resposta ao ADP (Chang *et al.*, 2012). Esses achados apontam para seu potencial uso como agente terapêutico multifuncional, com possibilidade de interferência tanto na reatividade vascular quanto nos processos hemostáticos, o que o torna um candidato relevante para investigação em modelos experimentais de doenças cardiovasculares.

Dessa forma, a presente pesquisa tem como objetivo geral avaliar o efeito do galato de etila sobre a função vascular e a hemostasia sanguínea em ratos, por meio de um modelo experimental pré-clínico. Especificamente, pretende-se: verificar a influência do galato de etila na reatividade vascular frente a agonistas vasocontráteis; avaliar sua atividade vasorrelaxante em artéria mesentérica isolada; identificar a participação do endotélio no efeito relaxante; estabelecer sua ação antiagregante plaquetária e anticoagulante *in vivo*; investigar sua atividade

anticoagulante no plasma; e analisar sua eficácia antitrombótica em modelo de trombose induzida por cloreto férrico.

Espera-se, com este estudo, contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação do galato de etila e seu possível uso como agente terapêutico no tratamento ou prevenção de desordens cardiovasculares associadas à disfunção vascular e distúrbios da hemostasia.

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

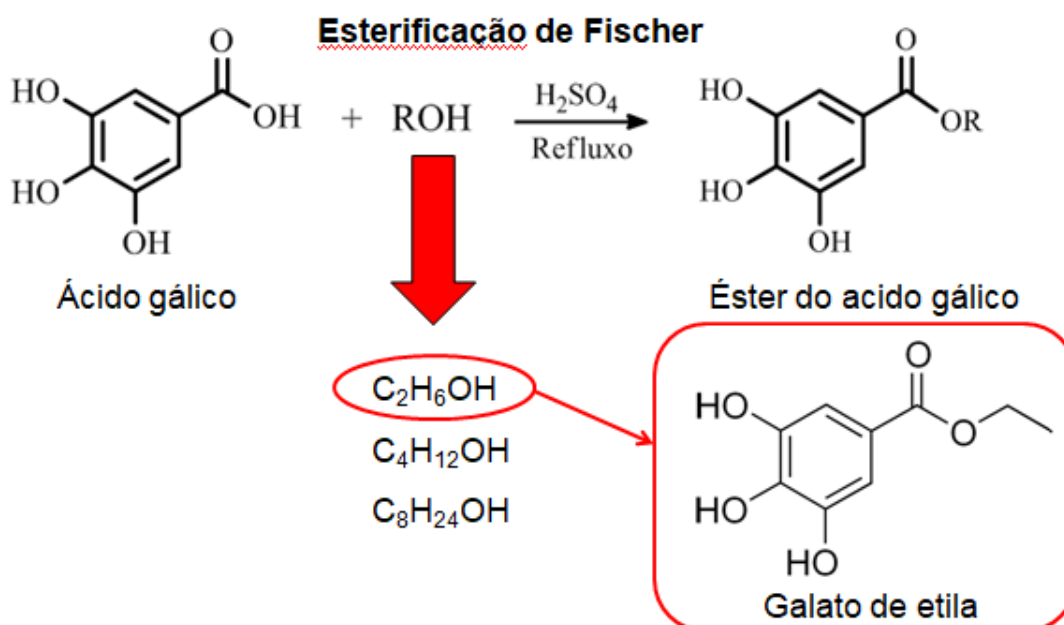
### 2.1 ÁCIDO GÁLICO E SEU DERIVADO GALATO DE ETILA

O ácido gálico (figura 1) 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; Schenkel, *et al.*, 2016).

A molécula é precursora, por rotas biológicas, de diversas outras substâncias em plantas, fungos e animais (Marmouzi; Ezzat; Mostafa; El Jemli *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 uma parte dessas. Esses derivados (como o galato de etila) já foram identificados em espécies vegetais e animais (Latha; Daisy, 2013; Lu; Zhang; Yao; Wang *et al.*, 2022).

O método mais notório para obtenção de ésteres foi desenvolvido por Emil Fischer e Arthur Speier em 1895, é versado como esterificação de Fischer e ocorre entre um ácido carboxílico e um álcool, sob aquecimento e na presença de um ácido forte como catalisador (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

**Figura 1** - Estrutura do ácido gálico e de seus derivados alquílicos – esterificação de Fischer.



**FONTE:** Autor (2025).

O ácido gálico e seus derivados atuam como agentes antioxidantes, tanto neutralizando radicais livres, bem como estimulando a expressão de enzimas que atuam reduzindo essas espécies moleculares (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) e por isso têm sido usados na indústria alimentícia e de cosméticos (Badhani *et al.*, 2015).

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 animais de hipertensão (Ogunsanwo *et al.*, 2017; Prince *et al.*, 2009; Shaik *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2020; Zarei *et al.*, 2023). Em aorta de rato, o ácido gálico induz, em baixas concentrações, efeito vasoconstritor de forma dependente do endotélio vascular quando pré-contráídos com FEN ou prostaglandina F2 $\alpha$ , porém em concentrações maiores se observa um relaxamento (Sanae *et al.*, 2003).

A ação antioxidante do ácido gálico é muito mais estudada do que seus derivados alquilados. Dessa maneira, é um caminho que pode ser tomado a se investigar esses derivados. 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 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, cujo 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz a fosforilação e ativação da eNOS por levar a ativação da PI3K (Cai *et al.*, 2001; Tejero *et al.*, 2019).

Além desse efeito vascular, o ácido gálico também possui ação antiagregante plaquetária. Sobre plaquetas humanas, o ácido gálico inibe a ação agregante induzida pelo ADP, pelo U46619 (um análogo sintético do TXA<sub>2</sub>) e pela trombina (Chang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2020). 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  $\text{Ca}^{2+}$  (Chang *et al.*, 2012).

A partir do uso de modelos de animais íntegros, o tratamento com o ácido gálico atuou reduzindo a pressão arterial de ratos hipertensos com melhora da função endotelial e vascular nas artérias desses animais. Essas ações parecem estar associadas a redução da angiotensina II circulante e aumento da biodisponibilidade de NO. 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; 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 etila tem esse efeito anti-inflamatório (diminuindo, também, a atividade do NFkB) 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). O galato de etila atua sobre as células endoteliais estimulando a produção de prostaglandina  $\text{E}_2$  (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 pode estar relacionado com o Nrf2, molécula chave na regulação do balanço redox na células (Chen *et al.*, 2019; Mehla *et al.*, 2013).

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.

A oxidação lipídica é uma das principais causas da deterioração da qualidade dos alimentos e da geração de odores e sabores desagradáveis, diminuindo o prazo de validade, alterando a textura e a cor e diminuindo o valor nutricional dos alimentos (Alamed, *et al.*, 2009).

Vários métodos foram desenvolvidos para controlar a taxa e a extensão da oxidação lipídica em alimentos, mas a adição de antioxidantes é mais eficaz. Os antioxidantes se tornaram um grupo indispensável de aditivos alimentares principalmente por causa de suas propriedades únicas de estender a vida útil dos



produtos alimentícios sem qualquer efeito adverso em suas qualidades sensoriais e nutricionais, neles se destacam os derivados do ácido gálico como o galato de propila e o galato de etila (Fereidoon S. *et al.* 2015)

Entre os antioxidantes derivados do ácido gálico usados e aplicados na indústria como antioxidantes, o galato de etila e propila é empregado em alimentos, cosméticos e medicamentos, já os galatos de metila, etila, octila e dodecila são empregados na indústria farmacêutica e cosmética. (Locatelli, *et al*, 2013).

## **2.2 HEMOSTASIA SANGUÍNEA: RESPOSTA VASCULAR, ADESÃO E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

O sangue necessariamente precisa se manter fluido para exercer suas diversas funções fisiológicas ao percorrer o sistema circulatório. Se um vaso sanguíneo sofre uma ruptura de sua integridade, a tendência é que o sangue extravase. Na finalidade de se evitar esta perda, ocorre a formação de um tampão hemostático no local da lesão com a participação de vários personagens de importância variada. Este processo fisiológico denominado Hemostasia controla a manutenção do sangue fluído como também reduz o fluxo sanguíneo local e controla a formação de um tampão durante uma injúria vascular. Este processo finamente controlado leva a hemostasia a ser ativada em segundos e mantém-se localizado no sítio vascular injuriado (LaPelusa e Dave 2022)

O processo de Hemostasia é regido por uma série de eventos e sinalizações interligadas bem como pela ação de proteínas, enzimas, partículas sanguíneas e células (endoteliais e leucocitárias, principalmente). O endotélio vascular mantém uma superfície anticoagulante, composta por vários componentes que favorecem a manutenção da fluidez sanguínea. Porém, se a matriz subendotelial é exposta, outros componentes induzem a contração vascular, ativam a formação do tampão plaquetário e conseqüentemente iniciam a coagulação. Desta forma, é comum destacar que o evento para cessar um sangramento pode ser dividido em três fases: 1) Vasoespasmos; 2) Formação do tampão; 3) Coagulação (Gale, 2011).

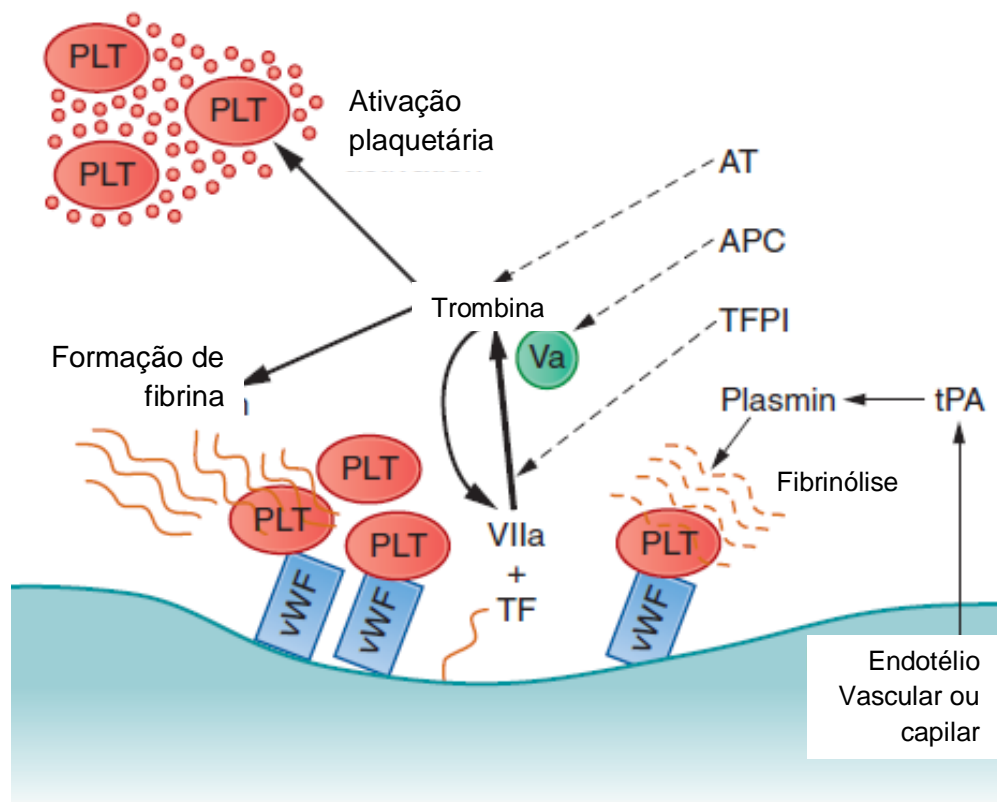
Em um dano vascular hemorrágico, o endotélio é destruído e dois eventos principais levam a vasoconstrição reflexa: A perda repentina da liberação basal de Óxido Nítrico (NO) pelo endotélio e o aumento de fatores vasoconstritores como a

endotelina-1 (ET-1), o difosfato de Adenosina (ADP) e a Trombina (TB) (Moore; Tymvios; Michael, 2010; Schoenichen; Bode; Duerschmied, 2019).

Essas moléculas causam a contração da musculatura lisa por ativarem receptores membranares acoplados à proteína G (GPCRs). A ET-1 ativa os receptores  $ETR_A$  e  $ETR_B$ , o ADP ativa os receptores  $P2Y_1$  e  $P2Y_{12}$  e a TB ativa os receptores  $PAR1$ , todos com acoplamento para a  $G_{q/11}$ , levando ao aumento da concentração do  $Ca^{2+}$  no interior celular, acarretando os processos de contração do músculo liso vascular e agregação plaquetária (Asada; Yamashita; Sato; Hatakeyama, 2020; Bouchard; Freeman, 2021; Kevane; Allen; Walsh; Egan *et al.*, 2018; Titus; Marappa-Ganeshan, 2019).

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 ( $Ca_v$ ) 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; Okamoto; Ito; Zhe *et al.*, 2022).

