

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**

**Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia**

**VANESSA GONÇALVES WOLF**

**Ácido gálico e seus ésteres como agentes anti – *Helicobacter pylori* e  
sequestradores de oxidantes produzidos por neutrófilos**

**Araraquara**

**2017**

**VANESSA GONÇALVES WOLF**

**Ácido gálico e seus ésteres como agentes anti – *Helicobacter pylori* e  
sequestradores de oxidantes produzidos por neutrófilos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Área de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

**Orientador:** Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

**Coorientador:** Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

**Araraquara**

**2017**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**W855a** Wolf, Vanessa Gonçalves  
Ácido gálico e seus ésteres como agentes anti-*Helicobacter pylori* e sequestradores de oxidantes produzidos por neutrófilos / Vanessa Gonçalves Wolf. – Araraquara, 2017.  
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Análises Clínicas.

Orientador: Valdeci Farias Ximenes.  
Coorientador: Luiz Marcos da Fonseca.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Ácido gálico. 3. Alquil galatos. 4. Neutrófilo. 5. *Burst oxidativo*. 6. NADPH oxidase. I. Ximenes, Valdeci Farias, orient. II. Fonseca, Luiz Marcos da, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

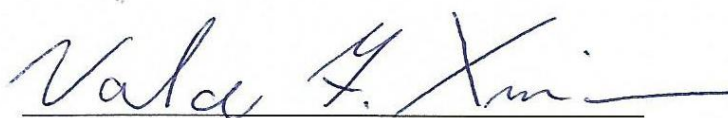
VANESSA GONÇALVES WOLF

**Ácido gálico e seus ésteres como agentes anti-Helicobacter pylori e sequestradores de oxidantes produzidos por neutrófilos**

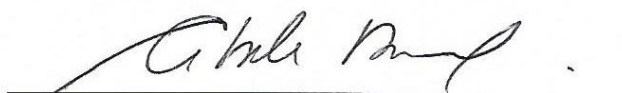
Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre (a) em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Araraquara, 22 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA



VALDECIR FARIAS XIMENES



CIBELE BONACORSI



IRACILDA ZEPPONE CARLOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hematologia Clínica e no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Araraquara.

**Fomento:** Bolsa CNPq – Mestrado (março/2015 a fevereiro/2016)  
Bolsa FAPESP – Mestrado (março/2016 a fevereiro/2017)

*“A fé e a razão constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade. Foi Deus quem colocou no coração do homem o desejo de conhecer a verdade e, em última análise, de conhecer a Ele, para que, conhecendo-O e amando-O, possa chegar também à verdade plena sobre si próprio”*

*(São João Paulo II)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por quem realizo todas as coisas em minha vida! A Ti toda honra, glória e louvor! Obrigada, Senhor, e obrigada também à Virgem Maria, por todo o sustento e fortaleza concedidos a mim em todas as áreas de minha vida! Obrigada por terem me acompanhado e completado mais esta etapa junto comigo! Minha vida sempre foi e sempre será entregue em suas mãos!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, muito obrigada por não ter medido esforços em me ajudar e orientar mesmo à distância, muito obrigada por todos os conhecimentos transmitidos e por toda a paciência e confiança despendidas para comigo, obrigada por contribuir tão grandemente à minha formação pessoal e profissional!

Ao Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca, Coorientador deste trabalho, meus sinceros agradecimentos por todo o auxílio prestado, por todo incentivo dado mesmo antes de iniciar meu mestrado, muito obrigada por sempre confiar em mim e em meu potencial, mesmo quando eu mesma talvez não acreditasse que fosse possível, muito obrigada por tudo!

À Prof. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi, por ceder o laboratório de Microbiologia clínica para a realização de parte deste trabalho e por todo o apoio dado durante sua execução.

À Prof. Dra. Cibele Bonacorsi, por não ter medido esforços em dispor de seus períodos de férias para me ensinar metodologias e me direcionar na execução deste trabalho! Não tenho nem como agradecer! Obrigada por cada ensinamento transmitido, por cada conselho dado, por todo o auxílio prestado sempre que precisei.

Ao Marcos e à Elaine, por todo o auxílio prestado na execução dos experimentos, manuseio de equipamentos e pelo apoio dado ao longo desses dois anos. Agradeço à Prof. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça e à Prof. Dra. Iracilda Zeppone Carlos pelos equipamentos disponibilizados para a realização de partes deste projeto. Agradeço também à Luiza (UNESP-Bauru) pelos procedimentos ensinados, ajuda e companheirismo nos dias que estive em Bauru; e a todos os alunos do laboratório de Microbiologia Clínica, obrigada por toda ajuda, apoio e companheirismo ao longo deste tempo de mestrado.

Agradeço de modo especial aos meus pais, Donária e Donizete, por sempre serem meu sustento e me apoiarem e todos os meus passos e decisões!! Sem vocês nenhuma conquista da minha vida teria sido possível! Obrigada por todo amor, cuidado, força, compreensão e por

me fazerem crer que tudo daria certo! Obrigada por sempre acreditarem em mim e em meu potencial! Vocês sempre foram e sempre serão meus maiores exemplos! Agradeço também aos meus queridos irmãos, Gustavo e Tiago, por todo apoio, companheirismo, força e sorrisos proporcionados em todos os momentos, amo muito vocês!

Ao meu noivo, Carlinhos, por todo amor, cuidado, paciência e compreensão dados durante mais esta etapa de minha vida. Em todos os momentos em que minhas forças pareciam acabar você estava lá, de prontidão para me sustentar. Obrigada por me oferecer seu ombro para chorar, por fazer de tudo para arrancar de mim um sorriso nos momentos em que parecia apenas haver lugar para o desespero, obrigada por sempre confiar em mim e me impulsionar a continuar caminhando, e acreditar que tudo daria certo no final, eu amo você!

Agradeço também à Edilma e ao Saú, por cuidarem de mim como uma filha e sempre torcerem por todas as minhas conquistas, e também agradeço às minhas cunhadas, Carol, Luana e Nayara por todo o apoio e torcida em cada momento.

À Tarsila e à Denise, agradeço por toda amizade, companheirismo, apoio e mesmo paciência com minhas manias, rs, vocês tornaram meus dias em Araraquara mais divertidos (afinal, fazemos parte da casa mais legal de Araraquara...haha) e amenizaram a dor da saudade da família, obrigada por tudo sempre!

Aos meus amigos e irmãos dos Grupos de Oração Universitários (GOUs) de Araraquara, bem como de todo o MUR São Carlos e RCC, o meu muito obrigada por tudo!!! Vocês sabem o quanto são essenciais em minha vida e me apresentaram uma nova família aqui em Araraquara! Obrigada a todos por todo apoio, orações, partilhas, momentos de confraternização e por terem permitido que eu vivesse junto de vocês o sonho de construir uma civilização do amor e o desejo de lutar por um mundo melhor. Amo vocês!

À todos os amigos, familiares, que torceram e me apoiaram ao longo desse caminho, e à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo nº: 130667/2015-3 (março/2015 a fevereiro/2016), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo nº: 2015/21693-0 (março/2016 a fevereiro/2017) pelo apoio financeiro na concessão das bolsas de mestrado que possibilitaram a realização deste trabalho.



## RESUMO

*Helicobacter pylori* é um dos principais causadores de gastrite crônica e úlcera péptica, e embora o mecanismo envolvido na inflamação gástrica por esta bactéria não esteja completamente elucidado, sabe-se do importante papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas por polimorfonucleares neutrófilos, que são atraídos e ativados pelo agente da infecção, sem que, entretanto, consigam debelar a mesma, mas que contribuem fortemente para a lesão tecidual e o processo inflamatório crônico. Diante disso, tem aumentado a busca de novas estratégias de tratamento que possam levar à redução do estresse oxidativo gerado no sítio da infecção, com consequente redução do processo inflamatório. Neste sentido, ácido gálico, juntamente com seus ésteres (galato de metila, propila, hexila e octila), foram utilizados neste estudo, com o objetivo de avaliar suas ações como inibidores da liberação de EROs por neutrófilos ativados, bem como seus efeitos antimicrobianos sobre *H. pylori*. Para a avaliação da atividade antioxidante dessas substâncias foram realizados ensaios livres de células (efeito supressor sobre o radical DPPH e sobre radicais peroxila), e o efeito anti-EROs foi avaliado utilizando neutrófilos isolados de sangue humano estimulados por *H. pylori*, Zymosan ou PMA, através de ensaio quimiluminescente dependente de luminol ou lucigenina, ensaio com WST-1, ensaio de inibição da produção de HOCl, e o teste do NBT. Ensaio antimicrobiano foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo. A presença da cadeia lateral carbônica levou a um significativo aumento na capacidade dos ésteres em inibir a produção de EROs por neutrófilos ativados, quando comparados ao ácido precursor, com destaque para os galatos de hexila e octila, que inibiram em quase 100% a produção de radical ânion superóxido, bem como de todas as EROs do *burst* oxidativo de forma geral. Galatos de octila e hexila também mostraram-se ser as moléculas com maior atividade antimicrobiana sobre *H. pylori*, com um valor de CIM de 125 e 250 µg/mL, respectivamente, ao passo que as demais substâncias apresentaram valor de CIM acima de 1000 µg/mL. Os resultados obtidos mostram o grande potencial dos ésteres do ácido gálico quanto à suas atividades anti-*H. pylori* e anti-EROs, e além disso demonstram a importância da presença de uma cadeia carbônica lateral, conferindo maior hidrofobicidade à molécula, para obter-se a máxima atividade antimicrobiana *in vitro* e a máxima atividade antioxidante em modelo *ex vivo*. Assim, os ésteres do ácido gálico apresentam-se como moléculas promissoras no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori*, apresentando ação antimicrobiana sobre o mesmo, bem como na redução do estresse oxidativo gerado no sítio da infecção.

**Palavras-chaves:** *Helicobacter pylori*. Ácido gálico. Alquil galatos. Neutrófilo. *Burst* oxidativo. NADPH oxidase.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is one of major cause of chronic gastritis and peptic ulcer disease, and although the mechanism involved in gastric inflammation by this bacterium is not fully understood, it is know the important role of reactive oxygen species (ROS) produced by polymorphonuclear neutrophils (PMNs), which are attracted and activated by infection agent, without, however, to be able to overcome the same, but which contribute strongly to the tissue damage and chronic inflammation. Therefore, it has increased the search for new strategies of treatment that can lead to the reduction of the oxidative stress generated at the infection site, with consequent reduction of the inflammatory process. In this sense, gallic acid, together with its esters (methyl, propyl, hexyl and octyl gallate), were used in this study, with the aim of evaluating their actions as inhibitors of ROS release by activated neutrophils, as well as their antimicrobial effects on *H. pylori*. Cell-free assays (suppressor effect on the DPPH radical and peroxy radicals) were performed to evaluate the antioxidant activity of these substances, and the anti-EROs effect was evaluated using neutrophils isolated from human blood, stimulated by *H. pylori*, Zymosan or PMA, through luminol-dependent or lucigenin-dependent chemiluminescent assay, WST-1 assay, inhibition of HOCl production assay, and the NBT assay. Antimicrobial assay was performed by broth microdilution technique. The presence of the carbonic side chain led to a significant increase in the ability of the esters to inhibit the ROS production by activated neutrophils when compared to the precursor acid, especially hexyl and octyl gallates, which inhibited practically 100% of the superoxide anion radical production, as well as all ROS of the oxidative burst in general. Octyl and hexyl gallates were also shown to be the molecules with the highest antimicrobial activity on *H. pylori*, with a MIC value of 125 and 250 µg/mL, respectively, while the other substances had a MIC value higher than 1000 µg/ml. The results show the great potential of the esters of gallic acid for their anti-*H. pylori* and anti-EROs activities, and furthermore demonstrate the importance of the presence of a lateral carbonic chain, giving greater hydrophobicity to the molecule, to obtain the maximum antimicrobial activity in vitro and the maximum antioxidant activity in an ex vivo model. Thus, esters of gallic acid are promising molecules in the treatment of *Helicobacter pylori* infection, presenting antimicrobial action on the same, as well as reducing the oxidative stress generated at the site of infection.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*. Gallic acid. Alkyl gallates. Neutrophil. Oxidative burst. NADPH oxidase.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAPH</b>	2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração efetiva de 50%
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Íons cloreto
<b>CLR</b>	<i>C-type Lectin Receptor</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribunucleico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>G0</b>	Ácido gálico
<b>G1</b>	Galato de metila
<b>G3</b>	Galato de propila
<b>G6</b>	Galato de hexila
<b>G8</b>	Galato de octila
<b>G12</b>	Galato de dodecila
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HOCl</b>	Ácido hipocloroso
<b>HP-NAP</b>	<i>H. pylori neutrophil-activating protein</i>
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>Lucigenina</b>	Nitrato de bis-N-metil acridina
<b>Luminol</b>	5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione
<b>MALT</b>	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MTT</b>	Brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio

<b>NADPH</b>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
<b>NBT</b>	<i>4-Nitro Blue Tetrazolium</i>
<b>NCCLS</b>	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
<b>NIH</b>	<i>National Institutes of Health</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Radical ânion superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxil
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>PMA</b>	Phobol 12-myristate 13-acetate
<b>PMNs</b>	Polimornucleares neutrófilos
<b>QLDLuc</b>	Quimiluminescencia dependente de lucigenina
<b>QLDLum</b>	Quimiluminescencia dependente de luminol
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TEAC</b>	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>UDO</b>	Unidade de densidade óptica
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>WST-1</b>	Sal de tetrazólio solúvel em água

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de ativação da NADPH oxidase .....	22
<b>Figura 2:</b> Produção de EROs no <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos .....	23
<b>Figura 3:</b> Redução do radical livre DPPH .....	29
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do ácido eleosteárico .....	29
<b>Figura 5:</b> Reações de quimiluminescência dependentes de luminol e de lucigenina .....	34
<b>Figura 6:</b> Capacidade de supressão do DPPH pelo ácido gálico e seus ésteres .....	39
<b>Figura 7:</b> Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres na degradação do óleo de Tungue por radical peroxila .....	41
<b>Figura 8:</b> Relação linear entre área sob a curva do teste e a do controle ( $A_t - A_c$ ) e as concentrações das substâncias testadas .....	42
<b>Figura 9:</b> Atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) do ácido gálico e seus ésteres .....	42
<b>Figura 10:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres no <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos estimulados por Zymosan. QLDLum .....	45
<b>Figura 11:</b> Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10 $\mu$ M) no <i>burst</i> oxidativo de PMNs estimulados por Zymosan (QLDLum) .....	46
<b>Figura 12:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres no <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i> . QLDLum .....	47
<b>Figura 13:</b> Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10 $\mu$ M) no <i>burst</i> oxidativo de PMNs estimulados por <i>H. pylori</i> (QLDLum) .....	48
<b>Figura 14:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres no <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos estimulados por PMA. QLDLum .....	49
<b>Figura 15:</b> Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10 $\mu$ M) no <i>burst</i> oxidativo de PMNs estimulados por PMA (QLDLum) .....	50
<b>Figura 16:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres e da apocinina na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por Zymosan. QLDLuc .....	51
<b>Figura 17:</b> Efeito inibitório da apocinina e do ácido gálico e seus ésteres (10 $\mu$ M) na produção de radical ânion superóxido em PMNs estimulados por Zymosan (QLDLuc) ...	52
<b>Figura 18:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres e da apocinina na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i> . QLDLuc .....	52

<b>Figura 19:</b> Efeito inibitório da apocinina e do ácido gálico e seus ésteres (10 µM) na produção de radical ânion superóxido em PMNs estimulados por <i>H. pylori</i> (QLDLuc) ....	53
<b>Figura 20:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres e da apocinina na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por PMA. QLDLuc .....	54
<b>Figura 21:</b> Efeito inibitório da apocinina e do ácido gálico e seus ésteres (10 µM) na produção de radical ânion superóxido em PMNs estimulados por PMA (QLDLuc) .....	55
<b>Figura 22:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por Zymosan. WST-1 .....	56
<b>Figura 23:</b> Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10 µM) na produção de radical ânion superóxido em PMNs estimulados por Zymosan (WST-1) .....	57
<b>Figura 24:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i> . WST-1 .....	57
<b>Figura 25:</b> Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10 µM) na produção de radical ânion superóxido em PMNs estimulados por <i>H. pylori</i> (WST-1) .....	58
<b>Figura 26:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por PMA. WST-1 .....	59
<b>Figura 27:</b> Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10 µM) na produção de radical ânion superóxido em PMNs estimulados por PMA (WST-1) .....	60
<b>Figura 28:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de HOCl por neutrófilos estimulados por Zymosan .....	61
<b>Figura 29:</b> Comparação do efeito do ácido gálico e seus ésteres (10 µM) na produção de HOCl em PMNs estimulados por Zymosan .....	62
<b>Figura 30:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de HOCl por neutrófilos estimulados por PMA .....	62
<b>Figura 31:</b> Comparação do efeito do ácido gálico e seus ésteres (10 µM) na produção de HOCl em PMNs estimulados por PMA .....	63
<b>Figura 32:</b> Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de HOCl por MPO .....	64
<b>Figura 33:</b> Fotomicrografias de neutrófilos isolados na presença de NBT .....	66
<b>Figura 34:</b> Efeito da estimulação por PMA em neutrófilos isolados e efeito protetor dos ésteres do ácido gálico .....	68
<b>Figura 35:</b> Inibição do crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> pelo ácido gálico e seus ésteres .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estrutura do ácido gálico e seus ésteres .....	28
<b>Tabela 2:</b> Valores de CE <sub>50</sub> (µM) do ácido gálico e seus ésteres no ensaio de supressão do DPPH .....	40
<b>Tabela 3:</b> Porcentagem de células viáveis após tratamento com ácido gálico e seus ésteres através do ensaio de exclusão do corante Azul de Tripan .....	43
<b>Tabela 4:</b> Porcentagem de células viáveis após tratamento com ácido gálico e seus ésteres através do ensaio de citotoxicidade do MTT .....	44
<b>Tabela 5:</b> Porcentagem de inibição da produção de EROs do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos por QLDLum utilizando Zymosan como estímulo .....	45
<b>Tabela 6:</b> Porcentagem de inibição da produção de EROs do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos por QLDLum utilizando <i>H. pylori</i> como estímulo .....	47
<b>Tabela 7:</b> Porcentagem de inibição da produção de EROs do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos por QLDLum utilizando PMA como estímulo .....	49
<b>Tabela 8:</b> Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por Zymosan – QLDLuc .....	51
<b>Tabela 9:</b> Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i> – QLDLuc .....	53
<b>Tabela 10:</b> Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por PMA – QLDLuc .....	54
<b>Tabela 11:</b> Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por Zymosan – WST-1 .....	56
<b>Tabela 12:</b> Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i> – WST-1 .....	58
<b>Tabela 13:</b> Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por PMA – WST-1 .....	59
<b>Tabela 14:</b> Concentração de HOCl produzido (µM) por neutrófilos estimulados por Zymosan .....	61
<b>Tabela 15:</b> Concentração de HOCl produzido (µM) por neutrófilos estimulados por PMA .....	63
<b>Tabela 16:</b> Concentração de HOCl produzido (µM) por MPO tratada com ácido gálico e seus ésteres .....	64
<b>Tabela 17:</b> Porcentagem de PMNs com presença de precipitado de formazana após	

tratamento com ácido gálico e seus ésteres (10 $\mu$ M). Teste de redução do NBT ..... 65

**Tabela 18:** Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* e valores de CIM ( $\mu$ g/mL) e CBM ( $\mu$ g/mL) obtidos para o ácido gálico e seus ésteres ..... 69



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b>	18
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
1.1 A infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	19
1.2 Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos no contexto da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	21
1.3 Ácido gálico e seus ésteres	25
<b>2 OBJETIVO GERAL</b>	27
2.1 Objetivos Específicos	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	28
3.1 Substâncias testes	28
3.2 Efeito supressor sobre o radical livre DPPH	28
3.3 Efeito supressor sobre radicais peroxila (degradação do óleo de tungue)	29
3.4 Comitê de ética para ensaio com neutrófilos isolados de sangue humano	30
3.5 Separação de PMNs por gradiente duplo de densidade	30
3.6 Teste de viabilidade celular de neutrófilos com Azul de Tripan	31
3.7 Teste de citotoxicidade do ácido gálico e seus derivados através de ensaio do MTT	31
3.8 Avaliação da inibição da produção de EROs do <i>burst</i> oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de luminol (QLDLum)	32
3.9 Avaliação da inibição da produção de EROs do <i>burst</i> oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina (QLDLuc)	33
3.10 Avaliação da inibição da produção do radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados. Ensaio WST-1	34
3.11 Inibição da produção do ácido hipocloroso: neutrófilos ativados	35
3.12 Efeito do ácido gálico e seus ésteres na atividade clorinante da mieloperoxidase	36
3.13 Teste do nitro azul de tetrazólio (NBT)	36
3.14 Ensaio para a avaliação da morfologia dos neutrófilos sob efeito da estimulação por PMA	37
3.15 Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> : crescimento do microrganismo	37
3.16 Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> : avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	37
3.17 Análise estatística	38
<b>4 RESULTADOS</b>	39
4.1 Efeito supressor sobre o radical livre DPPH	39
4.2 Efeito supressor sobre radicais peroxila (degradação do óleo de tungue)	40
4.3 Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos com Azul de Tripan	42
4.4 Teste de citotoxicidade do ácido gálico e seus derivados: Ensaio do MTT	43
4.5 Inibição da produção de EROs do <i>burst</i> oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de luminol (QLDLum)	44
4.6 Inibição da produção de EROs do <i>burst</i> oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina (QLDLuc)	50
4.7 Avaliação da inibição da produção do radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados. Ensaio WST-1	55
4.8 Inibição da produção do ácido hipocloroso: neutrófilos ativados	60

4.9 Efeito do ácido gálico e seus ésteres na atividade clorinante da mieloperoxidase	63
4.10 Teste do nitro azul de tetrazólio (NBT)	65
4.11 Avaliação da morfologia dos neutrófilos sob efeito da estimulação por PMA	67
4.12 Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> do ácido gálico e seus ésteres	69
<b>5 DISCUSSÃO</b>	70
<b>6 CONCLUSÕES</b>	80
<b>REFERÊNCIAS</b>	81
<b>ANEXO 1</b>	92
<b>CAPÍTULO II</b>	94

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A infecção por *Helicobacter pylori*

Gastrite crônica e úlceras pépticas são patologias amplamente distribuídas e estabelecidas na sociedade, e cada vez o número de casos tem aumentado. Há anos atrás se acreditava que o surgimento dessas condições patológicas era devido, apenas, ao desequilíbrio entre a quantidade de muco no estômago e a produção de suco gástrico (rico em ácido clorídrico e enzimas digestivas), associado ao uso de algumas drogas e/ou hábitos alimentares inadequados. Diante desse quadro iniciava-se um processo inflamatório, podendo progredir para uma área ulcerada. Assim, o tratamento padrão consistia em administrar medicamentos inibidores da liberação de ácidos, associados a uma dieta alimentar, para reduzir a irritação da mucosa gástrica (MAITY et al., 2003). Desde 1994, entretanto, sabe-se que este não é o principal agente causal de gastrite crônica, mas sim a infecção da mucosa gástrica pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), um bacilo espiralado Gram-negativo e microaerofílico (NIH, 1994; TOYODA et al., 2009; PANDEY et al., 2010). A prevalência de contaminação desse agente etiológico é de 25 a 50% em países desenvolvidos, sendo bem maior em países em desenvolvimento, podendo alcançar a taxa de 90% (SÁNCHEZ-ZAUCO; GIONO-CEREZO; MALDONADO-BERNAL, 2010).

A forma de transmissão da bactéria *Helicobacter pylori* ainda não é bem esclarecida na literatura (VALSTA; TAPANAINEN; MÄNNISTÖ, 2005), entretanto, acredita-se que a infecção geralmente ocorra na infância ou adolescência (VU; NG, 2000), sendo a principal forma de transmissão o contato pessoa-pessoa, especialmente através das vias fecal-oral ou oral-oral (WEBBERLEY et al., 1992). Vários estudos também têm sido desenvolvidos para investigar o papel dos alimentos na transmissão desta bactéria. Condições adequadas de umidade, temperatura e pH apropriados permitem que o *Helicobacter pylori* sobreviva em vários tipos de alimentos, como saladas, vegetais, leite e carne (MOUSAVI; SAFARPOOR-DEHKORDI; RAHIMI, 2014; YAHAGHI et al., 2014; GILANI et al., 2017).

Embora somente em 1994 o *Helicobacter pylori* tenha sido descrito como o principal agente causal da gastrite crônica e úlcera péptica, sabe-se hoje que ele coexiste com o hospedeiro humano há milhares de anos e isto tem levado esse microrganismo a desenvolver elaboradas adaptações que permitem que o mesmo permaneça no estômago, um ambiente extremamente hostil, bem como sobreviva à intensa resposta imune inata e adaptativa desencadeada (MÜLLER; OERTLI; ARNOLD, 2011). A sobrevivência do *H. pylori* frente à grande concentração de ácido clorídrico presente no estômago, deve-se ao fato de que esta

bactéria produz apreciáveis quantidades de urease, uma enzima que converte ureia em amônia, reduzindo a acidez no microambiente colonizado, e permitindo a sobrevivência e multiplicação da mesma em regiões do estômago e duodeno (SÁNCHEZ-ZAUCO; GIONO-CEREZO; MALDONADO-BERNAL, 2010).

Este microrganismo também tem desenvolvido múltiplos mecanismos de evasão da resposta imune inata e adaptativa, o que é necessário para o estabelecimento de uma infecção persistente. Dentre estes mecanismos, tem se mostrado que o *H. pylori* possui alterações em suas estruturas microbianas conservadas, como as PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*), ou seja, constituintes da parede celular (lipopolissacarídeo e peptidoglicano) e componentes flagelares (flagelinas), fazendo com que seja mais fracamente reconhecido pelas células epiteliais gástricas e pelas células da resposta imune inata, e assim, diminuindo a eficácia dessa resposta na eliminação da bactéria (ISHII et al., 2008). Um exemplo é o lipopolissacarídeo (LPS) do *H. pylori* que é constituído predominantemente por uma variedade de lipídeo A tetracilado, fazendo com que o mesmo tenha uma bioatividade reduzida em 1000 vezes quando comparado com o LPS de *E. coli* (MORAN; LINDNER; WALSH, 1997). Outro exemplo são os ligantes fucosilados apresentados pelo *H. pylori*, que são reconhecidos por receptores de lectina tipo C (CLR), mas ao invés de desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, esses ligantes tem mostrado desativar o complexo de sinalização celular, com consequente supressão da produção dessas citocinas (GRINGHUIS et al., 2009).

Apesar do *H. pylori* possuir vários mecanismos de evasão e modulação da resposta imunológica do hospedeiro, a marca da gastrite crônica causada por essa bactéria é a intensa infiltração de neutrófilos e células mononucleares na mucosa gástrica, não só nos estágios iniciais da infecção, mas também durante a fase crônica (FU, 2014). Sabe-se que o grau de dano na mucosa gástrica em pacientes infectados com *H. pylori* está associado com um aumento na infiltração de neutrófilos (WARREN; MARSHALL, 1983; FIOCCA et al., 1994) e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos mesmos (WANG et al., 2008).

Já é bem descrito, também, o papel do *H. pylori* no desenvolvimento de linfoma de alto grau no estômago e do câncer gástrico, sendo que esta foi a primeira bactéria implicada diretamente como causadora de uma neoplasia (ISAACSON; SPENCER, 1996; NAKAMURA et al., 1997; TOYODA et al., 2009). A mucosa infectada passa por uma série de lesões pré-cancerosas intermediárias, iniciando a gastrite, e seguindo com atrofia, metaplasia intestinal e eventualmente displasia (BOREIRI et al., 2013). Aproximadamente 10% dos indivíduos infectados desenvolvem lesões gástricas graves, como úlcera péptica, 1 a

3% progridem para o câncer gástrico (CIRAK; AKYON; MEGRAUD, 2007), e 0,1% desenvolvem linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) (NOTO; PEEK, 2012; PARREIRA et al., 2013; WANG et al., 2014). Estima-se que indivíduos infectados por *H. pylori* tem risco duas vezes maior para o desenvolvimento do câncer gástrico quando comparados a indivíduos não infectados (QUEIROZ et al., 2012, DEMIREL et al., 2013).

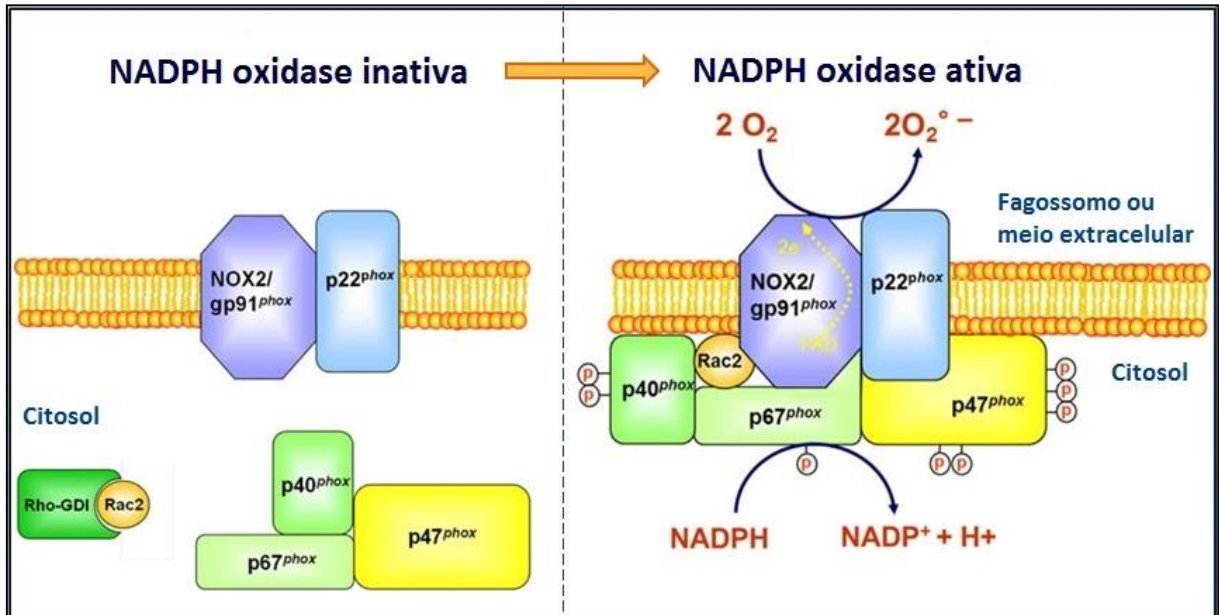
## **1.2 Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos no contexto da infecção por *Helicobacter pylori***

Os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) representam mais de 60% das células brancas circulantes em humanos (SUMMERS et al., 2010; CAIELLI; BANCHEREAU; PASCUAL, 2012), e possuem papel essencial na imunidade inata e também na regulação da imunidade adaptativa (MANTOVANI et al., 2011; MÓCSAI, 2013; NAUSEEF; BORREGAARD, 2014). Os PMNs sabidamente constituem a primeira barreira da defesa imunológica inata do hospedeiro contra a invasão por microrganismos, através do reconhecimento do patógeno e fagocitose do mesmo, processo este que desencadeia a ativação do neutrófilo, levando à liberação intra-fagossomal de peptídeos antibacterianos, protease, mieloperoxidase e radical ânion superóxido, que é produzido através da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (EL-BENNA et al, 2016). A produção de radical ânion superóxido e das outras EROs é essencial para a destruição microbiana, sendo conhecida como *burst* oxidativo ou *burst* respiratório, e consiste em uma série de eventos metabólicos que levam a um aumento no consumo de oxigênio não mitocondrial e que gera como produto inicial o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (BABIOR, 1999, 2004; EL-BENNA et al., 2016). A enzima de membrana NADPH oxidase catalisa a redução do oxigênio em radical ânion superóxido, usando como doador de elétrons a coenzima NADPH (BABIOR, 1999, 2004).

O complexo enzimático NADPH oxidase (Figura 1) é constituído por componentes citosólicos (proteínas p40phox, p47phox, p67phox, Rac1 e Rac2) e pelo componente membranar (flavocitocromo b<sub>558</sub>, composto de gp91phox e p22phox). Na célula inativa os componentes citosólicos p40phox, p47phox e p67phox encontram-se como um complexo no citoplasma, separados do componente membranar, garantindo a inatividade do sistema. Quando esta célula é exposta a um estímulo (como, por exemplo, a presença de um microrganismo), p47phox é fosforilado e o complexo citosólico migra em direção à membrana celular e interage com o flavocitocromo b<sub>558</sub>, que juntamente com as proteínas Rac2 e Rap1A formam o complexo NADPH oxidase ativo. Esse sistema, uma vez ativado,

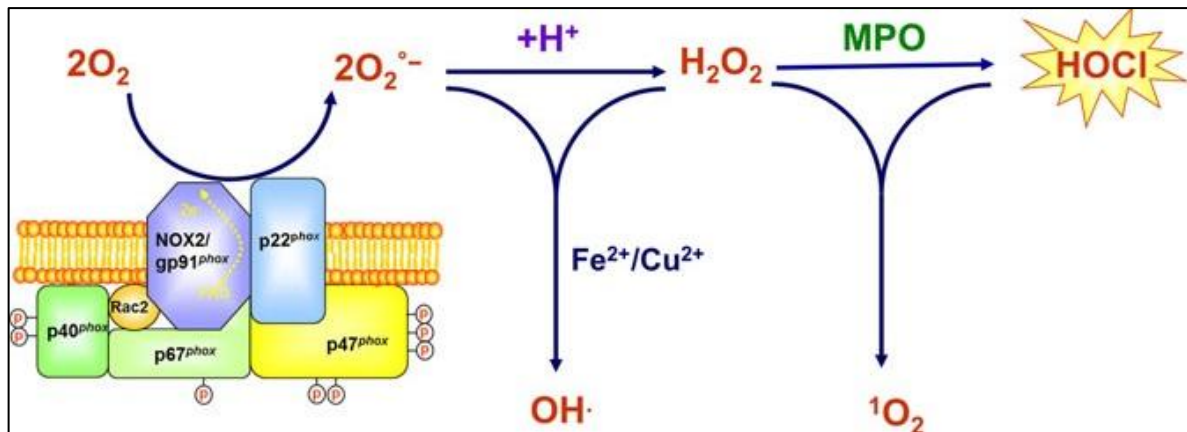
transfere elétrons da NADPH para o  $O_2$  através da flavoproteína, produzindo o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (BABIOR, 1999, 2004; EL-BENNA et al., 2016).