**Figura 2** - Processos pró-coagulantes e anticoagulantes do sangue. A formação inicial do tampão começa com o fator de von Willebrand (FvW) ligando-se ao colágeno no local da lesão, que atua como uma ponte para a adesão das plaquetas. Ao mesmo tempo, o fator tecidual (FT) exposto no local da lesão liga-se a pequenas quantidades de fator VII (VIIa) ativado circulante para produzir trombina através da via do fator tecidual (extrínseca). A trombina ativa um ciclo de retroalimentação positiva, produzindo mais de si mesma, cliva o fibrinogênio em fibrina insolúvel e ativa as plaquetas, que liberam mais fatores pró-coagulantes e inflamatórios. O processo é controlado por forças anticoagulantes. Longe do local da lesão, a antitrombina (AT) inibe a trombina. Além disso, a proteína C ativada (APC) destrói o fator V (Va — necessário para a via do fator tecidual) e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI) destrói os complexos FT-FVIIa. O endotélio libera o ativador do plasminogênio tecidual (tPA) que cliva o plasminogênio em plasmina para iniciar a fibrinólise.



**Fonte:** Adaptação de: Jerrold H. L. et, 2013

As plaquetas uma vez produzidas e em circulação pouco interagem com a camada endotelial. Porém, quando há alguma lesão e camadas sub-endoteliais são expostas, uma rápida e complexa interação é iniciada. As plaquetas saem de seu estado de repouso e se tornam ativadas, com intensa mudança da conformação, liberação de agonistas e interação de adesinas. A liberação granular de ADP (Adenosina di-fosfato) e serotonina, por exemplo, potencializam essa conversão de

plaqueta em repouso para plaqueta ativada (Jurk e Kehrel 2005) em um mecanismo feedback positivo.

A multimérica glicoproteína Fator de Von Willebrand (FvW) unida ao colágeno serve de receptor para as glicoproteínas plaquetárias GP-V e GP-IX, predominantemente em vasos com alto estresse de cisalhamento. Já em condições de lesão em vasos de baixo fluxo e consequente baixo estresse de cisalhamento, a interação entre plaquetas e tecidos sub-endoteliais ocorre em maior grau entre a GP-I e o colágeno. Esta ligação facilita a interação de uma outra glicoproteína, a GP-VI, que pertence a um supergrupo de imunoglobulinas (Clemetson e Clemetson 2001), e fortalece as interações entre as plaquetas-matrix proteica e plaqueta-plaqueta.

Observa-se também no sítio tissular lesado que há um acúmulo de plaquetas e o grande impacto para que isso ocorra é a exposição da GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3-integrin). Esta glicoproteína é a cabeceira da ponte formada com o fibrinogênio, que ficará imobilizado e servirá de liga entre as plaquetas, agregando-as (Dagmar Dörmann et al, 2001).

### **2.3 HEMOSTASIA SANGUÍNEA: COAGULAÇÃO SANGUÍNEA**

A hemostasia da coagulação é um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes. O sistema de coagulação garante que o sangramento não continue indefinidamente após a lesão vascular, mas é equilibrado por forças tromborresistentes envolvendo proteínas anticoagulantes para controlar a formação de coágulos e proteínas fibrinolíticas para remover o coágulo uma vez que a lesão vascular tenha sido reparada. Um equilíbrio adequado entre esses sistemas deve ser mantido para garantir a natureza fluida do sangue, mas ser facilmente ativado quando ocorre ativação excessiva (Sniecinski, *et al.*, 2010).

Assim, a fluidez do sangue é mantida por contrapesos dentro dos sistemas de coagulação e fibrinolítico. Em pacientes cirúrgicos, especialmente no pós-operatório, há um risco potencial para um estado hipercoagulatório, o que resulta de uma mudança do equilíbrio normal em favor da coagulação. (Sniecinski, *et al.*, 2010; Martinelli, *et al.*, 2010).

Embora trombos arteriais e venosos tenham sido considerados problemas distintos, pacientes com hipercoagulabilidade podem estar em risco de ambos, e foi

sugerido que a hipercoagulabilidade representa um espectro de doenças em vez de entidades clínicas separadas (Franchini, *et al.*, 2010; Lowe, 2006).

No ambiente perioperatório, os médicos geralmente estão cientes e preocupados com o risco de sangramento; no entanto, a hipercoagulabilidade também é uma causa potencial de resultados adversos pós-operatórios que geralmente é esquecida (Sniecinski, *et al.* 2010; Chan. *et al.*, 2008; Kfoury , *et al.*, 2009).

Os fatores de risco para hipercoagulabilidade podem ser herdados ou adquiridos e são causados pelo aumento da atividade pró-coagulante e/ou diminuição da atividade anticoagulante ou fibrinolítica (Sniecinsk, *et al.* 2010; Mannucci, *et al.* 2009). Devido a esse risco aumentado, pacientes hipercoaguláveis geralmente recebem terapia de anticoagulação profilática (Geerts, *et al.* 2008; Warkentin, *et al.* 2008).

Didaticamente as atividades da coagulação são subdivididas para melhor compreensão dos processos, portanto, a hemostasia primária consiste em uma adesão e agregação de plaquetas formando um tampão no local vascular danificado. A hemostasia secundária inclui as duas principais vias de coagulação, intrínseca e extrínseca, que se encontram em um ponto para formar a via comum, que por sua vez converte o fibrinogênio em fibrina. Essas unidades de fibrina têm afinidade entre si e se combinam em filamentos que unem as plaquetas, estabilizando o tampão plaquetário (Panova-Noeva, *et al.* 2019; Phasha, *et al.* 2019; Grover, *et al.* 2019).

### **2.3.1 Via Intrínseca**

A via intrínseca é iniciada com a ativação do fator XII (um zimogênio, serina protease inativada), que se transforma a fator XIIA (serina protease ativada) após a exposição ao colágeno subendotelial (exposto após dano endotelial). O fator XIIA atua como um catalisador para ativar o fator XI em fator XIA, que por sua vez converte o fator IX em fator IXA. A ativação deste fator é chave para que o Fator X se ligue aos fosfolípidos de membrana plaquetários e exerça sua ação de converter a trombina para sua forma ativa. Na clínica, a via intrínseca é medida como tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), (Panova-Noeva, *et al.*, 2019; Raheel *et al.*, 2023).

### 2.3.2 Via Extrínseca

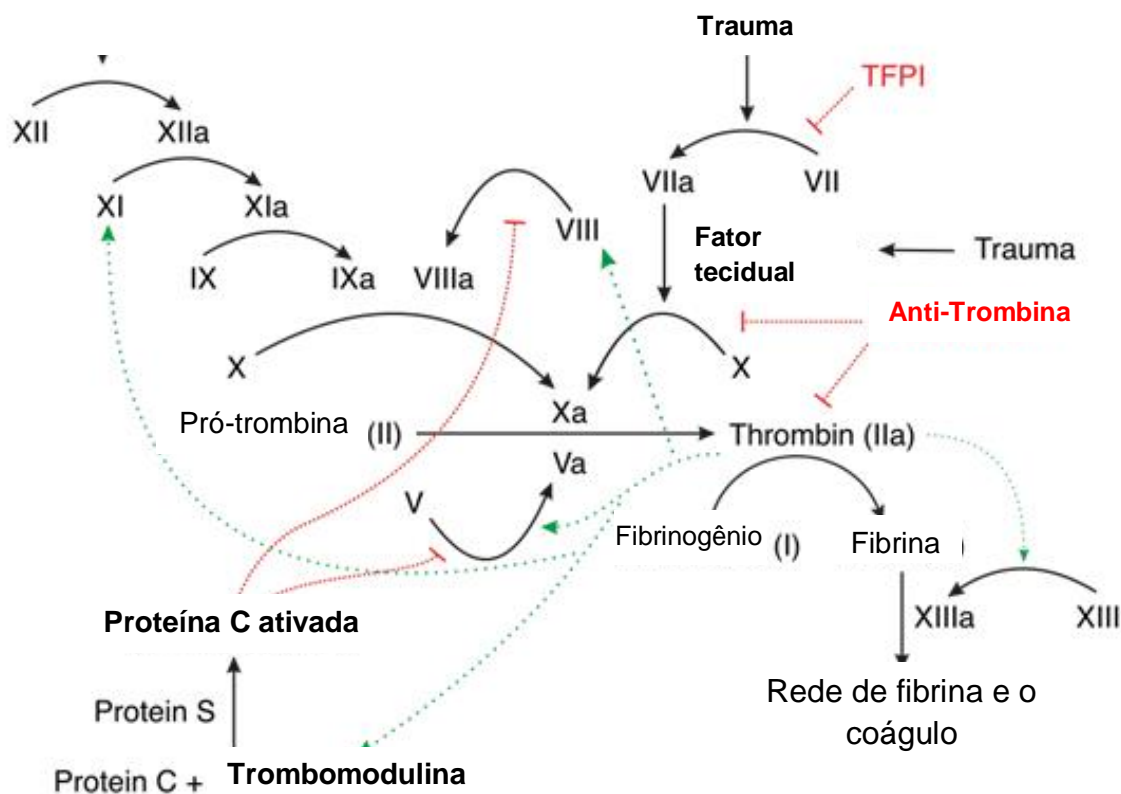
A via extrínseca é a via mais rápida e fisiologicamente funcional. Uma vez que o dano ao vaso é causado, ao se expor o fator tecidual (FT), ocorre a formação do complexo FT-FVII-FX, o qual apresenta uma alta afinidade à pró-trombina, convertendo-a em trombina. A via extrínseca é clinicamente medida como tempo de protrombina (TP), (Raheel. *et al.*, 2023).

### 2.3.4 Via Comum da coagulação

Tendo em mente que esta via é uma separação apenas didática, a ativação do fator X, passa por várias atividades metabólicas com feedback positivo direto e indireto. A formação da trombina é a grande chave do processo, pois essa enzima por ser inespecífica ativa vários alvos diferentes, dentre eles: Fator IX, Fator VIII, Fator V (de Leiden), Fator XIII. Esses citados co-fatores ajudam a retroalimentar a cascata coagulante levando a formação de fibrina. As suas unidades se unem, sob ação do fator XIII, formando uma malha, cuja contração ajuda a estabilizar o coágulo. (Raheel, *et al.*, 2023).

Para prevenir a hipercoagulação, que causa trombose generalizada, existem certos processos que controlam a cascata da coagulação. Como a trombina atua como um pró-coagulante, ela também atua como um feedback negativo, ativando o plasminogênio em plasmina e estimulando a produção de antitrombina (AT). A plasmina atua diretamente na malha de fibrina, decompondo-a. A AT diminui a produção de trombina a partir da protrombina e diminui a quantidade de fator X ativado. As proteínas C e S também atuam na prevenção da coagulação, principalmente pela inativação dos fatores V e VIII (Raheel, *et al.*, 2023).

**Figura 3** - Cascata da coagulação; vias: intrínseca, extrínseca e comum.



**Fonte:** Adaptado de Nayanika Sreejith, T. Fisiology, 2023.

## 2.4 HEMOSTASIA SANGUÍNEA: TROMBOSE

A trombose é definida como a formação de um coágulo sanguíneo dentro de um vaso sanguíneo, podendo ser uma artéria, uma veia ou o sistema capilar. A trombose arterial com significância clínica ocorre mais tipicamente como uma combinação de três eventos primários: a predisposição inerente, seja fisiológica ou anatômica vaso arterial para desenvolver trombose, a tolerância à hipóxia do tecido cuja vascularização é sustentada pelo próprio vaso e a função do tecido e ou órgão (Lippi, *et al.*, 2012 ; Giuseppe, *et al.*, 2018).

A formação de trombos leva à oclusão vascular ou à geração de êmbolos que bloqueiam os vasos sanguíneos, resultando em infarto do miocárdio (IM), acidente vascular cerebral isquêmico agudo (AVCI) ou embolia pulmonar (EP). Os principais

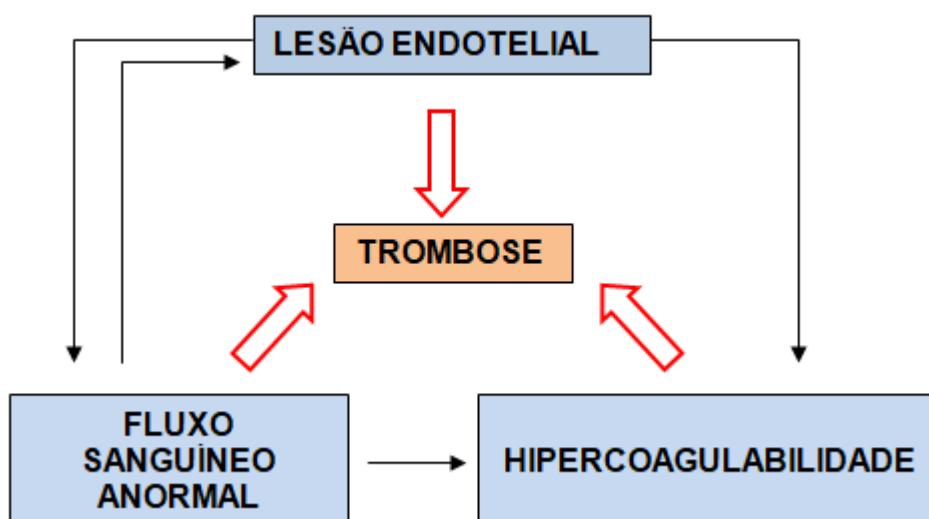
componentes dos trombos incluem fibrina, plaquetas, hemácias (HE), leucócitos e malhas extracelulares (NETs) de neutrófilos. No entanto, a contribuição relativa de cada componente difere entre a localização do trombo e a patogênese (Ghadir, *et al.* 2023).

As propriedades mecânicas do coágulo sanguíneo e a resistência à lise são amplamente determinadas pela estrutura da fibra de fibrina e suas relações espaciais, que dependem de diversos fatores genéticos, clínicos e ambientais, incluindo as concentrações plasmáticas de proteína C-reativa (PCR) e fibrinogênio. A taxa de degradação da fibrina é determinada pelos níveis de plasminogênio, antiplasmina, ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e inibidor da fibrinólise ativável pela trombina (TAFI). Todavia, a trama ou malha dos coágulos de fibrina também afeta consideravelmente a eficiência da fibrinólise, tornando-a afetada e ou prejudicada em redes de fibras finas, altamente reticuladas e densas. (Marcin, *et al.*, 2014).

Os transtornos trombóticos podem ser categorizados entre aqueles que são predominantemente causados por agregados plaquetários e aqueles que são causados pela deposição de fibrina. As plaquetas estão predominantemente envolvidas na trombose que afeta o sistema arterial, o chamado trombo branco. Consequentemente, não é surpreendente que os agentes antiplaquetários sejam mais eficazes em doenças ateroscleróticas como as síndromes coronárias agudas e acidente vascular cerebral. Em contraste, os trombos que se formam nos sistemas de baixa pressão como o sistema venoso e os átrios cardíacos são ricos em fibrina e eritrócitos; estes são frequentemente chamados de "trombos vermelhos" (Hart, 1999; Kamath, *et al.*, 2021).



**Figura 4** - Tríade da formação do trombo.



**Fonte:** Autor (2025).

A importância dessa distinção entre trombos vermelhos e brancos tem sua importância para o direcionamento do tratamento, os agentes antiplaquetários são frequentemente o melhor tratamento para doenças que envolvem trombos brancos, enquanto os trombos vermelhos podem ser melhor tratados com anticoagulantes (Hart, 1999; Kamath S. *et al.*, 2021).

**OBJETIVOS**

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito pré-clínico do galato de etila sobre a função vascular e hemostasia sanguínea de ratos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar a influência do tratamento com galato de etila sobre a reatividade vascular frente à ação de agonistas vasocontráteis;

Avaliar a atividade vasorrelaxante do galato de etila em modelos de artéria mesentérica isolada;

Identificar a participação do endotélio vascular no efeito relaxante induzido pelo galato de etila;

Estabelecer a ação antiagregante plaquetária e anticoagulante com o galato de etila após a administração intravenosa em ratos;

Investigar a ação anticoagulante com o galato de etila no plasma de ratos;

Averiguar a ação antitrombótica com galato de etila em trombose induzida por cloreto férrico em artéria carótida comum de ratos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

O galato de etila (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi solubilizado em água destilada com o auxílio de um agente solubilizante não-iônico Cremophor® Rh 60 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a 2% (p/v) para obter uma solução de concentração de  $10^{-1} \text{mol L}^{-1}$ , a qual foi utilizada para o preparo de soluções por meio de diluição seriada e para os ensaios experimentais. Esse preparo foi feito antes de cada experimento e protegido da luz. Nos experimentos, a concentração de Cremophor® Rh 60 não excedeu 0,02%, o que não o torna capaz de exercer quaisquer atividades biológicas.

Os sais e a glicose para o preparo das soluções nutritivas foram provenientes da empresa Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). O 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), Dihydroethidium (DHE), fenilefrina (Phe), Acetilcolina (ACh) e Angiotensina II (Ang II) foram provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os anestésicos utilizados para a eutanásia dos animais foram provenientes da farmacêutica Syntec do Brasil LTDA (Barueri, São Paulo, Brasil). ODQ, L-NAME, DHE, Angiotensina.

### 4.2 ANIMAIS

Para os protocolos experimentais foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 a 300 gramas, provenientes da Unidade de Produção Animal da Universidade Federal da Paraíba. Os animais foram mantidos isolados em gaiolas plásticas com livre acesso à água tratada e à ração (Nuvillab®, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, Paraná, Brasil) e submetidos a ciclo claro-escuro de 12 horas (6am-6pm). O uso desses animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da UFPB sob certidão de número 9106020519 (Anexo I).

### 4.3 REATIVIDADE VASCULAR

Após a aplicação da anestesia nos animais, estes foram colocados em decúbito dorsal e com uma tesoura cirúrgica uma incisão foi realizada no abdômen até o tórax de aproximadamente 10 cm, expondo e retirando lateralmente os intestinos e isolando a parte da artéria mesentérica, iniciando a dissecação da artéria mesentérica dos tecidos subjacentes em uma placa de petri com solução de Tyrode.

Foi realizada a limpeza dos tecidos conjuntivos aderentes e depois cortado em anéis (1-2 mm) em uma solução de Tyrode contendo a seguinte composição (mM): NaCl 138,16, KCl 4,0, CaCl<sub>2</sub> 2,0, MgCl<sub>2</sub> 1,05, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42, NaHCO<sub>3</sub> 10,0 e glicose 5,6. (pH = 7,4); mantido a 37°C e gaseificado com uma mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>).

Após a eutanásia a artéria mesentérica superior foi removida, limpa de tecido conjuntivo seccionada em anéis (1-2 mm) em uma solução de Tyrode contendo a seguinte composição (mM): NaCl 138,16, KCl 4,0, CaCl<sub>2</sub> 2,0, MgCl<sub>2</sub> 1,05, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42, NaHCO<sub>3</sub> 10,0 e glicose 5,6. (pH = 7,4); mantido a 37°C e gaseificado com uma mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>).

Em cubas de banho de órgãos isolados, os anéis foram suspensos por linha de algodão, fixados a um transdutor de força (MLT020, ADInstruments, Austrália) acoplados a um sistema de aquisição de dados (ML870/P, utilizando LabChart® versão 7.0, ADInstruments, Austrália), para os registros das tensões isométricas. As preparações foram mantidas a uma tensão basal de 0,75g, por um período de estabilização de 60 minutos. A cada 15 minutos, a solução de Tyrode era trocada para prevenir a produção de metabólitos indesejáveis (MORAES *et al.*, 2020). Conforme necessário, o endotélio foi removido esfregando suavemente a superfície íntima dos vasos.

A integridade endotelial foi avaliada quantitativamente a partir do grau de relaxamento usando ACh (10 µM) sob o efeito da atividade contrativa induzida por Phe ou FEN (10 µM). Os anéis foram considerados desprovidos de endotélio quando o efeito de relaxamento induzido pela acetilcolina foi inferior a 10% e endotélio intacto quando o efeito de relaxamento foi superior a 90%.

O efeito vasorrelaxante do galato de etila foi observado sob contração induzida por Phe (1 µM). No tônus da contração de Phe foram adicionadas

concentrações crescentes e cumulativas de galato de etila ( $0,01 - 3.000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Isso ocorreu tanto em anéis com endotélio funcional quanto naqueles sem endotélio.

#### **4.4 ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO**

Para investigar a participação do NO no efeito vasodilatador dependente do endotélio do galato de etila, os anéis da artéria mesentérica com endotélio funcionais foram incubados com o L-NAME ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), um inibidor competitivo da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) ou com o ODQ ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), inibidor específico da ciclase de guanilil solúvel (CGs), ambos por um período de 30 minutos (SIMPLICIO *et al.*, 2014). Após esse tempo, fora induzida uma contração com  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Phe e na fase tônica de contração, adicionou-se às cubas concentrações crescentes e cumulativas de galato de etila ( $0,01 - 3.000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para obter as curvas concentração-respostas.

#### **4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO GALATO DE ETILA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA ANGIOTENSINA II EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATO.**

Tendo por finalidade investigar a atividade antioxidante do galato de etila frente à Ang II, um potente indutor da expressão de NADPH oxidase e de produção de ânions superóxidos (Zahng *et al.*, 2020), a artéria mesentérica foi seccionada em anéis que ficaram separados em quatro grupos: (1) grupo controle (CTL); (2) grupo tratado com Ang II  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Ang II); (3) grupo tratado com Ang. II  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  e galato de etila  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; e (4) grupo tratado com Ang. II  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  e galato de etila  $1.500 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Foram usado a solução de Tyrode para solubilizar e incubar essas substâncias e anéis, respectivamente.

Os anéis foram mantidos em microtubos plásticos atóxicos (Eppendorf® company. Hamburgo, Alemanha) por 60 minutos em banho-maria a  $37^\circ \text{C}$  e após esse período foram retirados, lavados com Tyrode e fixados em meio TissueTek® O.C.T.™ (Optimal Cutting Temperature) (Sakura finetek USA Inc. Torrance, Califórnia, EUA) seguindo do congelamento em nitrogênio líquido e mantidos em refrigeração a  $-80^\circ \text{C}$  por 24 horas.

As amostras foram microtomizadas em ambiente criogênico de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Cryostat Leica®, Nussioc, Alemanha) na espessura de  $10\text{ }\mu\text{m}$  e alocadas em lâminas de vidro silanizadas. As lâminas preparadas foram mantidas protegidas da luz sob refrigeração de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após as 24 horas, os cortes histológicos nas lâminas foram lavados com tampão de fosfato-salino (PBS) ( $\text{NaCl}$  161,0 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  1,8 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  15,8 mM) e, em seguida, incubados com  $5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  de DHE, uma sonda para os ânions superóxidos (Sarr *et al.*, 2006), por 30 minutos, protegidos da luz, à  $37^{\circ}\text{C}$  e em estufa úmida. Após esse tempo, as amostras foram levadas para o microscópio de fluorescência (Nikon-eclipse® Ti-S. Nikon, Japão) equipado com uma câmera de captura de imagens (Nikon DS-U3 Digital camera control. Nikon, Japão).

As análises de imagens adquiridas foram analisadas pelo programa ImageJ (National Institute of Health, EUA), sendo quantificado a intensidade de fluorescência de cada anel arterial. Os dados foram expressos em porcentagem de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelo DHE do grupo CTL. Todos os experimentos desse protocolo foram feitos de maneira quadruplicada.

#### **4.6 AVALIAÇÃO SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E COAGULAÇÃO PLASMÁTICA**

O galato de etila (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi disperso em uma emulsão do tipo óleo/água, na concentração de 3% (equivalente a  $151\text{ mMol.L}^{-1}$ ). A formulação foi preparada utilizando-se de agentes solubilizantes (MCT e Cremophor), foi homogeneizada e armazenada sob refrigeração, sendo utilizada em até 7 dias. Os protocolos experimentais foram feitos com a utilização de ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com peso em torno de 300 a 350 g. Foram mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12 horas e em gaiolas plásticas de polipropileno com livre acesso à água e ração ad libitum (Nuvillab, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, Paraná, Brasil).

Os grupos de animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos diferentes: grupo controle (CTL), grupo galato de etila  $5\text{ mg.kg}^{-1}$  (GAETIL  $5\text{ mg.kg}^{-1}$ ), grupo galato de etila  $50\text{ mg.kg}^{-1}$  (GAETIL  $50\text{ mg.kg}^{-1}$ ), grupo enoxaparina  $5\text{ mg.kg}^{-1}$  (ENOX  $5\text{ mg.kg}^{-1}$ ) – anticoagulante injetável de potente atividade –, grupo enoxaparina 5



mg.kg<sup>-1</sup> + galato de etila 5 mg.kg<sup>-1</sup> (ENOX 5 mg.kg<sup>-1</sup> + GAETIL 5 mg.kg<sup>-1</sup>). Os animais foram inicialmente anestesiados via intraperitoneal com cetamina (75 mg.kg<sup>-1</sup>) e xilazina (10 mg.kg<sup>-1</sup>).

As substâncias foram administradas por via intravenosa na veia caudal e após 1h da administração foram realizados os protocolos experimentais. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, também por via intraperitoneal (Groeneveld, 2019). Decorrida 1 hora da administração das substâncias, os animais foram colocados em decúbito dorsal para serem abertos na região abdominal, foi localizada e isolada a veia cava inferior.

Em seguida, o sangue foi coletado do leito vascular e foi aliquoteado em tubos de coleta contendo citrato de sódio 3,8%. Para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) o sangue foi centrifugado a 150 g (rcf) em temperatura ambiente por 10 minutos. Outros sim, o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido a partir da centrifugação do sangue a 1500 g em temperatura ambiente por 15 minutos (DE Silva E., *et al.*, 2022).

A avaliação da agregação plaquetária das amostras foi feito com a utilização do equipamento agregômetro (Agrego, São Paulo, Brasil). Para tal, o sangue coletado, como descrito anteriormente, foi colocado em tubos de coleta contendo citrato de sódio 3,8% e centrifugados nas programações supracitadas a fim de se obter o PRP e o PPP. Para calibração foi utilizado uma cubeta com uma alíquota de 300 µl de PPP mantido por 10 minutos à 37 °C. Em seguida, cubetas com 300 µl de PRP foram utilizadas em cada um dos canais do sistema para análise de agregação plaquetária frente estímulo a um agente agregante, nesse caso foi usado ADP na concentração de 17 µmol.L<sup>-1</sup> (Chan Chh, 2020).

A avaliação das duas vias da hemostasia secundária foi feita através das metodologias de tempo de trombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), via extrínseca e via intrínseca, respectivamente. Na determinação do TP foi pipetado 50 µl do PPP em cubetas pré-aquecidas e mantidas à 37 °C por 3 minutos. Após esse período de incubação, foi adicionado à cubeta 100 µl do reagente pré-aquecido (37 °C) PT-SI (extrato liofilizado do cérebro de coelho e cloreto de cálcio), o equipamento então registrou o tempo que leva até a formação da fibrina.