**Figura 1:** Mecanismo de ativação da NADPH oxidase



**Fonte:** adaptado de EL-BENNA et al., 2016

A produção de  $O_2^{\bullet-}$  é o primeiro passo de uma série de reações bioquímicas que geram uma larga variedade de EROs (Figura 2). Entre esses oxidantes estão incluídos o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), gerado pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  através de um processo espontâneo ou ativado pela superóxido dismutase (SOD). O ácido hipocloroso (HOCl) também constitui-se em uma ERO importante e é sintetizado pela ação da mieloperoxidase (MPO) sobre  $H_2O_2$ , na presença de íons  $Cl^-$ , que oxidados geram o HOCl. Outras espécies também podem ser citadas, como o oxigênio singlete, o óxido nítrico e o peroxinitrito (KITAGAWA et al., 2003).

**Figura 2:** Produção de EROs no *burst* oxidativo de neutrófilos

Fonte: EL-BENNA et al., 2016

Embora sua função seja essencial na defesa inata do organismo, o papel prejudicial dos neutrófilos em doenças de cunho inflamatório também é bem documentado (SEGEL; HALTERMAN; LICHTMAN, 2011; TAKAC; SCHRODER; BRANDES, 2012). Entre essas doenças são relatadas a aterosclerose, artrite reumatoide, falência renal, asma, mal de Alzheimer, diabetes, alergia, câncer, bem como a gastrite e úlcera associadas ao *H. pylori* (JOHNSON, 2002; JÖNSSON et al., 2011; BATTAGLIA, 2014; WCULEK; MALANCHI, 2015). Estes dados mostram a importância dos estudos para o melhor entendimento de como os neutrófilos são ativados e como essa ativação se torna excessiva, para ajudar no desenvolvimento de novos agentes que possam manter essa ativação à um nível que previna uma resposta inflamatória exacerbada, mas que permita a supressão da infecção (EL-BENNA et al., 2016).

Como já citado anteriormente, infecção por *H. pylori* ocasiona uma atração e ativação contínua de PMNs para a mucosa gástrica, sem que, com isso, a infecção seja debelada e como consequência surge no local um processo inflamatório crônico pelas substâncias bactericidas liberadas pelos neutrófilos, bem como pela contínua produção de EROs pelos mesmos (DING et al., 2007). Se não tratada, a infecção persiste e a lesão tecidual do hospedeiro contribui para a atração de mais PMNs e, dessa forma, exacerbando o processo inflamatório (DING et al., 2007; ZAIDI et al., 2012).

Vários estudos tem sido realizados para o melhor entendimento da manutenção desse intenso infiltrado neutrofílico durante todas as fases da infecção pelo *H. pylori*. Sabe-se que os neutrófilos são recrutados para a mucosa gástrica via quimiotaxia por CXCL1-3 ( $\text{GRO}\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e CXCL8 (IL-8) (YAMAOKA et al., 1998) e também através da ativação de célula endotelial, caracterizada pela superexpressão de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-



1(INNOCENTI et al., 2002; SVENSSON et al., 2009). Entretanto, tem se demonstrado que uma proteína produzida pelo próprio *H. pylori*, a HP-NAP (*H. pylori* neutrophil-activating protein), possa ser a principal responsável por esse intenso recrutamento de PMNs. A HP-NAP tem papel na adesão do neutrófilo ao endotélio, bem como aumenta significativamente a migração transendotelial dos mesmos (BRISLERT et al., 2005; POLENGHI et al., 2007). A HP-NAP atua também sobre monócitos, promovendo a sobrevivência dessas células pela estimulação da secreção de IL-1 $\beta$ , de modo que, na presença de monócitos, essa proteína poderia aumentar ainda mais o tempo de vida dos neutrófilos (CAPPON et al., 2010) e assim desempenhar papéis no desencadeamento e manutenção da inflamação gástrica através da ativação prolongada de células mielóides (FU, 2014). A HP-NAP não somente atua na manutenção do infiltrado neutrofílico na mucosa gástrica, mas também estimula a produção de EROs por estas células (EVANS et al., 1995; SATIN et al., 2000), além de induzir a síntese e liberação de várias citocinas, que juntamente com a HP-NAP induzem ainda mais a produção de EROs (FU, 2014).

Além das funções já descritas para a HP-NAP, tem se demonstrado que ela também desempenha um papel protetor sobre *H. pylori*, principalmente por prevenir danos provocados ao DNA bacteriano devido ao estresse oxidativo (FU, 2014). Provavelmente isso aconteça devido à capacidade da HP-NAP se ligar ao DNA e impedir a ação dos radicais livres sobre ele, e também por captura de íons ferro e redução do estresse oxidativo produzido por estas nas reações de Fenton (KOTTAKIS et al., 2008).

As células do hospedeiro, diante de estresse oxidativo crônico, como o que ocorre na infecção pelo *H. pylori*, agem para proteger elas mesmas do ataque por EROs, através da expressão e atividade de enzimas antioxidantes. Entretanto, já foi demonstrado que a proteína de choque térmico (HspB) produzida pelo *H. pylori* atua sobre a via de Nrf2 (fator nuclear eritróide 2) e impede que este induza a expressão de genes codificadores de numerosos antioxidantes. Assim, as células da mucosa infectada pelo *H. pylori* são impedidas de ativar sua resposta antioxidante, exacerbando o processo inflamatório gerado na mucosa gástrica (BUOMMINO et al., 2012).

Portanto, através dos mecanismos acima descritos, o *H. pylori* leva a um grande e constante recrutamento e ativação de neutrófilos, com intensa produção de EROs, sem que isto leve à sua morte devido aos seus mecanismos de proteção ao estresse oxidativo e, adicionalmente, impede que as células da mucosa gástrica se protejam do ataque pelos radicais livres gerados no *burst* respiratório. Todo esse quadro leva a uma intensa resposta inflamatória na mucosa gástrica, gerando a gastrite crônica e úlcera péptica. Portanto, o

processo inflamatório instalado não leva à morte da bactéria, e segundo alguns autores, como Fu (2014), promove até mesmo o maior crescimento do *H. pylori*, por meio da utilização, pelo mesmo, de nutrientes liberados a partir do tecido inflamado. Além disso, as EROs também parecem atuar ativamente no processo de desenvolvimento de câncer em indivíduos infectados por *H. pylori*. Bauer et al. (2014) mostraram que existe uma ação direta das EROs, produzidas no processo infeccioso, no desenvolvimento neoplásico na mucosa estomacal, e portanto, quanto maior o estresse oxidativo gerado, maior a propensão ao desenvolvimento do câncer gástrico.

### 1.3 Ácido gálico e seus ésteres

Diante deste contexto, com o papel crucial das EROs na gênese da patologia apresentada, moléculas com propriedades antioxidantes têm sido estudadas como uma terapia alternativa ou adjuvante para o tratamento da infecção pelo *H. pylori*, pela redução do nível de dano oxidativo (DUNN; COHEN; BLASER, 1997; ZAIDI et al., 2012). Associado a isso, a busca por novas moléculas com atividade anti-*Helicobacter pylori* também tem se destacado, uma vez que o tratamento padrão para a infecção consiste em uma terapia tripla, com o uso de um inibidor de bomba de próton, como o omeprazol e o antibiótico claritromicina, além de amoxicilina, metronidazol ou furazolidona; ou a associação do inibidor de bomba de próton, furazolidona e tetraciclina (COELHO; ZATERKA, 2005; MALFERTHEINER et al., 2012). Entretanto, o aparecimento de isolados de *H. pylori* resistentes a esta terapia está cada vez maior (MALFERTHEINER; SELGRAD, 2010), aumentando a necessidade da caracterização de novas moléculas com esta atividade.

Dentre os compostos antioxidantes que tem se destacado, atualmente, encontra-se o ácido gálico e seus derivados, que estão entre os maiores antioxidantes fenólicos encontrados em vinhos e chá verde (BERTELLI; DAS, 2009; BUTT; SULTAN, 2009; PAIXÃO et al., 2008). O ácido gálico é um metabólito encontrado amplamente no reino vegetal, ocorrendo em muitas plantas, como por exemplo, raízes de *Paeonia rockii* (PICERNO et al., 2011), frutos de *Syzygium cumini* (TOBAL et al., 2012), folhas, caules e raízes de variedades diferentes de *Labisa pumila* Benth (KARIMI et al., 2011), *Alchornea glandulosa* (CALVO et al., 2007), entre muitos outros. Esse ácido fitoquímico é bem conhecido pelas suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antivirais e analgésicas (BIROSOVÁ; MIKULÁSOVÁ; VAVERKOVÁ,

2005; GIFTSON; JAYANTHI; NALINI, 2009; KANG et al., 2008; KIM et al., 2006; LOPES et al., 2011).

O efeito benéfico dos seus ésteres também tem sido extensamente estudado, e, na maioria das vezes, apresentam atividade superior a do ácido gálico. Dessa forma, o laurilgalato (dodecil-galato), usado largamente como aditivo em alimentos, é mais eficiente que o ácido gálico como inibidor da xantina oxidase, uma fonte endógena de ânion superóxido e peroxidação lipídica mitocondrial induzida por Fe III – NADPH (KUBO et al., 2002). Em 2001, Kubo, Xiao e Fugita (2001) testaram a atividade antimicrobiana dos galatos de propila, octila e dodecila contra 16 microrganismos. No geral, bactérias Gram-positivas e fungos foram mais sensíveis, enquanto as bactérias Gram-negativas foram menos sensíveis aos galatos. Estudo recente também mostrou maior atividade dos ésteres do ácido gálico com cadeia carbônica de 7 a 14 carbonos contra várias espécies de fungos patogênicos (DE PAULA; SILVA et al., 2014). O metil-galato foi mais efetivo que o ácido gálico na inibição do crescimento bacteriano oral e a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* (KANG et al., 2008), e o nonil-galato foi mais efetivo que o ácido gálico na inibição do crescimento de *Salmonella choleraesuis* (KUBO; FUJITA; NIHEI, 2002). Lauril-galato, por sua vez, protegeu contra a formação de tumores na pele de ratos, induzidos por dimetilbenzoantraceno, e é citotóxico para tumores estabilizados (ORTEGA et al., 2003). Essa maior atividade foi correlacionada com as características anfifílicas dos ésteres derivados do ácido gálico, facilitando suas interações com a membrana das células, uma vez que, “*in vitro*” o potencial antioxidante é aproximadamente o mesmo que o ácido gálico (KUBO et al., 2003).

Diante do exposto, é promissora a investigação da atividade desses compostos tanto quanto à verificação de sua atividade antimicrobiana sobre *H. pylori*, quanto pela sua atividade antioxidante sobre as EROs produzidas pelos neutrófilos, e desta forma, estudando a possibilidade da utilização dessas moléculas como alternativa ou como adjuvante no tratamento da infecção pelo *H. pylori*.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-*Helicobacter pylori* do ácido gálico e seus ésteres, além de verificar a ação dos mesmos como inibidores do complexo NADPH oxidase e MPO em fagócitos, e conseqüentemente anti-EROs, por metodologia *ex vivo*, simulando, desta forma, a ação potencialmente farmacológica dessas moléculas em condições próximas a testes *in vivo*.

### 2.1 Objetivos específicos

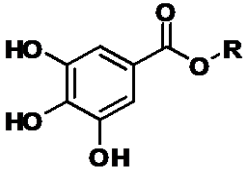
- Avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das moléculas frente à bactéria *Helicobacter pylori*.
- Avaliar a atividade inibitória do ácido gálico e seus derivados sobre as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), produzidas no *burst* oxidativo em neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos normais;
- Avaliar efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de ácido hipocloroso em neutrófilos ativados;
- Analisar o efeito do ácido gálico e seus derivados sobre a membrana dos neutrófilos frente à ativação por PMA, através de ensaios morfológicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Substâncias testes

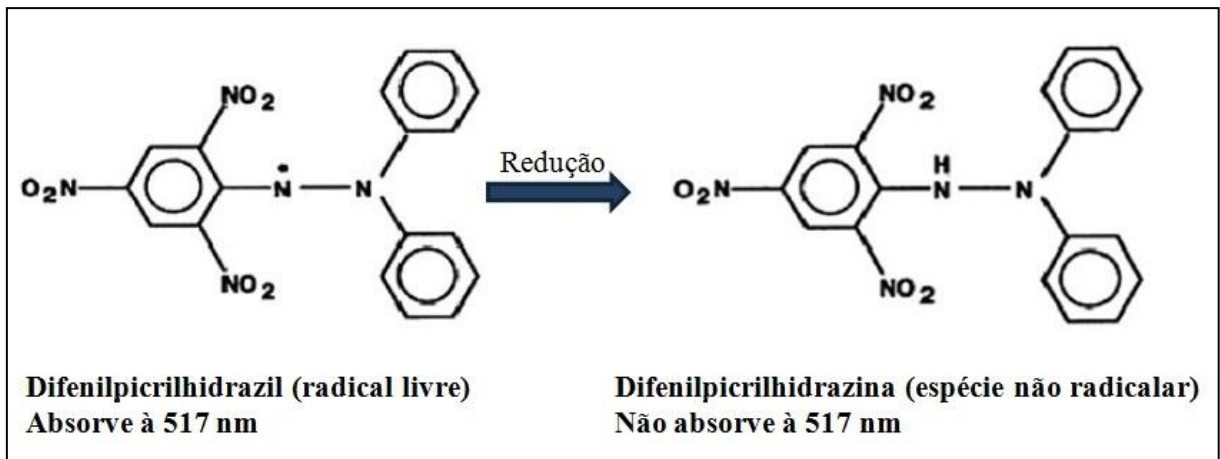
Para os testes foram utilizados o ácido gálico (G0) e seus ésteres: galato de metila (G1), propila (G3), hexila (G6), octila (G8) e dodecila (G12), todos obtidos comercialmente (Sigma). A Tabela 1 representa as estruturas químicas das substâncias estudadas.

**Tabela 1:** Estrutura do ácido gálico e seus ésteres

Sigla	Nome	R	Estrutura
G0	Ácido gálico	H	
G1	Galato de metila	CH <sub>3</sub>	
G3	Galato de propila	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
G6	Galato de hexila	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	
G8	Galato de octila	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	
G12	Galato de dodecila	(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub>	

#### 3.2 Efeito supressor sobre o radical livre DPPH

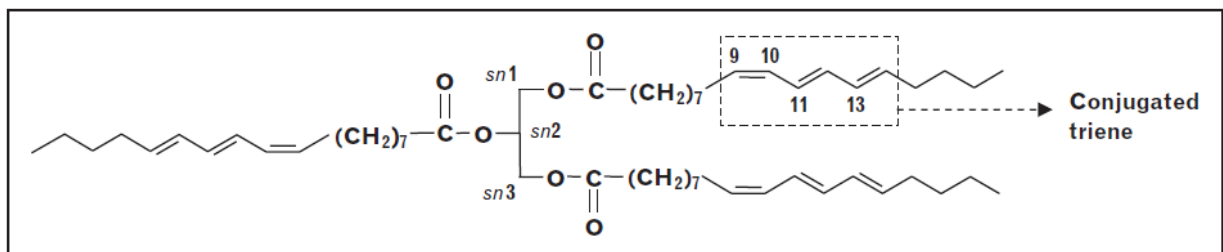
O teste sobre o radical livre DPPH baseia-se na redução do mesmo por agentes redutores (antioxidantes), que é monitorada pela diminuição de sua absorvância a 517 nm (Figura 3). As reações foram constituídas de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) 200µM em etanol e do ácido gálico e seus ésteres, nas concentrações finais de 10, 20, 30 e 40µM para G0 e de 20, 30, 40 e 50µM para os galatos. As reações foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, e então, a absorvância foi medida à 517 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV mini-1240. Etanol foi utilizado como branco e o controle foi constituído de DPPH sem a adição de antioxidantes. A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada tendo como referência a absorvância do controle. A partir das porcentagens de inibição, calculou-se a concentração eficaz necessária para a inibição de 50% do DPPH (CE<sub>50</sub>) (BRAND-WILLIANS et al., 1995 modificado por SANCHES-MORENO et al., 1998).

**Figura 3:** Redução do radical livre DPPH

Fonte: Adaptado de KEDARE, SINGH, 2011

### 3.3 Efeito supressor sobre radicais peroxila (degradação de óleo de tungue)

Este ensaio tem como princípio a degradação oxidativa do trieno conjugado presente no ácido eleostearico (Figura 4), o principal constituinte do óleo de tungue, provocada por radicais peroxila, com consequente decaimento da absorção a 273 nm (LAGUERRE et al., 2008). Este teste teve como objetivo avaliar a capacidade do ácido gálico e seus ésteres de inibirem essa degradação, e consequentemente prolongar o decaimento da absorbância do óleo de tungue.

**Figura 4:** Estrutura química do ácido eleostearico

Fonte: LAGUERRE et al., 2009

Para o teste preparou-se uma emulsão de óleo de tungue, adicionando 5mg do mesmo em 50 mL de PBS contendo 17 $\mu$ M do tensoativo Brij 35®. Esta mistura foi vigorosamente agitada até a obtenção de uma emulsão homogênea. Na sequência, 50 $\mu$ L desta emulsão foi incubada com 50  $\mu$ L de AAPH, na concentração final de 1mM (fonte de radical peroxila), PBS, e na presença do ácido gálico ou seus ésteres em diferentes concentrações (0,05 $\mu$ M –

1,6 $\mu$ M), ou ausência dos mesmos (controle). O volume final da reação foi de 250  $\mu$ L. Teste controle também foi realizado com Trolox, um conhecido antioxidante e supressor dos radicais peroxila. A reação foi realizada em placa de 96 poços por 1,5 a 2,5h, dependendo da substância. A leitura à 273 nm foi realizada em intervalos de 5 minutos, em leitor de placas Synergy 2 Multi-mode (BioTek - Winooski, VT, EUA), à 37°C. A degradação do óleo de tungue produziu curvas de absorvância x tempo, a partir das quais se calculou o valor da área sob a curva. A relação de área sob a curva do composto – área sob a curva do controle, versus a concentração de cada substância, foram plotados e os coeficientes angulares das retas foram utilizados para expressar o resultado do teste em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao trolox), no qual comparamos diretamente a atividade antioxidante das amostras com a atividade antioxidante do trolox.

### **3.4 Comitê de ética para ensaio com neutrófilos isolados de sangue humano**

O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Campus de Araraquara), autorizando a coleta de sangue humano conforme documento apresentado no Anexo1.

### **3.5 Separação de PMNs por gradiente duplo de densidade**

Os polimorfonucleares neutrófilos foram obtidos a partir de sangue humano e separados das demais células sanguíneas por gradiente duplo de densidade em *Ficoll Hypaque*, segundo as instruções do fabricante. O método utiliza HISTOPAQUE®-1119 e HISTOPAQUE®-1077 (Sigma), e assim, permite a separação das células mononucleares e polimorfonucleares (BOYUM, 1968).

Para a separação foram adicionados em um falcon estéril, 3 mL de HISTOPAQUE®-1119, e cuidadosamente foram acrescentados 3 mL de HISTOPAQUE®-1077, e 6mL de sangue total, seguidos da centrifugação do falcon a 2500 rpm por 40 minutos. Após a ycentrifugação, a camada superior, composta de células mononucleadas, foi aspirada e desprezada. A segunda camada, composta de polimorfonucleares foi transferida para outro tubo falcon estéril e lavada duas vezes com 10 mL de PBS. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS suplementado (10 mL de PBS acrescentado de 100  $\mu$ L solução de glicose (100 mg/mL), 100  $\mu$ L de solução de cloreto de magnésio (50 mM) e 100  $\mu$ L de solução de cloreto de cálcio (100 mM). Realizou-se, então, a

contagem das células em câmara de Neubauer, e a suspensão celular foi ajustada para a concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL.

### **3.6 Teste de viabilidade celular de neutrófilos com Azul de Tripán**

O teste de exclusão do corante Azul de Tripán baseia-se no princípio de que somente as células vivas e, portanto, com a membrana íntegra, conseguem repelir o corante azul de Tripán, permanecendo brilhantes e transparentes quando observadas ao microscópio, enquanto as células mortas apresentam-se coradas em azul, devido à perda da integridade de sua membrana e à consequente entrada do corante.

Para a realização do teste,  $1 \times 10^6$  células/mL da suspensão de PMNs foram incubadas com ácido gálico e seus ésteres nas concentrações finais de 0,1; 1,0; 10,0 e 100  $\mu$ M, durante 90 minutos. Controle de morte foi realizado incubando as células com DMSO a 20%, bem como o controle negativo consistiu na incubação das células em tampão PBS suplementado, na ausência das substâncias testes. Transcorrido o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 50  $\mu$ L de PBS suplementado. À 20  $\mu$ L desta suspensão de PMNs tratados, foram adicionados 20  $\mu$ L de solução de Azul de Tripán a 0,04%, e após 5 minutos de repouso em temperatura ambiente, 200 células foram contadas em câmara de Neubauer, e a porcentagem de células viáveis foi definida através da fórmula:

$$\% \text{ Células viáveis} = [\text{células vivas} / (\text{células vivas} + \text{células mortas})] \times 100$$

### **3.7 Teste de citotoxicidade do ácido gálico e seus derivados através do ensaio do MTT**

O ensaio do MTT (brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), baseia-se na redução do sal tetrazólico em seu derivado azul de formazana, que consiste em um precipitado formado como produto da respiração mitocondrial, pela ação da enzima succinato desidrogenase, avaliando, portanto, a sobrevivência e proliferação celular, uma vez que a conversão do MTT em formazana ocorre somente em células vivas e a quantidade do precipitado é proporcional ao número de células vivas (DENIZOT; LANG, 1986; GERLIER; THOMASSET, 1986; FERRARI; FORNASIERO et al., 1990). O precipitado de formazana pode ser solubilizado com a adição de um solvente orgânico, o que pode ser observado pelo desenvolvimento de coloração azul ao meio (DENIZOT; LANG, 1986).



Inicialmente, assim como no teste com o corante Azul de Tripán,  $1 \times 10^6$  células/mL da suspensão de PMNs foram incubadas com ácido gálico e seus ésteres nas concentrações finais de 0,1; 1,0; 10,0 e 100  $\mu\text{M}$ , em um volume final de 500  $\mu\text{L}$  em PBS suplementado, durante 90 minutos. Controle de morte foi realizado incubando as células com DMSO a 20%, bem como o controle negativo consistiu na incubação das células em tampão PBS suplementado, na ausência das substâncias testes. Transcorrido este período de incubação, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com tampão PBS. Na sequência as células foram ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (1 mg/mL) e incubadas à 37°C por 3 horas, e após a incubação seguiu-se nova centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Os cristais de formazana foram solubilizados com adição 150  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Após agitação vigorosa, 100  $\mu\text{L}$  das soluções foram transferidas para placa de 96 poços e leitura espectrofotométrica foi realizada à 570 e 630 nm em leitor de placas ELx800™ Absorbance Reader (BioTek - Winooski, VT, EUA). A leitura realizada à 630 nm teve como objetivo eliminar a absorvância correspondente a materiais particulados, que poderiam estar presentes no meio, sendo, portanto, descontada da leitura à 570 nm.

A porcentagem de células viáveis foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ Células viáveis} = \text{média do teste} \times 100 / \text{média do controle negativo.}$$

### **3.8 Avaliação da inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de luminol (QLDLum)**

O princípio do método consiste na oxidação do luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione), com conseqüente produção de quimiluminescência, através das EROs produzidas no *burst* oxidativo (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radical ânion superóxido e mesmo o oxigênio singlete), na presença de um catalisador, neste caso, a MPO, presente nos neutrófilos (Figura 5). Em soluções tamponadas e na presença de MPO, o monoânion luminol é univalentemente oxidado por uma variedade de oxidantes (neste caso, as EROs), e então, o radical superóxido é introduzido, produzindo um alfa-hidroxi-peróxido. Posteriormente, ocorre uma adição intramolecular e formação de um endoperóxido, seguida da liberação de  $\text{N}_2$  e formação de aminoftalato no estado eletronicamente excitado, que ao decair para o estado fundamental, produz luminescência (SANTOS; SANTOS; COSTA,

1993). Assim, o ensaio quimiluminescente dependente de luminol foi utilizado para a detecção de todas as EROs produzidas no *burst* oxidativo, indistintamente.

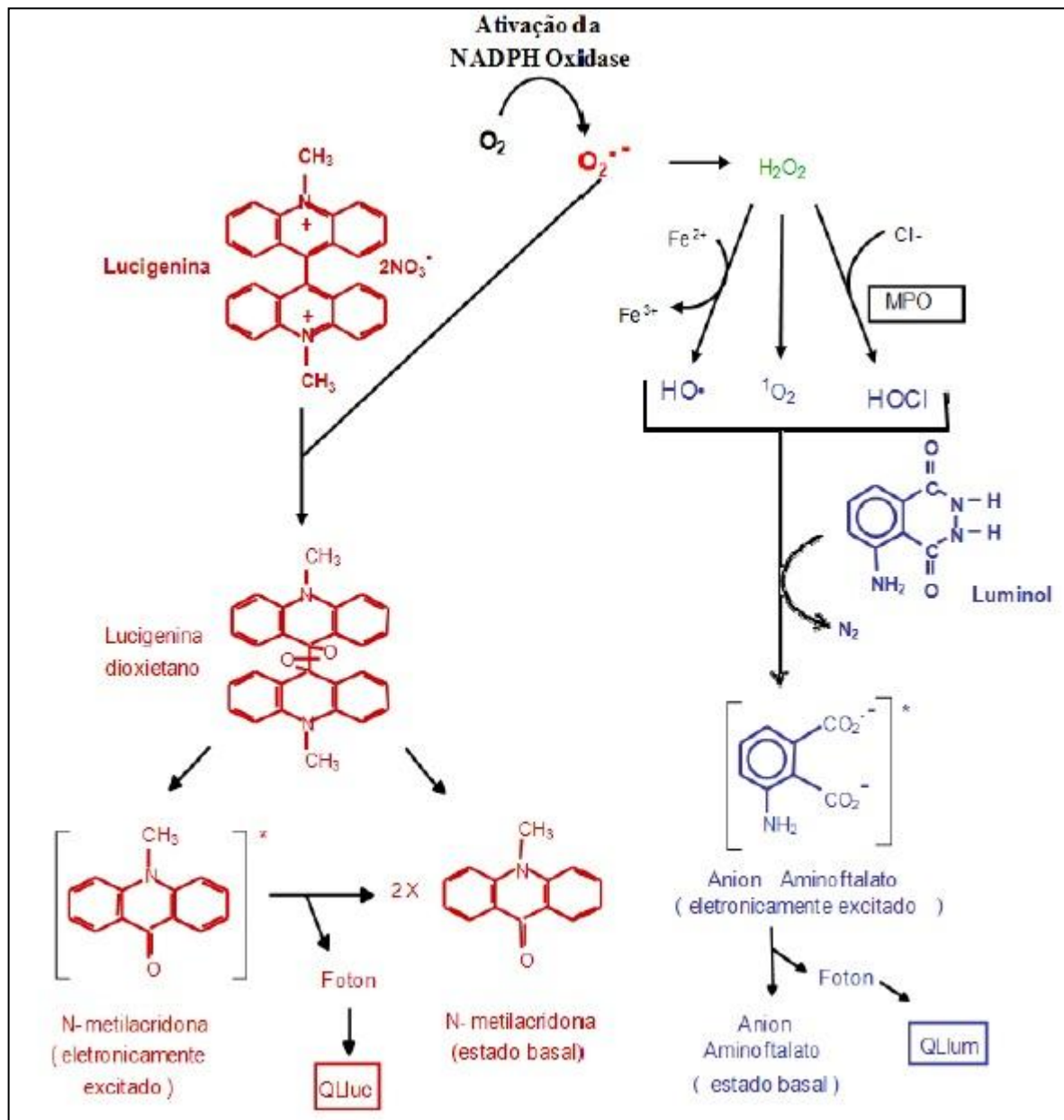
Para a realização do teste adicionou-se à placa de leitura: tampão PBS suplementado, suspensão celular de neutrófilos ( $1 \times 10^6$  células/mL), luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M), as substâncias testadas (ácido gálico e seus ésteres) nas concentrações finais de 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e o estímulo do *burst* oxidativo: suspensão de *H. pylori* a 0,2 UDO, Zymozan (1 mg/mL) ou PMA (0,1  $\mu$ M). O volume final da reação foi de 250  $\mu$ L. O monitoramento da reação foi iniciado após o posicionamento da placa na câmara de leitura do luminômetro Synergy 2 – BioTek e o tempo de reação foi de 90 minutos para a bactéria e o Zymozan e de 30 minutos para o PMA (KITAGAWA et al., 2003; GALICE et al., 2006).

### **3.9 Avaliação da inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina (QLDLuc)**

O ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina (Nitrato de bis-*N*-metil acridina) foi utilizado para quantificar especificamente a geração do radical ânion superóxido no *burst* oxidativo. O princípio do método consiste na redução da lucigenina a seu radical cátion lucigenina e a reação deste com o ânion superóxido, formando um dióxetano que se quebra decompondo-se em duas moléculas de acridina, uma eletronicamente excitada e que emite luz ao voltar ao seu estado fundamental (Figura 5) (ALLEN, 1986; FAULKNER; FRIDOVICH, 1993).

Para a realização dos ensaios foram adicionados à placa de leitura: tampão PBS suplementado, suspensão de neutrófilos ( $1 \times 10^6$  células/mL), lucigenina ( $1 \times 10^{-5}$  M), ácido gálico e seus ésteres nas concentrações finais de 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, e o estímulo do “burst” oxidativo: suspensão de *H. pylori* a 0,2 UDO, Zymozan (1 mg/mL) ou PMA (0,1  $\mu$ M). O volume final da reação foi de 250  $\mu$ L. Neste ensaio também utilizou-se como controle uma substância conhecida por inibir a NADPH – oxidase e, portanto, inibir a formação de ânion superóxido, a apocinina. O monitoramento da reação foi iniciado após o posicionamento da placa na câmara de leitura do luminômetro Synergy 2 – BioTek e o tempo de reação foi de 90 minutos para a bactéria e o Zymozan e de 30 minutos para o PMA (KITAGAWA et al., 2003; KANEGAE et al., 2007).

**Figura 5:** Reações de quimiluminescência dependentes de luminol e de lucigenina



Fonte: Adaptado de FIGUEIREDO, 2010

### 3.10 Avaliação da inibição da produção de radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados. Ensaio WST-1

Ensaio realizado segundo Tan e Berridge (2000), com alterações, com o objetivo de avaliar o efeito inibitório dos galatos sobre a produção de radical ânion superóxido por neutrófilos. O princípio do método consiste na redução do sal de tetrazólio, WST-1, pelo

radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados, produzindo formazana solúvel em água (TAN; BERRIDGE, 2000).

Para a realização do teste, suspensão de PMNs ( $1,0 \times 10^6$ ) foi pré-incubada com o ácido gálico e seus ésteres nas concentrações finais de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  em PBS suplementado, durante 10 minutos à 37°C. Adicionou-se, então, WST-1 (500  $\mu\text{M}$ ) e PMA (0,1  $\mu\text{M}$ ), Zymosan (1 mg/mL) ou *H. pylori* (0,2 UDO) como estímulo da produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , e leitura espectrofotométrica a 450 nm foi realizada após 30 minutos de incubação para PMA e 90 minutos para Zymosan e *H. pylori*, utilizando leitor de placas ELx800™ Absorbance Reader (BioTek – Winooski, VT, EUA). O volume final de reação foi de 250  $\mu\text{L}$ . A porcentagem de inibição foi calculada baseada na absorbância do controle positivo, no qual os PMNs foram estimulados e incubados na ausência das substâncias testes.

### **3.11 Inibição da produção de ácido hipocloroso: neutrófilos ativados**

A determinação da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados foi baseada na reação do HOCl com taurina, formando taurina cloramina, que por sua vez oxida a 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB), produzindo coloração azulada de forma proporcional à concentração de HOCl (MALLE et al., 2007). A mieloperoxidase e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  são oriundos de PMNs estimulados com PMA ou Zymosan.

A suspensão de PMNs ( $2 \times 10^6$  células/mL) foi pré-incubada a 37°C durante 10 minutos em PBS suplementado contendo 10 mM de taurina, e o ácido gálico ou seus ésteres nas concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ . Em seguida as células foram estimuladas pela adição de PMA (0,1  $\mu\text{M}$ ) ou zymosan (1mg/mL) e incubadas a 37°C durante mais 30 minutos para o PMA e 90 minutos para o Zymosan. O volume final da reação foi de 250  $\mu\text{L}$ . A reação foi interrompida pela adição de catalase (1mg/mL) e os tubos de reação foram centrifugados a 4000 rpm. Então, 200 $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e solução de TMB foi adicionada. O efeito dos galatos na produção de HOCl foi calculado baseado na quantidade de taurina cloramina produzida no controle positivo (células estimuladas por PMA ou Zymosan na ausência das substâncias testes), e o resultado foi expresso em concentração de HOCl produzido, calculada a partir de uma curva padrão gerada pelo uso HOCl puro e submetido ao mesmo procedimento. A absorbância foi medida a 630 nm em leitor de placas ELx800™ Absorbance Reader (BioTek – Winooski, VT, EUA), e comparada com a do controle.