Na determinação do TTPa, foi pipetado 50 µl de PPP em cubetas pré-aquecidas à 37 °C por 1 minuto, ato contínuo, foi pipetado 50 µl do reagente a-PTT-EL (extrato cloroformizado de cérebro de coelho: fosfolipídeos 0,007%, ácido elágico

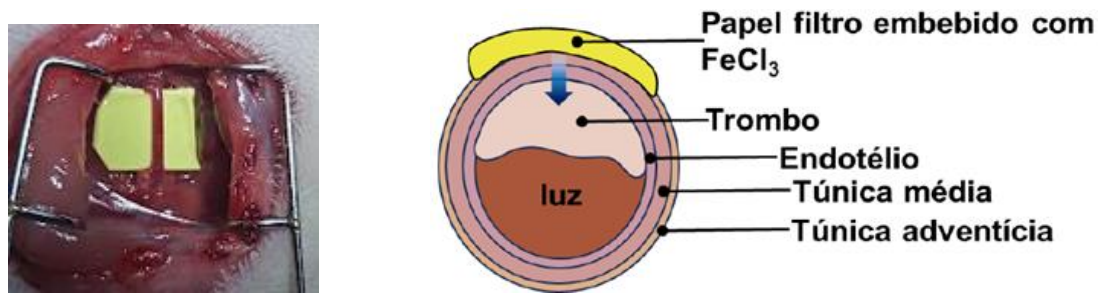
0,0037%) na cubeta e após homogeneização, a mistura foi mantida em 37°C por 3 minutos para incubação; por último, é registrado o tempo até a formação do coágulo sanguíneo segundos depois da adição de 50 µl de cloreto de cálcio pré-aquecido à 37 °C na cubeta (Harris H.M, *et al.*, 2022).

#### **4.7 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITROMBÓTICA DO GALATO DE ETILA INDUZIDO PELO CLORETO FÉRRICO (FeCl<sub>3</sub>) EM CARÓTIDA ISOLADA DE RATO.**

Após a aplicação das substâncias e da anestesia nos animais, estes foram colocados em decúbito dorsal e com uma tesoura cirúrgica uma incisão foi realizada a direita da linha medial do animal (aproximadamente 5 mm) tendo com base a traqueia, iniciando a dissecação dos tecidos e músculo esquelético até localizar a artéria carótida comum. Todo o tecido nervoso aderido à carótida e ao seu redor foi meticulosamente afastado e limpo tendo a observância de conservá-los íntegros durante o processo, de modo que a artéria ficasse completamente isolada e limpa.

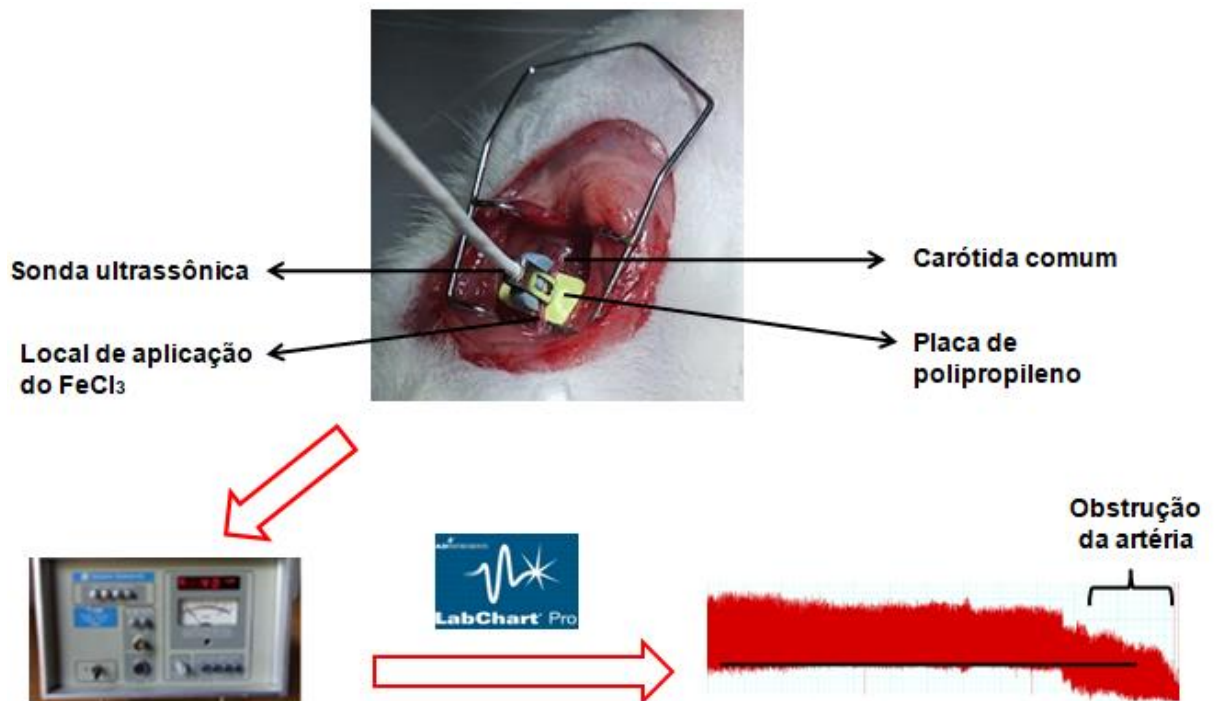
Na região superior da carótida é conectada uma sonda ultrassônica (modelo X1, ligada a um fluxômetro e ao sistema de aquisição de dados - software LabChart). Após estabilização do sistema registra-se o fluxo basal por aproximadamente 5 minutos, após isso, foi colocado um papel-filtro de 5 por 5mm por cima da artéria e adicionado sobre o papel-filtro com 10 µl de FeCl<sub>3</sub> a 40% para induzir a formação do trombo e conseqüentemente a oclusão da artéria. O tempo da colocação FeCl<sub>3</sub> e da oclusão da artéria é monitorado e aferido (Surin, *et al.*, 2010; Zakrzeska, *et al.*, 2015) Figura (5 e 6).

**Figura 5** – Obstrução arterial (visão frontal e corte em perfil).



**FONTE:** Adaptado de: 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.

**Figura 6** – Esquema do experimento de indução do trombo com cloreto férrico em artéria carótida de ratos.



**FONTE:** Autor (2024).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism® versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA) e expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (e.p.m.). As curvas concentração-resposta e o valor de  $E_{m\acute{a}x}$  (Efeito máximo expresso em % de relaxamento dos anéis arteriais) foram obtidos por regressão não-linear. A potência foi calculada como CE50 (concentração que induziu 50% da resposta máxima relaxante). Utilizou-se o teste t-Student não-pareado para comparar dois grupos e o teste de análise de variância ordinária (ANOVA) para a comparação com 3 grupos ou mais, seguido do pós-teste de Tukey. Quando o  $p < 0,05$  considera-se relevância estatística significativa entre os grupos estudados.

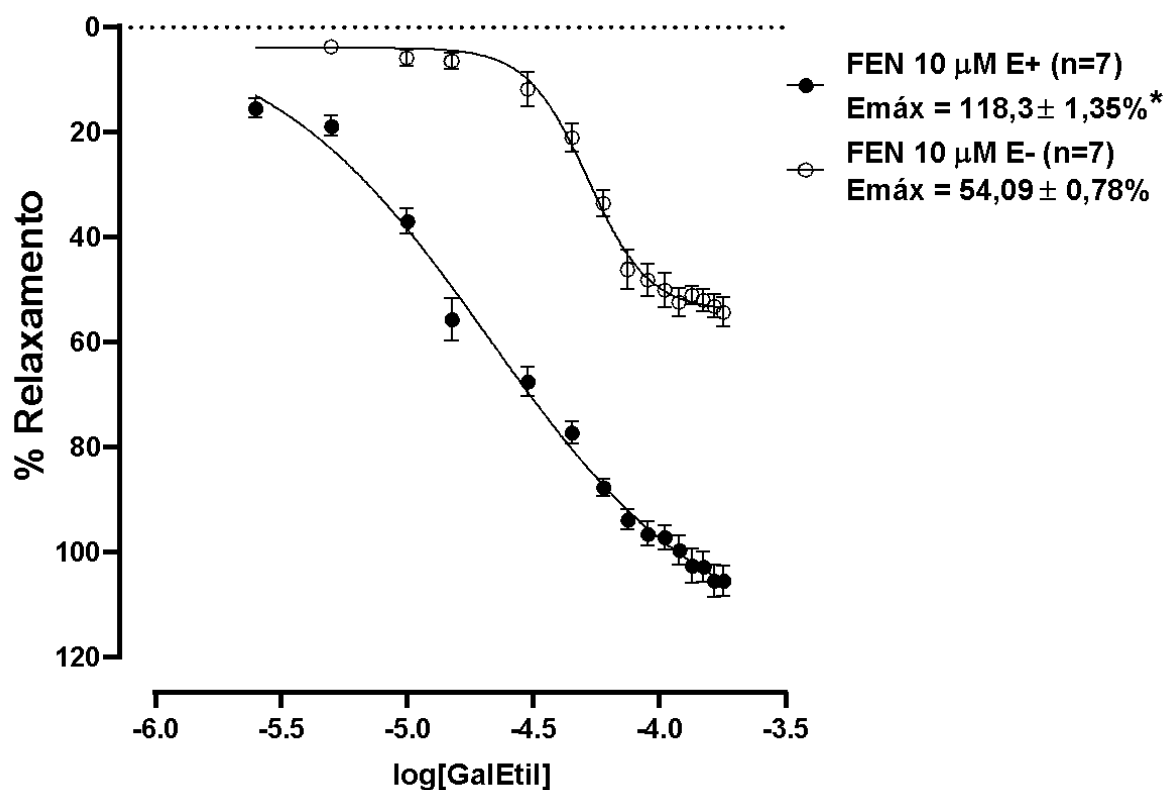


## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITOS DO GALATO DE ETILA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR

O Galato de etila induz efeito vasorelaxante dependente de endotélio em artéria mesentérica superior isolada de ratos. Após a contração induzida por Phe ( $1\mu\text{M}$ ) o galato de etila ( $0,01 - 3.000\mu\text{M}$ ) promoveu efeito vasorelaxante, em anéis com endotélio intacto ( $\text{MR} = 98.9 \pm 1.6 \%$ ;  $\text{CE}_{50} = 270 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ), de maneira dependente de concentração. Após a remoção do endotélio funcional a curva concentração-resposta para o galato de etila foi deslocada para a direita, com uma diminuição significativa do efeito vasorelaxante ( $\text{MR} = 53,6 \pm 3.8 \%$ ;  $\text{CE}_{50} = 485 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ) ( $p < 0.05$ ), sugerindo que o galato de etila induz o efeito relaxante de forma mais pronunciada com a presença do endotélio funcional (gráfico 1).

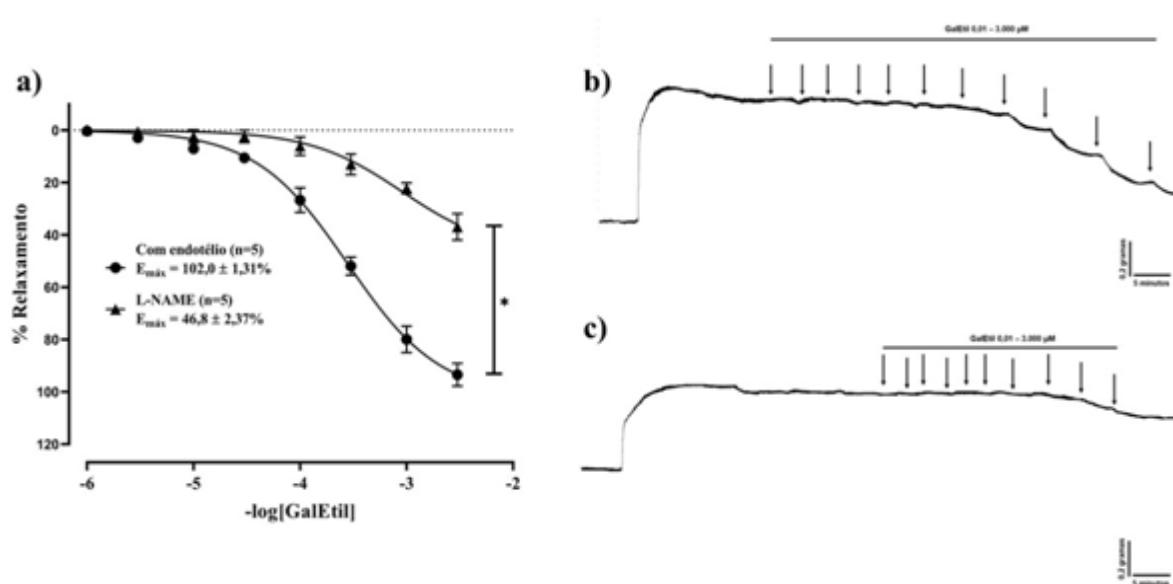
**Gráfico 1** - Curva de relaxamento de artéria com endotélio (●) e sem endotélio (○) induzida com FEN.



Fonte: Autor (2023).

O relaxamento induzido por galato de etila em artéria mesentérica superior de ratos envolve a ativação de eNOS, pois em anéis com endotélio funcional foram incubados com L-NAME, um inibidor da NOS e após este procedimento, a curva de relaxamento do galato de etila foi deslocada para a direita, com redução significativa do efeito máximo (MR =  $46.8 \pm 2.37\%$ ; n = 5), quando comparado ao controle (MR =  $98.9 \pm 1.6 \%$ ; n = 5) ( $p < 0.05$ ), sugerindo que o vasorelaxamento induzido pelo galato de etila é dependente da ativação da eNOS (gráfico2).

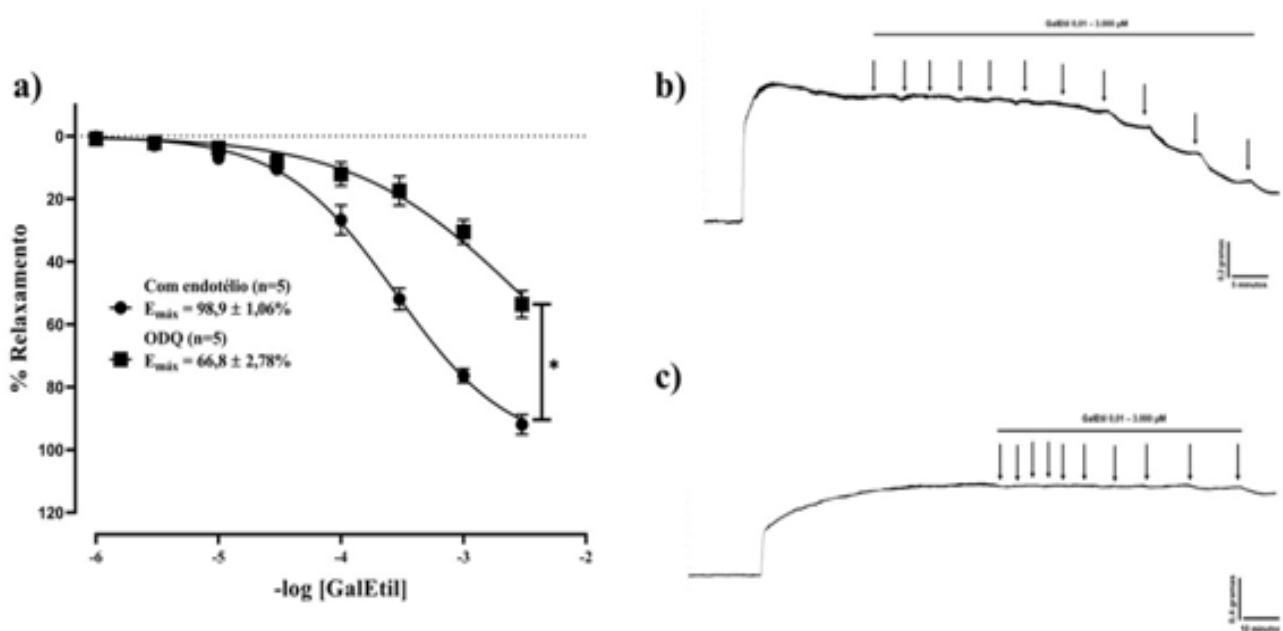
**Gráfico 2** – Gráfico das curvas concentração-resposta do galato de etila em anéis de artéria mesentérica superior de rato com endotélio funcional na presença e ausência de L-NAME. a) Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na ausência (●) e presença (▲) de L-NAME 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; b) Registro original da curva concentração-resposta do galato de etila em L-NAME; c) Registro original da curva concentração-resposta do galato de etila na presença de L-NAME. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  versus com endotélio.



**Fonte:** Autor, 2023.

Na presença do ODQ, um inibidor da enzima sCG, o efeito vasorelaxante induzido pela adição cumulativa do galato de etila em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio funcional foi atenuado significativamente, apresentando um deslocamento da curva para a direita com diminuição do efeito máximo (MR =  $66.8 \pm 2.78\%$ ; n = 5), quando comparado ao controle (MR =  $98.9 \pm 1.6\%$ ; n = 5) (gráfico 3).

**Gráfico 3** – Gráfico das curvas concentração-resposta do galato de etila em anéis de artéria mesentérica superior de rato com endotélio funcional na presença e ausência de ODQ. a) Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na ausência (●) e presença (■) de ODQ 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; b) Registro original da curva concentração-resposta do galato de etila sem ODQ; c) Registro original da curva concentração-resposta do galato de etila na presença de ODQ. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \*p<0,05 versus com endotélio.



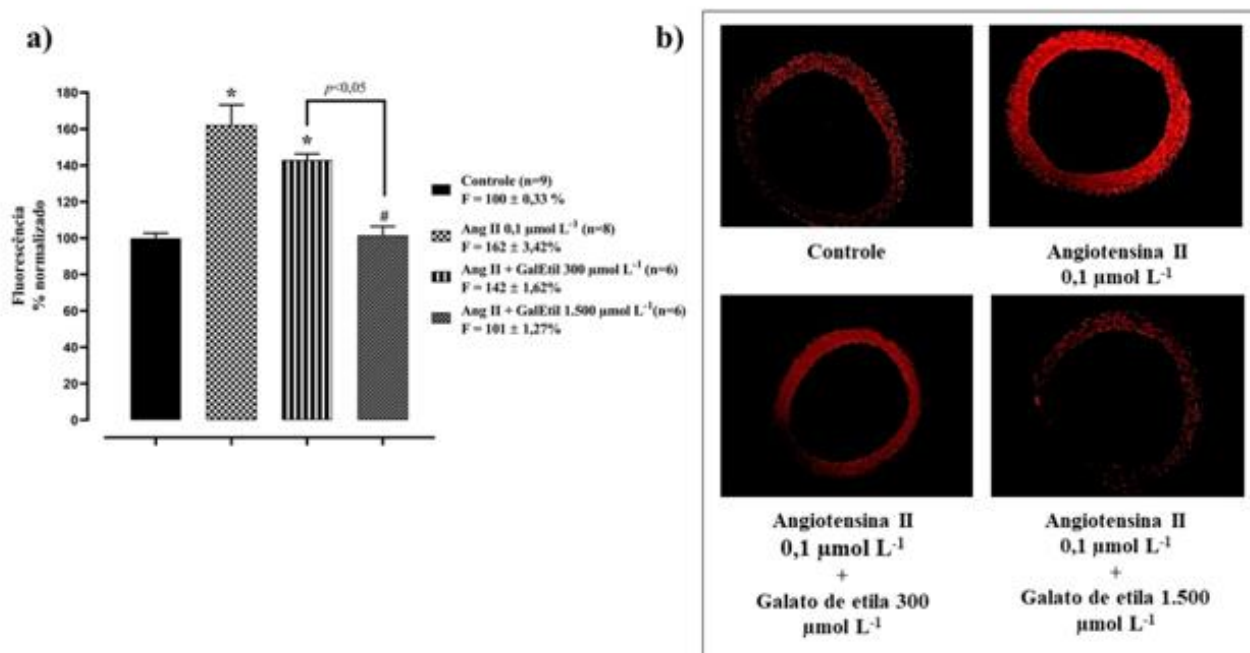
Fonte: Autor, 2023.



## 5.2 EFEITO ANTIOXIDANTE DO GALATO DE ETILA NA PRESENÇA DE ANG II EM ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR DE RATOS.

A ação antioxidante do galato de etila foi avaliada pela quantificação da intensidade de fluorescência de ânions superóxidos através da sonda DHE. A incubação com ANG II ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) induziu um aumento da intensidade de fluorescência da sonda DHE ( $162 \pm 3,42\%$ ), quando comparado ao grupo controle ( $100 \pm 0,33\%$ ). Em contrapartida, a incubação concomitante da ANG II e galato de etila na concentração de 300 ( $142 \pm 1,62\%$ ) e  $1.500 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $101 \pm 1,27\%$ ) reduziu a formação dos ânions superóxidos ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo tratado apenas com ANG II. Vale evidenciar que a concentração de  $1.500 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi capaz de reverter o efeito oxidante induzido pela ANG II (gráfico 4).

**Gráfico 4** – Gráfico e imagens do efeito antioxidante do galato de etila em artéria mesentérica de rato frente à ang. II. a) dados cumulativos das análises. Gráfico que mostra a intensidade de fluorescência normalizado pelo controle em função dos diversos grupos experimentais. O galato de etila demonstrou ter efeito antioxidante de forma concentração-dependente; b) Imagens representativas dos grupos. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  versus controle; #  $p < 0,05$  versus ANG II  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



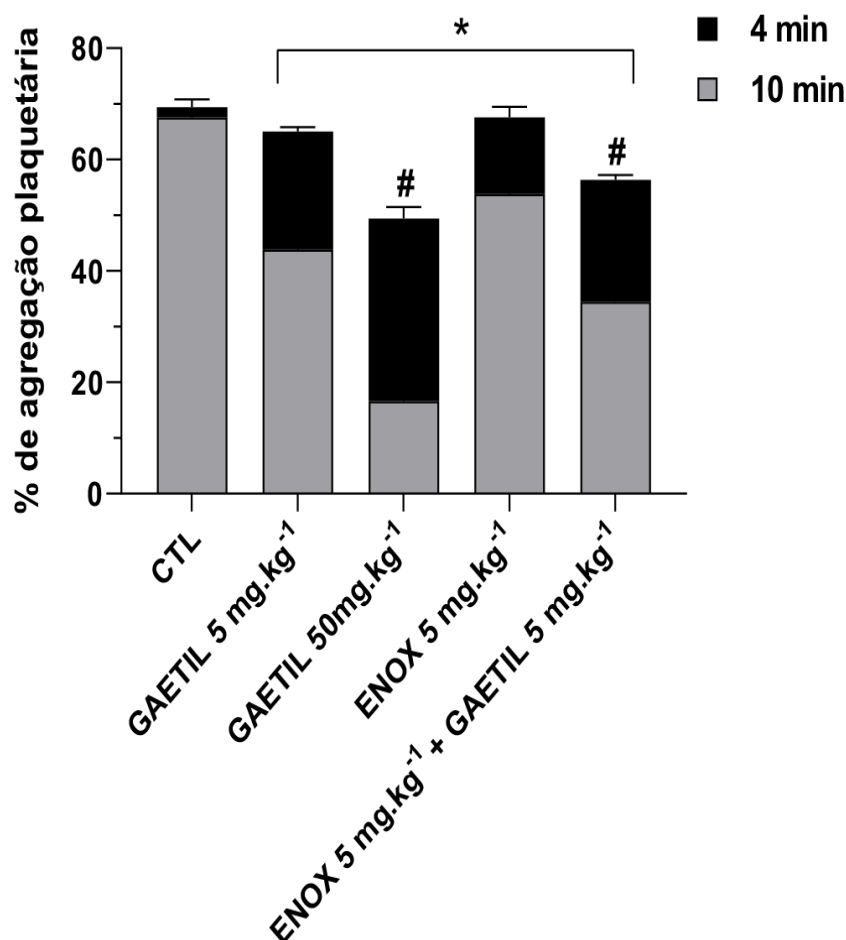
Fonte: Autor, 2023.

### 5.3 ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E ANTICOAGULANTE DO GALATO DE ETILA *IN VIVO* EM RATOS TRATADOS

Inicialmente, foi avaliado o potencial do galato de etila em reduzir a atividade de agregação plaquetária em plaquetas lavadas de rato, frente estímulo do agente agregante ADP. Após análise dos dados, foi possível observar que o galato de etila na dose de 50 mg.kg<sup>-1</sup> reduziu o percentual de agregação plaquetária quando comparado com o grupo controle, no tempo de 4 minutos após exposição ao agente agregante (49,4 ± 2,1% vs 69,4 ± 1,4%, respectivamente, p<0,05). Essa diferença não foi observada na menor dose do galato de etila (5 mg.kg<sup>-1</sup>) quando comparado ao grupo controle.

A dose de 50 mg.kg<sup>-1</sup> do galato de etila ainda apresentou uma redução significativa quando comparada ao grupo ENOX 5 mg.kg<sup>-1</sup> no mesmo tempo (49,4 ± 2,1% vs 67,6 ± 2,0 %, respectivamente). Essa diferença ainda foi vista no grupo ENOX 5 mg.kg<sup>-1</sup> + GAETIL 5 mg.kg<sup>-1</sup> que obteve menor percentual de agregação quando comparado ao grupo controle e ao grupo ENOX 5 mg.kg<sup>-1</sup> (56,3 ± 1,0% vs 69,4 ± 1,4% e 67,6 ± 2,0%, respectivamente) (gráfico 5).

**Gráfico 5** – Galato de etila reduz a agregação plaquetária e estabilidade do tampão plaquetário. Legenda: Percentual de agregação plaquetária em diferentes tempos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \* $p < 0,05$  vs CTL; # $p < 0,05$  vs GAETIL 5 mg.kg<sup>-1</sup>.