### 3.12 Efeito do ácido gálico e seus ésteres na atividade clorinante da mieloperoxidase

Este teste possui o mesmo princípio apresentado no teste anterior, determinando a atividade clorinante da MPO através da quantidade de HOCl produzida, com a diferença de que este ensaio foi realizado na ausência de neutrófilos, e o HOCl foi gerado pela adição direta da enzima MPO pura e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços, pela adição de PBS, taurina (10 mM), MPO pura (10 nM), e as substâncias testes (G0, G3 e G8) nas concentrações de 0,1 µM, 1 µM, 10 µM. A reação foi disparada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) e a placa foi incubada por 30 min à 37°C. Transcorrido este tempo, a reação foi interrompida pela adição de catalase (1mg/mL), solução de TMB foi adicionada e leitura espectrofotométrica foi realizada a 630 nm em leitor de placas ELx800™ Absorbance Reader (BioTek – Winooski, VT, EUA). O efeito dos galatos na produção de HOCl foi calculado baseado na quantidade de taurina cloramina produzida no controle positivo (incubação de MPO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ausência das substâncias testes) e o resultado foi expresso em concentração de HOCl produzida, calculada a partir de uma curva padrão gerada pelo uso HOCl puro e submetido ao mesmo procedimento.

### 3.13 Teste do Nitro Azul de Tetrazólio (NBT)

Para a avaliação do efeito do ácido gálico e seus derivados sobre a atividade oxidativa produzida pelas EROs, também foi realizado o ensaio do NBT. Neste ensaio, a atividade oxidativa é medida pela presença de precipitados negros de formazana no citoplasma do neutrófilo, devido à redução do NBT pelo radical ânion superóxido.

Para a realização do teste, adicionou-se a microtubos: PMNs (1x10<sup>6</sup> células/mL), tampão PBS suplementado, PMA (0,1 µM) como estímulo do “burst” oxidativo, e ácido gálico ou seus ésteres na concentração de 10 µM. O volume final de reação foi de 250 µL. Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se solução de NBT, seguida de incubação por mais 30 minutos em temperatura ambiente (CIARLINI et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2009). Transcorrido este tempo foram confeccionadas lâminas com a centrífuga CitoSpin, obtendo-se uma camada monocelular de células, e as lâminas foram coradas com corante de rotina hematológica, May Grounwald/Giemsa, com posterior leitura das mesmas em microscópio óptico, estabelecendo-se a percentagem de células positivas, que

apresentarem grânulos escuros de formazana no seu citoplasma (NBT reduzido pelo radical ânion superóxido).

### **3.14 Ensaio para avaliação da morfologia dos neutrófilos sob efeito da estimulação por PMA**

Em microtubos foram adicionados PBS suplementado, PMNs ( $1 \times 10^6$  células/mL), ácido gálico e seus ésteres na concentração de 10  $\mu$ M e PMA (0,1  $\mu$ M), em um volume final de reação de 250  $\mu$ L. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, 100  $\mu$ L da reação foram utilizados para confeccionar lâminas em CitoSpin, que na sequência foram coradas com corante hematológico (May Grounwald/Giemsa). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, estabelecendo-se qualitativamente a morfologia celular em relação aos controles positivo (células estimuladas por PMA e sem tratamento com as substâncias), com presença de dano celular; e negativo (células não tratadas com as substâncias e sem adição de PMA), com ausência de dano celular.

### **3.15 Atividade anti-*Helicobacter pylori*: crescimento do microrganismo**

Para a obtenção do crescimento bacteriano, *Helicobacter pylori* (cepa ATCC 43504) foi semeado em placas contendo ágar BHI, suplementado com 10% de soro fetal bovino, as quais foram incubadas por 72 horas a 36-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub>. Para a determinação da concentração inibitória mínima utilizou-se uma suspensão de *H. pylori* na concentração de 10<sup>6</sup> UFC/mL em caldo BHI contendo 10% de soro fetal bovino.

### **3.16 Atividade anti-*Helicobacter pylori*: Avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)**

A atividade anti-*Helicobacter pylori* do ácido gálico e seus ésteres foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, com determinação da CIM (NCCLS/CLSI, 1999; OSATO et al., 2001; NCCLS/CLSI, 2003), conforme descrito por Bonacorsi et al. (2009). Para a realização do teste as cavidades da microplaca foram preenchidas com 100  $\mu$ L de caldo BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo diferentes concentrações das

substâncias testes, sobre os quais foi adicionado o mesmo volume de uma suspensão de *H. pylori* ( $10^6$  UFC/mL em caldo BHI contendo 10% de soro fetal bovino). Leitura espectrofotométrica em 630 nm foi realizada e a microplaca incubada a 36-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub>, por 72 horas. Após incubação, a placa foi homogeneizada e nova leitura espectrofotométrica foi realizada em mesmo comprimento de onda. A primeira leitura teve objetivo de eliminar a absorbância inicial e foi descontada da leitura obtida após incubação, com a finalidade de computar somente o crescimento bacteriano. Os testes foram acompanhados de crescimento bacteriano controle (na ausência das substâncias testes) e controle de cor (meio de cultura acrescido de diferentes concentrações das substâncias testes). Após a leitura, uma alíquota de cada poço da placa foi transferida para placas contendo ágar BHI, suplementado com 10% de soro fetal bovino, as quais foram incubadas por 72 horas a 36-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub>, para a determinação da CBM (menor concentração que levou à morte da bactéria). A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano em mais de 90% (BONACORSI et al., 2009).

### **3.17 Análise estatística**

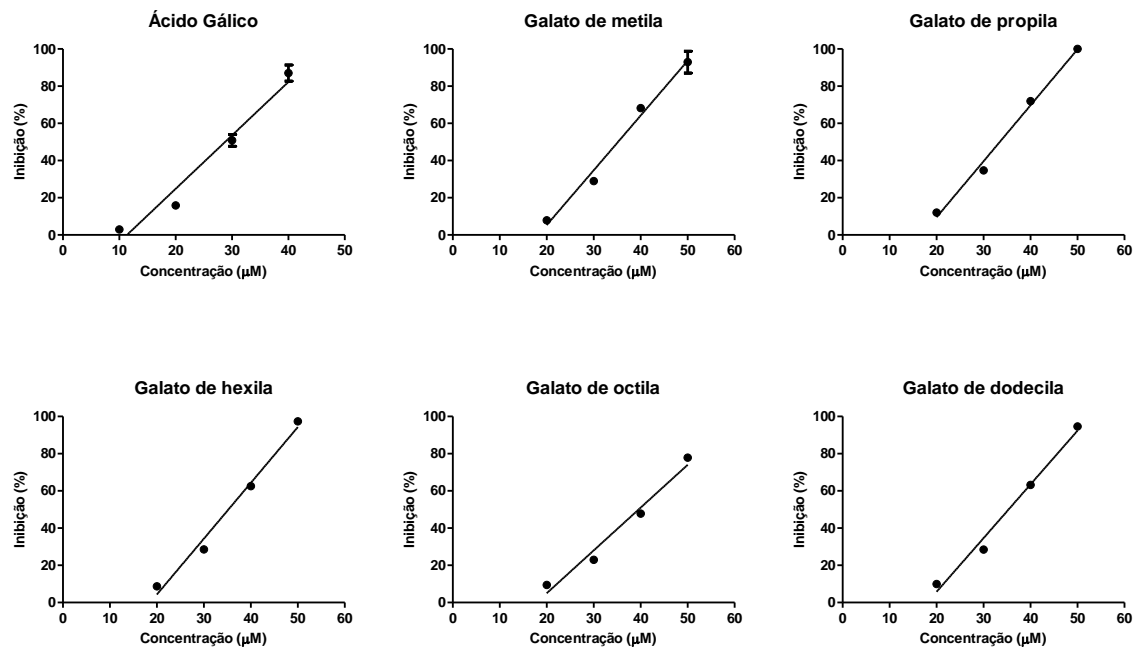
Os resultados dos testes foram analisados através do teste de análise de variância (*one way ANOVA*), com aplicação do pós teste de Tukey, adotando um nível de significância de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito supressor sobre o radical livre DPPH

Os resultados obtidos no ensaio de inibição do radical DPPH são apresentados na Figura 6, bem como os valores de  $CE_{50}$  obtidos para ácido gálico e seus ésteres estão contidos na Tabela 2. Neste teste, G0 demonstrou melhor atividade antioxidante quando comparado aos seus ésteres, com  $CE_{50} = 28,8\mu M$ , enquanto os galatos apresentaram valores de  $CE_{50} > 28,8\mu M$ , e com diferença estatística significativa. Entre os galatos testados, G8 demonstrou a menor atividade antioxidante com  $CE_{50} = 39,6\mu M$ , apresentando diferença estatística significativa em relação aos demais galatos.

**Figura 6:** Capacidade de supressão do DPPH pelo ácido gálico e seus ésteres



Os resultados representam a média e o desvio padrão de experimento realizado em triplicata



**Tabela 2:** Valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) do ácido gálico e seus ésteres no ensaio de supressão do DPPH

Inibição do radical DPPH*	
Substância	$CE_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
G0	$28,8 \pm 1,0$
G1	$35,2 \pm 1,2^{**}$
G3	$33,4 \pm 0,3^{**}$
G6	$35,2 \pm 0,3^{**}$
G8	$39,6 \pm 0,5^{**}$
G12	$35,1 \pm 0,1^{**}$

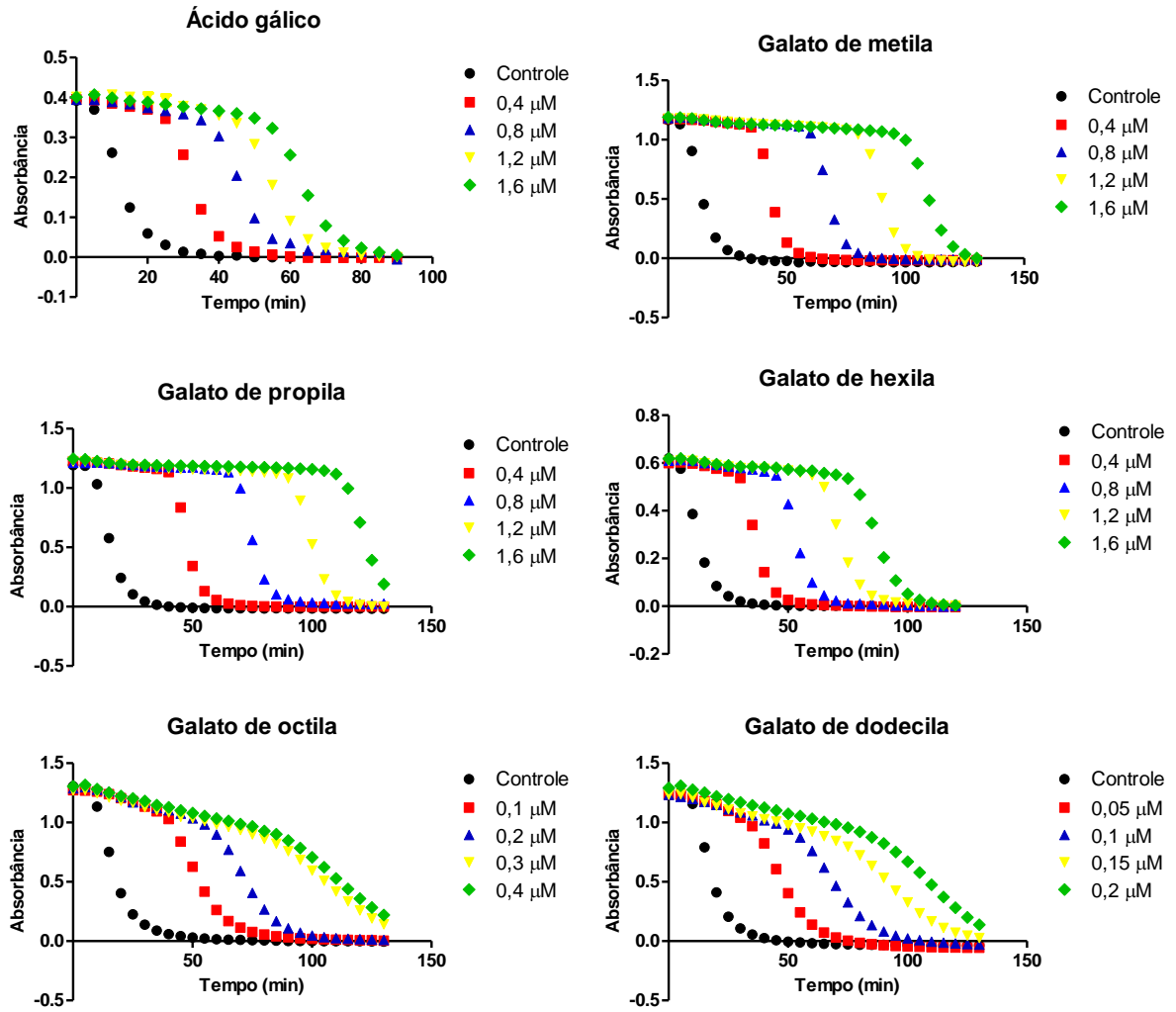
\*Valor = média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Diferença estatística significativa em relação ao G0, com  $p < 0,05$

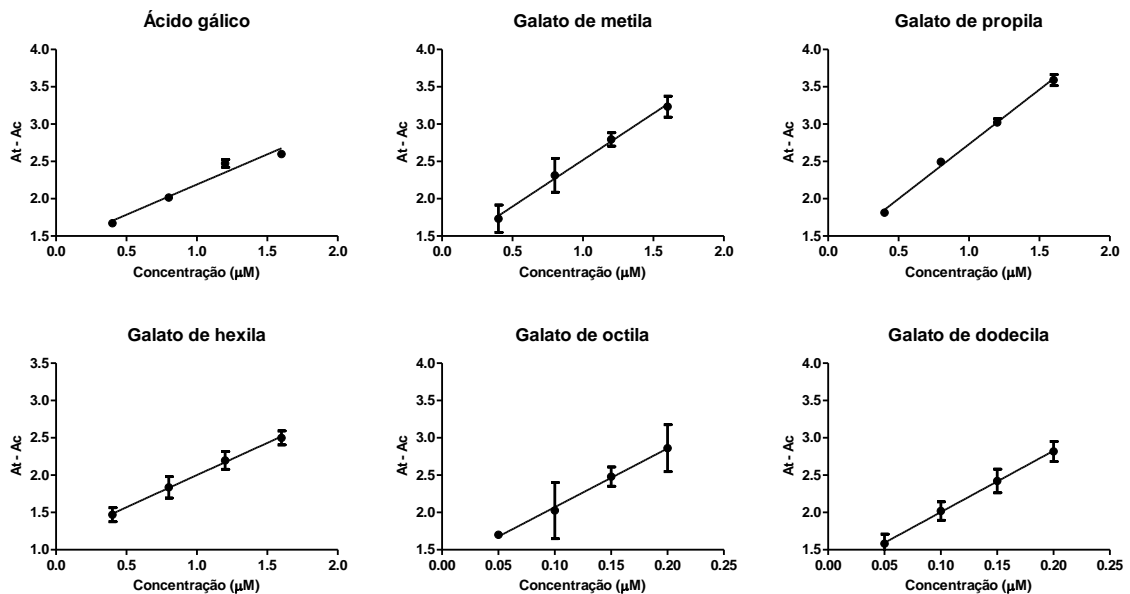
#### 4.2 Efeito supressor sobre radicais peroxila (degradação de óleo de tungue)

Os resultados obtidos no teste de degradação do óleo de tungue por radicais peroxila são apresentados nas Figuras 7, 8 e 9. Diferentemente dos resultados obtidos no ensaio de supressão do DPPH, no qual o ácido gálico demonstrou maior potencial antioxidante em relação aos seus ésteres, e no qual G8 apresentou menor efeito, no teste realizado com óleo de tungue os ésteres de maior cadeia carbônica (G8 e G12) mostraram um maior efeito antioxidante, levando a um maior prolongamento do tempo de decaimento da absorbância. Esta diferente atividade pode ser melhor visualizada na Figura 9, que relaciona o índice TEAC das diferentes substâncias. G8 e G12 apresentaram atividade antioxidante cerca de 5 vezes superior ao trolox no ensaio realizado, enquanto as demais substâncias não apresentaram diferença estatística em relação ao trolox.

**Figura 7:** Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres na degradação do óleo de tungue por radical peroxila

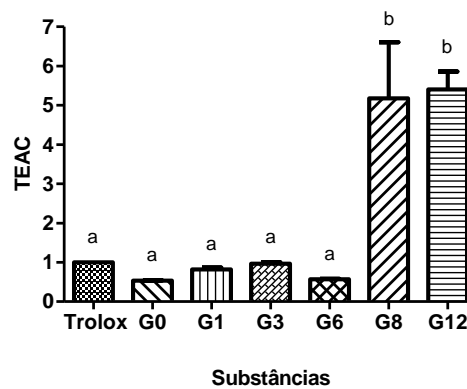


**Figura 8:** Relação linear entre área sob a curva do teste e a do controle (At-Ac) e as concentrações das substâncias testadas



Os resultados representam a média e o desvio padrão de experimento realizado em triplicata.

**Figura 9:** Atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) do ácido gálico e seus ésteres



Letras diferentes representam diferença estatística significativa. Os resultados representam a média e o desvio padrão de experimento realizado em triplicata.

### 4.3 Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos com Azul de Tripán

Previamente à realização dos testes antioxidantes em sistemas biológicos, foram realizados testes de citotoxicidade do ácido gálico e seus ésteres frente ao neutrófilo, a fim de verificar uma possível toxicidade dessas substâncias nas concentrações a serem utilizadas nos testes.

Como apresentado no item 3.6, o ensaio de exclusão do corante Azul de Tripán foi realizado para avaliar a viabilidade dos PMNs após o tratamento com o ácido gálico e seus ésteres, nas concentrações de 0,1; 1,0; 10,0 e 100,0  $\mu\text{M}$ , durante 90 minutos. Em todos os tratamentos realizados com G0, G1 e G3, bem como com G6 e G8 nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ , e G12 nas concentrações de 0,1 e 1,0  $\mu\text{M}$ , as células apresentam viabilidade acima de 80%, e sem diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (células não tratadas), que após 90 minutos de incubação apresentou uma viabilidade de  $81,1 \pm 6,3\%$ . G6 e G8 na concentração de 100  $\mu\text{M}$  demonstraram-se citotóxicos, com viabilidade de apenas  $32,2 \pm 3,9\%$  para G6 e de 0,0% para G8. G12, por sua vez, mostrou-se citotóxico nas concentrações de 100 e 10  $\mu\text{M}$ , com viabilidade de 0,0 e  $51,6 \pm 6,7\%$ , respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Porcentagem de células viáveis após tratamento com ácido gálico e seus ésteres através do ensaio de exclusão do corante Azul de Tripán

Substância	% Células viáveis - Azul de Tripán*			
	Concentração ( $\mu\text{M}$ )			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	$87,5 \pm 1,1$	$87,8 \pm 3,0$	$87,8 \pm 2,9$	$87,5 \pm 1,6$
G1	$86,4 \pm 3,5$	$85,9 \pm 3,0$	$88,1 \pm 4,3$	$84,6 \pm 4,9$
G3	$86,8 \pm 2,9$	$87,3 \pm 2,2$	$85,9 \pm 2,3$	$88,0 \pm 4,7$
G6	$87,5 \pm 4,1$	$85,5 \pm 4,1$	$90,1 \pm 0,9$	$32,2 \pm 3,9^{**}$
G8	$85,9 \pm 0,2$	$89,8 \pm 1,6$	$83,6 \pm 5,9$	$0,0 \pm 0,0^{**}$
G12	$89,0 \pm 3,9$	$87,0 \pm 4,0$	$51,6 \pm 6,7^{**}$	$0,0 \pm 0,0^{**}$

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$

#### 4.4 Teste de citotoxicidade do ácido gálico e seus derivados: Ensaio do MTT

O ensaio do MTT, conforme descrito no item 3.7 também foi realizado com a finalidade de avaliar efeitos citotóxicos do ácido gálico e seus ésteres sobre os PMNs isolados de sangue humano, nas concentrações utilizadas nos testes de inibição da produção de EROs. De forma semelhante ao teste com o corante Azul de Tripán, no ensaio do MTT, em todos os tratamentos realizados com G0, G1 e G3, bem como com G6 nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ , e G8 e G12 nas concentrações de 0,1 e 1,0  $\mu\text{M}$ , as células apresentam viabilidade de 100%. G8, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , apresentou uma pequena redução na viabilidade,

apresentando um valor de  $90,8 \pm 4,3\%$  na mesma. G6 e G8, na concentração de  $100 \mu\text{M}$ , entretanto, demonstraram-se citotóxicos, com viabilidade de apenas  $49,3 \pm 9,2\%$  para G6 e de  $13,4 \pm 2,7\%$  para G8. G12, por sua vez, mostrou-se citotóxico nas concentrações de  $100$  e  $10 \mu\text{M}$ , com viabilidade de  $15,1 \pm 0,5\%$  e  $58,2 \pm 7,6\%$ , respectivamente. O controle positivo de morte apresentou uma porcentagem de células vivas de  $4,4 \pm 1,2\%$ . Os resultados podem ser visualizados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Porcentagem de células viáveis após tratamento com ácido gálico e seus ésteres através do ensaio de citotoxicidade do MTT

Substância	% Células Viáveis – MTT*			
	Concentração ( $\mu\text{M}$ )			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$
G1	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$
G3	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$
G6	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$49,3 \pm 9,2^{**}$
G8	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$90,8 \pm 4,3$	$13,4 \pm 2,7^{**}$
G12	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$58,2 \pm 7,6^{**}$	$15,1 \pm 0,5^{**}$

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$

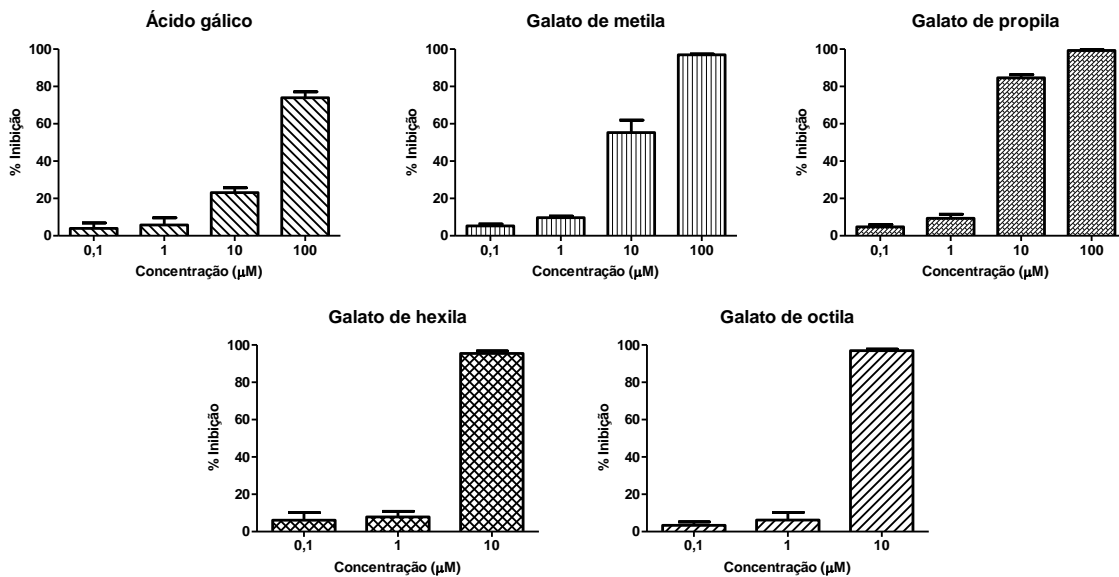
A partir dos resultados obtidos nos ensaios com o corante Azul de Tripán, bem como no ensaio do MTT, eliminou-se dos testes subsequentes o galato de dodecila, bem como a concentração de  $100 \mu\text{M}$  para G6 e G8, por terem demonstrado citotoxicidade nos testes realizados.

#### 4.5 Inibição da produção de EROs do “burst” oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de luminol (QLDLum)

O efeito supressor do ácido gálico e seus ésteres sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos ativados por zymozan é apresentado na Figura 10 e Tabela 5. Nas concentrações de  $10$  e  $100 \mu\text{M}$  os ésteres apresentaram maior eficácia quando comparados ao ácido gálico. Nas concentrações de  $0,1$  e  $1 \mu\text{M}$ , entretanto, não se observou diferença entre os tratamentos realizados. Comparando a inibição da quimiluminescência na concentração de  $10 \mu\text{M}$ , temos

que:  $G8 = G6 > G3 > G1 > G0$ . Dentre os galatos testados G8 e G6 apresentaram os melhores resultados, de modo especial quando observamos a concentração de 10  $\mu\text{M}$ , comparada à mesma concentração dos demais ésteres.

**Figura 10:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres no burst oxidativo de neutrófilos estimulados por Zymozan. QLDLum



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes.

**Tabela 5:** Porcentagem de inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo de neutrófilos por QLDLum utilizando Zymozan como estímulo

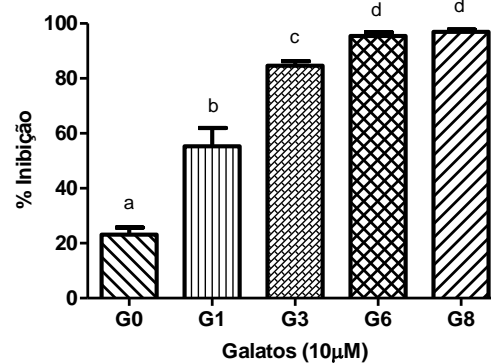
Substância	Inibição da produção de EROS - QLDLum (%) <sup>*</sup>			
	Concentração ( $\mu\text{M}$ )			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	3,9 $\pm$ 2,9	5,8 $\pm$ 3,8	23,2 $\pm$ 2,4	74,0 $\pm$ 2,9
G1	5,3 $\pm$ 1,0	9,7 $\pm$ 0,9	55,3 $\pm$ 6,7	96,9 $\pm$ 0,5
G3	4,8 $\pm$ 1,1	9,4 $\pm$ 2,1	84,6 $\pm$ 1,7	99,3 $\pm$ 0,1
G6	6,1 $\pm$ 4,1	7,9 $\pm$ 3,0	95,5 $\pm$ 1,3	**
G8	3,3 $\pm$ 1,9	6,2 $\pm$ 4,1	97,0 $\pm$ 0,8	**

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão.

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

Análise comparativa dos diferentes tratamentos, utilizando a concentração de 10  $\mu\text{M}$  e Zymosan como estímulo, é apresentada na Figura 11.

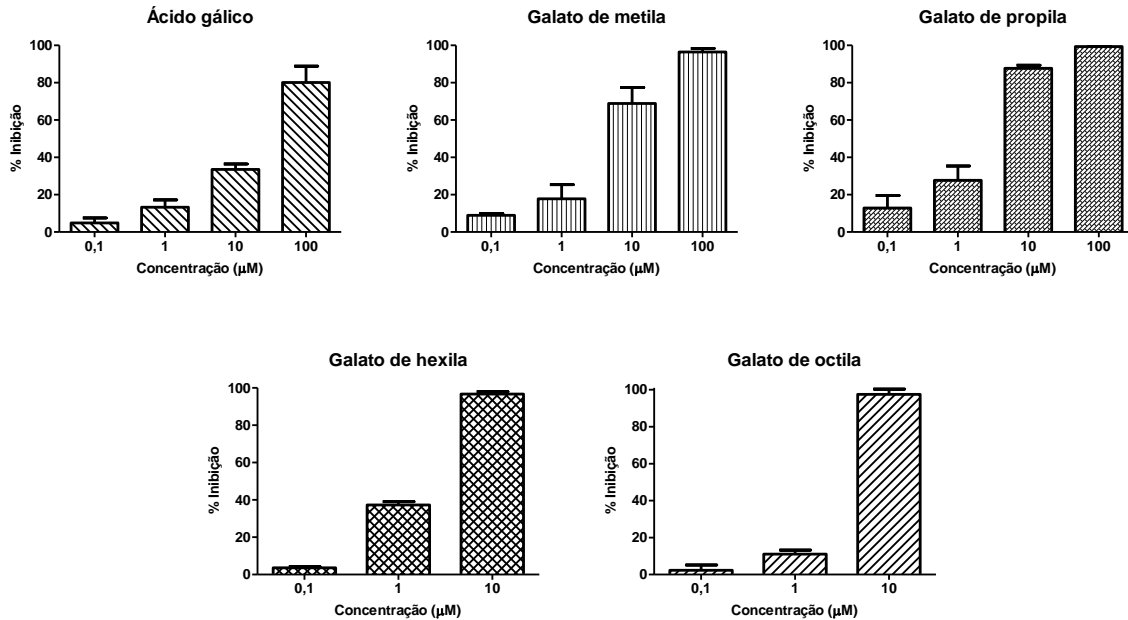
**Figura 11:** Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu\text{M}$ ) no *burst* oxidativo de PMNs estimulados por Zymosan (QLDLum)



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

Na QLDLum utilizando *H. pylori* como estímulo, os resultados foram semelhantes ao teste com zymosan, com os ésteres apresentando maior eficácia que o ácido gálico nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$ . Relacionando-se a porcentagem de inibição da quimiluminescência na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , temos que:  $G8 = G6 = G3 > G1 > G0$ . Os melhores resultados foram apresentados por G8, G6 e G3 na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , comparado à mesma concentração dos demais ésteres. Os resultados podem ser melhor visualizados na Figura 12 e Tabela 6.

**Figura 12:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres no *burst* oxidativo de neutrófilos estimulados por *H. pylori*. QLDLum



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes.

**Tabela 6:** Porcentagem de inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo de neutrófilos por QLDLum utilizando *H. pylori* como estímulo

Substância	Inibição da produção de EROS - QLDLum (%)*			
	Concentração (µM)			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	4,9 $\pm$ 2,6	13,3 $\pm$ 3,9	33,6 $\pm$ 2,8	80,1 $\pm$ 8,7
G1	8,9 $\pm$ 1,0	17,8 $\pm$ 7,6	68,9 $\pm$ 8,6	96,5 $\pm$ 1,9
G3	12,9 $\pm$ 6,7	27,7 $\pm$ 7,6	87,7 $\pm$ 1,7	99,3 $\pm$ 0,2
G6	3,6 $\pm$ 0,6	37,3 $\pm$ 1,8	96,7 $\pm$ 1,2	**
G8	2,3 $\pm$ 2,9	11,0 $\pm$ 2,2	97,5 $\pm$ 2,8	**

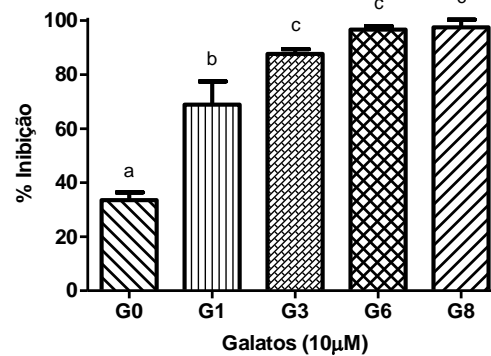
\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

Análise comparativa dos diferentes tratamentos, utilizando a concentração de 10 µM e *H. pylori* como estímulo, é apresentada na Figura 13.



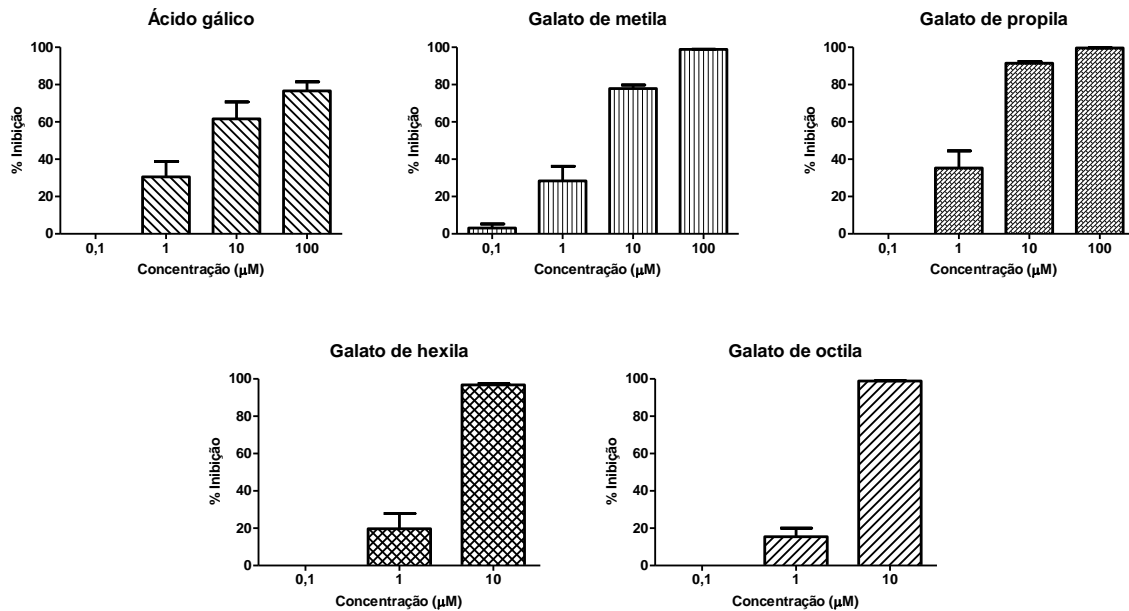
**Figura 13:** Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu$ M) no *burst* oxidativo de PMNs estimulados por *H. pylori* (QLDLum)



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

De forma semelhante à QLDLum utilizando zymosan ou *H. pylori* como estímulo, na QLDLum estimulada por PMA os galatos também apresentaram maior eficácia que o ácido gálico nas concentrações de 10 e 100  $\mu$ M. Relacionando-se a porcentagem de inibição da quimiluminescência na concentração de 10  $\mu$ M, temos que:  $G8 = G6 = G3 > G1 > G0$ . Seguindo a mesma tendência dos demais testes, os melhores resultados foram apresentados por G8, G6 e G3 na concentração de 10  $\mu$ M, comparado à mesma concentração dos demais ésteres. Os resultados podem ser melhor visualizados na Figura 14 e Tabela 7.

**Figura 14:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres no *burst* oxidativo de neutrófilos estimulados por PMA. QLDLum



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes.