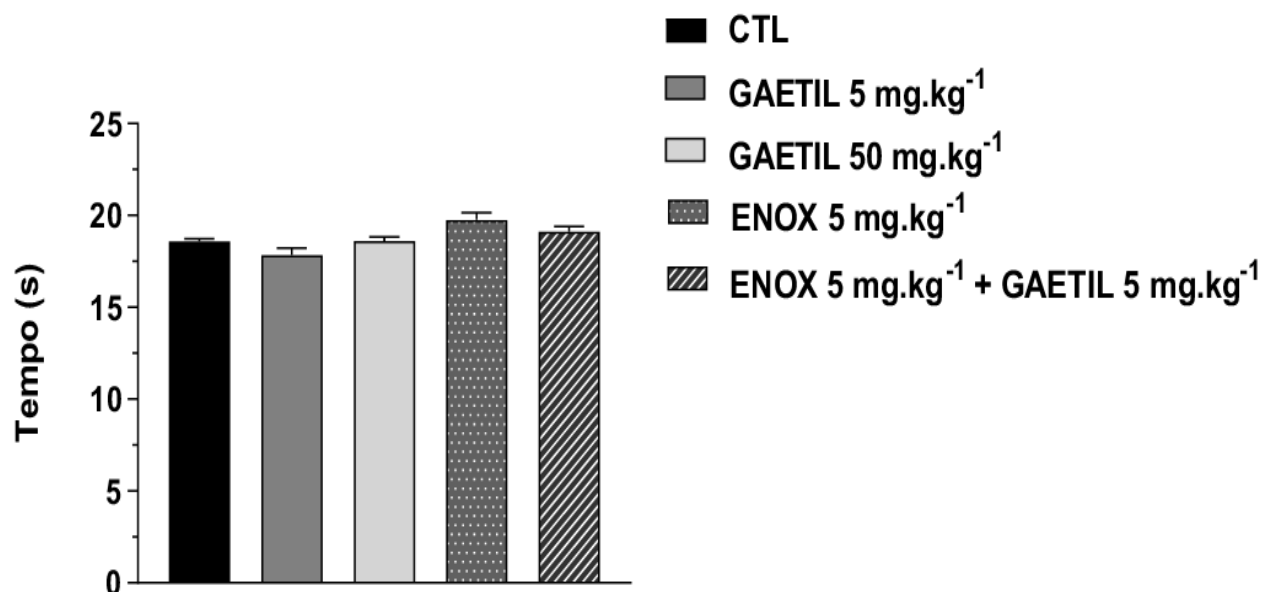
**Fonte:** Ramalho RC, *et al.*, 2024.

Já no tempo de 10 minutos, observou-se uma capacidade pronunciada do grupo galato de etila 50 mg.kg<sup>-1</sup> na redução de agregação quando comparado com todos os outros grupos. Na sua menor dose, o galato de etila também mostrou-se capaz de reduzir a agregação plaquetária, observando-se uma diferença significativa quando comparada aos grupos controle e ENOX 5 mg.kg<sup>-1</sup> ( $43,8 \pm 1,4\%$  vs  $67,6 \pm 1,2\%$  e  $53,8 \pm 3,0\%$ , respectivamente). É importante notar que o grupo onde foram usadas as doses de 5 mg.kg<sup>-1</sup> de enoxaparina + 5 mg.kg<sup>-1</sup> galato de etila, também apresentou uma diferença em relação aos grupos controle e ENOX de forma isolada, porém essa diferença não foi tão acentuada como o grupo GAETIL 50 mg.kg<sup>-1</sup>.

O potencial de redução da porcentagem de agregação plaquetária do galato de etila, em especial na dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , sendo notada uma diferença relevante nos dois tempos, 4 e 10 minutos, mostra que a substância foi capaz de modular o mecanismo de ativação das plaquetas possivelmente pela inibição das vias de ativação da hemostasia primária. As diferenças em relação ao tempo também sugerem que as plaquetas dos animais tratados com o galato de etila na dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  tinham menor capacidade de se aderirem e que o tampão parcialmente estabelecido não possuía adesão suficiente pra se manter ao longo do tempo de exposição ao ADP, notando-se essa diferença especialmente no registro após decorridos 10 minutos.

Esses resultados respaldam triagens feitas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, que demonstraram uma atividade antiagregante do galato de etila incubado em plasma de ratos frente estímulo por ADP. A respeito da avaliação do TP e TTPa, não foi notada uma diferença entre os grupos no tempo de protrombina, indicando não haver uma influência direta pela via extrínseca (via comum) (gráfico 6).

**Gráfico 6** – Galato de etila não altera a coagulação ativada pela Tromboplastina. Legenda: Avaliação do Tempo de Protrombina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM (n = 6).



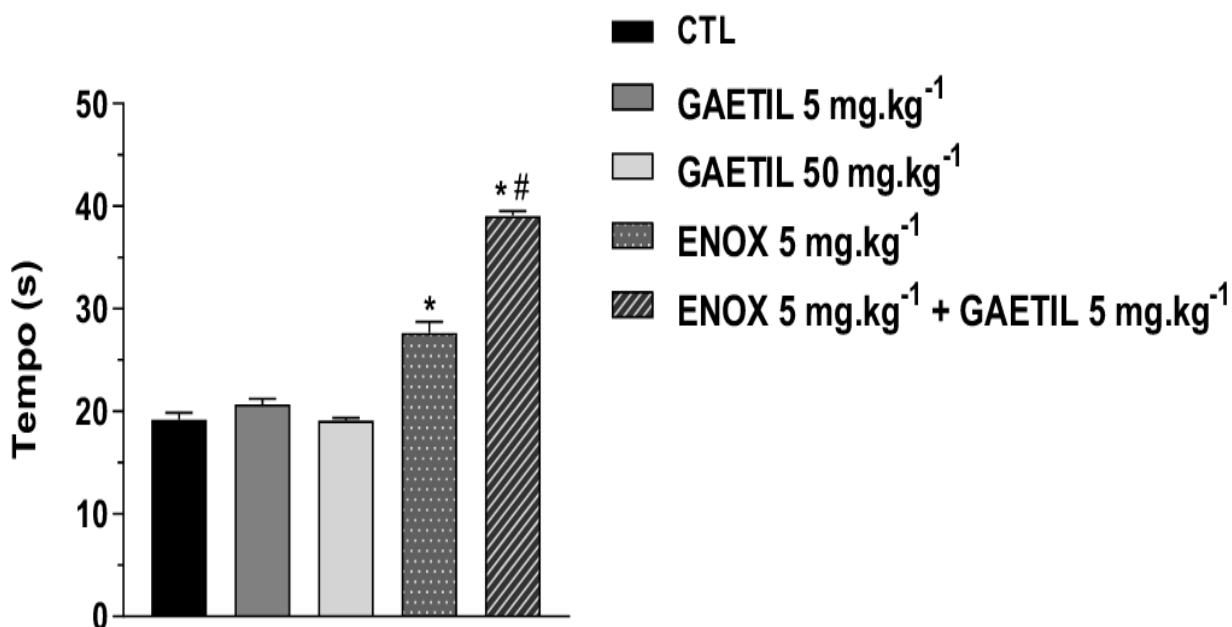
Fonte: Ramalho RC, *et al.*, 2024.

Já quando avaliado o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), foi obtida uma diferença já esperada do grupo ENOX 5 mg.kg<sup>-1</sup> quando comparado ao controle. (27,6 ± 1,1s vs 19,2 ± 0,7s, respectivamente). Interessantemente, a associação da enoxaparina 5 mg.kg<sup>-1</sup> ao galato de etila 5 mg.kg<sup>-1</sup>, apresentou uma diferença significativa em relação ao controle (39,1 ± 0,5 s vs 19,2 ± 0,7s, respectivamente) mas também em relação à enoxaparina isolada (39,1 ± 0,5 s vs 27,6 ± 1,1 s, respectivamente), demonstrando uma prolongação no tempo para formação do coágulo, indicando que de alguma forma o galato de etila na dose de 5 mg.kg<sup>-1</sup> foi capaz de ampliar a capacidade da ENOX 5 mg.kg<sup>-1</sup> em retardar o tempo para que o coágulo seja formado, sugerindo uma possível aditividade do galato de etila em relação a atividade anticoagulante da enoxaparina e implicando um importante efeito terapêutico.

Entretanto, preconiza-se uma maior investigação tendo em vista que o galato de etila, em ambas doses avaliadas, não possui efeito anticoagulante de forma isolada (Figura 3). O presente estudo demonstrou o potencial relevante do galato de etila como agente antiplaquetário. Esses resultados corroboram dados da literatura a respeito dos derivados do ácido gálico, segundo YUN-CHOI HS, *et al.* (1996), derivados alquilados do ácido gálico apresentaram efeitos antitrombóticos em ratos.

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa também sugerem uma atividade antiagregante do galato de etila frente estímulo por ADP, reforçando os resultados encontrados no atual estudo. O perfil da resposta variou de acordo com a dose utilizada, em especial no grupo GAETIL 5 mg.kg<sup>-1</sup> que não apresentou diferença significativa em relação ao controle, quando analisou-se o registro 4 minutos após a exposição ao ADP, entretanto a dose de 50 mg.kg<sup>-1</sup> do galato de etila apresentou resultados promissores em ambos tempos de registro (gráfico 7).

**Gráfico 7** – Galato de etila potencializa o efeito anticoagulante da enoxaparina. Legenda: Avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM (n = 6). \*p<0,05 vs CTL; #p<0,05 vs ENOX 5 mg.kg<sup>-1</sup>.



Fonte: Ramalho RC, *et al.*, 2024.

Constatou-se que sua atividade hemostática é voltada à inibição da agregação plaquetária, tendo em vista que a substância, quando administrada de forma isolada, não apresentou nenhuma alteração significativa no processo de coagulação, entretanto, foi possível notar que o galato de etila potencializou o efeito da enoxaparina quando administrados de forma conjunta, indicando uma alternativa para possível integração entre as substâncias, a fim de alcançar efeitos terapêuticos mais eficientes e menos tóxicos, além de possivelmente melhorar o custo-benefício da terapia anti-coagulante.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DE TROMBOSE INDUZIDA POR $\text{FeCl}_3$

Na avaliação de trombose induzida por cloreto férrico na artéria comum de ratos, foi administrado previamente por via intravenosa (IV): galato de etila (Et-Gal) 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$ , ENOX 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$  e ENOX 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$  + Et-Gal 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$  e obteve-se os seguintes tempos, em segundos (s), de oclusão (Quadro 1):

**Quadro 1** – Tempos médios de oclusão de fluxo sanguíneo induzida por cloreto férrico em carótida de ratos dos grupos estudados (n = 5).

Grupos	Dose (IV)	Tempo de oclusão médio pelo trombo
Controle	-	<b>712 ± 4 s</b>
Et-Gal	5 $\text{mg.Kg}^{-1}$	<b>1000 ± 12s * #</b>
ENOX	5 $\text{mg.Kg}^{-1}$	<b>1021 ± 10s * #</b>
ENOX + Et-Gal	5 $\text{mg.Kg}^{-1}$ 5 $\text{mg.Kg}^{-1}$	<b>1390 ± 20s *</b>

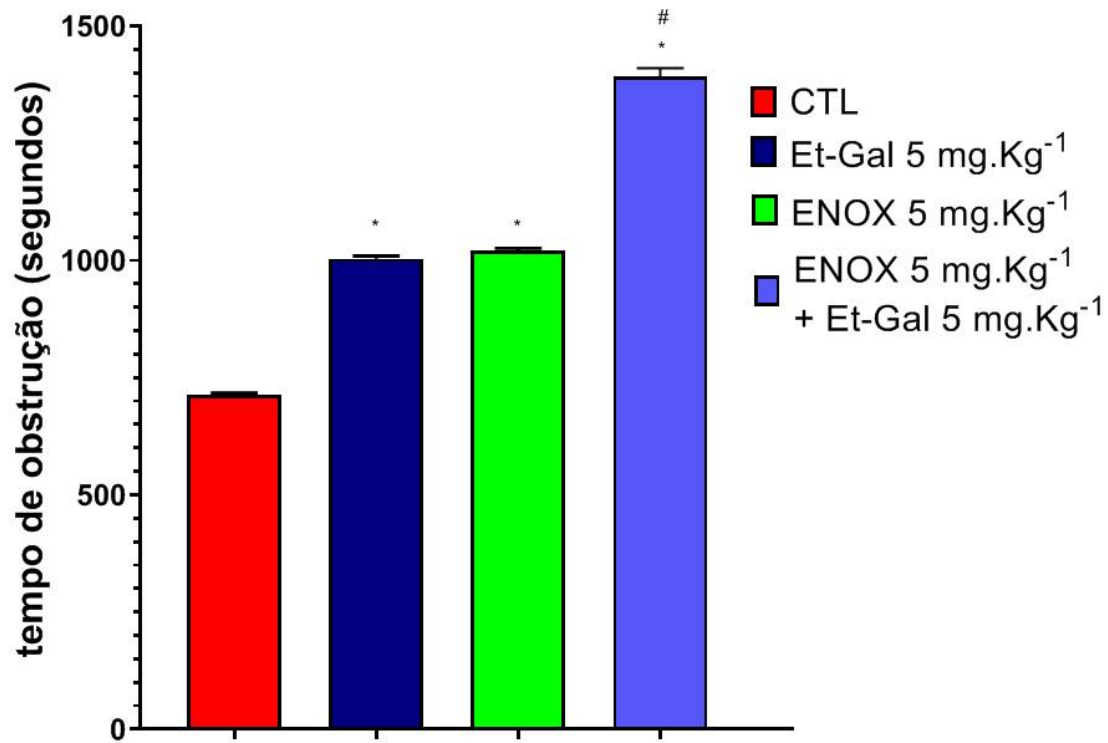
\*P < 0,05 em relação ao grupo controle; # p < 0,05 em relação ao grupo ENOX + Et-Gal

**Fonte** – Autor, 2025

Os animais que receberam o galato de etila na dose de 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$  (Et-GA) obtiveram tempo de obstrução médio superior ao grupo Controle e próximo aos que utilizaram enoxaparina 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$  (ENOX). O grupo que foi administrado em conjunto galato de etila a 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$  + enoxaparina também a 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$  (ENOX + Et-Gal) obteve o tempo de oclusão superior ao controle acima de 95%.