**Tabela 7:** Porcentagem de inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo de neutrófilos por QLDLum utilizando PMA como estímulo

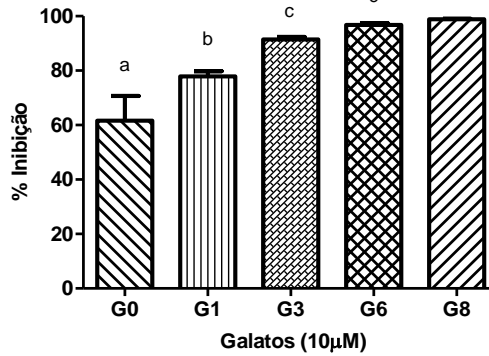
Substância	Inibição da produção de EROS - QLDLum (%) <sup>*</sup>			
	Concentração (μM)			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	0,0 $\pm$ 0,0	30,6 $\pm$ 8,2	61,6 $\pm$ 9,0	76,6 $\pm$ 4,9
G1	3,1 $\pm$ 2,2	28,4 $\pm$ 7,9	77,8 $\pm$ 2,0	98,8 $\pm$ 0,1
G3	0,0 $\pm$ 0,0	35,3 $\pm$ 9,2	91,5 $\pm$ 0,9	99,6 $\pm$ 0,1
G6	0,0 $\pm$ 0,0	19,7 $\pm$ 8,2	96,8 $\pm$ 0,6	**
G8	0,0 $\pm$ 0,0	15,4 $\pm$ 4,6	98,8 $\pm$ 0,2	**

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

Análise comparativa dos diferentes tratamentos, utilizando a concentração de 10 μM e PMA como estímulo, é apresentada na Figura 15.

**Figura 15:** Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu$ M) no *burst* oxidativo de PMNs estimulados por PMA (QLDLum)

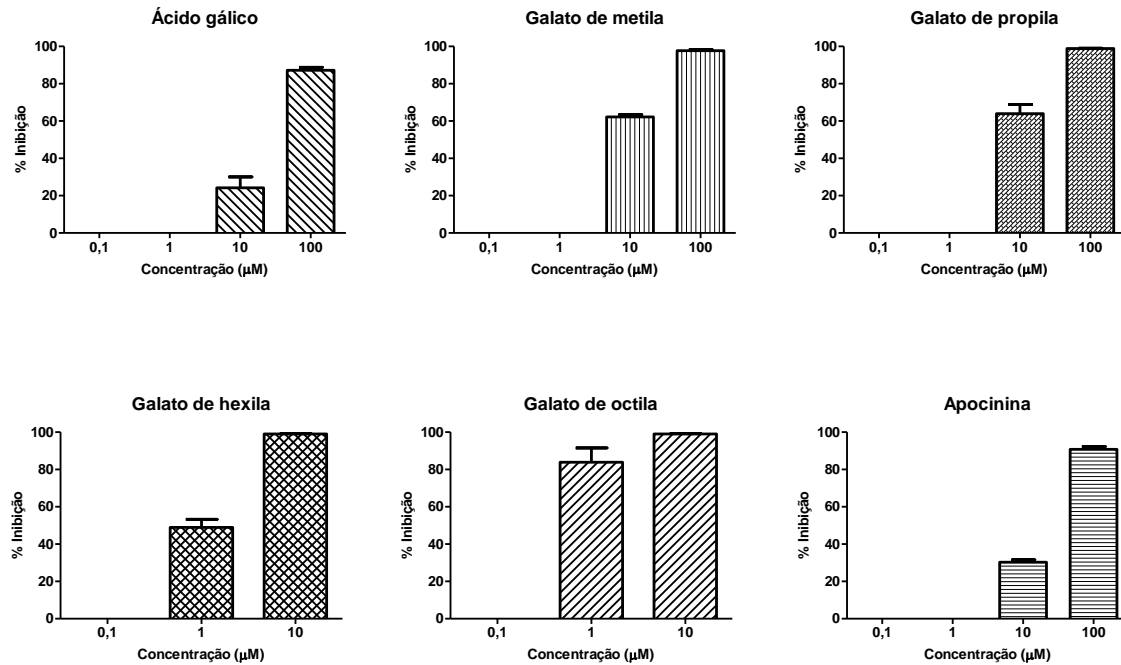


Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

#### 4.6 Inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina (QLDLuc)

Como citado no item 3.9, o ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina foi utilizado para avaliar o efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de radical ânion superóxido, a primeira ERO formada no *burst* oxidativo. O efeito supressor do ácido gálico e seus ésteres, bem como da apocinina, um conhecido inibidor da produção deste radical, sobre a produção do radical ânion superóxido de neutrófilos ativados por zymozan é apresentado na Figura 16 e Tabela 8. Nas concentrações de 10 e 100  $\mu$ M os ésteres apresentaram maior eficácia quando comparados ao ácido gálico, bem como em relação à apocinina. G6 e G8 demonstraram maior efeito supressor mesmo na concentração de 1  $\mu$ M. Comparando a inibição da quimiluminescência na concentração de 10  $\mu$ M, temos que:  $G8 = G6 > G3 = G1 > G0$ , com apocinina apresentando inibição igual à G0. Dentre os galatos testados G8 e G6 apresentaram os melhores resultados, de modo especial quando observamos a concentração de 10  $\mu$ M, comparada à mesma concentração dos demais ésteres.

**Figura 16:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres e da apocinina na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por Zymosan. QLDLUC



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes.

**Tabela 8:** Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por Zymosan – QLDLUC

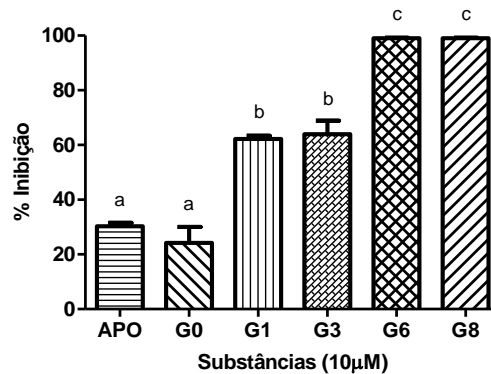
Substância	Inibição da produção de EROS - QLDLUC (%) <sup>*</sup>			
	Concentração (μM)			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	24,2 $\pm$ 5,8	87,2 $\pm$ 1,6
G1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	62,2 $\pm$ 1,2	97,7 $\pm$ 0,5
G3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	64,0 $\pm$ 4,9	98,9 $\pm$ 0,1
G6	0,0 $\pm$ 0,0	49,0 $\pm$ 4,4	99,0 $\pm$ 0,2	**
G8	0,0 $\pm$ 0,0	83,9 $\pm$ 7,7	99,1 $\pm$ 0,2	**
APO	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	30,3 $\pm$ 1,3	90,8 $\pm$ 1,5

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

A comparação dos diferentes tratamentos, utilizando a concentração de 10 μM e Zymosan como estímulo, é apresentada na Figura 17.

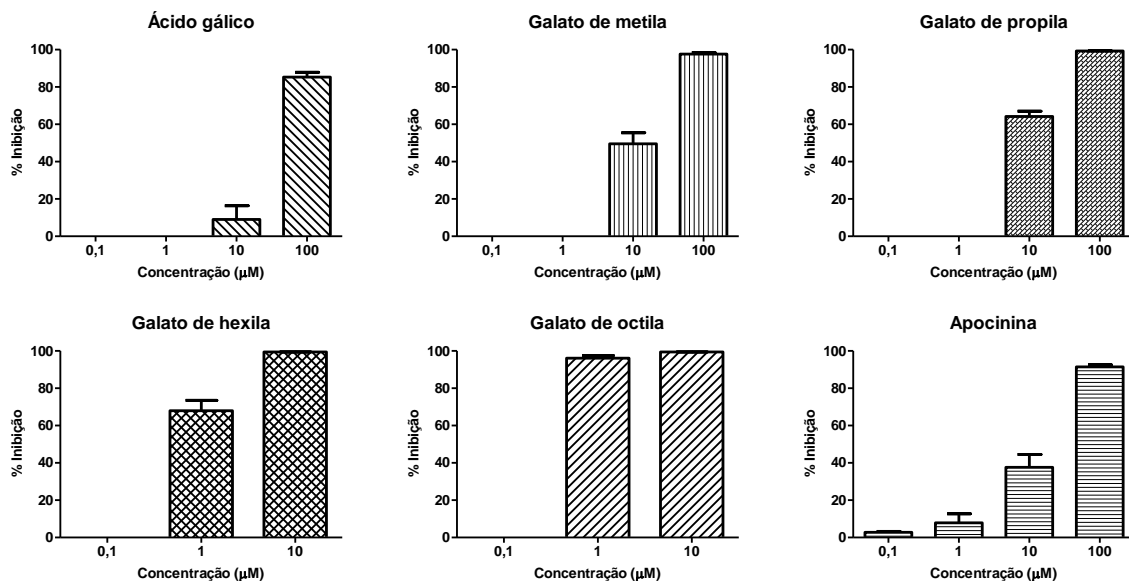
**Figura 17:** Efeito inibitório da apocinina e do ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu\text{M}$ ) na produção de radical ânion superóxido em PMNs estimulados por Zymosan (QLDLuc)



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

Efeito semelhante foi obtido utilizando *H. pylori* como estímulo, conforme mostrado na Figura 18 e Tabela 9. Nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  os ésteres apresentaram maior efeito inibidor da produção do radical ânion superóxido quando comparados ao ácido gálico e à apocinina. G6 e G8 demonstraram maior efeito supressor mesmo na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Comparando a inibição da quimiluminescência na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , temos que:  $G8 = G6 > G3 > G1 > G0$ , com apocinina apresentando inibição um pouco superior à G0. Dentre os galatos testados G8 e G6 também apresentaram os melhores resultados neste teste.

**Figura 18:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres e da apocinina na produção do radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por *H. pylori*. QLDLUC



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes.

**Tabela 9:** Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por *H. pylori* – QLDLuc

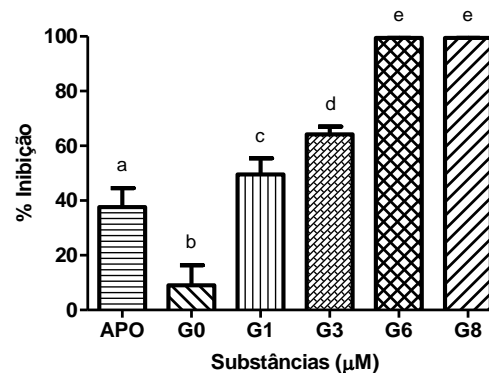
Substância	Inibição da produção de EROS - QLDLuc (%) <sup>*</sup>			
	Concentração (µM)			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 7,3	85,3 ± 2,7
G1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	49,6 ± 5,9	97,7 ± 0,7
G3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	64,2 ± 2,9	99,3 ± 0,1
G6	0,0 ± 0,0	68,0 ± 5,6	99,4 ± 0,1	**
G8	0,0 ± 0,0	96,1 ± 1,4	99,4 ± 0,0	**
APO	2,8 ± 0,5	7,9 ± 4,9	37,7 ± 6,9	91,5 ± 1,1

\*Valor apresentado como média ± desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

A comparação dos diferentes tratamentos, utilizando a concentração de 10 µM e *H. pylori* como estímulo, é apresentada na Figura 19.

**Figura 19:** Efeito inibitório da apocinina e do ácido gálico e seus ésteres (10 µM) na produção do radical ânion superóxido em PMNs estimulados por *H. pylori* (QLDLuc)

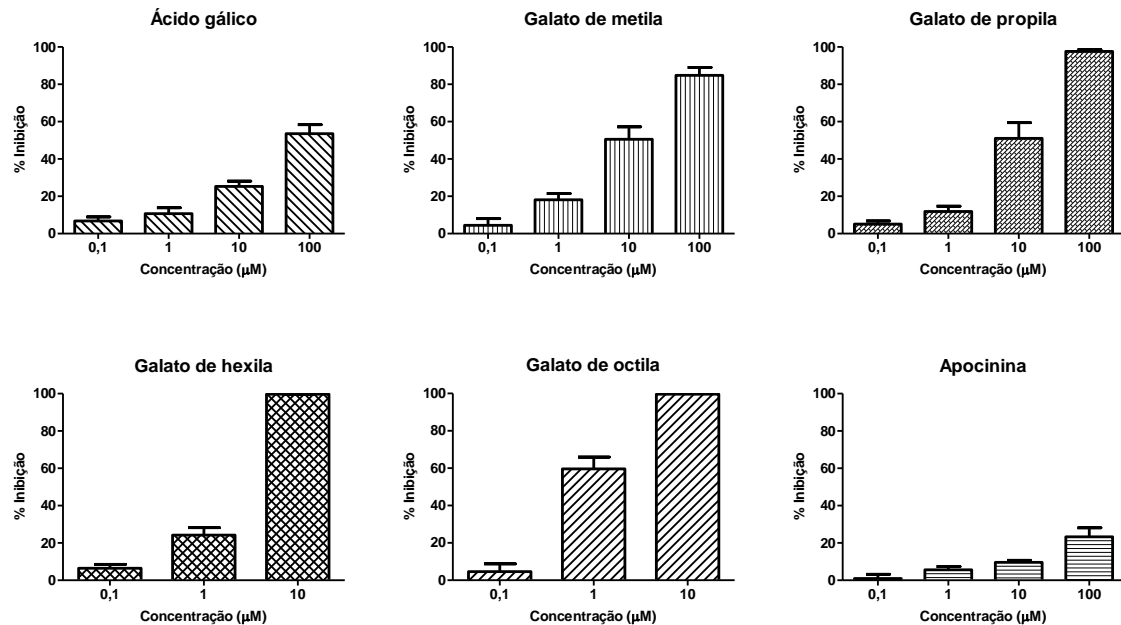


Os resultados representam a média ± desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos na QLDLuc utilizando PMA como estímulo estão representados na Figura 20 e Tabela 10. Assim como nos testes utilizando *H. pylori* e Zymosan como estímulo, nas concentrações de 10 e 100 µM os ésteres apresentaram maior efeito inibidor da produção do radical ânion superóxido quando comparados ao ácido gálico e à apocinina. Comparando a inibição da quimiluminescência na concentração de 10 µM, temos que:  $G8 = G6 > G3 = G1 > G0$ , com apocinina apresentando inibição inferior à G0. Dentre os galatos

testados G8 e G6 também apresentaram os melhores resultados nesse teste utilizando PMA como estímulo.

**Figura 20:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres e da apocinina na produção do radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por PMA. QLDLuc



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes.

**Tabela 10:** Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por PMA – QLDLuc

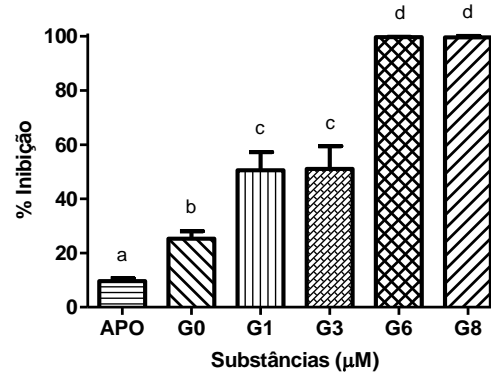
Substância	Inibição da produção de EROS - QLDLuc (%) <sup>*</sup>			
	Concentração (µM)			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	6,8 $\pm$ 2,2	10,7 $\pm$ 3,1	25,3 $\pm$ 2,8	53,5 $\pm$ 4,9
G1	4,5 $\pm$ 3,6	18,1 $\pm$ 3,3	50,5 $\pm$ 6,7	84,8 $\pm$ 4,3
G3	5,1 $\pm$ 1,7	11,8 $\pm$ 2,8	51,1 $\pm$ 8,4	97,7 $\pm$ 0,9
G6	6,5 $\pm$ 2,0	24,2 $\pm$ 4,0	99,7 $\pm$ 0,1	**
G8	4,6 $\pm$ 4,2	59,7 $\pm$ 6,3	99,6 $\pm$ 0,5	**
APO	0,9 $\pm$ 2,3	5,6 $\pm$ 1,8	9,6 $\pm$ 1,1	23,3 $\pm$ 4,8

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

A comparação dos diferentes tratamentos, utilizando a concentração de 10  $\mu\text{M}$  e PMA como estímulo, é apresentada na Figura 17.

**Figura 21:** Efeito inibitório da apocinina e do ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu\text{M}$ ) na produção do radical ânion superóxido em PMNs estimulados por PMA (QLDLuc)



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

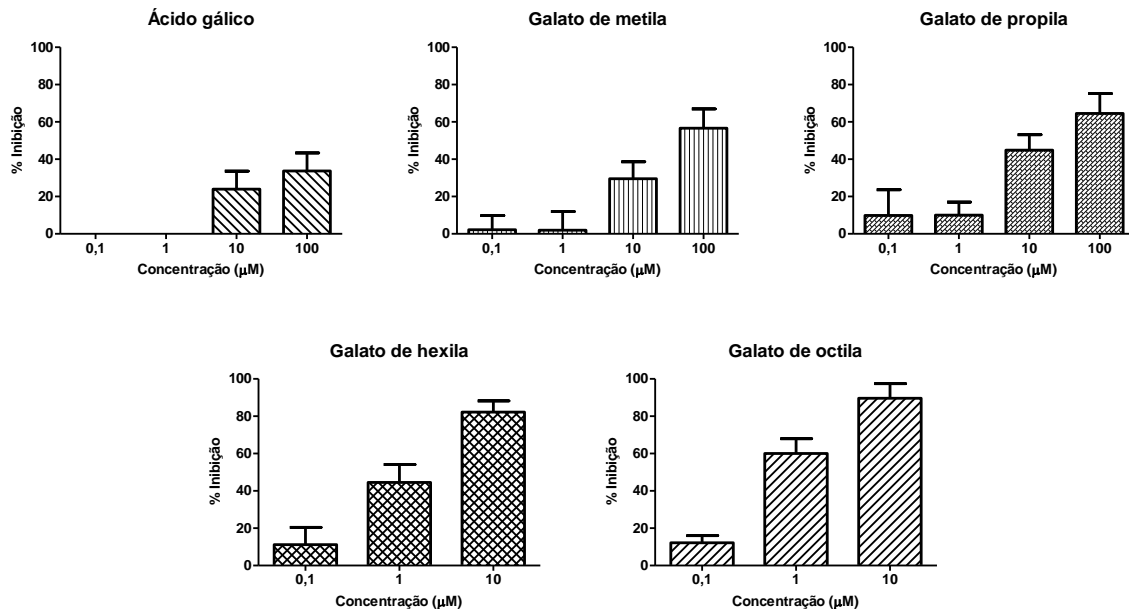
#### 4.7 Avaliação da inibição da produção de radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados. Ensaio WST-1

Os resultados obtidos no ensaio do WST-1 foram condizentes com os da quimiluminescência dependente de lucigenina, confirmando a capacidade do ácido gálico e seus ésteres de inibir a produção do radical ânion superóxido.

No teste utilizando Zymosan como estímulo, G8 e G6 foram as moléculas que se mostraram mais eficientes na inibição da produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Considerando a supressão observada na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , temos que:  $\text{G8} = \text{G6} > \text{G3} > \text{G1} = \text{G0}$ . Os resultados podem ser visualizados na Figura 22 e Tabela 11.



**Figura 22:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por Zymosan. WST-1



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de quatro experimentos independentes.

**Tabela 11:** Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por Zymosan – WST-1

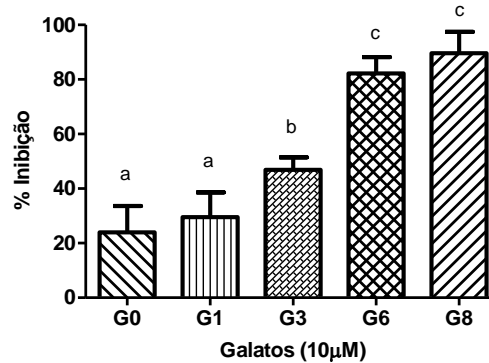
Substância	Inibição da produção de $O_2^{\bullet-}$ - WST-1 (%)*			
	Concentração (µM)			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	23,9 $\pm$ 9,7	33,7 $\pm$ 9,7
G1	2,2 $\pm$ 7,6	1,9 $\pm$ 10,0	29,6 $\pm$ 9,1	56,7 $\pm$ 10,3
G3	9,9 $\pm$ 13,8	10,1 $\pm$ 7,0	44,8 $\pm$ 8,3	64,5 $\pm$ 10,7
G6	11,2 $\pm$ 9,3	44,5 $\pm$ 9,6	82,2 $\pm$ 6,0	**
G8	12,2 $\pm$ 3,9	60,0 $\pm$ 8,0	89,7 $\pm$ 7,8	**

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

Análise comparativa da inibição da produção de  $O_2^{\bullet-}$  pelo ácido gálico e seus ésteres, utilizando a concentração de 10 µM e Zymosan como estímulo, é apresentada na Figura 23.

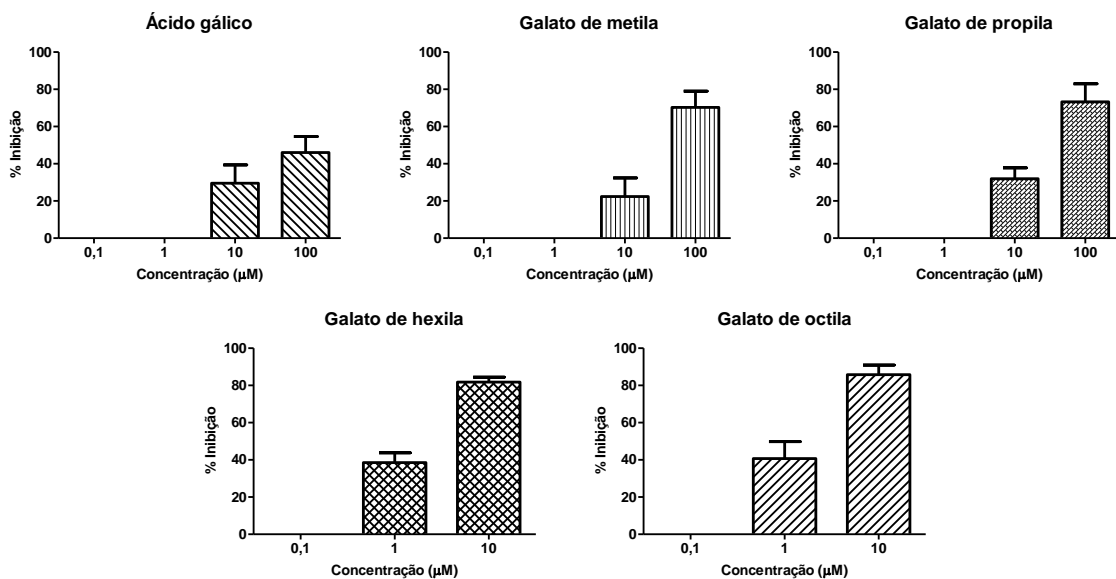
**Figura 23:** Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu\text{M}$ ) na produção do radical ânion superóxido em PMNs estimulados por Zymosan (WST-1)



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de quatro experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

De forma semelhante ao ensaio do WST-1 utilizando Zymosan como estímulo, no teste com *H. pylori* G8 e G6 também se mostraram mais eficientes na inibição da produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Considerando a supressão observada na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , temos que:  $\text{G8} = \text{G6} > \text{G3} = \text{G1} = \text{G0}$ . Os resultados podem ser visualizados na Figura 24 e Tabela 12.

**Figura 24:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção do radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por *H. pylori*. WST-1



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de quatro experimentos independentes.

**Tabela 12:** Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por *H. pylori* – WST-1

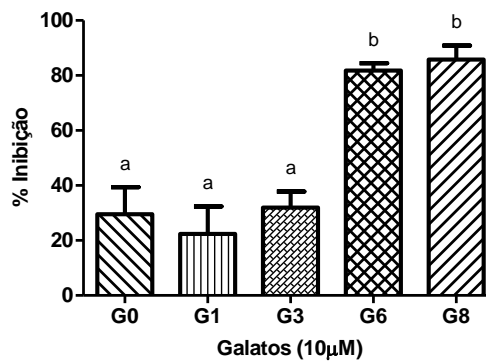
Substância	Inibição da produção de $O_2^{\bullet-}$ - WST-1 (%)*			
	Concentração ( $\mu$ M)			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	29,6 $\pm$ 9,8	46,0 $\pm$ 8,6
G1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	22,2 $\pm$ 9,8	70,3 $\pm$ 8,8
G3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	32,0 $\pm$ 5,6	73,3 $\pm$ 9,6
G6	0,0 $\pm$ 0,0	38,6 $\pm$ 5,3	81,8 $\pm$ 2,6	**
G8	0,0 $\pm$ 0,0	40,7 $\pm$ 9,1	85,8 $\pm$ 5,1	**

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

Análise comparativa da inibição da produção de  $O_2^{\bullet-}$  pelo ácido gálico e seus ésteres, utilizando a concentração de 10  $\mu$ M e *H. pylori* como estímulo, é apresentada na Figura 25.

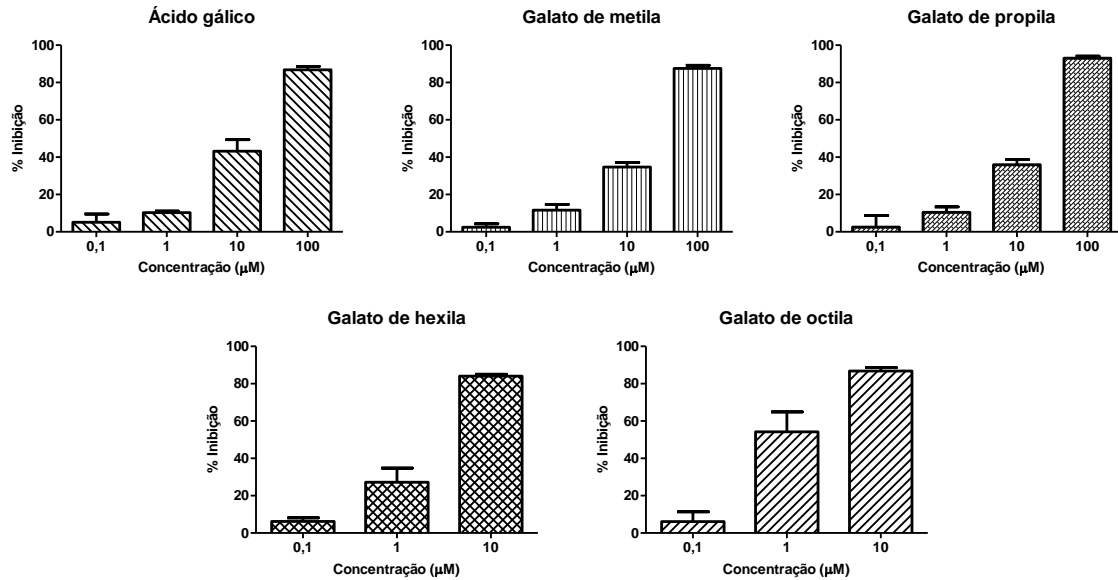
**Figura 25:** Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu$ M) na produção do radical ânion superóxido em PMNs estimulados por *H. pylori* (WST-1)



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de quatro experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

No teste utilizando PMA como estímulo, G8 e G6 também se mostraram mais eficientes na inibição da produção de  $O_2^{\bullet-}$  do que o ácido gálico e os ésteres de menor cadeia carbônica (G1 e G3). Considerando a supressão observada na concentração de 10  $\mu$ M, temos que:  $G8 = G6 > G3 = G1 = G0$ . Os resultados são apresentados na Figura 26 e Tabela 13.

**Figura 26:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção do radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por PMA. WST-1



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes.

**Tabela 13:** Porcentagem de inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por PMA – WST-1

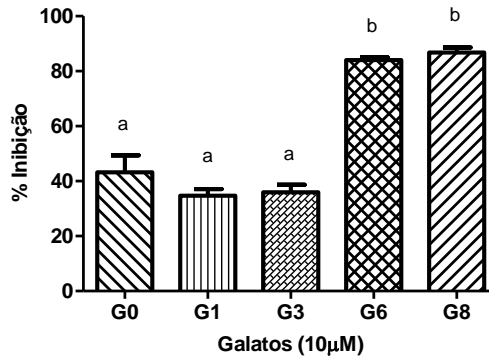
Substância	Inibição da produção de $O_2^{\bullet-}$ - WST-1 (%) <sup>*</sup>			
	Concentração (µM)			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	5,1 $\pm$ 4,4	10,3 $\pm$ 0,8	43,2 $\pm$ 6,2	86,8 $\pm$ 1,8
G1	2,4 $\pm$ 1,8	11,6 $\pm$ 3,0	34,7 $\pm$ 2,4	87,6 $\pm$ 1,6
G3	2,5 $\pm$ 6,2	10,4 $\pm$ 3,0	35,9 $\pm$ 2,8	93,0 $\pm$ 1,2
G6	6,2 $\pm$ 1,9	27,2 $\pm$ 7,6	84,0 $\pm$ 1,1	**
G8	6,2 $\pm$ 5,2	54,2 $\pm$ 10,7	86,8 $\pm$ 1,9	**

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

Análise comparativa da inibição da produção de  $O_2^{\bullet-}$  pelo ácido gálico e seus ésteres, utilizando a concentração de 10 µM e PMA como estímulo, é apresentada na Figura 27.

**Figura 27:** Efeito inibitório do ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu$ M) na produção do radical ânion superóxido em PMNs estimulados por PMA (WST-1)

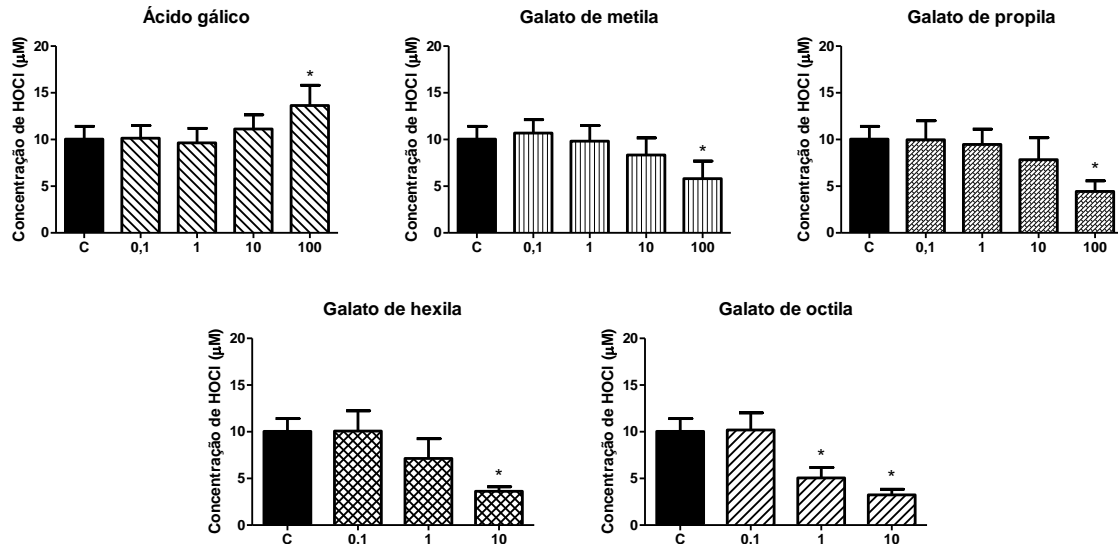


Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de três experimentos independentes. Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

#### 4.8 Inibição da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados

Conforme descrito no item 3.11, teste baseado na reação de HOCl com taurina, produzindo taurina cloramina, foi realizado com a finalidade de observar o efeito do ácido gálico e seus ésteres sobre a produção de HOCl, uma importante ERO gerado no *burst* oxidativo de neutrófilos. Considerando a cascata enzimática de reação que segue a ativação da NADPH oxidase em PMNs, o efeito inibitório sobre a produção de radicais ânions superóxido por galatos de alquila também poderia provocar uma diminuição na liberação extracelular de HOCl. Este efeito foi observado em PMNs estimulados por Zymosan e tratados com G1 e G3 a 100  $\mu$ M, G6 a 10  $\mu$ M, e G8 a 1 e 10  $\mu$ M (Figura 28 e Tabela 14).

**Figura 28:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de HOCl por neutrófilos estimulados por Zymosan



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de cinco experimentos independentes. C = controle (PMNs sem tratamento com as substâncias). (\*) = diferença estatística significativa em relação ao controle, com  $p < 0,05$ .

**Tabela 14:** Concentração de HOCl produzido ( $\mu\text{M}$ ) por neutrófilos estimulados por Zymosan

Substância	Concentração de HOCl ( $\mu\text{M}$ )*			
	Concentração ( $\mu\text{M}$ )			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	10,1 $\pm$ 1,4	9,6 $\pm$ 1,5	11,1 $\pm$ 1,5	13,6 $\pm$ 2,2
G1	10,7 $\pm$ 1,4	9,8 $\pm$ 1,7	8,3 $\pm$ 1,8	5,8 $\pm$ 1,9
G3	10,0 $\pm$ 2,0	9,5 $\pm$ 1,6	7,8 $\pm$ 2,4	4,4 $\pm$ 1,1
G6	10,1 $\pm$ 2,2	7,1 $\pm$ 2,1	3,6 $\pm$ 0,5	**
G8	10,2 $\pm$ 1,8	5,1 $\pm$ 1,1	3,2 $\pm$ 0,6	**

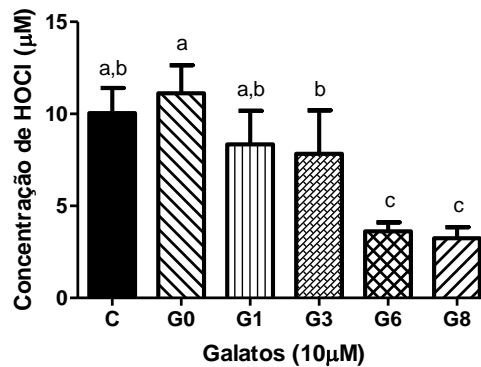
\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

Concentração de HOCl do controle = 10,0  $\pm$  1,4  $\mu\text{M}$

Análise comparativa do efeito das substâncias (10  $\mu\text{M}$ ) na produção de HOCl por PMNs, utilizando Zymosan como estímulo, é apresentada na Figura 29.

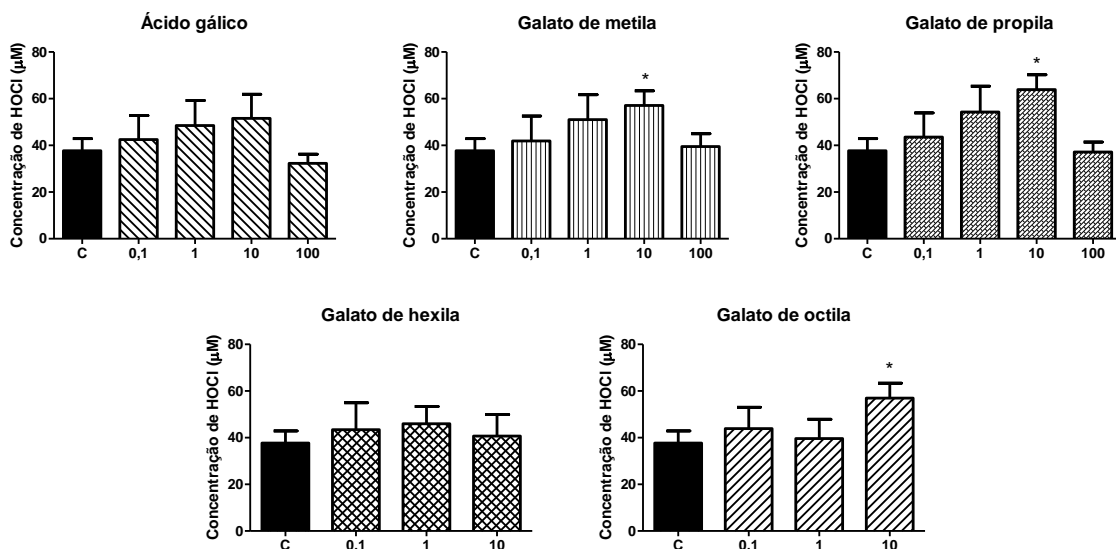
**Figura 29:** Comparação do efeito ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu\text{M}$ ) na produção de HOCl em PMNs estimulados por Zymosan



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de cinco experimentos independentes. C = controle (PMNs sem tratamento com as substâncias). Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

No teste utilizando PMA como estímulo, entretanto, o efeito observado foi menos evidente. Somente G1, G3 e G8 a 10  $\mu\text{M}$  apresentaram diferença estatística significativa na produção de HOCl em relação ao controle, e ao contrário do observado no teste com Zymosan, levaram a um aumento na produção de HOCl. Os resultados podem ser visualizados na Figura 30 e Tabela 15.

**Figura 30:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de HOCl por neutrófilos estimulados por PMA



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de quatro experimentos independentes. C = controle (PMNs sem tratamento com as substâncias) (\*) = diferença estatística significativa em relação ao controle, com  $p < 0,05$ .

**Tabela 15:** Concentração de HOCl produzido ( $\mu\text{M}$ ) por neutrófilos estimulados por PMA

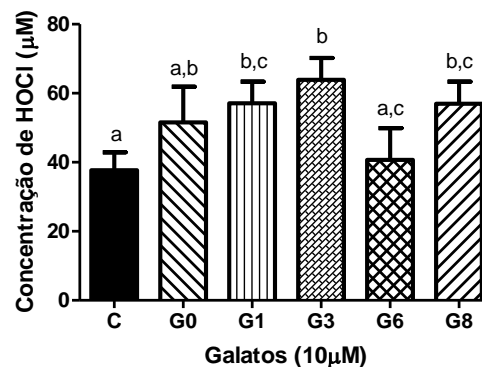
Substância	Concentração de HOCl ( $\mu\text{M}$ )*			
	Concentração ( $\mu\text{M}$ )			
	0,1	1,0	10,0	100,0
G0	42,5 $\pm$ 10,3	48,5 $\pm$ 10,7	51,6 $\pm$ 10,3	32,3 $\pm$ 3,9
G1	41,9 $\pm$ 10,7	51,0 $\pm$ 10,7	57,1 $\pm$ 6,3	39,5 $\pm$ 5,4
G3	43,5 $\pm$ 10,4	54,3 $\pm$ 11,0	63,9 $\pm$ 6,4	37,2 $\pm$ 4,3
G6	43,4 $\pm$ 11,5	45,9 $\pm$ 7,4	40,7 $\pm$ 9,3	**
G8	43,9 $\pm$ 9,1	39,7 $\pm$ 8,2	57,0 $\pm$ 6,4	**

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

\*\*Concentração não testada devido à citotoxicidade

Concentração de HOCl do controle = 37,7  $\pm$  5,2  $\mu\text{M}$

Análise comparativa do efeito das substâncias (10  $\mu\text{M}$ ) na produção de HOCl por PMNs, utilizando PMA como estímulo, é apresentada na Figura 31.

**Figura 31:** Comparação do efeito ácido gálico e seus ésteres (10  $\mu\text{M}$ ) na produção de HOCl em PMNs estimulados por PMA

Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da duplicata de quatro experimentos independentes. C = controle (PMNs sem tratamento com as substâncias). Diferentes letras representam diferença estatística significativa, com  $p < 0,05$ .

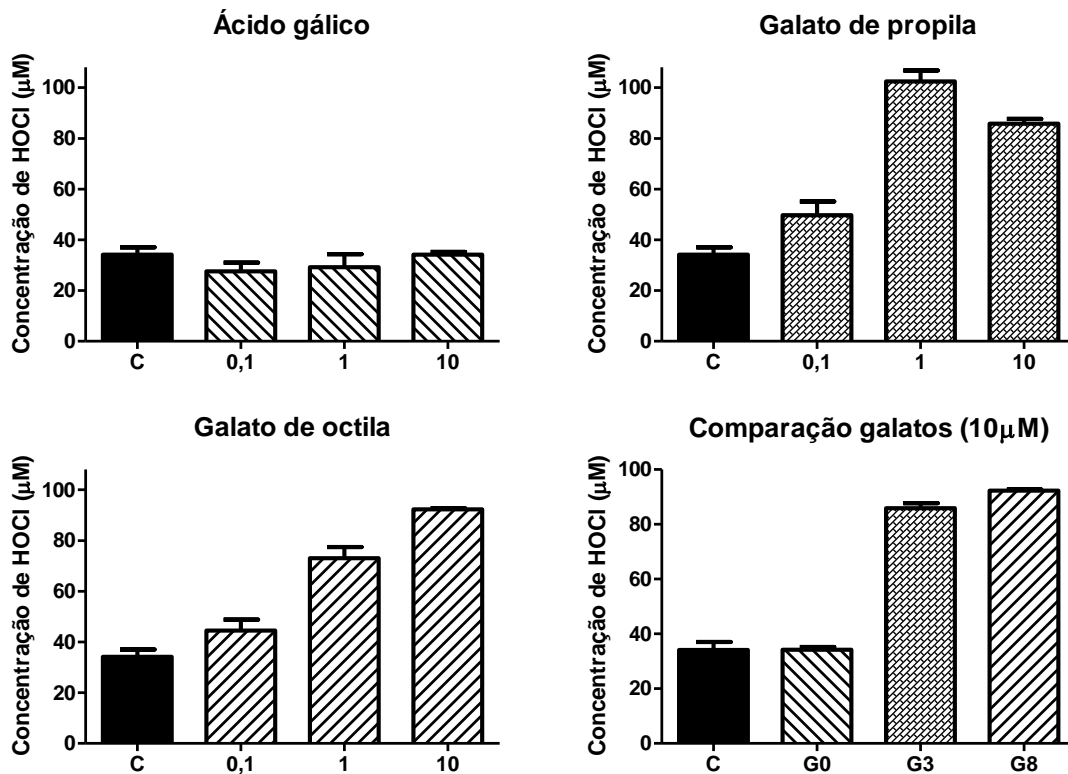
#### 4.9 Efeito do ácido gálico e seus ésteres na atividade clorinante da mieloperoxidase

Para um melhor entendimento do efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de HOCl, o teste de produção do mesmo também foi realizado em ensaio livre de células, com a



utilização de MPO pura e com adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ao meio reacional. Este teste foi realizado com G0, G3 e G8 nas concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ . Os resultados são apresentados na Figura 32 e Tabela 16. Como podemos observar, G0 não interferiu na produção de HOCl, enquanto que G3 e G8 levaram a um aumento significativo na produção. Na concentração de 10  $\mu\text{M}$  podemos observar que conforme aumenta a cadeia lateral do galato, maior o efeito estimulatório na produção de HOCl.

**Figura 32:** Efeito do ácido gálico e seus ésteres na produção de HOCl por MPO



Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de experimento realizado em triplicata. C = controle (MPO/ $\text{H}_2\text{O}_2$  sem tratamento com as substâncias).

**Tabela 16:** Concentração de HOCl produzido ( $\mu\text{M}$ ) por MPO tratada com ácido gálico e seus ésteres

Substância	Concentração de HOCl produzido ( $\mu\text{M}$ )*		
	Concentração ( $\mu\text{M}$ )		
	0,1	1,0	10,0
G0	27,6 $\pm$ 3,4	29,2 $\pm$ 5,2	34,2 $\pm$ 1,0
G3	49,7 $\pm$ 5,4	102,4 $\pm$ 4,3	85,8 $\pm$ 1,8
G8	44,5 $\pm$ 4,3	73,0 $\pm$ 4,4	92,3 $\pm$ 0,4

\*Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão  
Concentração de HOCl do controle = 34,1  $\pm$  2,9  $\mu\text{M}$

#### 4.10 Teste do Nitro Azul de Tetrazólio (NBT)

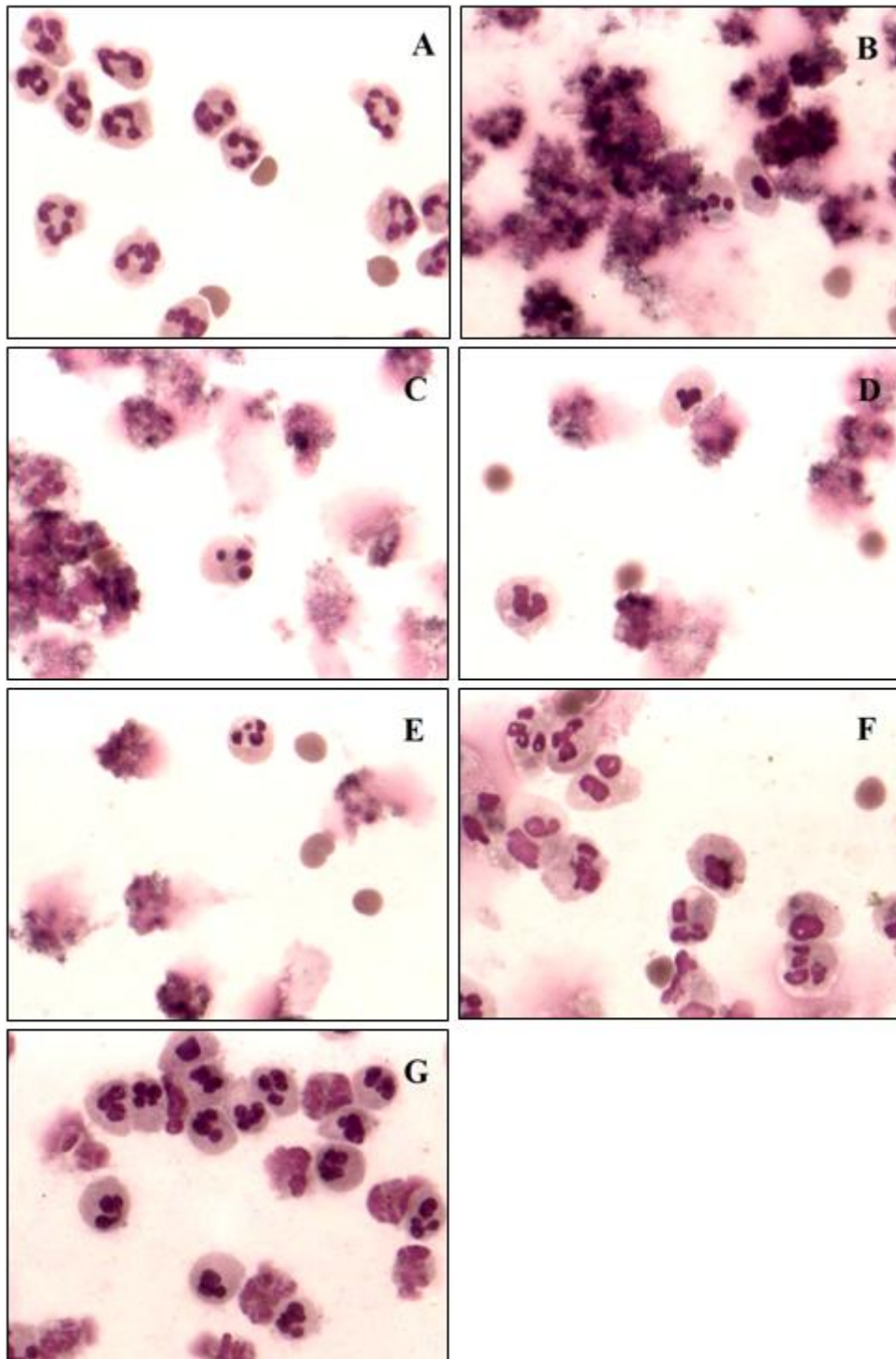
Para a avaliação do efeito do ácido gálico e seus derivados sobre a atividade oxidativa produzida pelas EROs, também foi realizado o ensaio do NBT. Neste ensaio, a atividade oxidativa foi medida pela presença de precipitados negros de formazana no citoplasma do neutrófilo, devido à redução do NBT pelo radical ânion superóxido. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 17, bem como as fotomicrografias dos neutrófilos submetidos aos diferentes tratamentos são apresentadas na Figura 33.

**Tabela 17:** Porcentagem de PMNs com presença de precipitado de formazana após tratamento com ácido gálico e seus ésteres (10 $\mu$ M). Teste de redução do NBT

% Células positivas - Teste do NBT	
Controle positivo	100,0%
Controle negativo	0,0%
Ácido gálico	97,0%
Galato de metila	97,0%
Galato de propila	97,0%
Galato de hexila	20,0%
Galato de octila	3,5%

Como apresentado na Tabela 17, e como podemos observar na Figura 33, apenas G6 e G8 mostraram-se eficazes na inibição da redução do NBT, com G6 apresentando inibição de 80% na formação de precipitado de formazana no citoplasma dos neutrófilos, e G8 inibindo em 96,5% esta formação. Nos neutrófilos tratados com G6 a 10 $\mu$ M (Figura 33 – F), mesmo as células positivas apresentaram a presença de precipitado de formazana em quantidade bastante inferior ao controle positivo, e aos neutrófilos tratados com G0, G1 e G3. Nas células tratadas com G8 a 10 $\mu$ M (Figura 33 – G), entretanto, praticamente não foram observadas células com presença de precipitado no citoplasma.

**Figura 33:** Fotomicrografias de neutrófilos isolados na presença de NBT

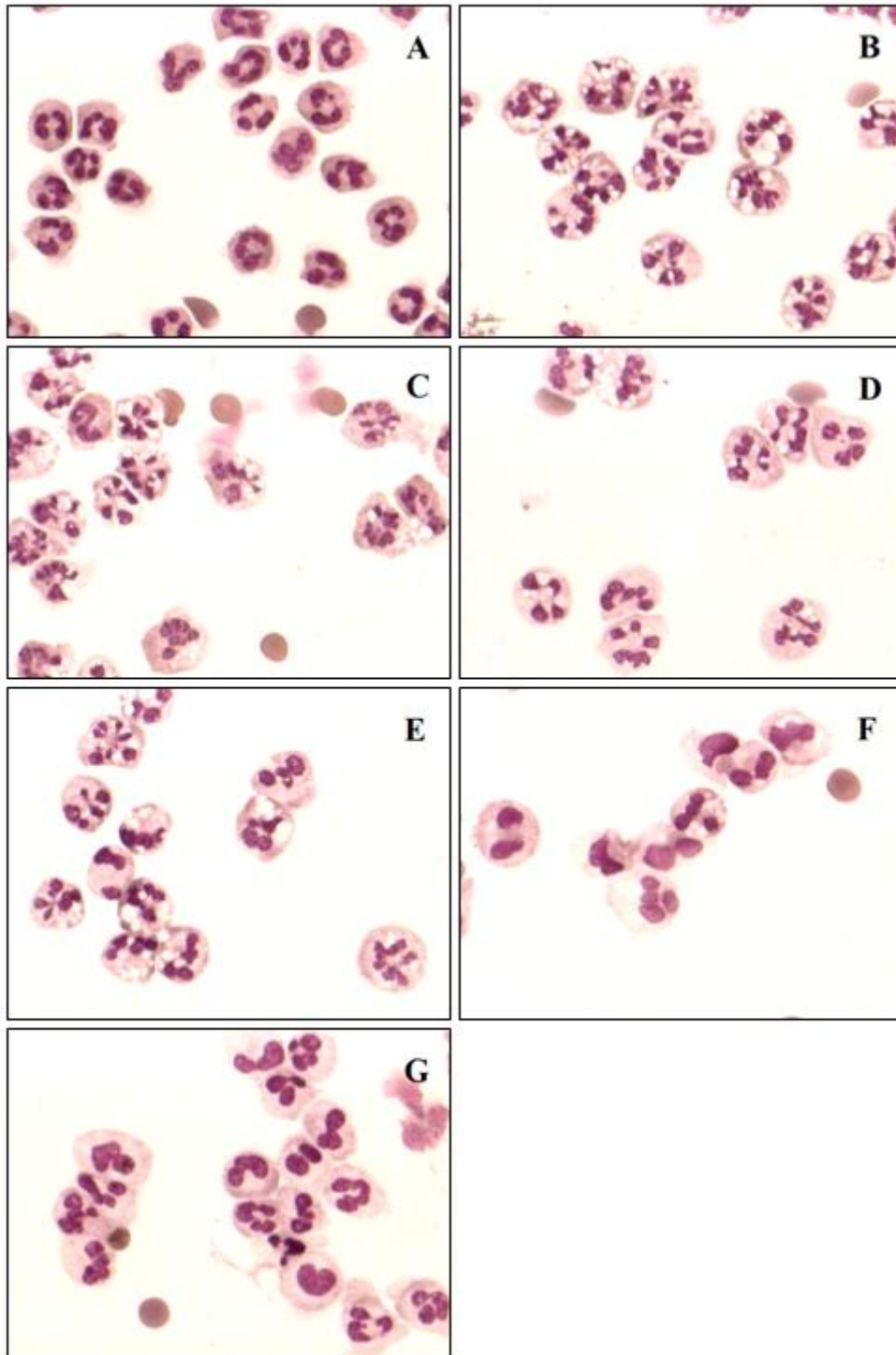


A) Neutrófilos sem estímulo (controle negativo); B) Neutrófilos estimulados por PMA (controle positivo); C-G) Neutrófilos estimulados por PMA e tratados com as substâncias testes a 10 $\mu$ M: C) ácido gálico; D) galato de metila; E) galato de propila; F) galato de hexila; G) galato de octila.

#### **4.11 Avaliação da morfologia dos neutrófilos sob efeito da estimulação por PMA**

Este teste foi realizado com o objetivo de avaliar qualitativamente o efeito de um estímulo celular potente, o PMA, na morfologia dos neutrófilos, bem como o efeito do tratamento dos neutrófilos com o ácido gálico e seus ésteres nos neutrófilos estimulados. A partir deste ensaio podemos observar que a estimulação do neutrófilo com PMA gera no mesmo grandes alterações morfológicas, com presença de intensa vacuolização do citoplasma, e a presença de núcleos picnóticos, característicos de células em processo de morte. O tratamento dos neutrófilos com ácido gálico não levou à significativa alteração desses efeitos, entretanto, um efeito protetor sobre os neutrófilos estimulados foi observado conforme o número de carbonos na cadeia lateral do galato aumentava. Grande efeito protetor pode ser observado nas células tratadas com G6 (Figura 34-F) e G8 (Figura 34-G), as quais apresentaram morfologia muito próxima ao controle negativo. As fotomicrografias dos neutrófilos nos diferentes tratamentos são apresentadas na Figura 34.

**Figura 34:** Efeito da estimulação por PMA em neutrófilos isolados e efeito protetor dos ésteres do ácido gálico

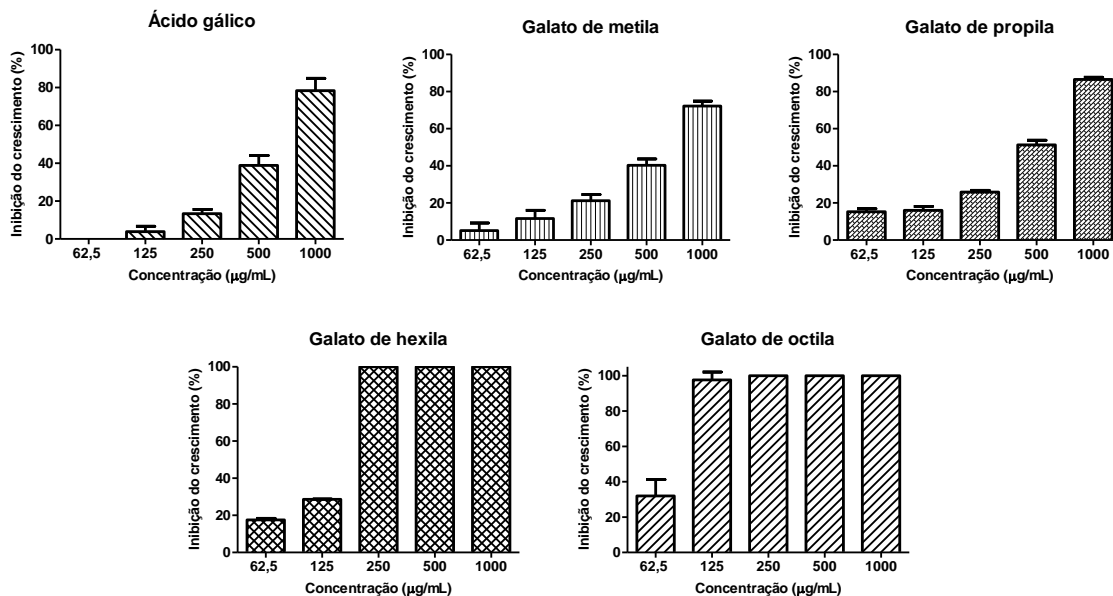


A) Neutrófilos sem estímulo (controle negativo); B) Neutrófilos estimulados por PMA (controle positivo); C-G) Neutrófilos estimulados por PMA e tratados com as substâncias testes a 10 $\mu$ M: C) ácido gálico; D) galato de metila; E) galato de propila; F) galato de hexila; G) galato de octila.

#### 4.12 Atividade anti-*Helicobacter pylori* do ácido gálico e seus ésteres

O efeito do ácido gálico e seus ésteres sobre o crescimento do *H. pylori* pode ser visualizado na Figura 35 e Tabela 18. Os galatos com maior cadeia carbônica apresentaram os melhores resultados, com CIM de 125 µg/mL para G8 e de 250 µg/mL para G6 e com CBM de 250 e 500 µg/mL para G8 e G6, respectivamente. Em relação ao G0, G1 e G3, as inibições encontradas na maior concentração testada (1000 µg/mL) foram de 78,4% ± 6,5; 72,2% ± 2,7 e 86,5% ± 1,2 respectivamente.

**Figura 35:** Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* pelo ácido gálico e seus ésteres



Os resultados representam a média ± desvio padrão da triplicata de três experimentos independentes

**Tabela 18:** Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* e valores de CIM (µg/mL) e CBM (µg/mL) obtidos para ácido gálico e seus ésteres

Substância	Inibição do crescimento (%) <sup>*</sup>						
	Concentração (µg/mL)					CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
	62,5	125	250	500	1000		
G0	0,0 ± 0,0	3,8 ± 2,9	13,3 ± 2,3	38,8 ± 5,3	78,4 ± 6,5	> 1000	-
G1	5,1 ± 4,1	11,6 ± 4,4	21,2 ± 3,4	40,3 ± 3,4	72,2 ± 2,7	> 1000	-
G3	15,3 ± 1,6	16,0 ± 2,1	25,9 ± 0,9	51,3 ± 2,5	86,5 ± 1,2	> 1000	-
G6	17,6 ± 0,8	28,6 ± 0,2	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	250	500
G8	32,0 ± 9,2	99,4 ± 6,1	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	125	250

\*Valor apresentado como média ± desvio padrão

## 5. DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos, presentes em grande variedade de plantas medicinais, vegetais e frutas, são classificados como metabólitos secundários de plantas, atuando nestas principalmente na defesa contra invasão por patógenos e radiação ultravioleta (BECKMAN, 2000; PASTENE et al., 2009). Estes compostos têm sido extensivamente estudados por pesquisadores do mundo todo, principalmente devido às suas atividades antioxidante e anti-inflamatória, e por atuarem em importantes processos biológicos, resultando em benefícios à saúde. Entre as atividades descritas para esses compostos encontram-se: 1) proteção contra aterosclerose, pela inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL); 2) proteção do DNA contra danos oxidativos, reduzindo, desta forma, o surgimento de alguns cânceres; 3) atividade anti-inflamatória e antitrombótica; 4) ação antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus; entre diversos outros efeitos já relatados (DUTHIE; DUTHIE; KYLE, 2000; PANDEY; RIZVI, 2009; ARRANZ et al., 2012; GIOVINAZZO; GRIECO, 2015). Destaca-se ainda que esses compostos possuem a vantagem, como fármacos em potencial, de apresentarem baixa toxicidade em relação a outras drogas utilizadas (PASTENE et al., 2009).

O ácido gálico é um composto fenólico, do grupo dos ácidos fenólicos, que tem sido alvo de grandes estudos por suas atividades biológicas apresentadas. Assim como os polifenóis em geral, o ácido gálico está presente em grande diversidade de plantas, sendo também, o principal constituinte fenólico presente em vinhos (MOHAMED; ABD EL-TWAB, 2016; RAGUSA et al., 2017). Diversas atividades biológicas já foram descritas para o ácido gálico, entre elas ação antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (WOLFE; WU; LIU, 2003; KIM et al., 2006; KAUR et al., 2009).

Ésteres do ácido gálico, como metil, propil, octil e dodecil galatos são amplamente utilizados na indústria alimentícia como antioxidantes, bem como também têm sido usados nas indústrias farmacêuticas e cosmética (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013). Estes ésteres também têm sido muito pesquisados na área da saúde, por desempenharem efeitos biológicos semelhantes ao ácido gálico, entretanto, têm demonstrado maior estabilidade e atividades superiores ao próprio ácido.

A produção de EROs por neutrófilos via sistema NADPH oxidase é um processo fisiológico crucial para a defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos. Entretanto, sabe-se também que uma excessiva liberação de EROs provoca danos a tecidos do hospedeiro, intensificando a reação inflamatória e podendo levar à um processo inflamatório

crônico (EL-BENNA et al., 2016). A produção exacerbada de EROs tem sido demonstrada em diversas doenças de cunho inflamatório, tais como síndrome da insuficiência respiratória aguda, artrite reumatoide, aterosclerose, injúria tecidual induzida por isquemia, hipertensão, diabetes, doença renal e sepse (CONDLIFFE; KITCHEN; CHILVERS, 1998; BABIOR, 2000; EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

Uma produção exacerbada de EROs também é observada na infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, que leva à intensa atração de PMNs à mucosa gástrica, mesmo na fase crônica da infecção, com uma constante ativação dos mesmos e produção excessiva de EROs através do *burst* oxidativo dos neutrófilos. Essa grande produção de EROs, entretanto, não consegue debelar a infecção, mas por outro lado, gera uma intensa reação inflamatória no sítio da infecção (DING et al., 2007; ZAIDI et al., 2012). Sabe-se, portanto, que o grau de dano na mucosa gástrica em pacientes infectados com *H. pylori* está associado com o aumento da infiltração de neutrófilos (WARREN; MARSHALL, 1983; FIOCCA et al., 1994) e a produção de espécies reativas de oxigênio pelos mesmos (WANG et al., 2008). Além disso tem sido demonstrado também, que existe uma ação direta das EROs produzidas no processo infeccioso no desenvolvimento neoplásico na mucosa estomacal, e portanto, quanto maior o processo oxidativo gerado, maior a propensão ao desenvolvimento de câncer (BAUER et al., 2014).

Diante do exposto, com o importante papel das EROs no desenvolvimento da infecção por *H. pylori*, moléculas com atividade antioxidantes têm sido estudadas como uma terapia alternativa ou adjuvante para o tratamento desta patologia, pela redução do nível de dano oxidativo (DUNN; COHEN; BLASER, 1997; ZAIDI et al., 2012). Assim sendo, a proposta deste trabalho consistiu em avaliar o ácido gálico e seus ésteres como moléculas em potencial, a serem estudadas e utilizadas no contexto da infecção causada por *H. pylori*, avaliando a eficácia dessas moléculas na inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo de neutrófilos, bem como em sua ação antimicrobiana sobre esta bactéria. O estudo concomitante do próprio ácido gálico e de seus alquil ésteres teve o objetivo de avaliar possíveis diferenças na ação destas moléculas, pela presença de uma cadeia lateral lipofílica nos galatos.

Para triagem da ação antioxidante do ácido gálico e seus ésteres, inicialmente realizou-se ensaios químicos livres de células (efeito supressor sobre o radical livre DPPH e efeito supressor sobre radicais peroxila). Como podemos observar na Tabela 2, no teste com o radical livre DPPH, G0 demonstrou melhor atividade antioxidante quando comparado aos seus ésteres, com  $CE_{50} = 28,8 \mu\text{M}$ , enquanto todos os ésteres apresentaram valores acima deste e com diferença estatística significativa. No teste do efeito supressor sobre radicais



peroxila (degradação do óleo de Tungue), entretanto, os ésteres de maior cadeia carbônica levaram a um maior efeito antioxidante, com G8 e G12 apresentando atividade cerca de 5 vezes superior ao trolox, como apresentado no índice TEAC (Figura 9).

O diferente resultado obtido neste ensaio, em relação ao teste com DPPH (ambos são ensaios livres de células) pode ser explicado pelas diferentes condições nas quais os ensaios são realizados. O teste com óleo de tungue utiliza um sistema de emulsão óleo-água, o que pode facilitar a atividade de moléculas de caráter mais hidrofóbico. Isto explica a maior atividade obtida pelos galatos de maior cadeia carbônica (G8 e G12) neste teste. Tem sido demonstrado na literatura que ensaios baseados em sistemas emulsionados, como o método do óleo de tungue, permitem resultados mais relevantes para estudos da atividade antioxidante de moléculas, por permitir uma condição mais próxima à dos ensaios biológicos (LAGUERRE et al., 2010). Correlação entre os resultados obtidos por este método e em ensaio biológico utilizando fibroblastos foi encontrada, mostrando o clorogenato de dodecila com maior atividade antioxidante quando comparado aos clorogenatos de menor cadeia carbônica (LAGUERRE et al, 2009, LAGUERRE et al, 2011), fortalecendo a maior relevância dos resultados de testes que utilizam sistemas emulsionados para a triagem de um possível efeito em meio biológico.

Após a realização destes testes iniciais e antes da realização dos testes de inibição da produção de EROs em neutrófilos ativados, foram feitos os testes de exclusão do corante azul de tripan e o ensaio do MTT, a fim de verificar uma possível toxicidade do ácido gálico e seus ésteres sobre os neutrófilos isolados de sangue humano. Utilizou-se para estes testes, as mesmas concentrações das substâncias a serem usadas nos demais ensaios. Como podemos visualizar nas Tabelas 3 e 4, o galato de maior cadeia carbônica, G12, mostrou-se citotóxico nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$ , sendo, portanto, excluído dos demais testes. Da mesma forma, em ambos os ensaios, G6 e G8 mostraram-se citotóxicos na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e esta concentração foi excluída dos demais testes com estes dois galatos.

O primeiro teste realizado, para avaliar a inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo de neutrófilos, foi o ensaio quimiluminescente dependente de luminol (QLDLum). A QLDLum é, em grande parte, dependente das reações do sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> (DAHLGREEN; STENDHAL, 1983), entretanto, o luminol também pode ser oxidado pelas outras EROs produzidas no *burst* oxidativo e, além disso, por ser uma molécula relativamente pequena, consegue atravessar a membrana biológica, refletindo, portanto, a detecção de eventos dos ambientes intra e extracelulares (PARIJ et al., 1998) e, desta forma, permite

avaliar a produção de todas as EROs geradas no *burst* oxidativo de neutrófilos (PARACATU et al., 2014).

Para desencadear o *burst* oxidativo de neutrófilos foram utilizados como estímulo: a própria bactéria *Helicobacter pylori*, Zymosan ou PMA. O Zymosan é um estímulo particulado e, assim como a bactéria, necessita ser reconhecido por receptores da membrana do neutrófilo, ser fagocitado e desencadear a transdução de sinal, que culmina com a ativação da proteína quinase C (PKC) (LILIUS; MARNILA, 1992; THELEN; DEWALD; BAGGIOLINI, 1993; PAVELKOVA; KUBALA, 2004). Uma vez ativada, a PKC fosforila os componentes citoplasmáticos da NADPH oxidase, que então migram para a membrana da célula e formam o complexo NADPH oxidase ativo. O PMA, por sua vez, se trata de um estímulo solúvel, e desencadeia o *burst* oxidativo pela ativação direta da PKC, sem necessidade de ser fagocitado (EDWARDS, 1996; PAVELKOVA; KUBALA, 2004).

O ensaio da QLDLum deixou claro o potente efeito anti-EROs dos ésteres do ácido gálico, destacando-se a importância da presença da cadeia carbônica lateral lipofílica para se obter o melhor efeito na inibição da produção das EROs no *burst* oxidativo de neutrófilos. Como podemos observar nas Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15, bem como nas Tabelas 5, 6 e 7, tanto em neutrófilos ativados por Zymosan, quando *H. pylori* ou PMA, a tendência de inibição foi a mesma, com os galatos apresentando maior atividade anti-EROs quanto maior o tamanho da cadeia carbônica lateral, na concentração de 10 µM. A adição de uma metila à molécula do ácido gálico em G1, já levou a um grande aumento em sua capacidade antioxidante no sistema estudado, com a obtenção de uma inibição de quase 100% na produção de EROs com G3, G6 e G8, na concentração de 10 µM. As Figuras 11, 13 e 15, que comparam o efeito obtido para todas as substâncias a 10 µM, não deixam dúvidas sobre a superior atividade anti-EROs dos ésteres do ácido gálico em relação ao próprio ácido.

O ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina (QLDLuc), diferentemente da QLDLum, é utilizado para a avaliação da geração do radical ânion superóxido especificamente (GASBARRINI et al., 1998). O  $O_2^{\bullet-}$  é a primeira ERO formada no *burst* oxidativo de neutrófilos, e a partir do qual todas as demais são geradas.

De forma semelhante ao resultado observado na QLDLum, a QLDLuc também mostrou efeito superior dos ésteres do ácido gálico na inibição na produção de  $O_2^{\bullet-}$  quando comparados ao próprio G0. Mesmo na concentração de 1 µM os galatos de maior cadeia carbônica apresentaram bons valores de inibição, e na concentração de 10 µM esta relação estrutura-atividade fica clara, independente do estímulo utilizado, como podemos visualizar

nas Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21, e nas Tabelas 8, 9 e 10. G6 e G8 foram as moléculas que levaram à maior inibição da produção de  $O_2^{\bullet-}$  neste teste, tanto na concentração de 1  $\mu$ M quanto 10  $\mu$ M, sendo que nesta, levaram à uma inibição de praticamente 100% esta produção.

Neste ensaio, além de testar-se G0 e seus ésteres, utilizou-se também apocinina, um conhecido inibidor da NADPH oxidase e que, portanto, inibe a formação do  $O_2^{\bullet-}$ . Todos os ésteres apresentaram efeito superior à apocinina na concentração de 10  $\mu$ M, como pode ser observado nas Figuras 17, 19 e 21, mostrando mais uma vez o grande efeito anti-EROs apresentado por essas moléculas.

O ensaio do WST-1 também foi aplicado com objetivo de avaliar a produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por *H. pylori*, Zymosan e PMA. Este teste foi realizado a fim de confirmar os resultados obtidos no teste da QLDLuc, uma vez que alguns autores questionam a utilização da lucigenina para a quantificação do radical ânion superóxido, afirmando que ela por si mesma pode funcionar como uma fonte geradora deste radical, via oxidação do radical cátion lucigenina, em uma reação conhecida como ciclo redox (SPASOJEVIC et al., 2000), embora estudos de validação do método mostrarem que esta produção de  $O_2^{\bullet-}$  pela própria lucigenina ocorre somente na utilização de concentrações elevadas da mesma (acima de 250  $\mu$ M), concentrações estas bem acima das utilizadas nos testes para a detecção do radical nos sistemas enzimáticos e celulares (LI et al., 1998).

Os resultados obtidos no ensaio do WST-1 foram condizentes com os da quimiluminescência dependente de lucigenina, confirmando a capacidade do ácido gálico e seus ésteres de inibir a produção do radical ânion superóxido. Neste teste, independente o estímulo utilizado, G6 e G8 também mostraram ser as moléculas com maior capacidade de inibir a formação de  $O_2^{\bullet-}$ , apresentando as maiores porcentagens de inibição dessa formação, tanto nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ M, com inibição superior a 80% a 10  $\mu$ M, como pode ser visualizado nas Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27 e nas Tabelas 11, 12 e 13.

A fim de se obter uma visualização completa do efeito anti-EROs do ácido gálico e seus ésteres, também foram aplicados ensaios morfológicos. Para esta finalidade, realizou-se o teste do NBT, no qual a atividade oxidativa é medida pela presença de precipitados negros de formazana no citoplasma do neutrófilo, devido à redução do NBT pelo radical ânion superóxido (OLIVEIRA et al., 2009).

Como podemos observar na Tabela 17, e de forma incontestável na Figura 33, G6 e G8 mais uma vez se mostraram extremamente potentes na inibição da produção do radical ânion superóxido, com redução praticamente total da produção de precipitados de formazana

na concentração de 10  $\mu$ M para esses dois galatos, não deixando dúvidas quanto ao enorme potencial da aplicação dessas substâncias para reduzir o estresse oxidativo gerado no *burst* respiratório de neutrófilos.

Ensaio morfológico utilizando somente PMA e as substâncias testes também foi realizado, para verificar a ação dos galatos sem a interferência de sonda nenhuma. Os neutrófilos, quando estimulados por PMA, rapidamente sofrem alterações morfológicas, com formação de grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos, que se assemelham a vacúolos fagocíticos gerados na fagocitose de partículas (HOIDAL et al., 1978), e presença de degeneração nuclear (picnose) (DE FARIA et al., 2012; PARACATU et al., 2014).

O tratamento dos neutrófilos com ácido gálico não levou à significativa proteção dos neutrófilos frente ao estímulo com PMA, entretanto, efeito protetor crescente foi observado conforme o número de carbonos na cadeia lateral do galato aumentava. Grande efeito protetor pode ser observado nas células tratadas com G6 (Figura 34-F) e G8 (Figura 34-G), as quais apresentaram morfologia muito próxima ao controle negativo, reafirmando, mais uma vez a enorme capacidade desses galatos na inibição do complexo NADPH oxidase.

Os resultados obtidos nos ensaios quimiluminescentes, bem como os obtidos no ensaio do WST-1, revelaram o ácido gálico e seus ésteres como moléculas com grande capacidade de inibir a produção de EROs no *burst* oxidativo de neutrófilos, e esta atividade aumenta à medida que a cadeia alquílica lateral aumenta. Desta forma, os galatos com seis e oito carbonos na cadeia lateral, G6 e G8, foram as moléculas que demonstraram a maior efeito anti-EROs, e portanto, na capacidade de reduzir o estresse oxidativo do *burst* respiratório de neutrófilos. Esta inibição se deu de forma independente do estímulo empregado, e resultados semelhantes foram obtidos com a utilização dos estímulos particulados, Zymosan e *H. pylori*, bem como com o estímulo solúvel, o PMA. A mesma tendência foi confirmada através dos ensaios morfológicos, que mostraram claramente que o efeito protetor sobre as alterações morfológicas dos neutrófilos estimulados por PMA, aumentou à medida que a cadeia carbônica lateral também aumentava, de modo que o tratamento dos neutrófilos com G8 levou praticamente à ausência de tais alterações. Considerando que tais efeitos deletérios são decorrentes da grande estimulação provocada pelo PMA ao neutrófilo, e à conseqüente produção intensa de EROs, a redução desses danos é condizente com o efeito anti-EROs observado nos demais testes.

Vários outros estudos tem demonstrado que pequenas mudanças na estrutura de moléculas podem levar a grandes melhoras em sua atividade biológica. Em estudo realizado por Paracatu et al. (2014), cafelato de heptila se mostrou mais eficiente que os cafelatos de

menor cadeia carbônica e o ácido cafeico na inibição da produção de EROs por neutrófilos ativadas, bem como também demonstrou maior atividade antimicrobiana contra *H. pylori*. O mesmo efeito também foi demonstrado em estudo realizado com ácido protocatecuico e seus ésteres, no qual a presença de cadeia carbônica lateral nos ésteres deste ácido, foi fator determinante para se obter apreciável inibição da enzima NADPH-oxidase (DE FARIA et al, 2012). O mecanismo pelo qual os ésteres desses compostos levam a uma maior atividade anti-EROs ainda não está completamente elucidado, entretanto, todos estes estudos tem destacado como fator crucial o aumento da hidrofobicidade da molécula, conferido pela adição da cadeia alquílica lateral. Esse aumento da lipofilicidade dos ésteres permitiria uma maior interação dessas moléculas com a membrana lipídica das células eucarióticas, de forma a exercerem suas atividades de forma mais pronunciada (XIMENES et al, 2010).

Baseado nesses dados seria de se esperar que efeito similar fosse observado no teste de inibição da produção do ácido hipocloroso, o que somente ocorreu no teste realizado com Zymosan, não sendo observado no teste realizado com PMA, e comprovado no teste utilizando a enzima pura, nos quais efeito oposto foi encontrado, ou seja, o tratamento com os galatos levou à estimulação da produção de HOCl (Figuras 28, 30 e 32).

O HOCl é formado dentro do neutrófilo através da ação da enzima mieloperoxidase (MPO). Esta enzima pode participar de dois ciclos diferentes, o ciclo de cloração e o ciclo da peroxidase. A MPO em sua forma nativa (forma férrica) reage com o  $H_2O_2$  presente no meio, o que leva à formação do chamado composto I, forma altamente oxidativa da MPO, que pode ser diretamente reduzida em dois elétrons por (pseudo) haletos, restituindo a forma nativa da enzima, e formando derivados halogenados, como o HOCl (este é o chamado ciclo de cloração). Caminho alternativo a este consiste na redução consecutiva de dois elétrons, no qual inicialmente o composto I é reduzido ao chamado composto II e este, por sua vez, é novamente reduzido, restituindo a forma nativa da enzima (ciclo da peroxidase) (VLASOVA; SOKOLOV; ARNHOLD, 2012). Sabe-se também, que a presença de grandes quantidades de  $H_2O_2$  leva à estabilização do composto II, fazendo com que este acumule e não seja facilmente reduzido para a forma de MPO nativa. A presença de alguns substratos, entretanto, ao reagir com o composto II, levam à reciclagem da MPO nativa, tornando-a novamente disponível para os ciclos de cloração ou da peroxidase. Um estudo realizado com o aminoácido tirosina demonstrou esse efeito para o mesmo, no qual este substrato mostrou-se reagir com o composto II, e a restituição da forma nativa da MPO levou a um aumento da atividade de cloração da mesma, com consequente aumento da produção de HOCl (VLASOVA; SOKOLOV; ARNHOLD, 2012). No presente estudo, entretanto, podemos observar dois

efeitos diferentes do ácido gálico e seus ésteres: 1) agem como inibidores do complexo enzimático NADPH oxidase, com diminuição da produção de radical ânion superóxido e, conseqüentemente, diminuição da produção das outras EROs do *burst* oxidativo de neutrófilos; 2) ação das substâncias como substratos que reagem com o composto II no ciclo da peroxidase da MPO, levando à restituição de sua forma nativa, e tornando-a novamente disponível para a geração de mais HOCl, o que levaria à maior formação desta ERO.

No caso da estimulação do neutrófilo por PMA, por ser um estímulo muito potente, este levaria à produção de grandes quantidades de EROs, e conseqüentemente, a alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio levaria ao acúmulo do composto II, que reagindo com o ácido gálico ou seus ésteres, seria convertido novamente à forma nativa da enzima, e esta por sua vez, geraria mais HOCl. No teste realizado utilizando como estímulo o Zymosan, entretanto, como a estimulação provocada por este não é tão acentuada como o PMA, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado no meio seria menor, a ponto de não estabilizar o composto II do ciclo da peroxidase e, desta forma, o efeito estimulatório da MPO não seria observado.

Mesmo com este efeito estimulatório da produção de HOCl em neutrófilos estimulados por PMA, entretanto, o efeito geral na produção de EROs no *burst* oxidativo de neutrófilos continua sendo o de inibição, conforme claramente observado no teste quiluminescente dependente de luminol, que detecta a produção de todas as EROs do *burst* oxidativo, sem diminuição da eficiência em obter tal efeito.

Além da realização dos testes de inibição da produção de EROs do *burst* oxidativo de neutrófilos, avaliou-se também a atividade antimicrobiana do ácido gálico e seus ésteres sobre a bactéria *Helicobacter pylori*.

Embora existam muitas pesquisas sendo desenvolvidas com o *H. pylori* há anos, e que esforços tenham sido despendidos, muitas dificuldades ainda tem sido encontradas para o estabelecimento de uma terapia eficaz na erradicação desta bactéria (FU et al., 2017). O tratamento padrão utilizado consiste em uma terapia tripla, como o uso de um inibidor de bomba de prótons, como o omeprazol, e o antibiótico claritromicina, além de amoxicilina ou metronidazol (MALFERTHEINER et al., 2012), no entanto, o aparecimento de isolados de *H. pylori* resistentes à esta terapia está cada vez maior (MALFERTHEINER; SELGRAD, 2010), e além disso, o surgimento de alergias à um desses medicamentos não é raro (FU et al., 2017), dificultando ainda mais o tratamento da infecção, pela inexistência de tratamentos alternativos eficazes. Este panorama leva à necessidade urgente de caracterização de novas moléculas com atividade anti-*Helicobacter pylori*.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do ácido gálico e seus ésteres sobre *H. pylori*, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme descrito em material e métodos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano em mais de 90% (BONACORSI et al., 2009).

De forma semelhante ao observado nos testes de inibição da produção de EROs, o teste antimicrobiano também deixou claro a necessidade de uma cadeia lateral lipofílica para se obter maior atividade anti- *Helicobacter pylori*, no qual G6 e G8 novamente foram as moléculas mais ativas, com valores de CIM de 250 e 125 µg/mL, respectivamente. Para as demais substâncias o valor de CIM não pode ser determinado, sendo este superior à maior concentração testada (1000 µg/mL).

Alguns trabalhos tem tentado explicar a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos e seus ésteres. Tem sido sugerido que a interação desses compostos com os componentes lipofílicos, e a alteração na permeabilidade da membrana celular microbiana leve a tal efeito. Estudos tem destacado o dano em membrana como um dos principais mecanismos através do qual compostos fenólicos exercem efeito anti- *Helicobacter pylori*, além de poderem agir neutralizando proteínas da bactéria, como a urease, um fator de virulência essencial para a sobrevivência deste microrganismo (PASTENE et al., 2009).

Embora o exato mecanismo de ação dos galatos não esteja completamente esclarecido, de forma semelhante ao efeito anti-EROs observado, a maior atividade antimicrobiana encontrada para os ésteres do ácido gálico contendo maior número de carbonos em sua cadeia lateral, também pode ser explicada pela maior lipofilicidade dessas moléculas, que permitiria uma maior interação com a membrana celular bacteriana e consequente desestabilização da mesma, destacando-se o fato do *H. pylori* ser uma bactéria Gram-negativa, e possuir membrana externa de natureza lipídica. Resultados de atividade anti-*H. pylori* similares foram obtidos em estudo com ácido cafeico e seus alquil cafelatos (cafelatos de metila, butila e heptila), no qual cafelatos de butila e heptila mostraram maior atividade antimicrobiana sobre *H. pylori* (PARACATU et al., 2014). Estudos com outros microrganismos também mostraram maior atividade dos alquil galatos. O metil-galato mostrou-se mais efetivo que o ácido gálico na inibição do crescimento bacteriano oral e a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* em estudo desenvolvido por Kang et al., (2008), bem como o nonil-galato apresentou maior atividade que o ácido gálico na inibição do crescimento de *Salmonella choleraesuis* (KUBO; FUJITA; NIHEI, 2002). Em estudo realizado com diferentes espécies de fungos os ésteres também apresentaram maior atividade antifúngica quando comparados ao ácido gálico, com uma atividade antifúngica crescente à medida que a cadeia lateral lipofílica aumentava (DE

PAULA; SILVA et al., 2014). Todos esses resultados destacam a importância da cadeia carbônica lateral, garantindo uma característica anfifílica à molécula para a seu maior efeito antimicrobiano.



## 6. CONCLUSÕES

- O ácido gálico e seus ésteres mostraram acentuada atividade inibitória na formação de EROs no *burst* oxidativo de neutrófilos, independente do estímulo utilizado;
- Associado ao efeito anti-EROs, as substâncias testadas também demonstraram atividade antimicrobiana sobre *H. pylori*, atividade esta de extrema importância no contexto da infecção por esta bactéria;
- Tanto na ação anti-EROs quanto na atividade antimicrobiana, o efeito obtido foi maior quanto maior o número de carbonos presentes na cadeia carbônica lateral dos galatos, sendo crucial a presença desta, por conferir maior hidrofobicidade à molécula, e permitir a máxima atividade antimicrobiana observada *in vitro* e a máxima atividade anti-EROs em modelo *ex vivo*;
- Assim, os ésteres do ácido gálico apresentam-se como moléculas promissoras no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori*, devido à ação antimicrobiana sobre o mesmo, bem como pela redução do estresse oxidativo gerado no sítio da infecção.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, R. C. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. **Methods Enzymol.**, v.133, p.449-93, 1986.
- ARRANZ, S.; CHIVA-BLANCH, G.; VALDERAS-MARTINEZ, P.; MEDINA-REMON, A.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ESTRUCH, R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. **Nutrients.**, v.4, 759–81, 2012.
- BABIOR, B. M. NADPH Oxidase: an update. **Blood**, v.93,p.1464-76, 1999.
- BABIOR, B. M. NADPH Oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v.16, p.42-7, 2004.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v.109, p.33–44, 2000.
- BATTAGLIA, M. Neutrophils and type 1 autoimmune diabetes. **Curr. Opin. Hematol.**, v.21, p.8–15, 2014.
- BAUER, G.; BERESWILL, S.; AICHELE, P.; GLOCKER, E. *Helicobacter pylori* protects oncogenically transformed cells from reactive oxygen species-mediated intercellular induction of apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 7, p. 1582-91, 2014.
- BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiol. Mol. Plant. Pathol.**, v.57, p.101-10, 2000.
- BERTELLI, A. A.; DAS, D. K. Grapes, wines, resveratrol and heart health. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 54, p.468-76, 2009.
- BIROSOVÁ, L.; MIKULÁSOVÁ, M.; VAVERKOVÁ, S. Antimutagenic effect of phenolic acids. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.**, v.149, p.489-91, 2005.
- BONACORSI, C.; RADDI, M. S. G.; Z CARLOS, I. Z.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). **BMC Complement. Altern. Med.**, v.9, p.1-7, 2009.
- BOREIRI, M.; SAMADI, F.; ETEMADI, A.; BABAEI, M.; AHMADI, E.; SHARIFI, A. H.; NIKMANESH, A.; HOUSHIAR, A.; POURFARZAI, F.; YAZDANBOD, A.; ALIMOHAMMADIAN, M.; SOTOUDEH, M. Gastric cancer mortality in a high incidence area: Long-term follow-up of *Helicobacter pylori*-related precancerous lesions in the general population. **Arch. Iran. Med.**, v.16, p.343–7, 2013.
- BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, Suppl 9, 77, 1968.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRISSELT, M.; ENARSSON, K.; LUNDIN, S.; KARLSSON, A.; KUSTERS, J.G.; SVENNERHOLM, A.M.; BACKERT, S.; QUIDING-JÄRBRINK, M. *Helicobacter pylori* induce neutrophil transendothelial migration: role of the bacterial HP-NAP. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 249, p. 95-103, 2005.

BUOMMINO, E.; DONNARUMMA, G.; MANENTE, L.; DE FILIPPIS, A.; SILVESTRI, F.; IAQUINTO, S.; TUFANO, M.A.; DE LUCA, A. The *Helicobacter pylori* protein HspB interferes with Nrf2/Keap1 pathway altering the antioxidant response of Ags cells. **Helicobacter**, v. 17, p. 417-25, 2012.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Green tea: Nature's defense against malignancies. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.49, p.463-73, 2009.

CAIELLI, S.; BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V. Neutrophils come of age in chronic inflammation. **Curr. Opin. Immunol.**, v.24, p.671-7, 2012.

CALVO, T. R.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S.; BALLESTEROS, K. V. R.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TAMASHIRO, J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; TAKAHIRA, R. K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 3, p. 451-9, 2007.

CAPPON, A.; BABOLIN, C.; SEGAT, D.; CANCIAN, L.; AMEDEI, A.; CALZETTI, F.; CASSATELLA, M.A.; D'ELIOS, M.M.; DE BERNARD, M. *Helicobacter pylori*-derived neutrophil-activating protein increases the lifespan of monocytes and neutrophils. **Cell Microbiol.**, v. 12, p. 754-64, 2010.

CIARLINI, P.C.; ANTONIO, D.B.A.; BARBIERE, F.; BONELLO, F.L.; FEITOSA, F.L.F. Efeito da vacina contra brucelose bovina sobre a capacidade neutrofílica de redução do NBT. **Ars. Veterinaria**, Jaboticabal, SP. vol. 21, n° 2, p.251-256, 2005.

CIRAK, M. Y.; AKYON, Y.; MEGRAUD, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.12, p.4-9, 2007.

COELHO, L. G. V.; ZATERKA, S. II Consenso brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. **Arq. Gastroenterol.**, v. 42, n. 2, p. 128-32, 2005.

CONDLIFFE, A. M.; KITCHEN, E.; CHILVERS, E. R. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. **Clin. Sci. (Lond)**, v.94, p.461-71, 1998.

DAHLGREN, C.; STENDHAL, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.**, v.39, p. 736-41, 1983.

DEMIREL, B. B.; AKKAS, B. E.; VURAL, G. U. Clinical factors related with *Helicobacter pylori* infection—Is there an association with gastric cancer history in first-degree family members? **Asian. Pac. J. Cancer. Prev.**, v.14, p.1797-1802, 2013.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v. 89, n. 2, p.271-7, 1986.

DE FARIA, C. M.; NAZARÉ, A. C.; PETRÔNIO, M. S.; PARACATU, L. C.; ZERAIK, M. L.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H.; DA FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Protocatechuic acid alkyl esters: hydrophobicity as a determinant factor for inhibition of NADPHoxidase. **Curr. Med. Chem.**, v.19(28), p.4885-93, 2012.

DE PAULA E SILVA, A. C. A.; COSTA-ORLANDI, C. B.; GULLO, F. P.; SANGALLI-LEITE, F.; OLIVEIRA, H. C.; SILVA, J. F.; SCORZONI, L.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, S. A.; BENADUCCI, T.; WOLF, V. G.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Antifungal activity of decyl gallate against several species of pathogenic fungi. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

DING, S. Z.; MINOHARA, Y.; FAN, X. J.; WANG, J.; REYES, V. E.; PATEL, J.; DIRDEN-KRAMER, B.; BOLDOGH, I.; ERNST, P. B.; CROWE, S. E. *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.75, p.4030-39, 2007.

DUNN, B. E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* . **Clin. Microbiol. Rev.**,v.10, 720-41, 1997.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: Implications as nutritional antioxidants. **Nutr. Res. Rev.**, v.13, p.79–106, 2000.

EDWARDS, S. W. The O<sub>2</sub>- generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **Methods.**,v. 9, p. 563–77, 1996.

EL-BENNA, J.; HURTADO-NEDELEC, M.; MARZAIOLI, V.; MARIE, J. C.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; DANG, P. M. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunol. Rev.**, v.273, p.180-93, 2016.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Semin. Immunopathol.**, v.30, p.279–89, 2008.

EVANS, D.J.; EVANS, D.G.; TAKEMURA, T.; NAKANO, H.; LAMPERT, H.C.; GRAHAM, D.Y.; GRANGER, D.N.; KVIETYS, P.R. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2213-20, 1995.

EVANS, D.J.; EVANS, D.G.; TAKEMURA, T.; NAKANO, H.; LAMPERT, H.C.; GRAHAM, D.Y.; GRANGER, D.N.; KVIETYS, P.R. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2213-20, 1995.

FARIA, C.M.Q.G.; NAZERÉ, A.C.; PETRÔNIO, M.S.; PARACATU, L.C.; ZARAIK, M.L.; REGASINI, L.O.; SILVA, D.H.S.; FONSECA, L.M.; XIMENES, V.F. Protocatechuic Acid Alkyl Esters: Hydrophobicity As a Determinant Factor for Inhibition of NADPH Oxidase. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, p. 4885-93, 2012.

FAULKNER, K.; FRIDOVICH, I. Luminol and lucigenin as detectors for O<sub>2</sub><sup>-</sup>. **Free Radic. Biol. Med.**, v.15, p.447-51, 1993.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M.C., ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **J. Immunol. Methods**, v. 131, n.2, p. 165-72, 1990.

FIGUEIREDO, A. S. G. **Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) a ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. De Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

FIOCCA, R.; LUINETTI, O.; VILLANI, L.; CHIARAVALLI, A.M.; CAPELLA, C.; SOLCIA, E. Epithelial cytotoxicity, immune responses, and inflammatory components of *Helicobacter pylori* gastritis. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v. 205, p. 11-21,1994.

FU, H.W. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein: From molecular pathogenesis to clinical applications. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, i.18, p. 5294-5301, 2014.

FU, W.; SONG, Z.; ZHOU, L.; XUE, Y.; DING, Y.; SUO, B.; TIAN, X.; WANG, L. Randomized clinical trial: Esomeprazole, Bismuth, Levofloxacin, and Amoxicillin or Cefuroxime as first-line eradication regimens for *Helicobacter pylori* infection. **Dig. Dis. Sci.**, 2017.

GALICE. D. M.; BONACORSI, C.; SOARES, V. C. G.; RADDI, M. S. G.; FONSECA, L. M. Effect of subinhibitory concentration of chlorhexidine on *Streptococcus agalactiae* virulence factor expression. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.28, p.143-46, 2006.

GASBARRINI, A.; PASINI, P.; NARDO, B.; DE NOTARIIS, S.; SIMONCINI, M.; CAVALLARI, A.; BERNARDI, M.; RODA, A. Chemiluminescent real time imaging of postischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. **Free Radic. Biol. Med.**, v.15, p.211-16, 1998.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **J. Immunol. Methods**, v. 94, n.1-2, p.57-63, 1986.

GIFTSON, J. S.; JAYANTHI, S.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Invest. New. Drugs**, v. 28, p.251-59, 2009.

GILANI, A.; RAZAVILAR, V.;ROKNI, N.; RAHIMI, E. *VacA* and *cagA* genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from raw meat in Isfahan province, Iran. **Vet. Res. Forum.**, v.8, p.75-80, 2017.

GIOVINAZZO, G.; GRIECO, F. Functional properties of grape and wine polyphenols. **Plant Food Hum. Nutr.**, v.70, 454–62, 2015.

GRINGHUIS, S.I.; DEN DUNNEN, J.; LITJENS, M.; VAN DER VLIST, M.; GEIJTENBEEK, T.B. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signal some

tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. **Nat. Immunol.**, v.10, p. 1081-88, 2009.

HOIDAL, J. R.; REPINE, J. E.; BEALL, G. D.; RASP, F. L. JR.; WHITE, J. G. The Effect of Phorbol Myristate Acetate on the Metabolism and Ultrastructure of Human Alveolar Macrophage. **Am. J. Pathol.**, v.91(3), p.469-82, 1978.

INNOCENTI, M; THORESON, A.C.; FERRERO, R.L.; STRÖMBERG, E.; BÖLIN, I.; ERIKSSON, L.; SVENNERHOLM, A.M.; QUIDING-JÄRBRINK, M. Helicobacter pylori-induced activation of human endothelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4581–90, 2002.

ISAACSON, P.G.; SPENCER, J. Gastric lymphoma and *Helicobacter pylori*. **Important Adv. Oncol.**, p.111, 1996.

ISHII, K.J.; KOYAMA, S.; NAKAGAWA, A.; COBAN, C.; AKIRA, S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. **Cell Host Microbe**, v. 3, p. 352-363, 2008.

JOHNSON, D.K. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by orthomethoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v.9, p.191-203, 2002.

JÖNSSON, F.; MANCARDI, D. A.; KITA, Y.; KARASUYAMA, H.; IANNASCOLI, B.; ROOIJEN, N. V.; SHIMIZU, T.; DAËRON, M.; BRUHNS, P. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. **J. Clin. Invest.**, v. 121, p.1484–96, 2011.

KANEGAE, M.P.P.; FONSECA, L. M.; BRUNETTI, I. L.; SILVA, S. O.; XIMENES, V. F. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: Contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. **Biochem. Pharmacol.**, v.74, p.457-64, 2007.

KANG, M. S.; OH, J. S.; KANG, I. C.; HONG, S. J.; CHOI, C. H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **J. Microbiol.**, v.46, p.744-50, 2008.

KARIMI, E.; JAAFAR, H. Z.; AHMAD, S. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisa pumila* Benth. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4438-50, 2011.

KAUR, M.; VELMURUGAN, B.; RAJAMANICKAM, S.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. **Pharm. Res.**, v.26, p.2133–40, 2009.

KEDARE, S. B.; SINGH, R P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **J. Food Sci. Technol.**, v.48, p.412-22, 2011.

KIM, S. H.; JUN, C. D.; SUK, K.; CHOI, B. J.; LIM, H.; PARK, S.; LEE, S. H.; SHIN, H. Y.; KIM, D. K.; SHINK, T. Y. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicol. Sci.**, v.91, p.123-31, 2006.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, p.905-8, 2003.

KOTTAKIS, F.; PAPADOPOULOS, G.; PAPPA, E.V.; CORDOPATIS, P.; PENTAS, S.; CHOLI-PAPADOPOULOU, T. *Helicobacter pylori* neutrophil- activating protein activates neutrophils by its C-terminal region even without dodecamer formation, which is a prerequisite for DNA protection--novel approaches against *Helicobacter pylori* inflammation. **FEBS. J.**, v. 275, p. 302-17, 2008.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, n. 3, p. 347-50, 2001.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; XIAO, P.; HARAGUCHI, H. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p.3533-39, 2002.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Anti-*Salmonella* activity of alkyl gallates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p.6692-96, 2002.

KUBO, I.; FUJITA, K. I.; NIHEI, K. I.; MASUOKA, N. Non-antibiotic anti-bacterial activity of dodecyl gallate. **Bioorg. Med. Chem.**, v.11, p.573-80, 2003.

LAGUERRE, M., DECKER, E. A.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 13, p. 518-25, 2010.

LAGUERRE, M.; LOPEZ-GIRALDO, L. J.; LECOMTE, J.; BAREA, B.; COMBON, E.; TCHOBO, P. F.; BAROUCH, N.; VILLENEUVE, P. Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: A novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. **Anal. Biochemistry**, v. 308, p. 282-290, 2008.

LAGUERRE, M.; LOPEZ-GIRALDO, L. J.; LECOMTE, J., et al. Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: the cutoff theory behind the polar paradox. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p. 11335-42, 2009.

LAGUERRE, M.; LOPEZ-GIRALDO, L. J.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Widespread methods and new analytical approaches in antioxidant evaluation. **Inform.**, v.20, p. 328-32, 2009.

LAGUERRE, M.; WRUTNIAK-CABELLO, C.; CHABI, B.; LÓPEZ-GIRALDO, L.J.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P.; CABELLO, G. Does hydrophobicity always enhance antioxidant drugs? A cut-off effect of the chain length of functionalized chlorogenate esters on ROS-overexpressing fibroblasts. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 63, p. 531-40, 2011

LI, Y.; ZHU, H.; KUPPUSAMY, P.; ROUBAUD, V.; ZWEIER, J. L.; TRUSH, M. A. Validation of lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.4, p. 2015-23, 1998.

- LILIUS, E. M.; MARNILA, P. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. **Experientia**, v.48, p.1082–91, 1992.
- LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur. J. Med. Chem.**, v.60, p.233-9, 2013.
- LOPES, F. C. M.; ROCHA, A.; PIRRACO, A.; REGASINI, L. O.; SIQUEIRA, J. R.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; CARLOS, I. Z.; SOARES, R. *Alchornea glandulosa* ethyl acetate fraction exhibits antiangiogenic activity: preliminary findings from in vitro assays using human umbilical vein endothelial cells. **J. Med. Food**, v. 14, n. 10, p. 1244-53, 2011.
- MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism update. **Mol. Cell Biochem.**, v. 253, n. 1-2, p. 329-338, 2003.
- MALLE, E.; FURTMULLER, P.G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br. J. Pharmacol.** , v.152, n.6, p. 838-54, 2007.
- MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O’MORAIN, C.A.; ATHERTON, J.; AXON, A.T.; BAZZOLI, F.; GENSINI, G.F.; GISBERT, J.P.; GRAHAM, D.Y.; ROKKAS, T.; EL-OMAR, E.M.; KUIPERS, E.J. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. **Gut.**, v.61, p. 646-64, 2012.
- MALFERTHEINER, P.; SELGRAD, M. *Helicobacter pylori* infection and current clinical areas of contention. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 26, p. 618-23, 2010.
- MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.11, p.519–53, 2011.
- MÓCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **J. Exp. Med.**, v.210, p.1283–99, 2013.
- MOHAMED, H. M.; ABD EL-TWAB, S. M. Gallic acid attenuates chromium-induced thyroid dysfunction by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.48, p.225-36, 2016.
- MORAN, A.P.; LINDNER, B.; WALSH E. J. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 6453-63,1997.
- MOUSAVI, S.; SAFARPOOR-DEHKORDI, F.; RAHIMI, E. Virulence factors and antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from raw milk and unpasteurized dairy products in Iran. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 20, p. 51-7, 2014.
- MÜLLER, A.; OERTLI, M.; ARNOLD, I. C. *H. pylori* exploits and manipulates innate and adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection. **Cell Commun. Signal.**, v. 9, n.1, p.1-9, 2011.



NAKAMURA, S.; YAO, T.; AOYAGI, K.; IIDA, M.; FUJISHIMA, M.; TSUNEYOSHI, M. *Helicobacter pylori* and primary gastric lymphoma: histopathologia and immunohistochemical analysis of 237 patients. **Cancer.**, v.79, p.3-15, 1997.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nat. Immunol.**, v.15, p.602–11, 2014.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 9<sup>th</sup> Informational Supplement (aerobic dilution). NCCLS document M100-S9. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard, 6<sup>th</sup> ed. NCCLS document M7-A6. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

NIH. Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, v. 272, n. 1, p. 65-69, 1994.

NOTO, J. M.; PEEK, R. M., Jr. *Helicobacter pylori*: An overview. **Methods. Mol. Biol.**, v.921, p.7–10, 2012.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

ORTEGA, E.; SADABA, M. C.; ORTIZ, A. I.; CESPON, C.; ROCAMORA, A.; ESCOLANO, J. M.; ROY, G.; VILLAR, L. M.; GONZALEZ-PORQUE, P. Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumours in mice. **Br. J. Cancer**, v.88, 940-43, 2003.

OSATO, M. S.; REDDY, R.; REDDY, S. G.; PENLAND, R. L.; GRAHAM, D. Y. Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 17, n.1, p.39-44, 2001.

PAIXÃO, N.; PEREIRA, V.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Quantification of polyphenols with potencial antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. **J. Sep. Sci.**, v.31, p.2189-98, 2008.

PANDEY, R.; MISRA, V.; MISRA, S. P.; DWIVEDI, M.; KUMAR, A.; TIWARI, B. K. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v.11, p.583-88, 2010.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v.2, p.270–8, 2009.

PARACATU, L. C.; BONACORSI, C.; DE FARIAS, C. M. Q. G.; NAZARÉ, A. C.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; RADDI, M. S. G.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Alkyl caffeates as anti-*Helicobacter pylori* and scavenger of oxidants produced by neutrophils. **Med. Chem.**, v.10, i.1, p.74-80, 2014.

- PARIJ, N.; NAGY, A.M.; FONDU, P.; NÈVE, J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.**, v.352, p.299-305, 1998.
- PARREIRA, P.; MAGALHAES, A.; REIS, C. A.; BOREN, T.; LECKBAND, D.; MARTINS, M. C. Bioengineered surfaces promote specific protein-glycan mediated binding of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Acta. Biomater.**, v.9, p.8885–93, 2013.
- PASTENE, E.; SPEISKY, H.; TRONCOSO, M.; ALARCON, J.; FIGUEROA, G. In Vitro Inhibitory Effect of Apple Peel Extract on the Growth of *Helicobacter pylori* and Respiratory Burst Induced on Human Neutrophils. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.7743–9, 2009.
- PAVELKOVA, M.; KUBALA, L. Luminol-, isoluminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence of rat blood phagocytes stimulated with different activators. **Luminescence**, v.19, p.37-42, 2004.
- PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; SANSONE, F.; GAUDIO, P. D.; GRANATA, I.; PORTA, A.; AQUINO, R. P. Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. **J. Ethnopharmacol.**, v. 138, n. 3, p. 705-12, 2011.
- POLENGHI, A.; BOSSI, F.; FISCHETTI, F.; DURIGUTTO, P.; CABRELLE, A.; TAMASSIA, N.; CASSATELLA, M.A.; MONTECUCCO, C.; TEDESCO, F.; DE BERNARD, M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. **J. Immunol.**, v. 178, p.1312-20, 2007.
- QUEIROZ, D. M.; SILVA, C. I.; GONÇALVES, M. H.; BRAGA-NETO, M. B.; FIALHO, A. B.; FIALHO, A. M.; ROCHA, G. A.; ROCHA, A. M.; BATISTA, S. A.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A.; BRAGA, L. L. Higher frequency of cagA EPIYA-C phosphorylation sites in *H. pylori* strains from first-degree relatives of gastric cancer patients. **BMC Gastroenterol.**, v.12, p.107, 2012.
- RAGUSA, A.; CENTONZE C.; GRASSO, M. E.; LATRONICO, M. F., MASTRANGELO, P. F.; SPARASCIO, F.; FANIZZI, F. P.; MAFFIA, M. A comparative study of phenols in Apulian Italian wines. **Foods**, v.6; p.1-10, 2017.
- SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J. Sci. Food Agric.**, v. 76 p.270-276, 1998.
- SÁNCHEZ-ZAUCO, N. A.; GIONO-CEREZO, S.; MALDONADO-BERNAL, C. Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. **Salud Publica Mex.**, v. 52, p.447-54, 2010.
- SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F.; COSTA, M.F.D. Quimioluminescência e bioluminescência. **Quim. Nova**, v.16, n.3, p.200-209, 1993.
- SATIN, B.; DEL GIUDICE, G.; DELLA BIANCA, V.; DUSI, S.; LAUDANNA, C.; TONELLO, F.; KELLEHER, D.; RAPPUOLI, R.; MONTECUCCO, C.; ROSSI, F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 1467-76, 2000.

SEGEL, G. B.; HALTERMAN, M. W.; LICHTMAN, M. A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **J. Leukoc. Biol.**, v.89, p.359–72, 2011.

SPASOJEVIC, I.; LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. Lucigenin: Redox potential in aqueous media and redox cycling O<sub>2</sub> production. **Archiv. Biochem. Biophys.**, v.373, p. 447-50, 2000.

SUMMERS, C.; RANKIN, S. M.; CONDLIFFE, A. M.; SINGH, N.; PETERS, A. M.; CHILVERS, E. R. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends. Immunol.**, v.31, p.318–24, 2010.

SVENSSON, H.; HANSSON, M.; KILHAMN, J.; BACKERT, S.; QUIDING-JÄRBRINK, M. Selective upregulation of endothelial E-selectin in response to *Helicobacter pylori*-induced gastritis. **Infect. Immun.**, v. 77, 3109–16, 2009.

TAKAC, I.; SCHRODER, K.; BRANDES, R. P. The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 14, n.1, p.70-78, 2012.

TAN, A. S.; BERRIDGE, M. V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. **J. Immunol. Methods**, v.238, p.59-68, 2000.

THELEN, M.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiol. Rev.**, v.73, p.797– 821, 1993.

TOBAL, T. M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; BOLINI, H. M.; BOSCOLO, M. Evaluation of the use of *Syzygium cumini* fruit extract as an antioxidant additive in orange juice and its sensorial impact. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 63, n. 3, p. 273-7, 2012.

TOYODA, T.; TSUKAMOTO, T.; TAKASU, S.; SHI, L.; HIRANO, N.; BAN, H.; KUMAGAI, T.; TATEMATSU, M. Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor, on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. **Int. J. Cancer**, v.125, p.1786-95, 2009.

VALSTA, L. M.; TAPANAINEN, H.; MÄNNISTÖ, S. Meat fats in nutrition. **Meat Sci.**, v.70, p.525-30, 2005.

VLASOVA, I.I.; SOKOLOV, A.V.; ARNHOLD, J. The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase. **J. Inorg. Biochem.**, v. 106, p.76-83, 2012.

VU, C.; NG, Y.Y. Prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease in a Singapore hospital. **Singapore Med. J.**, v.41, p.478-81, 2000.

XIMENES, V. F.; LOPES, M. G.; PETRONIO, M.S.; REGASINI, L.O., SILVA DHS, FONSECA, L.M. Inhibitory Effect of Gallic Acid and Its Esters on 2,20-Azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-Induced Hemolysis and Depletion of Intracellular Glutathione in Erythrocytes. **J. Agric. Food Chem.**, v.58, p.5355–5362, 2010.

WANG, C A.; LIU, Y. C.; DU, S. Y.; LIN, C. W.; FU, H. W. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating promotes myeloperoxidase release from human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 377, n.1, p.52-56, 2008.

WANG, F.; MENG, W.; WANG, B.; QIAO, L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. **Cancer Lett.**, v.345, p.196–202, 2014.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet.**, v. 1, p. 1273-75, 1983.

WCULEK, S. K.; MALANCHI, I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. **Nature**, v.528, p.413–17, 2015.

WEBBERLEY, M. J.; WEBBERLEY, J. M.; NEWELL, D. G.; LOWE, P.; MELIKIAN, V. Sero-epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in vegans and meat-eaters. **Epidemiol. Infect.**, v.108, p.457-62, 1992.

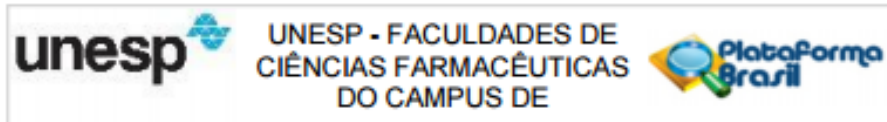
WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.609–14, 2003.

YAHAGHI, E.; KHAMESIPOUR, F.; MASHAYEKHI, F.; DEHKORDI, F. S.; SAKHAEI, M. H.; MASOUDIMANESH, M.; KHAMENEIE, M. K. *Helicobacter pylori* in vegetables and salads: genotyping and antimicrobial resistance properties. **Biomed Res. Int.**, v.2014, p.1-11, 2014.

YAMAOKA, Y.; KITA, M.; KODAMA, T.; SAWAI, N.; TANAHASHI, T.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. **Gut.**, v. 42, p. 609–17, 1998.

ZAIDI, S. F.; MUHAMMADB, J. S.; SHAHRYAR, S.; USMANGHANI, K.; GILANI, A. H.; JAFRI, W.; SUGIYAMA, T. Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. **J. Ethnopharmacol.**, v.141, p.403-10, 2012.

## ANEXO 1



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Ácido gálico e seus ésteres como agentes anti-*Helicobacter pylori* e sequestradores de oxidantes produzidos por neutrófilos

**Pesquisador:** Vanessa Gonçalves Wolf

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 47786915.2.0000.5426

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.639.614

**Apresentação do Projeto:**

O projeto é objetivo e descreve adequadamente as atividades propostas.

**Objetivo da Pesquisa:**

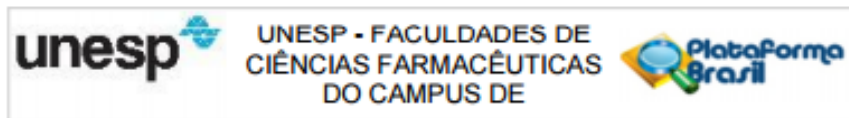
O objetivo principal do projeto é a avaliação do efeito anti-*Helicobacter pylori* do ácido gálico e seus derivados semissintéticos, além da verificação de atividade dos compostos como inibidores do complexo NADPH-oxidase e MPO em fagócitos, e consequentemente anti-ERO's, por metodologia ex vivo, simulando, a ação potencialmente farmacológica destas moléculas em condições próximas a testes in vivo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Praticamente não há riscos na pesquisa. O voluntário será submetido à coleta de sangue, que, eventualmente, poderá causar um pequeno desconforto/dor durante ou após a coleta, no local de introdução da agulha.

Quanto aos benefícios da pesquisa, destaca-se a apresentação de um possível composto promissor no tratamento da infecção provocada pela bactéria *H. pylori*, agindo não somente como antimicrobiano, mas também na redução do dano oxidativo ocasionado pelas espécies reativas de oxigênio produzidas exacerbadamente pelos neutrófilos recrutados para o local da infecção.

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 14.801-902  
 UF: SP Município: ARARAQUARA  
 Telefone: (16)3301-8897 E-mail: sta@fctfar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.639.614

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A proposta é relevante e promissora com a investigação da atividade do ácido gálico e seus compostos, na avaliação de sua atividade antimicrobiana sobre *H. pylori*, tanto pela sua atividade antioxidante sobre as ERO's produzidas pelos neutrófilos, e desta forma, estudar a possibilidade da utilização dessas moléculas como alternativa ou como adjuvante no tratamento da infecção pelo *H. pylori*.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O trabalho está bem redigido e contempla as exigências da pesquisa científica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, reunido no dia 30 de junho de 2016, analisou e aprovou as alterações do projeto de pesquisa em questão. O Relatório Final junto aos Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em JANEIRO de 2017.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_736642 E1.pdf	09/06/2016 14:36:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	24/09/2015 16:18:22	Vanessa Gonçalves Wolf	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo de doação do material biológico.doc	30/07/2015 14:33:20		Aceito
Outros	Declaração TCLE assinada.pdf	30/07/2015 14:32:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Mestrado.docx	23/07/2015 22:20:57		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto assinada.pdf	23/07/2015 22:19:22		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rodovia Araraquara-Jaú, km 1  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 14.801-902  
 UF: SP Município: ARARAQUARA E-mail: sta@fca.unesp.br  
 Telefone: (16)3301-6897

## **CAPÍTULO II**



Cite this: DOI: 10.1039/c7fo00707h

## Octyl gallate, a food additive with potential beneficial properties to treat *Helicobacter pylori* infection

 Vanessa Gonçalves Wolf,<sup>a</sup> Cibele Bonacorsi,<sup>b</sup> Maria Stella Gonçalves Raddi,<sup>a</sup>  
Luiz Marcos da Fonseca<sup>a</sup> and Valdecir Farias Ximenes<sup>b,\*</sup>

*Helicobacter pylori* infection is marked by intense production of reactive oxygen species (ROS) through the activation of neutrophils that are constantly attracted to the infected gastric mucosa. Here, gallic acid and its alkyl esters were evaluated as compounds able to act as antimicrobial agents and inhibitors of ROS released by *H. pylori*-activated neutrophils simultaneously. We found that the higher hydrophobicity caused by esterification of gallic acid led to a significant increase in its ability as a cytotoxic agent against *H. pylori*, a scavenger of ROS and an inhibitor of NADPH oxidase in neutrophils. Octyl gallate, a widely used food additive, showed the highest antimicrobial activity against *H. pylori*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , whereas gallic acid had a MIC value higher than 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The production of superoxide anion radicals was almost 100% abolished by the addition of 10  $\mu\text{M}$  (2.82  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) octyl gallate, whereas gallic acid inhibited around 20%. A similar tendency was also found when measuring the production of hypochlorous acid. The protective effect of the esters was cytochemically confirmed. In conclusion, this study showed that hydrophobicity is a crucial factor to obtain a significant anti-ROS and anti-*H. pylori* activity. Finally, it highlights octyl gallate, a food additive widely used in the food industry, as a promising molecule in the treatment of *H. pylori* infection.

Received 13th May 2017,  
Accepted 4th June 2017  
DOI: 10.1039/c7fo00707h  
rsc.li/food-function

### 1. Introduction

The bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is one of the major causes of chronic gastritis and peptic ulcer disease in individuals infected with this etiological agent.<sup>1,2</sup> *H. pylori*, a Gram-negative spiral bacillus, produces appreciable amounts of urease, an enzyme that converts urea into ammonia, reducing the stomach's acidity and allowing its survival in the stomach and duodenum regions.<sup>3</sup> This infection is also correlated with increased risk for stomach cancer development in their carriers.<sup>1</sup> The prevalence of contamination of this etiological agent is 25 to 50% in developed countries and about 90% in developing countries.<sup>3</sup>

Although the mechanism involved in the gastric inflammation caused by *H. pylori* is not fully understood, the important role of reactive oxygen species (ROS) produced by poly-

morphonuclear neutrophils (PMNs) in its pathogenesis is known. These cells are attracted and activated by the infection agent, which strongly contributes to tissue damage and chronic inflammation.<sup>4</sup> For this reason, molecules with antioxidant activity have been investigated as adjuvant therapy in the treatment of *H. pylori* infection.<sup>5,6</sup> In addition, the search for new molecules with anti-*H. pylori* activity has also been highlighted, since the emergence of *H. pylori* isolates resistant to standard therapy is increasing.<sup>7</sup>

Among the antioxidants, gallic acid and its esters, which are phenolic antioxidants found in wine and green tea,<sup>8–10</sup> must be highlighted. Gallic acid is a widely occurring metabolite in the plant kingdom, present in many plants and well known for its antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, antimutagenic, anticarcinogenic, antiviral and analgesic properties.<sup>11–15</sup> The beneficial effect of its esters has also been extensively studied, and most of the time, they have an activity superior to that of gallic acid. A number of authors have reported higher antioxidant,<sup>16</sup> antimicrobial<sup>17,18–19</sup> and anti-tumor activity<sup>20</sup> for esters of gallic acid when compared to the acid itself. A previous study by our group showed the same tendency for another phenolic compound, with a higher activity of caffeic acid esters compared to the acid precursor as anti-*Helicobacter pylori* agents and scavengers of oxidants produced

<sup>a</sup>Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP – São Paulo State University, 14060-903, Araraquara, São Paulo, Brazil

Email: vfximenes@foc.unesp.br; Tel: +5514 3301-6000

<sup>b</sup>Institute of Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), 78557-267 Sinop, Mato Grosso, Brazil

\*Department of Chemistry, Faculty of Sciences, UNESP – São Paulo State University, 17013-360 Baurax, São Paulo, Brazil



by neutrophils.<sup>21</sup> In addition to the biological effects described above, esters of gallic acid also have other applications. Octyl gallate, for example, is an internationally recognized antioxidant and is used in several countries as a food additive to inhibit lipid autooxidation.<sup>22,23</sup>

Based on this evidence, this work aimed to evaluate the antimicrobial capacity of gallic acid and its alkyl esters on *H. pylori*, as well as to evaluate their activities as scavengers of ROS produced by activated neutrophils and the inhibition of the NADPH oxidase.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Chemicals and solutions

Gallic acid, methyl gallate, propyl gallate, hexyl gallate, octyl gallate, apocynin, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH), dimethyl sulfoxide (DMSO), Brij 35, tung oil, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), luminol, lucigenin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), zymosan A, taurine, Histopaque-1077, Histopaque-1119, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT), trypan blue, nitroblue tetrazolium (NBT), trolox and catalase were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA). 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-dinitrophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-1) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Myeloperoxidase (MPO) (EC 1.11.1.7) was purchased from Planta Natural Products (Vienna, Austria). Hydrogen peroxide was prepared by diluting a 30% stock solution and calculating its concentration from its absorption at 240 nm ( $\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). All reagents used for buffers were of analytical grade. Stock solutions of the tested compounds were prepared in DMSO for cellular studies or in ethanol for DPPH scavenging assay. For the antioxidant assays, the DMSO stock solutions were diluted in 10 mM phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS), generating working solutions of lower concentrations. Ultrapure Milli-Q water from Millipore (Belford, MA, USA) was used for the preparation of buffers and solutions. PMA stock solutions were prepared in DMSO at a concentration of 50.0  $\mu\text{M}$  and were diluted to 0.5  $\mu\text{M}$  in PBS at the time of use. TMB solution was prepared by dissolving 14 mM TMB and 100  $\mu\text{M}$  potassium iodide in 50% dimethylformamide and 50% acetic acid (800 mM) (v/v).

### 2.2 DPPH scavenging assay

200  $\mu\text{M}$  DPPH in ethyl alcohol was incubated with gallic acid and its esters for 30 min at room temperature and in the dark. Then, the absorbance was measured spectrophotometrically at 517 nm. The control was composed of unreacted DPPH radical and ethyl alcohol used to blank the spectrophotometer (PerkinElmer Lambda 35 UV-visible spectrophotometer, Shelton, CT, USA). The reduction of DPPH radicals was calculated as  $[(\text{Absorbance of control} - \text{absorbance of sample}) / (\text{absorbance of control})] \times 100$ . The results were expressed as

the effective concentration of the test compound to reduce 50% of DPPH (EC 50).<sup>24,25</sup>

### 2.3 Triene degradation assay

A tung oil emulsion was prepared by mixing 5 mg of oil (not stripped of tocopherols) with PBS containing 17  $\mu\text{M}$  Brij 35®. This mixture was vigorously vortexed until obtaining a homogeneous emulsion. Subsequently, 50  $\mu\text{L}$  of this emulsion was incubated with 1 mM AAPH (source of peroxy radicals), PBS, and in the absence (control) or presence of gallic acid or its esters. A control test was also performed with trolox, a known antioxidant and a peroxy radical scavenger. The microplate was incubated at 37 °C for 1.5 to 2.5 hours, depending on the substance. The reading at 273 nm was performed at 5 min intervals on a Synergy 2 Multi-mode plate reader (BioTek-Winooski, VT, USA). The degradation of the eleostearic acid (conjugated triene) produced the absorbance versus time curve, from which the value of the area under the curve (AUC) was calculated. The curves of  $(\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{control}})$  against the concentration of each test compound were plotted and their slopes were used to express the test result in TEAC (trolox equivalent antioxidant activity), in which we directly compared the antioxidant activity of the samples with the antioxidant activity of trolox through the formula:  $\text{slope sample/slope trolox}$ .<sup>26,27</sup>

### 2.4 Isolation of human leukocytes

Blood samples were obtained from healthy volunteers using EDTA as an anticoagulant. The experiments were approved and performed in accordance with the regulations of the Research Ethics Committee (47786915.2.0000.5426), School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, São Paulo, Brazil. Informed consent was obtained from human subjects. Polymorphonuclear (PMN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by centrifugation on a Histopaque®-1077/1119 gradient at 700g for 30 min at room temperature.<sup>28</sup> After isolation of PMNs, the cells were resuspended in 10 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) supplemented with 1 mM calcium chloride, 0.5 mM magnesium chloride, and 1 mg per mL glucose (supplemented PBS), and the cell suspension was adjusted to the concentration of  $5 \times 10^6$  cells per mL. The cytotoxic effects of the tested substances on the isolated PMNs were studied using the trypan blue exclusion and MTT assays, as previously described.<sup>29-31</sup> In the concentrations used here, the tested substances did not present cytotoxic effects on neutrophils (results not shown).

### 2.5 ROS production by activated leukocytes: luminol-dependent chemiluminescence assay

PMNs ( $1 \times 10^6$  cells per mL), supplemented PBS and gallic acid or its esters were pre-incubated at 37 °C for 10 min. Next, luminol (10  $\mu\text{M}$ ) was added to the microplate, as well as the oxidative burst stimulus, *H. pylori* (0.2 ODU), zymosan (1 mg mL<sup>-1</sup>) or PMA (0.1  $\mu\text{M}$ ), and the light emission was measured for 90 min (for *H. pylori* and zymosan) or 30 min (for PMA) at 37 °C using a plate luminometer (Centro Microplate

Luminometer LB960, Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). The final reaction volume was 250  $\mu\text{L}$ . The integrated light emission was used as an analytical parameter for the measurement of ROS production. The inhibitory potency was calculated using the light emission generated by the control, in which the cells were stimulated in the absence of the tested substances.<sup>32</sup>

#### 2.6 Superoxide anion radical production by activated leukocytes: lucigenin-dependent chemiluminescence assay

PMNs ( $1 \times 10^6$  cells per mL), supplemented PBS and gallic acid or its esters were pre-incubated at 37 °C for 10 min. Next, lucigenin (10  $\mu\text{M}$ ) was added to the microplate, as well as the *H. pylori* (0.2 ODU), zymosan (1 mg mL<sup>-1</sup>) or PMA (0.1  $\mu\text{M}$ ), and the light emission was measured for 60 min (for *H. pylori* and zymosan) or 30 min (for PMA) at 37 °C using a plate luminometer (Centro Microplate Luminometer LB960, Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). The final reaction volume was 250  $\mu\text{L}$ . The integrated light emission was used as an analytical parameter for the measurement of superoxide anion radical production. The inhibitory potency was calculated using the light emission generated by the control, in which the cells were stimulated in the absence of the tested substances.<sup>33</sup>

#### 2.7 Superoxide anion radical production by activated leukocytes: WST-1 assay

PMNs ( $1 \times 10^6$  cells per mL), supplemented PBS and gallic acid or its esters were pre-incubated at 37 °C for 10 min. Next, WST-1 (500  $\mu\text{M}$ ) was added, as well as the *H. pylori* (0.2 ODU), zymosan (1 mg mL<sup>-1</sup>) or PMA (0.1  $\mu\text{M}$ ) and the extracellular release of O<sub>2</sub><sup>-</sup> was measured by the reduction of WST-1, which was determined spectrophotometrically at 450 nm after 90 min of incubation at 37 °C for *H. pylori* and zymosan, and 30 min for PMA; this was performed using an ELx800™ Absorbance Reader (BioTek – Winooski, VT, EUA). The inhibitory potency was calculated based on the absorbance of the control, in which the PMNs were stimulated and incubated in the absence of test substances. This assay was performed as previously described.<sup>34</sup>

#### 2.8 Nitroblue tetrazolium (NBT) assay

PMNs ( $1 \times 10^6$  cells per mL) were incubated with supplemented PBS, PMA (0.1  $\mu\text{M}$ ) and gallic acid or its esters (10  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at room temperature. Next, NBT solution was added, and the cells were incubated for an additional 30 min.<sup>35,36</sup> After this time the suspension of cells was centrifuged at 80g for 50 s at room temperature onto glass slides (Cytospin, FANEM, SP, Brazil) and cells were stained with May-Grünwald Giemsa. The cells were observed with an optical microscope, establishing the percentage of positive cells, which presented dark granules of formazan in their cytoplasm (NBT reduced by the superoxide anion radical).

#### 2.9 Neutrophil morphology assay

PMNs ( $1 \times 10^6$  cells per mL) were pre-incubated at 37 °C in supplemented PBS with gallic acid and its esters (10  $\mu\text{M}$ ) for 10 min. Next, the cells were activated by PMA (0.1  $\mu\text{M}$ ) and incubated for an additional 30 min at 37 °C. 100  $\mu\text{L}$  of a cell suspension was centrifuged at 80g for 50 s at room temperature onto glass slides (Cytospin, FANEM, SP, Brazil) and stained with May-Grünwald Giemsa. The morphological changes provoked by the activation of NADPH oxidase and the protective effects of the tested compounds were evaluated by observing vacuolization in the cytoplasm and nuclear disruption of the cells using the optical microscope.<sup>37,38</sup>

#### 2.10 Hypochlorous acid production: activated neutrophils

The determination of HOCl production by activated neutrophils was based on the reaction of HOCl with taurine to produce taurine chloramine which oxidizes TMB, producing a bluish coloration proportional to the concentration of HOCl.<sup>39</sup> The MPO and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were generated by PMNs stimulated with PMA or zymosan. The PMNs ( $2 \times 10^6$  cells per mL) were pre-incubated at 37 °C for 10 min in supplemented PBS containing 10 mM taurine with the tested substances. Next, the cells were stimulated by the addition of PMA (0.1  $\mu\text{M}$ ) or zymosan (1 mg mL<sup>-1</sup>) and incubated for an additional 30 min for PMA and 90 min for zymosan, at 37 °C. The reactions were stopped by the addition of catalase (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and centrifuged at 4000 rpm. The supernatant (200  $\mu\text{L}$ ) was transferred to a microplate and the accumulated taurine chloramine was measured by adding 50  $\mu\text{L}$  of TMB solution. The resulting oxidation product was detected spectrophotometrically at 630 nm using an ELx800™ Absorbance Reader (BioTek – Winooski, VT, EUA). The inhibitory potency was calculated by measuring the amount of taurine chloramine produced in the control, in which the cells were incubated in the absence of the tested compounds.<sup>21</sup>

#### 2.11 Hypochlorous acid production: MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

The determination of HOCl production by MPO-catalyzed oxidation of chlorine was also based on the reaction of the produced HOCl with taurine to produce taurine chloramine. The difference is that this assay was developed in the absence of neutrophils, and HOCl was generated by the direct addition of the pure MPO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reactions were performed in 96-well plates by the addition of PBS, taurine (10 mM), MPO (10 nM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu\text{M}$ ), and the tested substances (G0, G3 and G8) in different concentrations. The reactions were triggered by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the plate was incubated for 30 min at 37 °C. After this time, the reaction was stopped by the addition of catalase (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), a TMB solution was added and spectrophotometric reading was performed at 630 nm on an ELx800™ Absorbance Reader (BioTek-Winooski, VT, USA). The chlorination inhibitory potency was calculated by measuring the concentration of taurine chloramine produced in the control. A standard curve was generated by

adding the reagent HOCl to PBS containing taurine and used to calculate the amount of HOCl produced by MPO.<sup>38</sup>

### 2.12 Anti-bacterial activity

*H. pylori* type strain ATCC 43504 was provided by the microbiology clinical laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil. The bacterium was cultured in brain heart infusion (BHI) agar containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 36–37 °C for 72 hours under a microaerophilic atmosphere (10% CO<sub>2</sub>). The anti-*Helicobacter pylori* activity of gallic acid and its esters was determined by a broth microdilution method for the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).<sup>40–43</sup> Briefly, the wells of a 96-well microplate were filled with 100 µl of BHI broth supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum containing different concentrations of the tested substances (final concentrations of 62.5 to 1000 µg mL<sup>-1</sup>), on which the same volume of *H. pylori* suspension (10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) was added. Spectrophotometric reading at 630 nm was performed in an ELx800™ Absorbance Reader (BioTek – Winooski, VT, EUA), and the microplate was incubated at 36–37 °C under an atmosphere containing 10% CO<sub>2</sub> for 72 hours. After this, a new spectrophotometric reading was performed. Readings obtained before and after incubation were compared to determine an increase in bacterial growth. The percentage of growth inhibition was estimated with respect to a control that was incubated in the absence of tested substances. After reading, an aliquot of each well of the plate was transferred to plates containing BHI agar, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, which were incubated for 72 hours at 36–37 °C under an atmosphere containing 10% CO<sub>2</sub> for the determination of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The MIC was defined as the lowest concentration that inhibited bacterial growth by more than 90%. All tests were performed in triplicate and repeated at least three times.<sup>43</sup>

### 2.13 Statistical analysis

The results were expressed as the means ± SD. All tests were performed in duplicate and repeated at least 3 times using samples from different blood donors. Statistical difference was determined by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, using the control as a reference. A *p* value <0.05 was considered to be statistically significant.

## 3. Results

### 3.1 Cell-free antioxidant assays

Prior to the cell-based assays, gallic acid (G0) and its alkyl esters bearing one (G1), three (G3), six (G6) and eight (G8) carbons were evaluated regarding their efficacy as ROS scavengers. The molecular structures of the studied compound are shown in Fig. 1. Initially, the compounds were tested as reducing agents of the stable free radical DPPH, whose reactions were monitored by absorbance decrease. The concentration-

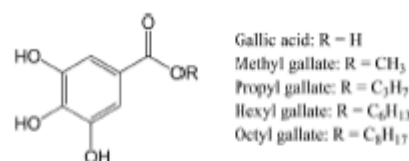


Fig. 1 Molecular structures of gallic acid and its alkyl esters.

response curves and the effective concentration values (EC<sub>50</sub>) are presented in Fig. 2. In this assay, G0 showed higher antioxidant activity, EC<sub>50</sub> = 29.7 µM, while its esters presented EC<sub>50</sub> values greater than 34.1 µM.

Subsequently, the antioxidant capacity of the substances was evaluated through the Triene Degradation Assay. In this assay, AAPH, an azo-compound that decomposes at 37 °C in aqueous solutions to generate alkyl radicals (R<sup>•</sup>), is used as a source of peroxy radicals (ROO<sup>•</sup>) by reaction with dissolved molecular oxygen.<sup>44</sup> The deleterious effect of ROO<sup>•</sup> was evaluated by the degradation of the conjugated triene present in the eleostearic acid (the main constituent of tung oil). The degradation was measured by its absorption bleaching at 273 nm. Fig. 3 shows the kinetic profile of eleostearic acid degradation, as well as the relationship between the area under the curve and the concentrations of the tested substances. It can be seen that, by scavenging ROO<sup>•</sup>, gallic acid and its alkyl esters provoked a concentration-dependent lag phase. The slope of the linear regressions AUC<sub>test compound</sub> – AUC<sub>control</sub> versus concen-

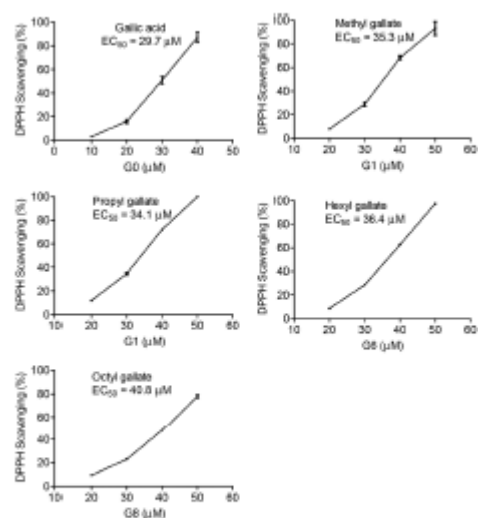


Fig. 2 DPPH scavenging capacity of G0 and its alkyl esters. The EC<sub>50</sub> were obtained by linear interpolation from triplicate experiments.

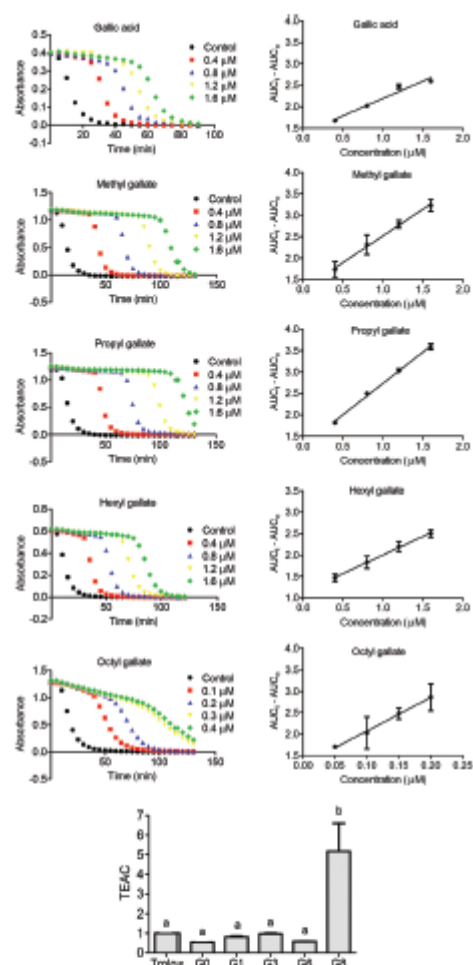


Fig. 3 Inhibitory effect of G0 and its alkyl esters on triene degradation by  $\text{ROO}^\bullet$ . The left graphics demonstrate the bleaching of triene (eleostearic acid) by  $\text{ROO}^\bullet$  and the protective effect provided by the addition of G0 and the gallates. The right graphics present the linear relationship between  $\text{AUC}_t - \text{AUC}_0$  and concentrations of the substances. The last graphic presents the trolox equivalent antioxidant activity. The results are the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ). Different letters denote significant differences.

tration of the tested substances was measured and compared with that obtained using trolox as a reference antioxidant. The results were expressed in terms of TEAC (trolox equivalent antioxidant activity). The results presented in Fig. 3 show the potent antioxidant activity of gallic acid and its alkyl esters.

However, unlike the results obtained in the DPPH assay, G8 was the most efficient molecule, presenting antioxidant activity about five-fold higher compared to the other substances.

### 3.2. Scavenger of ROS and inhibition of NADPH oxidase

After performing the *in vitro* tests, gallic acid and its alkyl esters were investigated as inhibitors of oxidative burst of PMNs. First, the compounds were evaluated for their ability to scavenge ROS by using the luminol-dependent chemiluminescence assay. As is well known, a luminol-dependent chemiluminescence assay is a non-specific assay used to measure the ROS produced by activated PMNs.<sup>45</sup> Here, the cells were stimulated with *H. pylori*, zymosan or PMA. As can be seen, the results were similar regardless of the stimulus used (Fig. 4). At a concentration of  $1 \mu\text{M}$  the inhibition obtained was small and it was not possible to establish a structure-activity relationship. At a concentration of  $10 \mu\text{M}$ , however, a progressive increase in the inhibitory capacity was obtained and it correlated with the alkyl carbon chain length of the esters.

Gallic acid and its alkyl esters were also investigated as inhibitors of the production of superoxide anion radicals by activated PMNs, specifically, through the lucigenin-dependent chemiluminescence assay. The specificity of the method is

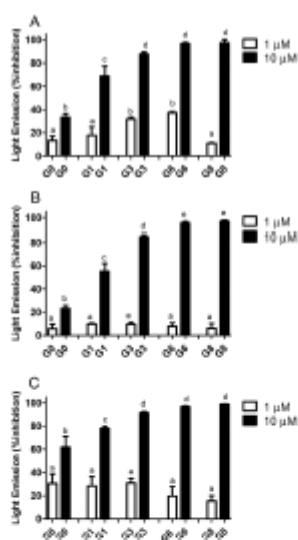


Fig. 4 Inhibitory effect of gallic acid and its alkyl esters on ROS produced by stimulated leukocytes (luminol-dependent chemiluminescence). (A) PMNs stimulated with *H. pylori*, (B) PMNs stimulated with zymosan, (C) PMNs stimulated with PMA. The cells ( $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) were pre-incubated in supplemented PBS with the tested substances for 10 min and the reactions were initiated by the addition of the stimulus. The results are the mean  $\pm$  SD of duplicates of three separate experiments. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ). Different letters denote significant differences.

based on the reduction of lucigenin by superoxide anion radicals.<sup>46,47</sup> Corroborating with the previous results, the inhibitory capacity was also correlated with the allyl carbon chain length, mainly in the concentration of 10  $\mu\text{M}$  and independently of the used stimulus. G6 and G8 were the molecules with the highest inhibitory potency, with almost 100% inhibition at 10  $\mu\text{M}$  concentration (Fig. 5).

To reinforce the previous results, the efficacy of the studied compounds as inhibitors of the production of superoxide anion radicals by stimulated PMNs was also evaluated using the WST-1 assay. WST-1 is a water soluble and membrane-impermeable sulfonated tetrazolium salt that has been used as a chromogenic probe for the superoxide anion radicals released into the extracellular medium.<sup>34</sup> Regardless of the stimulus used for the activation and similarly to the lucigenin assay, there was an increase in the inhibitory potency of the esters compared to gallic acid and again G6 and G8 proved to be the most efficient inhibitors (Fig. 6).

### 3.3 Cytochemical and cellular morphology assays

The potent activity of G6 and G8 as inhibitors of superoxide anion radical production in PMNs was also cytochemically

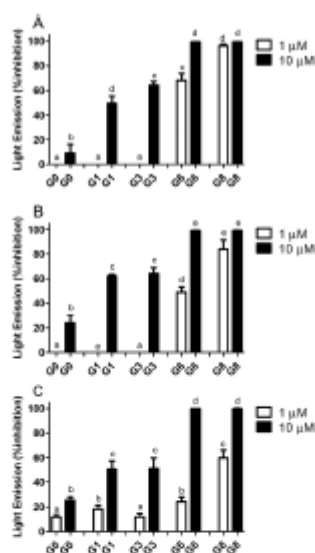


Fig. 5 Inhibitory effect of gallic acid and its alkyl esters on superoxide anion radicals produced by stimulated leukocytes (lucigenin-dependent chemiluminescence). (A) PMNs stimulated with *H. pylori*, (B) PMNs stimulated with zymosan, and (C) PMNs stimulated with PMA. The cells ( $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) were pre-incubated in supplemented PBS with the tested substances for 10 min and the reactions were initiated by the addition of the stimulus. The results are the mean  $\pm$  SD of duplicates of three separate experiments. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ). Different letters denote significant differences.

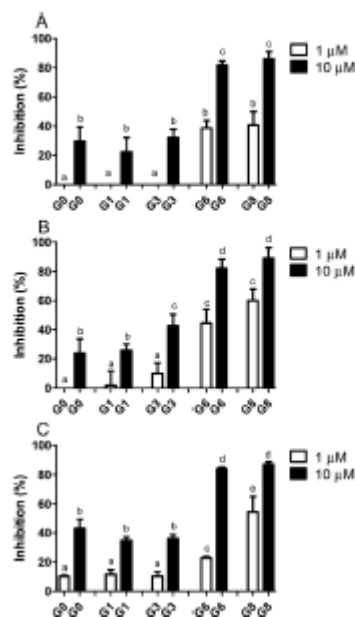


Fig. 6 Inhibitory effect of gallic acid and its alkyl esters on superoxide anion radicals produced by stimulated leukocytes (WST-1 assay). (A) PMNs stimulated with *H. pylori*, (B) PMNs stimulated with zymosan, and (C) PMNs stimulated with PMA. The cells ( $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) were pre-incubated in supplemented PBS with the tested substances for 10 min and the reactions were initiated by the addition of the stimulus. The results are the mean  $\pm$  SD of duplicates of three separate experiments. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ). Different letters denote significant differences.

demonstrated by using the NBT assay. In this case, the oxidative activity is measured by the presence of black formazan precipitates in the neutrophil cytoplasm due to the reduction of NBT by superoxide anion radicals.<sup>36</sup> PMNs were treated with the tested substances at 10  $\mu\text{M}$ . Formazan precipitate was reduced by 80 and 96% when the cells were incubated with 10  $\mu\text{M}$  of G6 and G8, respectively. On the other hand, using G0, G1 and G3 only 3% of the neutrophils were not colored by formazan. Fig. 7 shows the photomicrographs of the neutrophils subjected to the different treatments and allows a clear visualization of the decrease of formazan precipitate formation in G6 and G8 (Fig. 7F and G).

An additional confirmation of the progressive increase in the inhibitory capacity of the esters compared to gallic acid regarding the inhibition of NADPH oxidase in PMNs was obtained through cell morphology studies. In this assay, the PMNs were incubated with the studied compounds and stimulated with PMA. Then, the alteration in the cellular morphology was microscopically evaluated. The addition of PMA provoked the vacuolization in the cytoplasm and nuclear dis-

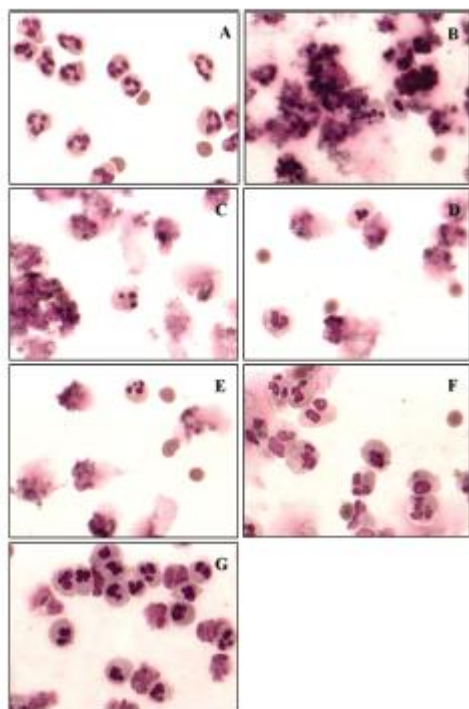


Fig. 7 Reduction of NBT by the superoxide anion radicals produced by leukocytes stimulated with PMA and the inhibitory effect of gallic acid and its alkyl esters. (A) PMNs without stimulus (negative control); (B) PMNs stimulated with PMA (positive control); (C to G) PMNs stimulated with PMA and treated with the tested substances at  $10 \mu\text{M}$ : (C) gallic acid; (D) methyl gallate; (E) propyl gallate; (F) hexyl gallate; (G) octyl gallate. The cells ( $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) were activated by  $0.1 \mu\text{M}$  PMA in the presence or absence of the tested substances for 30 min; then, NBT solution was added, and the cells were incubated for an additional 30 min and posteriorly concentrated by cytospin centrifugation and hemologically stained (May-Grünwald Giemsa).

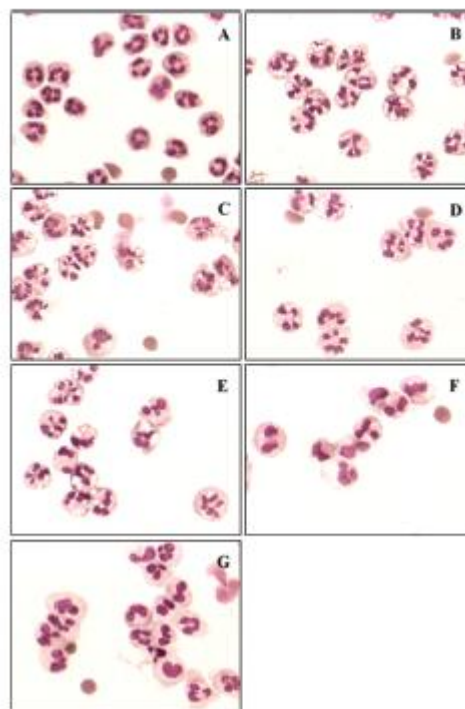


Fig. 8 Neutrophil morphological alteration induced by PMA and the protective effect of the gallates. (A) PMNs without stimulus (negative control); (B) PMNs stimulated with PMA (positive control); (C to G) PMNs stimulated with PMA and treated with the tested substances at  $10 \mu\text{M}$ : (C) gallic acid; (D) methyl gallate; (E) propyl gallate; (F) hexyl gallate; (G) octyl gallate. The cells ( $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) were activated by  $0.1 \mu\text{M}$  PMA in the presence or absence of the tested substances for 30 min, concentrated by cytospin centrifugation and hemologically stained (May-Grünwald Giemsa).

ruption of the PMNs was provoked by NADPH oxidase activation.<sup>27</sup> Again, the esters, particularly G8, provoked a progressive protective effect (Fig. 8).

### 3.4 HOCl assay

Considering the enzymatic cascade of reactions that follow the activation of NADPH oxidase in PMNs, the inhibitory effect on the production of superoxide anion radicals by alkyl gallates should also provoke a decrease in the extracellular release of HOCl. In agreement, this effect was observed in PMNs stimulated with zymosan and treated with G6 at  $10 \mu\text{M}$  and G8 at  $1$  and  $10 \mu\text{M}$  (Fig. 9A). On the other hand, the effect of the studied compounds when PMNs were stimulated with PMA was less evident. Indeed, G1, G3 and G8 at  $10 \mu\text{M}$  presented

statistically significant difference in the production of HOCl regarding the control and led to an increase in its production, instead (Fig. 9B). Finally, using purified MPO and  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a source of HOCl, we observed that G0 did not interfere in the production of HOCl, whereas G3 and G8 led to a significant increase in the production (Fig. 9C).

### 3.5 Antimicrobial assay

The substances were also evaluated for antimicrobial activity against *H. pylori*. Table 1 shows the progressive increase in the antimicrobial activity of esters as the alkyl carbon chain increases. G6 and G8 again showed the best results, with MICs of  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  for G8 and  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  for G6. G0, G1 and G3 were less effective, reaching the MIC at concentrations higher than  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

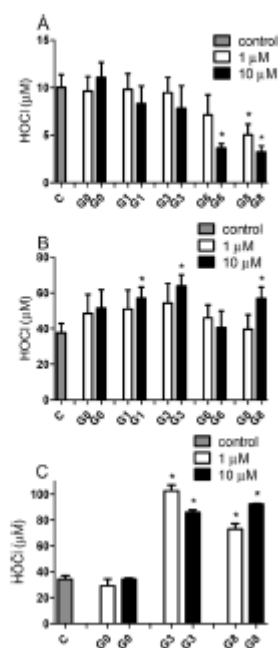


Fig. 9 Effect of gallic acid and its alkyl esters on the production of hypochlorous acid by (A) PMNs stimulated with zymosan, and (B) PMNs stimulated with PMA and (C) purified MPO. The results are the mean  $\pm$  SD of duplicates of three separate experiments. \* $p < 0.05$  relative to the control (one-way ANOVA and Tukey's Multiple Comparison Test).

## 4. Discussion

The correlation between ROS, PMNs and *H. pylori* infection is well established in the scientific literature. Indeed, the degree of gastric mucosal damage in patients infected with *H. pylori* is associated with increased neutrophil infiltration<sup>48,49</sup> and the production of ROS.<sup>4</sup> It has also been shown that there is a

direct action of ROS produced in the infectious process and neoplastic development in the stomach mucosa.<sup>50</sup>

In the search for molecules that could aid in the treatment of *H. pylori* infection by reducing the oxidative damage generated at the site of infection, as well as the antimicrobial activity therein, gallic acid and its alkyl esters were selected for this study. Here, it has been found that the esterification of gallic acid caused a significant improvement in its capacity as a potential suppressor of ROS, including those produced by PMNs activated by *H. pylori* as will be discussed below.

In order to obtain a general profile of the changes in the antioxidant properties caused by the esterification of gallic acid, *in vitro* tests were initially performed. With respect to the DPPH scavenging assay, it was noted that the esterification slightly reduced its efficiency as a suppressor of this free radical. On the other hand, G8 was about 5-fold more effective as a scavenger of ROO<sup>•</sup> compared to G0. This difference in relation to the DPPH test can be explained by the different reaction condition. Indeed, the reactivity with ROO<sup>•</sup> is performed in an oil-water emulsion, which may facilitate the activity of more hydrophobic molecules. In this regard, it has been demonstrated that antioxidant assays based on emulsified systems are more relevant, since they are closer to biological systems.<sup>51</sup> For instance, evidence of the importance of hydrophobicity was demonstrated using fibroblasts, where dodecyl chlorogenate showed higher antioxidant activity when compared to lower-carbon chlorogenates,<sup>22,23</sup> reinforcing the greater relevance of test results that use emulsified systems for the screening of a possible biological effect.

The higher capacity of the esters as ROS suppressors was extended to the cellular systems studied here. We verified a direct relationship between the carbon chain length and the scavenging efficiency of the ROS generated by the activation of PMNs, which was initially evaluated by the unspecific luminol-dependent chemiluminescence assay. It is important to highlight that the luminol is able to cross the biological membrane, thus reflecting the detection of intra- and extracellular ROS.<sup>54</sup> The efficacy of the esters was observed regardless of the stimulus: PMA (a soluble stimulus), zymosan particles or the bacterium *H. pylori* itself. In fact, the addition of just one methyl group (G1) to the gallic acid (G0) was enough to provoke a significant increase in its scavenging capacity, which

Table 1 Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by gallic acid and its alkyl esters

Substances	Growth inhibition <sup>a</sup> (%)					MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	MBC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
	Concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )						
	62.5	125	250	500	1000		
Gallic acid	0.0 $\pm$ 0.0	3.8 $\pm$ 2.9	13.3 $\pm$ 2.3	38.8 $\pm$ 5.3	78.4 $\pm$ 6.5	>1000	—
Methyl gallate	5.1 $\pm$ 4.1	11.6 $\pm$ 4.4	21.2 $\pm$ 3.4	40.3 $\pm$ 3.4	72.2 $\pm$ 2.7	>1000	—
Propyl gallate	15.3 $\pm$ 1.6	16.0 $\pm$ 2.1	25.9 $\pm$ 0.9	51.3 $\pm$ 2.5	86.5 $\pm$ 1.2	>1000	—
Hexyl gallate	17.6 $\pm$ 0.8	28.6 $\pm$ 0.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	250	500
Octyl gallate	32.0 $\pm$ 9.2	99.4 $\pm$ 6.1	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	125	250

<sup>a</sup>The results are the mean  $\pm$  SD.

reaches almost 100% using G3, G6 and G8 at the concentration of 10  $\mu\text{M}$ , while G0 reached only 34% using *H. pylori*, 23% with zymosan and 62% with PMA.

Despite the strong suppressive action of esters on the ROS produced by activated PMNs, the previous results do not exclude their possible action as direct inhibitors of the enzymatic activity of the NADPH-oxidase complex, which is the primary source of ROS in PMNs. This possibility was evidenced by the strong inhibition caused in the superoxide anion production, where the gallates were significantly more effective than the precursor acid. It is noteworthy that two different methodologies were used to evaluate superoxide anion production and in both cases, the gallates were strong inhibitors. In this regard, a WST-1 assay was used to prove the results obtained by the lucigenin-dependent chemiluminescence assay, since there are some controversies in its selectivity as a probe to measure the production of superoxide anions by PMNs.<sup>55,56</sup> The ability of the esters as inhibitors of superoxide production was also cytochemically demonstrated by a NBT assay. Again, G6 and G8 were extremely efficient, provoking total suppression of the formation of formazan precipitate in the cells.

In order to reinforce the previous findings based on chromogenic, fluorogenic and chemiluminescent probes, the effect of the esters on the morphological alterations provoked by the stimulation of the PMNs was also studied. Therefore, the results cannot be interpreted as an interference of the studied compounds in the performance of the probes used. The neutrophils, when stimulated with PMA, rapidly undergo morphological changes, with formation of a large number of cytoplasmic vacuoles, which resemble phagocytic vacuoles generated in particle phagocytosis,<sup>57</sup> and the presence of nuclear degeneration (picnosis).<sup>21,38</sup> The treatment of neutrophils with gallic acid did not lead to significant neutrophil protection against the PMA stimulus; however, an increasing protective effect was observed as the number of carbons increased.

Taken together, these results leave no doubt that the increased hydrophobicity caused by the esterification of gallic acid was crucial for the improvement not only of its efficiency as ROS suppressor but also of its efficiency as inhibitor of the NADPH oxidase in PMNs. These results are in agreement with several other studies conducted in our laboratory with other classes of phenolic acids. For instance, heptyl caffeate has been shown to be more efficient than the lower carbon chain esters and caffeic acid as inhibitors of ROS production by activated neutrophils.<sup>21</sup> The same effect was demonstrated in a study performed with protocatechuic acid and its esters as inhibitors of NADPH oxidase in PMNs.<sup>38</sup> The increase in hydrophobicity also promoted better protection in erythrocytes subjected to oxidative stress.<sup>57</sup> The mechanism by which these esters lead to increased anti-ROS activity and inhibition of NADPH oxidase in PMNs has not yet been fully elucidated. However, the increased hydrophobicity seems to be the crucial point and suggests that the accessibility to the membrane-bound NADPH oxidase might be the determinant factor.

The second proof that the esters act as NADPH oxidase inhibitors and not only as ROS scavengers was obtained by analyzing the apparently contradictory results obtained for the production of HOCl by activated neutrophils or by purified MPO. In fact, HOCl production was inhibited in the cell system when using zymosan as the stimulus, but was exacerbated in the free cell system (MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). This apparent contradiction can be explained by considering the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is essential, but also inhibits the catalytic action of the MPO. As is well known, MPO in its native form (iron form) reacts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, leading to the formation of the so-called compound I, a highly oxidative MPO form, which is responsible for the production of HOCl via the chlorination cycle.<sup>58</sup> However, the enzyme can also be degraded by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> itself, by a mechanism that involves the formation of compound II, an inactive chlorinating form. In this sense, the presence of substrates that recycle compound II is able to increase the chlorinating activity of MPO.<sup>58</sup> Here, for the first time, we demonstrated that gallates were also able to boost the production of HOCl via MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hence, the effect of gallates using PMNs can be only explained by their inhibitory action on NADPH oxidase, the primary source of all ROS produced by these cells.

Interestingly, the higher hydrophobicity of the esters was also crucial to the antimicrobial capacity of the studied compounds. It can be suggested that the higher lipophilicity of these molecules would allow a greater interaction with the bacterial cell membrane and consequently its destabilization. Similar anti-*H. pylori* activity results were obtained in a study with caffeic acid and its allyl caffeates, in which butyl and heptyl caffeates showed higher antimicrobial activity.<sup>21</sup> Studies with other microorganisms also showed higher activity of alkyl gallates. For instance, methyl gallate was more effective than gallic acid in inhibiting oral bacterial growth and the formation of *Streptococcus mutans* biofilms in a study developed by Kang *et al.* (2008)<sup>13</sup> and nonyl gallate presented higher activity than gallic acid in inhibiting the growth of *Salmonella choleraesuis*.<sup>19</sup> In a study performed with different species of fungi, the esters also had higher antifungal activity when compared to gallic acid.<sup>18</sup> All these results highlight the importance of the carbon chain, guaranteeing an amphiphilic characteristic in the molecule for its greater antimicrobial effect.

## 5. Conclusion

The esters of gallic acid presented greater activity than their acid precursor in the inhibitory capacity of the NADPH oxidase in PMN and in the growth inhibition of the *Helicobacter pylori* bacterium. These results were explained by the higher hydrophobicity of these esters, which directly improved their interactions with the cell membranes of PMN and of the bacterium. Therefore, besides the phenolic moiety, which is the redox active center responsible for ROS scavenging properties, we found that hydrophobicity of phenolic acids can also be crucial for their beneficial health properties. Regarding ROS



scavenging activity and inhibition of NADPH oxidase, G6 and G8 were the most effective compounds. However, G8 showed an advantage, due to its higher antimicrobial activity against *H. pylori* compared to G6. It is worthy of note that G8 is not devoid of potential harmful effects. Recently, it was demonstrated that alkyl esters of gallic acid are able to inhibit pyruvate carboxylation and lactate gluconeogenesis. Interestingly, G8 was the more effective inhibitor, highlighting its potential toxic effect on the liver.<sup>59</sup> In this regard, the FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) established an acceptable daily intake (ADI) for humans of 0.2 mg per kg body weight (as a sum of G3, G8 and G12).<sup>60</sup> In summary, the increased hydrophobicity provoked by esterification of gallic acid causes significant alteration in the biological effects of this polyphenol. This property deserves further exploration in a pharmacological and toxicological perspective. These results are particularly relevant considering the large application of G8 as a food additive.

## Acknowledgements

This work was supported by the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grants 2016/20594-5, 2015/21693-0 and INCT.Bio.Nat 2014/50926-0) and by the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grants 302793/2016-0, 440503/2014-0 and 130667/2015-3).

## References

- 1 T. Toyoda, T. Tsukamoto, S. Takasu, L. Shi, N. Hirano, H. Ban, T. Kumagai and M. Tatematsu, Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils, *Int. J. Cancer*, 2009, **125**, 1786–1795.
- 2 R. Pandey, V. Misra, S. P. Misra, M. Dwivedi, A. Kumar and B. K. Tiwari, *Helicobacter pylori*, and gastric cancer, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2010, **11**, 583–588.
- 3 N. A. Sánchez-Zauco, S. Giono-Cerezo and C. Maldonado-Bernal, Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*, *Salud. Pública de México*, 2010, **52**, 447–454.
- 4 C. A. Wang, Y. C. Liu, S. Y. Du, C. W. Lin and H. W. Fu, *Helicobacter pylori*, neutrophil-activating promotes myeloperoxidase release from human neutrophils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, **377**, 52–56.
- 5 B. E. Dunn, H. Cohen and M. J. Blaser, *Helicobacter pylori*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, **10**, 720–741.
- 6 S. F. Zaide, J. S. Muhammad, S. Shahryar, K. Usmanghani, A. H. Gilani, W. Jafri and T. Sugiyama, Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells, *J. Ethnopharmacol.*, 2012, **141**, 403–410.
- 7 P. Malfertheiner and M. Selgrad, *Helicobacter pylori* infection and current clinical areas of contention, *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2010, **26**, 618–623.
- 8 A. A. Bertelli and D. K. Das, Grapes, wines, resveratrol and heart health, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2009, **54**, 468–476.
- 9 M. S. Butt and M. T. Sultan, Green tea: Nature's defense against malignancies, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2009, **49**, 463–473.
- 10 N. Paixão, V. Pereira, J. C. Marques and J. S. Gâmas, Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC, *J. Sep. Sci.*, 2008, **31**, 2189–2198.
- 11 L. Birosová, M. Mikulášová and S. Vaverková, Antimutagenic effect of phenolic acids, *Bioméd. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.*, 2005, **149**, 489–491.
- 12 J. S. Giftson, S. Jayanthi and N. Nalini, Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis, *Invest. New Drugs*, 2009, **28**, 251–259.
- 13 M. S. Kang, J. S. Oh, I. C. Kang, S. J. Hong and C. H. Choi, Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria, *J. Microbiol.*, 2008, **46**, 744–750.
- 14 S. H. Kim, C. D. Jun, K. Suk, B. J. Choi, H. Lim, S. Park, S. H. Lee, H. Y. Shin, D. K. Kim and T. Y. Shin, Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells, *Toxicol. Sci.*, 2006, **91**, 123–131.
- 15 F. C. Lopes, A. Rocha, A. Piraco, L. O. Regasini, J. R. Siqueira, D. H. Silva, V. S. Bolzani, I. Z. Carlos and R. Soares, *Alchornea glandulosa* ethyl acetate fraction exhibits antiangiogenic activity: preliminary findings from in vitro assays using human umbilical vein endothelial cells, *J. Med. Food*, 2011, **14**, 1244–1253.
- 16 I. Kubo, N. Masuoka, P. Xiao and H. Haraguchi, Antioxidant activity of dodecyl gallate, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 3533–3539.
- 17 I. Kubo, P. Xiao and K. Fujita, Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 347–350.
- 18 A. C. de Paula e Silva, C. B. Costa-Orlandi, F. P. Gullo, F. Sangalli-Leite, H. C. de Oliveira, J. F. da Silva, L. Scorzoni, N. S. Pitanguí, S. A. Rossi, T. Benaducci, V. G. Wolf, L. O. Regasini, M. S. Petrónio, D. H. Silva, V. S. Bolzani, A. M. Fusco-Almeida and M. J. Mendes-Giannini, Antifungal activity of decyl gallate against several species of pathogenic fungi, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2014, **2014**, 1–8.
- 19 I. Kubo, K. Fujita and K. Nihei, Anti-Salmonella activity of alkyl gallates, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 6692–6696.
- 20 E. Ortega, M. C. Sadaba, A. L. Ortiz, C. Cespon, A. Rocamora, J. M. Escolano, G. Roy, L. M. Villar and P. Gonzalez-Porte, Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumours in mice, *Br. J. Cancer*, 2003, **88**, 940–943.
- 21 L. C. Parcatu, C. Bonacorsi, C. M. Faria, A. C. Nazaré, M. S. Petrónio, L. O. Regasini, D. H. Silva, M. S. G. Raddi,

- L. M. Fonseca and V. F. Ximenes, Allyl caffeates as anti-*Helicobacter pylori* and scavenger of oxidants produced by neutrophils, *Med Chem.*, 2014, **10**, 74–80.
- 22 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Evaluation of the toxicity of a number of antimicrobials and antioxidants*, World Health Organization Technical Report Series, 1962, vol. 228, pp. 61–65.
- 23 Q. Wang, Y. Zhang and H. Li, Octyl gallate: An antioxidant demonstrating selective and sensitive fluorescent property, *Food Chem.*, 2017, **219**, 268–273.
- 24 W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier and C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT – Food Sci Technol.*, 1995, **28**, 25–30.
- 25 C. Sanchez-Moreno, J. A. Larrauri and F. Saura-Calixto, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **76**, 270–276.
- 26 M. Laguerre, L. J. Lopez-Giraldo, J. Lecomte, B. Barea, E. Combon, P. F. Tehobo, N. Barouch and P. Villeneuve, Conjugated autooxidizable triene (CAT) assay: A novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe, *Anal. Biochem.*, 2008, **308**, 282–290.
- 27 L. C. Paracatu, C. M. Q. G. Faria, C. Quinello, C. Rennó, P. Palmeira, M. L. Zenaik, L. M. Fonseca and V. F. Ximenes, Caffeic acid phenethyl ester: Consequences of its hydrophobicity in the oxidative functions and cytokine release by leukocytes, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2014, **2014**, 1–13.
- 28 D. English and B. R. Andersen, Single-step separation of red blood cells, Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque, *J. Immunol. Methods*, 1974, **5**, 249–252.
- 29 W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Curr. Protoc. Immunol.*, 2001, **21**:3B:A.3B.1–A.3B.2.
- 30 F. Denizot and R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods*, 1986, **89**, 271–277.
- 31 M. C. Barbosa, T. E. J. Santos, T. N. Santos, A. M. Pedrosa, D. B. Elias, L. K. Leal, A. A. Lopes, G. L. Sasahara and R. P. G. Lemes, The effect of a selective inhibitor of phosphodiesterase-9 on oxidative stress, inflammation and cytotoxicity in neutrophils from patients with sickle cell anaemia, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2016, **118**, 271–278.
- 32 R. R. Kitagawa, M. S. Raddi, N. M. Khalil, W. Vilegas and L. M. da Fonseca, Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils, *Biol. Pharm. Bull.*, 2003, **26**, 905–908.
- 33 M. P. Kanegae, L. M. Fonseca, I. L. Brunetti, S. O. Silva and V. F. Ximenes, The reactivity of *ortho*-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: Contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, **74**, 457–464.
- 34 A. S. Tan and M. V. Berridge, Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents, *J. Immunol. Methods*, 2000, **238**, 59–68.
- 35 P. C. Ciarlini, D. B. A. Antonio, F. Barbieri, F. L. Bonello and F. L. F. Feitosa, Efeito da vacina contra brucelose bovina sobre a capacidade neutrofílica de redução do NBT, *Ars Vet.*, 2005, **21**, 251–256.
- 36 A. C. Oliveira, I. B. Valentim, M. O. F. Goulart, C. A. Silva, E. J. H. Bechara and M. T. S. Trevisan, Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes, *Quim. Nova*, 2009, **32**, 689–702.
- 37 J. R. Hoidal, J. E. Repine, G. D. Beall, F. L. Rasp Jr and J. G. White, The Effect of Phorbol Myristate Acetate on the Metabolism and Ultrastructure of Human Alveolar Macrophage, *Am. J. Pathol.*, 1978, **91**, 469–482.
- 38 C. M. Q. G. Faria, A. C. Nazaré, M. S. Petrónio, L. C. Paracatu, M. L. Zenaik, L. O. Regasini, D. H. S. Silva, L. M. Fonseca and V. F. Ximenes, Protocatechuic acid alkyl esters: hydrophobicity as a determinant factor for inhibition of NADPH oxidase, *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**, 4885–4893.
- 39 E. Malle, P. G. Furtmuller, W. Sattler and C. Obinger, Myeloperoxidase: a target for new drug development?, *Br. J. Pharmacol.*, 2007, **152**, 838–854.
- 40 NCCLS, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9th Informational Supplement (aerobic dilution)*, NCCLS document M100-S9, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1999.
- 41 NCCLS, *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard, NCCLS document M7-A6*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 6th edn, 2003.
- 42 M. S. Osato, R. Reddy, S. G. Reddy, R. L. Penland and D. Y. Graham, Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2001, **17**, 39–44.
- 43 C. Bonacorsi, M. S. G. Raddi, I. Z. Carlos, M. Sannoniyya and W. Vilegas, Anti *Helicobacter pylori*, activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae), *BMC Complementary Altern. Med.*, 2009, **9**, 1–7.
- 44 E. Niki, Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals, *Methods Enzymol.*, 1990, **186**, 100–108.
- 45 I. M. Paino, V. F. Ximenes, L. M. Fonseca, M. P. Kanegae, N. M. Khalil and I. L. Brunetti, Effect of the therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2005, **38**, 543–551.
- 46 R. C. Allen, Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis, *Methods Enzymol.*, 1986, **133**, 449–493.

- 47 K. Faulkner and I. Fridovich, Luminol and lucigenin as detectors for  $O_2^{\cdot-}$ , *Free Radicals Biol. Med.*, 1993, **15**, 447–451.
- 48 J. R. Warren and B. J. Marshall, Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet*, 1983, **1**, 1273–1275.
- 49 R. Fiocca, O. Luinetti, L. Villani, A. M. Chiaravalli, C. Capella and E. Solcia, Epithelial cytotoxicity, immune responses, and inflammatory components of *Helicobacter pylori* gastritis, *Scand. J. Gastroenterol., Suppl.*, 1994, **205**, 11–21.
- 50 G. Bauer, S. Bereswill, P. Aichele and E. Glocker, *Helicobacter pylori*, protects oncogenically transformed cells from reactive oxygen species-mediated intercellular induction of apoptosis, *Carcinogenesis*, 2014, **35**, 1582–1591.
- 51 M. Laguerre, E. A. Decker, J. Lecomte and P. Villeneuve, Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2010, **13**, 518–525.
- 52 M. Laguerre, L. J. Lopez-Giraldo, J. Lecomte, M. C. Figueroa-Espinoza, B. Baréa, J. Weiss, E. A. Decker and P. Villeneuve, Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: the cutoff theory behind the polar paradox, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 11335–11342.
- 53 M. Laguerre, C. Wrutniak-Cabello, B. Chabi, L. J. López-Giraldo, J. Lecomte, P. Villeneuve and G. Cabello, Does hydrophobicity always enhance antioxidant drugs? A cut-off effect of the chain length of functionalized chlorogenate esters on ROS-overexpressing fibroblasts, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2011, **63**, 531–540.
- 54 N. Parij, A. M. Nagy, P. Rondu and J. Nève, Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils, *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, **352**, 299–305.
- 55 I. Spasojevic, S. I. Liochev and I. Fridovich, Lucigenin: Redox potential in aqueous media and redox cycling  $O_2$  production, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **373**, 447–450.
- 56 Y. Li, H. Zhu, P. Kuppusamy, V. Roubaud, J. L. Zweier and M. A. Trush, Validation of lucigenin (Bis-N-methyl-acridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 2015–2023.
- 57 V. F. Ximenes, M. G. Lopes, M. S. Petronio, L. O. Regasini, D. H. S. Silva and L. M. Ronseca, Inhibitory Effect of gallic acid and its esters on 2,20-Azobis(2- amidinopropane) hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 5355–5362.
- 58 I. I. Vlasova, A. V. Sokolov and J. Amhold, The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **106**, 76–83.
- 59 G. J. Eler, I. S. Santos, A. G. de Moraes, J. F. Comar, R. M. Peralta and A. J. Bracht, n-Octyl gallate as inhibitor of pyruvate carboxylation and lactate gluconeogenesis, *Biochem. Mol. Toxicol.*, 2015, **29**, 157–164.
- 60 C. A. van der Heijden, P. J. Janssen and J. J. Strik, Toxicology of gallates: a review and evaluation, *Food Chem. Toxicol.*, 1986, **24**, 1067–1070.