O uso do galato de etila concomitante com a enoxaparina gerou um sinergismo na ação antitrombótica em comparação com os demais grupos (Gráfico 8).

**Gráfico 8** - Efeito do tratamento com Galato de Etila sobre o tempo médio de obstrução da carótida comum de ratos por trombo induzido por  $\text{FeCl}_3$ . Onde \*  $p < 0,05$  x controle; #  $p < 0,05$  x ENOX 5  $\text{mg.Kg}^{-1}$  (n = 5).



Ati

Fonte – Autor, 2025





## 6 DISCUSSÃO

Fora demonstrado nesse trabalho, pela primeira vez, a capacidade do galato de etila causar vasorelaxamento em artéria mesentérica superior isolada de rato pela ativação da via sintase de óxido nítrico endotelial/óxido nítrico/ciclase de guanilil solúvel (eNOS/NO/CGs). Além disso, foi observada a atividade antioxidante desse mesmo composto frente ao estímulo oxidativo estressor da Ang II.

O galato de etila é um derivado do ácido gálico encontrado em diversas plantas e produtos alimentícios naturais, como vinhos, frutas e nozes (Ahn *et al.*, 2022), conhecido por apresentar efeitos antioxidantes (Verdam *et al.*, 2017), antiinflamatórios (Seo *et al.*, 2015) e protetores contra a aterosclerose (Liu *et al.*, 2021). Entretanto, até o presente momento não foi descrito sua ação sobre a manutenção do tônus vascular. Por outro lado, o ácido gálico em diferentes estudos tem demonstrado um efeito dual sobre leitos vasculares, onde concentrações mais baixas induziram contração e concentrações mais altas induziram relaxamento (De Oliveira, 2016; Gil-Longo, 2010). Em nosso estudo, buscou-se elucidar os mecanismos vasorelaxantes do galato de etila. Desta forma, adotou-se concentrações mais altas para avaliar o relaxamento.

De forma semelhante ao ácido gálico, o galato de etila, induziu relaxamento de maneira dependente e independente de endotélio, sendo este efeito mais potente na presença do endotélio funcional. Interessantemente, o derivado do ácido gálico em nosso estudo não alterou apenas a potência, mas também o efeito máximo, diferente dos resultados apresentados por De oliveira (2015), com o ácido gálico, que demonstrou apenas uma redução da potência após a remoção do endotélio.

O NO é uma molécula lipossolúvel que é produzida nos vasos sanguíneos a partir da eNOS presente no endotélio vascular, sendo esse um dos principais fatores relaxantes derivados do endotélio (Kraehling, *et al.*, 2017). A via eNOS/NO/CGs é uma das primeiras a ser alterada em diversas doenças, como a hipertensão, diabetes, aterosclerose e insuficiência cardíaca, desencadeando a diminuição da biodisponibilidade de NO para o músculo liso vascular e desenvolvimento das lesões vasculares associadas à essas doenças (Pober; Sessa, 2007).

De maneira intuitiva, pode-se pensar que como há perda da quantidade de NO nos vasos, a restauração desse aporte reverteria a saúde vascular. Entretanto, doadores de óxido nítrico como a nitroglicerina e o dinitrato de isossorbida

demonstram serem eficazes em curto prazo, ao passo que pioram a disfunção endotelial em longo prazo por meio da dessensibilização a esses fármacos, aumento da quantidade de agentes vasoconstritores vasculares e radicais livres e da ação da fosfodiesterase (Munzel *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001). Tais fatores combinados pioram o quadro geral das doenças supracitadas com o passar do tempo.

Dessa forma, estudos apontam que o estímulo da produção de NO a partir da ativação da via eNOS/NO/CGs em pontos mais upstream da via de sinalização molecular podem ser mais favoráveis tanto para aumentar o aporte de NO no leito vascular quanto para melhorar a saúde dos vasos lesionados em decorrência da doença (Kraehling; Sessa, 2017).

Assim, fora demonstrado neste presente estudo que o galato de etila foi capaz de induzir efeito relaxante com endotélio intacto, tendo a resposta atenuada na presença de L-NAME, o que sugere o envolvimento desta enzima no mecanismo de ação dessa substância e estímulo na produção de NO. Nossos dados corroboram com o efeito vasorelaxante mediado pelo ácido gálico (Ramos L., 2016)

A eNOS catalisa a conversão da L-arginina, na presença de cofatores, em NO. Ao se difundir pelas membranas celulares e chegar ao citoplasma do músculo liso vascular, o NO liga-se à CGs, ativando-a. Ativada, essa enzima converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de ganosina cíclico (GMPc). Esse segundo mensageiro produzido pela CGs ativa a cinase dependente de GMPc, a proteína cinase G (PKG) que fosforila diversos alvos celulares. Tais efeitos promovidos pela PKG antagonizam os do  $\text{Ca}^{2+}$  e gera a vasodilatação. (Zhao, *et al.*, 2015).

Com o intuito de avaliar se a CGs estaria participando no efeito do galato de etila, os anéis com o endotélio funcional foram encubados com o ODQ, substância que inibe de forma seletiva essa enzima no músculo liso vascular (Simplicio *et al.*, 2014). Sobre essa condição, o relaxamento induzido pelo galato de etila foi reduzido de forma considerável ( $p < 0,05$ ) em comparação aos anéis com o endotélio funcional, sendo a curva concentração-resposta que fora construída semelhante àquela feita com o L-NAME.

Esses achados cumprem o primeiro objetivo do presente trabalho, demonstrando que de fato o galato de etila exerce (pelo menos uma parte) vasorelaxamento ativando a via eNOS/NO/CGs. Esses achados também corroboram

com o que a literatura cita para o ácido gálico, molécula da qual o galato de etila se origina (De Oliveira *et al.*, 2016)

Outro fator que implica na gênese de doenças cardiovasculares ou no seu agravamento é a produção EROs tanto nas células endoteliais quanto na musculatura lisa vascular, o que contribui para a disfunção desses tecidos (Wu *et al.*, 2020). Ademais, diversos estudos mostram que o estado pró-oxidante celular está intimamente relacionado com a disfunção endotelial, principalmente pela degradação do NO e alteração química das estruturas protéicas, lipídicas e do material nucleico pelos EROS produzidos (Rajagopalan *et al.*, 1996; García-Sánchez; Miranda-Díaz; Cardona-Muñoz, 2020).

A Ang II é um dos principais hormônios que, nos vasos sanguíneos, causa o aumento dos EROS. Ao se ligar aos receptores metabotrópicos AT1 no músculo liso vascular, a Ang II acaba ativando a proteína Gq/11 que, ativada, aumentará, em última análise, a concentração de cálcio no citoplasma das células musculares lisas, o que desencadeia a contração desse tecido. De forma paralela, A ativação desse receptor também ativa a NADPH Oxidase (NOX), que é considerada uma das principais enzimas que aumenta a produção e a concentração intracelular de  $O_2^{\cdot -}$  e outras EROS (Cai; Harisson, 2000). Desta forma, avaliou-se a ação antioxidante do galato de etila frente o estresse oxidativo induzido pela Ang II através da sonda DHE.

Corroborando com dados da literatura, que relatam sua atividade sequestradora de radicais livres (Keramat *et al.*, 2023), o galato de etila foi capaz de reduzir a intensidade de fluorescência induzida por ânions superóxidos, sendo capaz de reverter a resposta oxidante induzida pela Ang II no leito mesentérico. Esse achado encaminha a presente pesquisa para investigar, futuramente, mais a fundo o envolvimento do galato de etila sobre o sistema renina-angiotensina -aldosterona (SRAA) nos vasos, já que estudos apontam que tanto o ácido gálico, alguns derivados estudados e o próprio galato de etila tem a capacidade de atuarem como antioxidante não pela ação sobre um receptor ou alvo enzimático, mas sim inativando diretamente as espécies reativas (Aruoma *et al.* 1993; Mink *et al.*, 2011; Dorovic *et al.*, 2014).

No entanto, tal efeito não elimina a possibilidade da substância em questão está, de forma única ou concomitante, atuando sobre a via de sinalização da Ang II no músculo liso vascular, já que também é visto na literatura relatos da atividade

hipotensora do ácido gálico (em modelo de hipertensão em rato) por meio do antagonismo ao SRAA, sendo isso notado pela diminuição da expressão de receptores AT1, da NOX e da enzima conversora da angiotensina 1 (ECA1) e diminuição da concentração plasmática da própria angiotensina II (Jin *et al.*, 2017). Tais efeitos embasam a premissa de que também o galato de etila poderia atuar de forma semelhante, cabendo estudos futuros para tais conclusões sobre essa molécula.

# CONCLUSÃO

---

## 7 CONCLUSÃO

Frente ao exposto, os resultados desse trabalho apontam o galato de etila como uma promissora molécula que é dotada de atividade vasorrelaxante (tanto de forma dependente como de forma independente do endotélio funcional), sendo um dos mecanismos pelo qual esse efeito é gerando a ativação da via eNOS/NO/CGs. Também, evidenciou-se a capacidade do galato de etila em antagonizar o efeito pró-oxidante da Ang II provando sua ação antioxidante.

Quanto à agregação plaquetária e a coagulação, as avaliações propostas foram capazes de elucidar a atividade antiagregante do galato de etila no sistema de emulsão, implicando um possível alvo terapêutico, foi inteirada ainda a capacidade desse derivado do ácido gálico de potencializar a atividade da enoxaparina, mostrando um potencial não só isolado mais também em terapias conjuntas com outros fármacos, podendo ser usado em formulações que reduzam a dose de medicamentos com efeitos adversos indesejados, mantendo o efeito terapêutico e possibilitando opções mais seguras, além de possivelmente baratear o valor final dessas terapias, em especial com a heparina, gerando maior custo-benefício. Os resultados promissores apresentados instigam futuras investigações da atividade do galato de etila e outros derivados do ácido gálico, tornando-os alvos interessantes no desenvolvimento de novos tratamentos.

Conclui-se, também, que o galato de etila é dotado de ação antiagregante plaquetária e antitrombótica (em doses intravenosas) pelos experimentos apresentados. Outrossim, foi constatado que a utilização em conjunto da enoxaparina e do galato de etila na mesma proporção desempenha ação antitrombótica de forma superior a administração em separado de cada molécula nos animais tratados com doses intravenosas.

## REFERÊNCIAS

---



## 8 REFERÊNCIAS

AAMER SANDOO; JET J.C.S. VELDHUIJZEN VAN ZANTEN; GEORGE S. METSIOS; DOUGLAS CARROLL; GEORGE D. KITAS, The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone, **The Open Cardiovascular of Journal**, v. 4, p.302–312, 2023.

AHN, D.; KIM, J.; NAM, G.; ZHAO, X.; KWON, J.; HWANG, J. Y.; KIM, J. K.; YOON, S. Y.; CHUNG, S. J. Ethyl Gallate Dual-Targeting PTPN6 and PPARgamma Shows Anti-Diabetic and Anti-Obese Effects. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 9, Apr 30 2022.

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.

ALAMED, J.; Chaityasit,W.; McClements, D. J.; & Decker, E. A. . Relationship between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 2969-2976, 2009.

ARUOMA, OKEZIE I. *et al.* Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1880-1885, 1993.

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.

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.

BADHANI, BHARTI; SHARMA; NEHA; KAKKAR RITA. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **Rsc Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015.

BKAILY, G.; JACQUES, D. Morphological and functional remodeling of vascular endothelium in cardiovascular diseases. **International journal of molecular sciences**, v.2 n. 3, 2023.

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

CAI HUA; HARRISON DAVID G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.

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.

CHAN M.Y.; ANDREOTTI F.; BECKER R.C. Hypercoagulable states in cardiovascular disease. **Circulation**, v. 118, p. 2286-2297. 2008.

CHANG S.S., *et al.* Gallic Acid Attenuates Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Aggregation: Involving Pathways of Akt and GSK3 $\beta$ . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 683872, 2012.

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.

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.

DA SILVA, JOSIANE FERNANDES *et al.* Protein Tyrosine Phosphatase Type 1B (PTP1B) Contributes to Atherosclerotic Processes By Mechanisms That Involve NADPH-Oxidase And Calcium Influx. **The FASEB Journal**, v. 34, n. S1, p. 1-1, 2020.

DE OLIVEIRA, L. M.; DE OLIVEIRA, T. S.; DA COSTA, R. M.; DE SOUZA GIL, E.; COSTA, E. A.; PASSAGLIA RDE, C.; FILGUEIRA, F. P.; GHEDINI, P. C. The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and -independent mechanisms. **Vascular Pharmacology**, v. 81, p. 69-74, Jun 2016.

DE OLIVEIRA, LAIS MORAES *et al.* The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and-independent mechanisms. **Vascular pharmacology**, v. 81, p. 69-74, 2016.

DAGMAR DÖRMANN, JEANNINE M. CLEMETSON, ALEXEI NAVDAEV, BEATE E. KEHREL, AND KENNETH J. CLEMETSON. Alboaggregin A activates platelets by a mechanism involving glycoprotein VI as well as glycoprotein Ib. **Hemostasis, thrombosis, and vascular biology**, v. 97, n. 4, p. 929-936, 2002.

DOROVIĆ, JELENA *et al.* Influence of different free radicals on scavenging potency of gallic acid. **Journal of molecular modeling**, v. 20, n. 7, p. 1-9, 2014.

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.

FEREIDOOON S.; PRIYATHARINI A., **Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review**, *Journal of Functional Foods*, v.18, Part B, p. 820-897, 2015.

FRANCHINI M.; MANNUCCI P.M. Venous and arterial thrombosis: different sides of the same coin? **Eur J Intern Med.**; v. 19: p. 476-481. 2008.

GALE, A. J. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. **Toxicol Pathol**, 39, n. 1, p. 273-280, Jan 2011.

GARCÍA-SÁNCHEZ, ANDRÉS; MIRANDA-DÍAZ, ALEJANDRA GUILLERMINA; CARDONA-MUÑOZ, ERNESTO GERMÁN. The role of oxidative stress in physiopathology and pharmacological treatment with pro-and antioxidant properties in chronic diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

GEERTS W.H.; BERGQVIST D.; PINEO G.F.; *et al.* Prevention of venous thromboembolism: **American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines** (8th Edition). *Chest*. 133: p. 381S-453S. 2008.

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.

GIUSEPPE LIPPI; EMMANUEL J; FAVALORO. **Venous and Arterial Thromboses: Two Sides of the Same Coin?**. *Semin Thromb Hemost* 2018; v. 44(03): p. 239-248, 2012.

HART R.G.; BENAVENTE O.; MCBRIDE R.; PEARCE L.A., Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients with atrial fibrillation: ameta-analysis. **Ann Intern Medicine**; v. 131: p. 492-501. 1999.

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.

IDRIS KHODJA, NOUREDDINE *et al.* Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e32039, 2012.

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

JERROLD H. L. *et al.* Blood and Coagulation, Pharmacology and Physiology for Anesthesia, cap. 35, 2013.

JIN, Li *et al.* Gallic acid reduces blood pressure and attenuates oxidative stress and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

JURK K.; KEHREL BEATE E.; Platelets: Physiology and Biochemistry, **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, n. 31(4): p. 381-392, 2005.

KAMATH S.; BLANN A.D.; LIP G.Y.H., Platelets and atrial fibrillation. **European Heart Journal**.; v. 22: p. 2233-2242. 2021.

KERAMAT, M.; NIAKOUSARI, M.; GOLMAKANI, M. T. Comparing the antioxidant activity of gallic acid and its alkyl esters in emulsion gel and non-gelled emulsion. **Food Chem**, v. 407, p. 135078, May 1 2023.

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.

KFOURY E.; TAHER A.; SAGHIEH S.; OTROCK Z.K.; MAHFOUZ R., The impact of inherited thrombophilia on surgery: a factor to consider before transplantation? **Mol Biol Rep**.; v. 36: p. 1041-1051. 2009

KIAT T. TAN; GREGORY Y. H. LIP, Red vs White Thrombi: Treating the Right Clot Is Crucial, **American Medical Association**, arch intern med/vol 163, 2003.

KIM, DONGSOO *et al.* Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. **Circulation**, v. 104, n. 19, p. 2338-2343, 2001.

KRAEHLING, JAN R.; SESSA; WILLIAM C. Contemporary approaches to modulating the nitric oxide–cgmp pathway in cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 120, n. 7, p. 1174-1182, 2017.

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.

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.

LAPELUSA A.; DAVE, H. D.. Physiology, Hemostasis. **National Library of Medicine, StatPearls Publishing LLC**. 2025

LIPPI G.; FAVALORO EJ.; CERVELLIN G.; **Hemostatic properties of the lymph: relationships with occlusion and thrombosis**. Semin. Thromb Hemostatic; v. 38(02): p. 213–221, 2012.

LIPPI G.; FRANCHINI M.; TARGHER G.; Arterial thrombus formation in cardiovascular disease. **National Rev Cardiology**; v. 8(09): p. 502–512, 2011.

LITVINOV, Rustem I.; WEISEL, John W. Blood clot contraction: Mechanisms, pathophysiology, and disease. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 1, p. 100023, 2023.

LIU, W.; LIU, J.; XING, S.; PAN, X.; WEI, S.; ZHOU, M.; LI, Z.; WANG, L.; BIELICKI, J. K. The benzoate plant metabolite ethyl gallate prevents cellular- and vascular-lipid accumulation in experimental models of atherosclerosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 556, p. 65-71, Jun 4 2021.

LOCATELLI, FILIPPIN-MONTEIRO, F.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p 233-239, 2013.

LORGA FILHO, A. M.; AZMUS, A.; SOEIRO, A.; QUADROS, A.; AVEZUM JUNIOR, A.; MARQUES, A.; FRANCI, A.; MANICA, A.; VOLSCHAN, A.; DE PAOLA, A.; GRECO, A.; FERREIRA, A.; SOUSA, A.; PESARO, A.; SIMÃO, A.; LOPES, A.; TIMERMAN, A.; RAMOS, A.; ALVES, B.; PORTAL, V. Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 101 n. 3, p.01–95, 2013.

LOWE G.D., Arterial disease and venous thrombosis: are they related, and if so, what should we do about it? **J Thromb Haemost.**; v. 4: p. 1882-1885. 2006.

LOWE G.D., Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. **Br J Haematol.** V. 140: p. 488-495. 2008.

MANEESAI, PUTCHARAWIPA *et al.* Butterfly Pea Flower (*Clitoria ternatea* Linn.) Extract Ameliorates Cardiovascular Dysfunction and Oxidative Stress in Nitric Oxide-Deficient Hypertensive Rats. **Antioxidants**, v. 10, n. 4, p. 523, 2021.

MANNUCCI P.M. Laboratory detection of inherited thrombophilia: a historical perspective. **Semin Thromb Hemost.**; v. 31 p. :5-10. 2009.

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

MARTINELLI I, BUCCIARELLI P.; MANNUCCI P.M. Thrombotic risk factors: basic pathophysiology. **Crit Care Med.** v. 38: S3-S9. 2010.

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.

MINK, STEVEN N. *et al.* 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*, v. 110, n. 2, p. 359-374, 2011.

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.

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.

MÜNDEL, T. *et al.* Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 11, p. 5244-5248, 1995.

NOURI, A.; HEIBATI, F.; HEIDARIAN, E. Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 394, n. 1, p. 1-9, Jan 2021.

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.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* Síntese de ésteres de aromas de frutas: Um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 1, p. 152–167, 2014.

OLIVEIRA, G. M. M.; BRANT, L. C. C.; POLANCZYK, C. A.; MALTA, D. C.; BIOLO, A.; NASCIMENTO, B. R.; SOUZA, M. DE F. M.; LORENZO, A. R. D.; FAGUNDES JÚNIOR, A. A.; SCHAAN, B. D.; SILVA, C. G.; CASTILHO, F. M.; CESENA, F. H. Y.; SOARES, G. P.; XAVIER JUNIOR, G. F.; BARRETO FILHO, J. A. S.; PASSAGLIA, L. G.; PINTO FILHO, M. M.; MACHLINE-CARRION, M.J; RIBEIRO, A. L. P. **Estatística Cardiovascular – Brasil 2023. Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 121, n. 2, p. e20240079, 2024

**ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE.** Doenças cardiovasculares. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares>. Acesso em: 20 abr. 2025.

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

PABLO-MORENO, J. A; SERRANO, L.J; REVUELTA, L; SÁNCHEZ, M.J; LIRAS, A. The vascular endothelium and coagulation: homeostasis, disease, and treatment, with a focus on the von Willebrand factor and factors VIII and V. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, p. 8283, 2022.

PANOVA-NOEVA M., BIANCA WAGNER, MARKUS NAGLER, NATALIE ARNOLD, JÜRGEN H. PROCHASKA, SUSAN ECKERLE, HENRI M. SPRONK, HILTRUD MERZENICH, ARTHUR WINGERTER, ASTRID SCHNEIDER, SVEN D., HUGO TEN CATE, JÖRG FABER & PHILIPP S. WILD. Relation between platelet

coagulant and vascular function, sex-specific analysis in adult survivors of childhood cancer compared to a population-based sample, **Scientific Reports - Nature research**,9:20090, 2019.

PAUVERT, O.; MARTHAN, R.; SAVINEAU, J.-P. **NO-induced modulation of calcium-oscillations in pulmonary vascular smooth muscle. Cell calcium**, v. 27, n. 6, p. 329-338, 2000.

POBER, JORDAN S.; SESSA, WILLIAM C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803-815, 2007.

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.

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.

RAJAGOPALAN, SANJAY *et al.* Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 8, p. 1916-1923, 1996.

RAJPUT, SHIVAM; MALVIYA, R.; SRIVASTAVA, S.; AHMAD, I.; RAB, S; UNIYAL, P. Cardiovascular Disease and Thrombosis: Intersections with the Immune System, Inflammation, and the Coagulation System. In: **Annales Pharmaceutiques Françaises**. Elsevier Masson, 2024.

RAMALHO R. C., VERAS R. C., OLIVEIRA J. C. P. L. DE, FERNANDES G. F. S., GONÇALVES T. A. F., JANEIRO D. I., MEDEIROS. A. DE, & DINIZ M. DE F. F. M., **Atividade antiagregante plaquetária e anticoagulante do galato de etila in vivo em ratos tratados. Revista Eletrônica Acervo Saúde**, 24(11), e18911. e18911.2024.

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.

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.

SARR, MAMADOU *et al.* Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 4, p. 794-802, 2006.

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, S.; MAKATSARIYA, A.; KHIZROEVA, J.; BITSADZE, V.; KAPANADZE, D., The Basic Principles of Pathophysiology of Venous Thrombosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 21, p. 11447, 2024.

SEO, C. S.; LIM, H. S.; HA, H.; JIN, S. E.; SHIN, H. K. Quantitative analysis and anti-inflammatory effects of Gleditsia sinensis thorns in RAW 264.7 macrophages and HaCaT keratinocytes. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 3, p. 4773-4781, Sep 2015.

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.

SIMPLICIO, JANAINA A.P. *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**, v. 726, p. 66-76, 2014.

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, 8582713657. 2016.

SNIECINSKI R.M.; HURSTING M.J.; PAIDAS M.J. LEVY J.H. Etiology and assessment of hypercoagulability with lessons from heparin-induced thrombocytopenia. **Anesth Analg**.;v. 112: p. 46-58. 2010.

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.

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.

TITUS, A.; MARAPPA-GANESHAN, R., Physiology Endothelin. **National Libirry of Medicine**, 2023.



VERDAM, M. C.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; DE ANDRADE, K. C.; FERNANDES, K. L.; MACHADO, T. M.; DA SILVA, F. M.; DE SOUZA, M. P.; KOOLEN, H. H.; PAULA, C. D.; HIROTA, B. C.; DE OLIVEIRA, V. B.; MIYAZAKI, C. M.; KALEGARI, M.; MIGUEL, M. D.; STUELPE-CAMPELO, P. M.; MIGUEL, O. G. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities of *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae). **ScientificWorldJournal**, v. 2017, p. 8367042, 2017.

WARKENTIN T.E.; GREINACHER A.; KOSTER A.; LINCOFF A.M., Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: **American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines** (8th Edition). Chest.; v. 133: p. 340S-380S. 2008.

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, 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**, v. 9, p. 836112, 2022.

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, YIN *et al.* Oxidative stress, GTPCH1, and endothelial nitric oxide synthase uncoupling in hypertension. **Antioxidants and Redox Signaling**, n. ja, 2020.

XU, S.; ILYAS, I.; LITTLE, P. J.; LI, H.; KAMATO, D.; ZHENG, X.; LUO, S.; LI, Z.; LIU, P.; HAN, J.; HARDING, I. C.; EBONG, E. E.; CAMERON, S. J.; STEWART, A. G.; WENG, J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies. **Pharmacological reviews**, v. 73, n. 3, p. 924-967, 2021.

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.

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, YIXUAN *et al.* NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 3, p. 170-194, 2020.

ZHAO, YINGZI; VANHOUTTE, PAUL M.; LEUNG, SUSAN WS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of pharmacological sciences**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.



## 9 ANEXOS

### 9.1 ANEXO 1 – CERTIDÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL DA UFPB SOB CERTIDÃO DE NÚMERO 9106020519.



Universidade  
Federal da  
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

#### CERTIFICADO : RELATÓRIO PARCIAL v29/04/2022

Certificamos que o RELATÓRIO PARCIAL (versão de 29/04/2022) da proposta intitulada "ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA, ANTITROMBÓTICA e VASORELAXANTE DE COMPOSTOS DE ORIGEM NATURAL E/OU SINTÉTICA", CEUA nº 9106020519 (ID 073238), sob a responsabilidade de **Robson Cavalcante Veras** - 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 vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) em 29/07/2022.

Término previsto: 12/2021

#### ANIMAIS UTILIZADOS

		Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Camundongos heterogênicos	Machos	72	1
Ratos heterogênicos	Machos	72	20

João Pessoa, 25 de janeiro de 2023

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba