



RENORBIO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
Ponto Focal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI (UFPI)

Francilene Vieira da Silva

Investigação do potencial farmacológico dos monoterpenos carvacrol e (-)-linalol livres ou complexados e o desenvolvimento de formulação tópica para aplicações farmacêuticas

FRANCILENE VIEIRA DA SILVA

Investigação do potencial farmacológico dos monoterpenos carvacrol e (-)-linalol livres ou complexados e o desenvolvimento de formulação tópica para aplicações farmacêuticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia do Ponto Focal Piauí (RENORBIO/UFPI), como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Meneses Oliveira

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

S586i Silva, Francilene Vieira da

Investigação do potencial farmacológico dos monoterpenos carvacrol e (-) – linalol livres ou complexados e o desenvolvimento de formulação tópica para aplicação farmacêutica / Francilene Vieira da Silva - 2017.

107 f.: il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia - Renorbio, Teresina, 2017.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Meneses Oliveira

1. Monoterpenos 2. Gastroproteção (-) - linalol 3. Carvacrol
4. Ciclodextrina 5. Úlcera 6. Cicatrização I. Título

CDD 615.32

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: FRANCILENE VIEIRA DA SILVA

TÍTULO DO PROJETO: “Investigação do potencial farmacológico dos monoterpênos carvacrol e linalol livres ou complexados e o desenvolvimento de formulação tópica para aplicações farmacêuticas”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, UFPI
(Presidente)

Satisfatório Rita de Cássia Meneses Oliveira

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida, UFPI
(Examinadora)

Satisfatório Fernanda Regina de Castro Almeida

Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira - UFPI
(Examinador)

Satisfatório Francisco de Assis Oliveira

Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros – UFPI
(Examinadora)

Satisfatório Maria das Graças Freire de Medeiros

Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares - UFPI
(Examinadora)

Satisfatório Maria José dos Santos Soares

DATA DA AVALIAÇÃO: 11 de janeiro de 2017.

HORÁRIO: 14h

LOCAL: Auditório do NUPCelt/CCA/UFPI.

Dedico esta obra

Aos meus pais pelo exemplo diário e por ter me conduzido com maestria ao longo desses anos.

À Clovis Alencar por todo o companheirismo, paciência e por me reerguer nos meus piores dias.

AGRADECIMENTOS

Considerando que esta tese é resultado do apoio de muitas pessoas, agradecer não é uma tarefa fácil.

Agradeço especialmente:

À DEUS, pelas melhores dádivas da vida, pela minha experiência e formação, pelo amor da minha família, por estar sempre presente e, principalmente, por levantar-me quando, muitas vezes, tropecei, agradeço pela concretização de mais uma etapa de vida;

Aos meus pais, minha mãe Graça e meu pai Moacir, por todo esforço, sacrifício, pela paciência em entender os meus muitos momentos de ausência e de nervosismo ao longo desta trajetória e pelo exemplo diário de constituição familiar, por sempre acreditarem que investir nos meus estudos seria o melhor para eu trilhar um caminho com sabedoria e sucesso. Por vocês! Tenho o amor maior do mundo; À meu irmão Márcio pelo carinho e por estar sempre torcendo por mim;

À meu marido Clovis Alencar, presente de Deus, que sem dúvida alguma foi a pessoa que mais sofreu na pele com este doutorado. Obrigado pelas muitas ajudas no laboratório, por ser o tradutor dos meus artigos, pelo amor, companheirismo, paciência e por me reerguer inúmeras vezes ao longo dessa trajetória. Você foi fundamental neste processo de crescimento e amadurecimento e agradeço muito a Deus por você fazer parte da minha vida...Amo Muito!!

À Profa. Dra. Rita de Cassia Meneses Oliveira "mãe científica" pela orientação, dedicação, competência ao longo deste trabalho e acima de tudo por sua amizade... Obrigado por ter creditado confiança em meu trabalho, pela paciência e tempo dedicado ao repasse de conhecimentos, pelos conselhos fundamentais nos momentos certos, pela compreensão nos momentos de necessidade, e por participar de minhas muitas desconstruções/reconstruções ao longo de todos esses anos. Palavras jamais seriam capazes de descrever a admiração, carinho e gratidão que sinto... Agradeço por me ensinar a ser uma profissional melhor e pelas valiosas lições de vida!! Carregarei para sempre no meu coração;

A todos os meus amigos do LABGASTRO com quem, desde minha iniciação científica, dividi não só momentos de trabalho e experimentos, mas alegrias, conquistas, ideias, angústias, histórias, saberes... Irisdalva Sousa, Hélio Barros, Ana Flávia, Kamila Lopes, sem o apoio diário de vcs eu não teria conseguido. À Suylane Sobral que mesmo chegando a pouco tempo no laboratório, sempre esteve disposta a me ajudar nos experimentos e passou a ser uma companhia sempre presente. Muito obrigada a todos pela convivência e pela aprendizagem!

À Irisdalva e Hélio Barros meus companheiros de doutorado e de vida. Nós, mais do que ninguém, sabemos o quão difícil foi esta etapa das nossas vidas, mas vocês tornaram meus dias mais alegres na bancada do laboratório. Muito obrigada pela disponibilidade em me ajudar, por sempre me ouvir e respeitar minhas opiniões. Tenho certeza que vocês foram os melhores parceiros de doutorado que eu poderia ter.

A minha amiga Ana Karina por me ajudar nos protocolos, por ser uma amiga sempre presente e conselheira valiosa, suas palavras de incentivo me ajudaram a crescer nos momentos bons e a superar os momentos ruins!! Obrigada por sua amizade e disposição diária!!!

Ao professor Dr. Lucindo J. Quintans-Júnior, da Universidade Federal de Sergipe, por sempre ter dispensando grande parte do seu tempo na construção e aprimoramento deste trabalho e por junto com o professor Dr. Adriano Araújo terem fornecido as substâncias (carvacrol e linalol) objeto deste estudo;

A todos os docentes do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, que me auxiliaram em diversos pontos do meu trabalho, e por acrescentar conteúdo técnico e moral na minha vida. Aos meus amigos e companheiros de núcleo pelo apoio e companheirismo diário.

Ao Carlos de Deus e Kalina, meus compadres e amigos, pela amizade, apoio, por cuidar e me ajudar a cuidar dos animais do biotério tão bem;

A todos os professores da Rede Nordeste de Biotecnologia, pelo ensino e colaboração na minha formação acadêmica;

Agradeço aos professores que compuseram as bancas de qualificação e de defesa: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida; Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira; Profa. Dra. Maria Jose dos Santos Soares; Profa. Dra. Maria das Gracas Freire de Medeiros, por aceitarem participar deste trabalho com sugestões que, com certeza, enriqueceram e vão enriquecer muito este trabalho. Agradeço imensamente a Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida e o Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira que sempre me acompanharam em toda a minha vida acadêmica, obrigada por toda a paciência, disponibilidade e orientação, sem o apoio de vcs não teria conseguido.

Agradeço a CAPES, FAPEPI e a UFPI pelo apoio financeiro e estrutural.

Gostaria de agradecer a todos que direto ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que estiveram comigo por toda essa longa caminhada;

E, finalmente, aos indefesos camundongos e ratos, que com o sacrifício de suas vidas contribuem para o progresso da ciência.

Meu muitíssimo obrigada!!

“Não importa onde você parou, em que momento da vida você cansou. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo, é renovar as esperanças na vida e o mais importante acreditar em você de novo...”.

(Carlos Drummond de Andrade)

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese é apresentada em formato de Artigo Científico. As listas de figuras, siglas e abreviaturas contêm as ilustrações, siglas e abreviaturas apresentadas na introdução e revisão bibliográfica deste trabalho.

SILVA, F. V. **Investigação do potencial farmacológico dos monoterpenos carvacrol e (-)-linalol livres ou complexados e o desenvolvimento de formulação tópica para aplicações farmacêuticas.** Tese (Doutorado em Biotecnologia), 105 f;. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) NPPM/CCS/UFPI, 2017.

RESUMO

As plantas e os produtos do seu metabolismo secundário foram e continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica. Os óleos essenciais, produto desse metabolismo, são misturas naturais muito complexas que podem conter diversos componentes em concentrações muito diferentes, inclusos em dois grupos de origem biosintética distinta. O grupo principal é composto por terpenos e terpenóides e outro de componentes aromáticos e alifáticos. Os terpenos constituem o grupo mais abundante e estruturalmente mais diversificado de metabólitos secundários de plantas, representados principalmente pelos monoterpenos e sesquiterpenos. Os monoterpenos e seus derivados possuem amplo espectro de propriedades farmacológicas, das quais destacamos gastroprotetora, cicatrizante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e antidepressiva. O que foram comprovadas para o monoterpeno (-)-linalol e o carvacrol, presentes nos óleos essenciais de diversas espécies de plantas. O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial farmacológico do (-)-linalol e do carvacrol na forma livre e na forma complexada em β -ciclodextrina, com a finalidade de buscar maior estabilidade e segurança, potencializando a atividade gastroprotetora e diminuindo suas eventuais toxicidades, os quais serão investigados em modelos experimentais, agudos e crônicos de úlceras gástricas e no modelo de feridas cirúrgicas, bem como desenvolver uma formulação farmacêutica de uso tópico a partir desses bioprodutos. Nossos resultados sugerem que o (-)-linalol (LIN- β CD) e o carvacrol (CARV- β CD) quando complexados na matriz β -ciclodextrina, apresentaram efeito gastroprotetor significantivamente melhores em relação as formas livres destes terpenos. Possivelmente tal ação se deva ao aumento na solubilidade, estabilidade e atividade antioxidante e/ou cicatrizante com estes monoterpenos complexados. Grande parte das pesquisas que estudam patologias cutâneas em prol do tratamento e da cura de feridas, utilizam modelos animais que se assemelham com a pele humana. A formulação tópica à base de carvacrol a 5% mostrou boa estabilidade, bem como reduziu significativamente a área da ferida cirúrgica induzida em ratos, sendo gerado uma patente onde a referida invenção pode ser utilizada nas diversas áreas da saúde para tratamento de afecções cutâneas da pele. Em conjunto, os nossos resultados sugerem que a β -CD pode representar uma ferramenta importante para a melhoria da atividade gastroprotetora do (-)-linalol e carvacrol e outros compostos insolúveis em água, potencializando suas respostas, bem como a solubilidade, a estabilidade e segurança.

Palavras-chave: Monoterpenos. Gastroproteção. (-)-Linalol. Carvacrol. β -ciclodextrina. Úlcera. Cicatrização.

SILVA, F. V. **Investigation of pharmacological potential of carvacrol and (-)-linalool monoterpenes free or complexed and development of topical formulation for pharmaceutical applications.** (Doctoral thesis), 105 f., Post-graduate Program in Biotechnology (RENORBIO). NPPM/CCS/UFPI, 2017

ABSTRACT

Plants and products of their secondary metabolism were and still are very important in the pharmaceutical field. Essential oils are very complex natural mixtures may contain about 20-60 parts in very different concentrations, included in two groups of different biosynthetic origin. The main group consists of terpenes and terpenoids and other aromatic and aliphatic components. Terpenes are the most abundant and structurally diverse secondary metabolites of plants, mainly represented by monoterpenes and sesquiterpenes. The monoterpenes and their derivatives have various pharmacological properties, as gastroprotective, healing, antinociceptive, antiinflammatory, antioxidant and anti-depressant. The monoterpene (-)-linalool had its anti-inflammatory and analgesic effects widely suggested by several studies. Already the monoterpene carvacrol present in the essential oil of oregano and in several species of plants presented in previous studies anti-inflammatory, gastroprotective and anti-ulcerogenic activity. The present work aimed to investigate the pharmacological potential of (-)-linalool and carvacrol in the free or complexed form in β -cyclodextrin, in order to seek greater stability and safety, improving its gastroprotective activity and reducing its possible toxicities, through its investigation in different experimental models, acute and chronic of gastric ulcers and in the model of surgical wounds, as well as to develop a pharmaceutical formulation of topical use from these bioproducts. Our results suggest that (-)-linalool incorporated into β -cyclodextrin (LIN- β CD) revealed a significantly improved gastroprotective effect when compared to (-)-linalool in the non-complexed (free) form, suggesting that this improvement is related to Increase its solubility and stability, as well as the potentiation of the antioxidant profile of this monoterpene. Complexed carvacrol (CARV- β CD) has superior gastroprotective activity, possibly potentiating its antioxidant and healing activity when compared to its non-complexed gastroprotection (CARV) results, probably due to its incorporation into β -cyclodextrin to improve its gastroprotective profile. Much of the research that studies cutaneous pathologies for the treatment and healing of wounds uses animal models that resemble human skin. The topical formulation based on 5% carvacrol showed good stability as well as significantly reduced the area of the surgical wound induced in rats, a patent being generated wherein said invention can be used in the various health areas for the treatment of cutaneous skin conditions. Taken together, our results suggest that β -CD can represent an important tool for improving the gastroprotective activity of (-)-linalool and carvacrol and other water insoluble compounds, potentiating their responses, as well as solubility, stability and safety.

Keywords: Monoterpenes. Gastroprotection. Carvacrol. (-)-Linalool. β -cyclodextrin. Ulcer. Healing.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estrutura química do (-)-linalol (3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol) (SIGMA-ALDRICH, 2016). | 30 |
| Figura 2: Estrutura química do carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol) (CANBEK et al., 2008). | 31 |
| Figura 3: Representação esquemática da α -CD, β -CD e γ -CD (esquerda para a direita) e representação esquemática do aspecto truncado da CD/software Chem3D Pro 12.0 (PINHO et al., 2014). | 34 |
| Figura 4: Efeito do LIN e (-)-LIN- β CD nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg e da carbenoxolona (100 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos | 57 |
| Figura 5: Efeito de (-)- Linalol livre e complexado sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético (80%) em ratos..... | 59 |
| Figura 6: Efeito do CARV- β CD (12,5; 25 e 50 mg/kg), ciclodextrina (50 mg/kg) e da carbenoxolona (100 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos | 73 |
| Figura 7: Efeito do CARV- β CD (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) ou NAC (200 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por isquemia seguida de reperfusão em ratos | 74 |
| Figura 8: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) na atividade da mieloperoxidase (MPO) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos | 74 |
| Figura 9: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) no conteúdo gástrico de SH-NP no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos | 75 |
| Figura 10: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) no envolvimento da peroxidação lipídica no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos | 76 |
| Figura 11: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) sobre a atividade da catalase no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos..... | 76 |
| Figura 12: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) e da carbenoxolona (100 mg/kg) sobre a secreção de muco gástrico em ratos submetidos ao modelo de ligadura do piloro | 77 |
| Figure 13: Efeito do CARV- β CD na dose de 25 mg/kg e da L-arginina (600 mg/kg) após pré-tratamento com L-NOARG (70 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos | 78 |
| Figure 14: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) ou do diazóxido (3 mg/kg) após pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos..... | 78 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|--|
| AINEs | Anti-inflamatórios não-esteróidais |
| CARV-βCD | Carvacrol complexado em β -ciclodextrina |
| CAT | Catalase |
| CDs | Ciclodextrinas |
| Cl⁻ | Cloreto |
| COX-1 | Ciclooxigenase 1 |
| COX-2 | Ciclooxigenase 2 |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| ECL | Células do tipo enterocromafins |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FDA | (Food and Drug Administration)- órgão norte-americano responsável pelo controle de segurança na utilização de alimentos, drogas e outros suplementos |
| GRAS | (Generally Recognized as Safe)- Geralmente reconhecido como seguro |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| K_{ATP} | Canais de potássio sensíveis ao ATP |
| LIN-βCD | (-)-linalol complexado em β -ciclodextrina |
| MDA | Malondialdeído |
| MAPKs | Proteínas quinases ativadas por mitógenos |
| MPO | Mieloperoxidase |
| NF-κB | Fator nuclear kappa B |
| NO | Óxido nítrico |
| O₂^{•-} | Radical ânion superóxido |
| ¹O₂ | Oxigênio molecular singlete |
| OEs | Óleos essenciais |

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| OH[•] | Radicais hidroxil |
| PGs | Prostaglandinas |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral |
| -SH | Grupos sulfidrilas |
| SH-NP | Grupamentos sulfídricos não-proteicos |
| αCD | α -ciclodextrina |
| βCD | β -ciclodextrina |
| γC | γ -ciclodextrina |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 Objetivo Geral | 18 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 18 |
| | |
| CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 1.1 Úlcera Gástrica | 23 |
| 1.2 Tratamento da Úlcera Gástrica | 26 |
| 1.3 Produtos Naturais como alternativa Terapêutica | 27 |
| 1.4 - (-)-Linalol | 29 |
| 1.5 Carvacrol | 30 |
| 1.6 Ciclodextrinas (CDs) | 33 |
| Referências Bibliográficas | 36 |
| | |
| CAPITULO 2 - β-CICLODEXTRINA REFORÇA O EFEITO GASTROPROTETOR DO (-)-LINALOL, UM MONOTERPEÑO PRESENTE NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Aniba roseadora</i> Ducke, EM MODELOS DE LESÕES GÁSTRICAS | 51 |
| 2.1 Introdução | 52 |
| 2.2 Materiais e Métodos | 53 |
| 2.3 Resultados | 56 |
| 2.4 Discussão | 60 |
| Referências Bibliográficas | 62 |
| | |
| CAPITULO 3 - β-CICLODEXTRINA MELHORA A RESPOSTA GASTROPROTETORA E ANTIOXIDANTE DO CARVACROL, UM MONOTERPEÑO PRESENTE NO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM MODELOS ANIMAIS | 67 |
| 3.1 Introdução | 68 |
| 3.2 Metodologia | 70 |
| 3.3 Resultados | 73 |
| 3.4 Discussão | 79 |
| Referências Bibliográficas | 84 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 4- PATENTE: FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO TERPENO PARA APLICAÇÃO EM FERIDAS..... | 93 |
| 5 CONCLUSÕES | 96 |
| 6 PERSPECTIVAS..... | 97 |
| 7 ANEXOS | 98 |

1 INTRODUÇÃO

Os produtos do metabolismo secundário das plantas foram e continuam sendo de grande relevância na área médica, como os óleos essenciais, que são misturas de compostos orgânicos que apresentam como principais propriedades a volatilidade, o aroma intenso, a imiscibilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos. São largamente empregados pelas suas propriedades biológicas, tais como antinociceptiva (BATISTA et al., 2008), anti-inflamatória (PASSOS et al., 2007), antioxidante (MORAIS et al., 2006), antimicrobiana (FERRONATTO et al., 2007) e larvicida (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Os principais constituintes químicos dos óleos essenciais das plantas são os monoterpenos, encontrados como misturas de componentes odoríferos que podem ser obtidos de uma grande variedade de plantas aromáticas, através de diferentes métodos de extração (QUINTANS-JUNIOR, 2008). Os monoterpenos apresentam vários tipos de propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2009), antinociceptiva (GUIMARÃES et al., 2010), vasorrelaxante (SILVA-FILHO et al., 2011), ansiolítica (MELO et al., 2010), antidepressiva (MELO et al., 2011), e sedativa (DE SOUSA et al., 2006).

Dentre os compostos que podem estar presentes na composição dos óleos essenciais, se destacam o (-)-linalol e o carvacrol. O (-)-linalol é um monoterpene de cadeia aberta, álcool terciário, geralmente está presente em várias plantas medicinais aromáticas como principal constituinte dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). Apresenta várias atividades farmacológicas promissoras, tais como antinociceptiva e anti-inflamatória (PEANA et al., 2003; PEANA et al., 2002) e redução da alodinia em modelos de dor neuropática em roedores (BERLIOCCHI et al., 2009). Adicionalmente, demonstrou atividade antinociceptiva e modulação glutamatérgica mediada por mecanismos centrais, com o envolvimento dos sistemas opióide, dopaminérgico e colinérgico (PEANA et al., 2004; PEANA et al., 2006; BATISTA et al., 2010).

O carvacrol se destaca devido às suas diversas propriedades biológicas importantes, como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e anticarcinogênico. Este monoterpene é constituinte dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, tais como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanum compactum* Benth (Lamiaceae), *Acalypha phleoides* Cav. (Euphorbiaceae) e *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) (PEIXOTO-NEVES et al., 2010).

Os monoterpenos são compostos sensíveis, que podem sofrer degradação sob a ação da luz, oxigênio e temperaturas moderadas, a maioria é insolúvel na água, e para certas aplicações uma liberação controlada é exigida (MARQUES, 2010). Dentre as várias estratégias empregadas para prolongar a estabilidade dos monoterpenos, modelar a cinética de liberação e melhorar a absorção, destaca-se a microencapsulação, caracterizada por encapsular sólidos ou líquidos dentro de matrizes ou sistemas reservatórios poliméricos, formando complexos de inclusão (GARGANO, 2007).

As ciclodextrinas (CDs) são carreadores macrocíclicos, capazes de complexar, aumentar a solubilidade em água e estabilizar um largo espectro de substâncias e que, atualmente, têm sido utilizadas no desenvolvimento de novos produtos pela indústria farmacêutica. As ciclodextrinas naturais mais comuns apresentam seis, sete ou oito unidades de D(+)-glicopirranose unidas por ligações α e denominam-se α -, β - e γ -ciclodextrinas, respectivamente (GAVINI, 2011).

A incorporação das CDs em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. As associações com CDs já foram estudadas com 515 princípios ativos, melhorando sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (SZEJTLI, 2005).

O estudo da atividade gastroprotetora envolve diversos modelos biológicos para avaliação pré-clínica de substâncias. Tais modelos buscam conhecer e explicar os mecanismos que estão relacionados à gastroproteção. Estes ensaios biológicos geralmente usam agentes que promovem lesões gástricas como o álcool absoluto e o ácido acético.

Diante do exposto, o presente trabalho foi dividido em cinco capítulos sendo o primeiro destinado à revisão da bibliografia sobre a úlcera gástrica e o papel dos produtos naturais nesta patologia, bem como a associação desses produtos naturais em complexos de inclusão; o segundo capítulo, um estudo sobre a atividade gastroprotetora do (-)-linalol não complexado (LIN), e do (-)-linalol incorporado à β -ciclodextrina (LIN- β CD) em modelos de lesões agudas por etanol absoluto e de lesões crônicas por ácido acético; o terceiro capítulo, um artigo sobre a atividade gastroprotetora do carvacrol incorporado em β -ciclodextrina (CARV- β CD) utilizando diferentes modelos biológicos; o quarto capítulo, trata da patente em fase de conclusão, sobre o desenvolvimento de uma formulação tópica para aplicação em feridas contendo o carvacrol e o quinto capítulo contém os resultados complementares obtidos durante o desenvolvimento da tese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial farmacológico do (-)-linalol na forma livre ou incorporado em β -ciclodextrina e do complexo de inclusão carvacrol + β -ciclodextrina em modelos de lesões gástrica em roedores.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito do (-)-linalol na forma livre e incorporado em β -ciclodextrina na proteção da mucosa gástrica em modelos de úlceras induzidas por etanol e por isquemia e reperfusão.
- Investigar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pelo efeito gastroprotetor do (-)-linalol livre e complexado em β -ciclodextrina, avaliando o envolvimento de grupos sulfidrilas endógenos, atividade da mieloperoxidase, diminuição da peroxidação lipídica e produção de muco.
- Avaliar o efeito do complexo β -ciclodextrina do carvacrol na proteção da mucosa gástrica em modelos de indução aguda de lesões gástricas induzidas por etanol e isquemia e reperfusão;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pelo efeito gastroprotetor do carvacrol complexado em β -ciclodextrina, avaliando o envolvimento de grupos sulfidrilas endógenos, atividade da catalase, atividade da mieloperoxidase, diminuição da peroxidação lipídica, produção de muco, bem como o envolvimento do óxido nítrico e canais de potássio sensíveis ao K_{ATP} .
- Averiguar o efeito do carvacrol complexado em β -ciclodextrina e (-)-linalol livre e complexado no reparo e cicatrização de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.
- Desenvolver uma formulação tópica com o carvacrol na forma livre e avaliar o efeito desta formulação tópica no reparo e cicatrização de feridas cirúrgicas.

Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.325-354, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BATISTA, P. A.; WERNER, M. F. de P.; OLIVEIRA, E. C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, F. F. da S.; SANTOS, A. R. S. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-) - linalool in mice. **Neuroscience Letters**, v. 440, p. 299 – 303, 2008

BATISTA, P. A.; WERNER, M. F.; OLIVEIRA, E. C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L. F.; STORY, G. M.; SANTOS, A. R. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. **Journal of Pain**, v. 11, n. 11, p. 1222-12229, 2010.

BERLIOCCI, L.; RUSSO, R.; LEVATO, A.; FRATTO, V.; BAGETTA, G.; SAKURADA, S.; SAKURADA, T.; MERCURI, N.B; CORASANITI, M. T. (-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in c57/bl6 mice. **International Review of Neurobiology**, v. 85, p. 221-35, 2009.

DE SOUSA, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231–235, 2006

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

GARGANO, A. C. Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do óleo essencial das cascas de frutos de espécies do gênero Citrus. Dissertação de Mestrado, UNESP, São Paulo, 2007.

GAVINI E.; SPADA, G.; RASSU. G.; CERRI. G.; BRUNDU. A.; COSSU. M.; SORRENTI, M.; GIUNCHEDI P. Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl- β -cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium. **J Pharm Pharmacol**, v. 63(4), p. 472-82, 2011.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C.; ARAÚJO, A. A.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v.107, p.949-957, 2010.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p.313-326, 2010.

MELO, F. H.; VENÂNCIO, E. T.; DE SOUSA, D. P.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; DE VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v, 24, p.437-443, 2010.

MELO, F. H.; MOURA, B. A.; DE SOUSA, D. P.; DE VASCONCELOS, S. M.; MACEDO, D. S.; FONTELES, M. M.; VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v, 25, p.362-367, 2011.

MORAIS, S. L.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A. DA; NETO, J. S. RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

PASSOS G. F.; FERNANDES E. S.; CUNHA F. M.; FERREIRA J.; PIANOWSKI L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 330- 332, 2007.

PEANA, A. T; D'AQUILA, P. S; PANIN, F; SERRA, G; PIPPIA, P; MORETTI, M. D. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 721-726, 2002.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S; CHESSA, M. L; MORETTI, M. D; SERRA, G; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, n. 1, p. 37-41, 2003.

PEANA, A.T; DE MONTIS, M. G; SECHI, S; SIRCANA, G; D'AQUILA, P.S; PIPPIA, P. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, n. 3, p. 279-84, 2004.

PEANA, A. T; RUBATTU, P; PIGA, G.G; FUMAGALLI, S; BOATTO, G; PIPPIA, P; DE MONTIS, M.G. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. **Life Sciences**, v. 78, n. 21, p. 2471-4, 2006.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K.S.; GOMES, M. D.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, N. A.; LEAL-CARDOSO, J. H. 2010. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam Clin Pharmacol**, v.24, p.341-350, 2010.

QUINTANS-JUNIOR, L. J.; SOUZA, T. T.; LEITE, B. S.; LESSA, N. M. N.; BONJARDIM, L. R.; SANTOS, M. R. V. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, p. 619–624, 2008.

SILVA-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, N. N. P. M.; ARCANJO, D. D. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, M. R. V. et al. Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00784.x, 2011.

SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, v.36, 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. **Univale: Universidade do Vale do Itajaí**, 2009.

CAPITULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Úlcera Gástrica

A úlcera gástrica é um distúrbio multifatorial gastrointestinal comum, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Os sinais e sintomas podem incluir um ou mais dentre os seguintes sintomas: dor abdominal, inchaço, falta de apetite, perda de peso, náuseas ou vômitos. Embora a fisiopatologia exata da úlcera gástrica seja desconhecida, um desequilíbrio entre fatores defensivos e agressivos da mucosa gástrica podem resultar nesta patologia, sendo esta uma lesão caracterizada por necrose, infiltração de neutrófilos, redução no fluxo sanguíneo, aumento do estresse oxidativo e inflamação (DA SILVA et al., 2013; BANÍĆ et al., 2011).

A incidência de úlcera gástrica é aumentada devido ao estresse, tabagismo, álcool, por infecção por *Helicobacter pylori* e a ingestão excessiva de fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (AINES) (LI et al., 2014; SOWNDHARARAJAN et al., 2013; VONKEMAN et al., 2007). Tem sido sugerido que espécies reativas de oxigênio (ERO_S), principalmente ânions de super-óxido e radicais hidroxila, bem como a peroxidação lipídica promovida por estas espécies nocivas, podem causar o desenvolvimento de úlcera gástrica (BOLIGON et al., 2014).

O processo fisiopatológico da formação de úlceras é caracterizado por um aumento da permeabilidade microvascular, infiltração de neutrófilos, indução de estresse oxidativo, peroxidação lipídica, desequilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias, apoptose, necrose, redução do fluxo sanguíneo e secreção de mediadores inflamatórios (ANTONISAMY et al., 2015; ANTONISAMY et al., 2014).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio e a capacidade do organismo de contrapor a ação destes por sistemas de proteção antioxidante (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014). O aumento da produção de ERO_S e diminuição da defesa antioxidante interna desempenha um papel crítico no processo que leva à úlcera (SUZUKI et al., 2011). Além disso, de maneira direta ou indireta, estas espécies reativas de oxigênio estão relacionadas a doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson, mal de Alzheimer, doença de Huntington e esclerose amiotrófica lateral (MELO et al., 2011; UTTARA et al., 2009), além de ter correlações com 35 formas de diabetes tipo 2, aterosclerose (ALFADDA et al., 2012;

KANETO et al., 2010), doenças inflamatórias, envelhecimento e câncer (SOSA et al., 2013; BONAMIN et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio são representadas por ambas as espécies radicais e não radicalares, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio molecular singleto (1O_2) e radicais hidroxil (OH^{\cdot}). Nos organismos, os radicais livres ao serem formados podem reagir com o DNA (ácido desoxirribonucleico), modificando suas bases nitrogenadas, e caso não haja reparo, mutações podem ser geradas. Ao reagir com proteínas, as espécies reativas oxidam grupos sulfidrilas (-SH), alterando a conformação e consequentemente a função dessas biomoléculas (LUSHCHAK, 2014).

Estas espécies reativas de oxigênio podem iniciar a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados que constituem os lipídeos de membranas celulares (lipoperoxidação), ocasionando mudanças estruturais e funcionais. O produto final da lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA) é mutagênico (SOSA et al., 2013), sendo um marcador estável da peroxidação de lípidos da membrana. Podendo ser quantificado, este é suficientemente estável para se difundir do seu sítio de formação (ex. membranas) para outro sítio (ex. núcleo), podendo causar danos ao DNA (STYSKAL et al., 2012).

A mieloperoxidase (MPO) é outra enzima envolvida no processo de lesão na mucosa gástrica, sendo considerada um biomarcador para a infiltração de neutrófilos em diferentes tecidos (RIBEIRO et al., 2011), esta infiltração é relatada como um dos processos envolvidos na geração de úlceras gástricas (BAYIR et al., 2006). A enzima MPO presente nos grânulos dos neutrófilos catalisa a oxidação do cloreto (Cl^-) na presença de H_2O_2 e assim é capaz de convertê-lo em ácido hipocloroso. Esse composto produzido é um poderoso oxidante que pode estar associado a danos em tecidos, através de lesões inflamatórias graves. Pode também formar outros oxidantes, como por exemplo, cloraminas (NAITO; YOSHIKAWA, 2002).

Os primeiros sistemas de defesa antioxidante identificados contra o dano oxidativo, foram aqueles responsáveis pela prevenção da ocorrência de espécies reativas, e aqueles que bloqueiam ou capturam os radicais formados. Estes sistemas, presentes tanto em compartimentos hidrofóbicos das membranas celulares, quanto em ambientes aquosos (PISOSCHI; POP, 2015), são os responsáveis pela inibição e redução de radicais livres nas células (LIOCHEV, 2013; BIRBEN et al., 2012).

Os efeitos lesivos gerados pelas espécies reativas são geralmente combatidos por defesas antioxidantes enzimáticas (Ex: superóxido dismutase, catalase (CAT), grupamentos sulfidrilicos não proteicos), ou por antioxidantes não enzimáticos (Ex: vitamina C, vitamina

E, carotenóides, polifenóis) (BIRBEN et al., 2012; LIU et al., 2012; MOTA et al., 2011). Entre os fatores defensivos, podemos incluir ainda a produção de muco e bicarbonato, regeneração celular e fluxo sanguíneo adequado (MALFERTHEINER et al., 2009).

A catalase (CAT) representa a enzima envolvida na depleção redutiva de H_2O_2 em água, é expressa na maioria das células, órgãos e tecidos, e em concentrações elevadas no fígado e eritrócitos (SUNG et al., 2013; WONG et al., 2013), tendo a função também de detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois, pela redução do peróxido de hidrogênio (KIRKMAN et al., 1999). Os grupamentos sulfídricos não-proteicos (SH-NP) endógenos desempenham um papel crítico na manutenção da integridade da mucosa, a estes componentes se ligam os radicais livres formados por agentes ulcerogênicos e atuam como antioxidantes de reciclagem, também estão envolvidos no controle da produção e da natureza do muco (SIDAHMED et al., 2013).

O muco gástrico atua como um agente antioxidante reduzindo o dano da mucosa por espécies reativas de oxigênio (ARAWWAWALA et al., 2010). O aumento da quantidade de muco secretado pelas células da mucosa do estômago é capaz de prevenir a formação de úlceras gástricas, atuando de maneira eficaz para a difusão dos íons de hidrogênio, melhorando o efeito tampão do suco gástrico e reduzindo a fricção na parede do estômago durante o peristaltismo (ZAKARIA et al., 2014).

É bem conhecido que os receptores α^2 -adrenérgicos, óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGs) são envolvidos na modulação da integridade da mucosa gástrica e importantes para a regulação do pH gástrico e secreção de muco (JÚNIOR et al., 2014). O óxido nítrico é um mediador biológico que desempenha um papel importante na proteção gástrica. No trato gastrointestinal, esta molécula está envolvida na regulação do fluxo sanguíneo, manutenção do tônus vascular, secreção do muco gástrico, modulação da atividade de mastócitos, participa na regulação do peristaltismo, no esvaziamento gástrico e na atividade motora antral (FALCÃO et al., 2013).

As prostaglandinas (PGs) têm sua biossíntese no trato gastrointestinal, exclusivamente catalisada pela enzima ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e pela forma induzível ciclooxigenase-2 (COX-2) (TAKEUCHI, 2012), são importantes fatores gastroprotetores endógenos, modulando o fluxo sanguíneo da mucosa, estimulando a secreção de muco e bicarbonato, inibindo a adesão dos neutrófilos, favorecendo a ativação e aumento da resistência das células epiteliais aos danos ocasionados por citotoxinas (ZHAO et al., 2015; YILDIRIM et al., 2013; CRISTIANS et al., 2013).

A gastroproteção promovida pelo NO e prostaglandinas pode envolver a ativação de vários tipos de canais de K^+ . Recentemente, foi demonstrado que os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) atuam na proteção gástrica, os quais estão envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido e contratilidade do estômago (OLIVEIRA et al., 2012; GOMES et al., 2006; PESKAR et al., 2002).

Baseando-se nestas premissas e por meio da necessidade de buscar novas alternativas para o tratamento da úlcera gástrica, os pesquisadores simulam as condições às quais os humanos são expostos utilizando diferentes modelos animais, existem muitos modelos experimentais diferentes de indução desta patologia, incluindo indução por etanol, isquemia/reperfusão e ácido acético (JUNIOR et al., 2013).

1.2 Tratamento da Úlcera Gástrica

O tratamento da úlcera gástrica baseia-se na inibição da secreção do ácido gástrico por antagonistas- H_2 , tais como a ranitidina e inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol. No entanto, o principal problema é que, apesar de uma pequena taxa de cura, úlceras tratadas com antagonistas dos receptores H_2 e inibidores da bomba de prótons, podem apresentar recorrência dentro de 1 ano após o fim do tratamento (KANGWAN et al., 2014). Isto é devido principalmente ao acúmulo de neutrófilos e produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em um incompleto processo de cicatrização (TARNAWSKI et al., 1990). Além disso, os efeitos secundários tais como a osteoporose (PANDAY et al., 2014), hipergastrinemia e hiperplasia das células enterocromafins (ECL) (SHEEN; TRIADAFILOPOULOS, 2011) são comuns na terapia prolongada com medicamentos anti-secretores.

Portanto, a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antiúlcera é necessária devido aos seguintes pontos-chave: há uma diversidade de efeitos colaterais significativos apresentados por fármacos que estão atualmente disponíveis (aumento da susceptibilidade à pneumonia e fraturas ósseas, trombocitopenia, deficiências de ferro e vitamina B12, hipergastrinemia e câncer) (DACHA et al 2015) e existem várias interações medicamentosas (SHEEN; TRIADAFILOPOULOS, 2011) e frequente recorrência de úlcera em pacientes após o tratamento (KANGWAN et al., 2014). Em vista disso, produtos naturais são considerados fontes atraentes para potenciais novos tratamentos de úlcera gástrica. Controlar a formação de espécies reativas de oxigênio e a secreção de ácido gástrico são essenciais para o tratamento destas patologias, neste contexto, as plantas medicinais contêm

uma ampla variedade de componentes antioxidantes e anti-secretores (VIANA et al., 2013; GILL et al., 2012; SATHISH et al., 2011).

1.3 Produtos Naturais como alternativa Terapêutica

A pesquisa com plantas medicinais provou ser uma fonte promissora na busca de novos compostos com potencial terapêutico que possam ser utilizados no tratamento de úlceras gástricas (BOEING et al., 2016; SOFIDIYA et al., 2015; OMOJA et al., 2014; MOGHADAMTOUSI et al., 2014; SINGH et al., 2012). As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde o início de sua história e, muito antes do surgimento da escrita, a humanidade já utilizava ervas para fins medicinais (TOSCANO RICO, 2011).

O Brasil é detentor da maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações (FONSECA, 2012). Embora não se tenha muito investimento para pesquisas com plantas medicinais, calcula-se que pelo menos metade das plantas contenham substâncias chamadas de princípios ativos, os quais têm propriedades curativas e preventivas para muitas doenças (SILVA et al., 2014; LORENZI; MATOS, 2002).

Os produtos naturais, do ponto de vista da diversidade molecular, são bastante diversificados, o que representa novas possibilidades de investigação e descoberta de atividades biológicas favoráveis ao tratamento e prevenção de doenças. Compostos isolados de fontes vegetais fornecem moldes estruturais para a obtenção de substâncias sintéticas e, além disso, podem ser empregados como ferramentas na identificação de mecanismos de ação de diferentes compostos (SOUSA, 2013).

Nas últimas décadas, a indústria farmacêutica tem demonstrado interesse na investigação de plantas como fonte para novas estruturas, e para o desenvolvimento de agentes fitoterápicos padronizados com eficácia, segurança e qualidade comprovada. Esse interesse é justificado por diversas razões, a saber: preferências dos consumidores por terapias naturais; preocupação em relação aos efeitos colaterais dos fármacos sintéticos e a crença de que os produtos naturais sejam inócuos; alto custo dos remédios sintéticos; e a falta de acesso da população pobre ao tratamento farmacológico convencional (KINGHORN et al., 2011; FOGLIO et al., 2006; CALIXTO, 2000).

Diante disto, estudos que demonstrem a aplicabilidade de novas fontes naturais, bem como aprofundem o conhecimento de sua composição, são altamente valiosos (MOREIRA,

2013). Cresce também o interesse da indústria por novas moléculas bioativas. Isso ocorre, principalmente, devido à necessidade decorrente do surgimento de novas patologias e o aumento das resistências aos fármacos que estão disponíveis no mercado (BERNAITIS et al., 2013). O potencial dos compostos naturais como antioxidantes já descrito na literatura é considerado como um boa alternativa terapêutica para diversas enfermidades (CALO et al., 2015; FALOWO et al., 2014; SACCHETTI et al., 2005).

Dentre os compostos extraídos de plantas estão os terpenos, flavonoides, taninos, alcaloides e óleos essenciais (ROMANO et al., 2013). Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de substâncias baixo peso molecular (normalmente menos de 500 daltons), extraídas por destilação a vapor, hidrodestilação ou extração com solvente (NAKATSU et al., 2000). São conhecidos cerca de 3.000 óleos voláteis, e grande parte deles são comercialmente muito importantes para a indústria farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e perfumaria (SHERRY et. al., 2013).

Os óleos essenciais têm atraído uma atenção considerável em todo o mundo durante as últimas décadas. Estes produtos naturais têm uma gama de atividades farmacológicas e aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA et al., 2014; RAUT; KARUPPAYIL., 2014). Podemos citar, por exemplo as propriedades farmacológicas, como antinociceptiva (BATISTA et al., 2008), anti-inflamatória (MIGUEL, 2010; PASSOS et al., 2007; MONTEIRO et al., 2007), antioxidante (MIGUEL, 2010; HUSSAIN et al., 2008; DORDEVIC et al., 2007; MORAIS et al., 2006), antimicrobiana (FERRONATTO et al., 2007) e larvicida (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Os terpenoides e os fenilpropanóides constituem os principais componentes dos óleos essenciais, além disso, poucos constituintes aromáticos e alifáticos também estão presentes, muitas destas substâncias são voláteis e odoríferas e desta forma, conferem essas propriedades aos OEs (LI et al., 2014). Nos óleos essenciais os compostos terpenoides mais encontrados são os monoterpenos (C10) e sequisiterpenos (C15), que cada vez são mais estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (CARSON et al., 2006).

Os monoterpenos são constituintes básicos voláteis e pertencem a um grupo diverso de compostos químicos, com enorme variedade de estruturas e com implicações em diversas atividades biológicas, tais como: depressor do sistema cardiovascular, bradicardizante, antimicrobiana, sedativas, anticonvulsivante, hipnótica e hipotérmica ou ainda antiespasmódica, vasorrelaxante, antinociceptiva e gastroprotetora (CAMARGO; VASCONCELOS, 2014).

Vários monoterpenos presentes em óleos essenciais apresentaram efeitos gastroprotetores, como o geraniol (DE CARVALHO et al 2014), alfa-pineno (PINHEIRO et al. 2015), carvacrol (OLIVEIRA et al 2012; SILVA et al.,2012), β -mirceno (BONAMIN et al., 2014), limoneno (MORAES et al., 2009), isopulegol (SILVA et al., 2009), epoxi-carvona (SIQUEIRA et al., 2012), 1,8-cineol (ROCHA et al., 2015) e mentol (ROZZA et al., 2013). A atividade gastroprotetora destes compostos têm sido atribuída a propriedades anti-secretoras, citoprotetoras e antioxidantes.

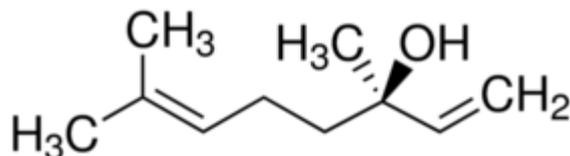
1.4 - (-)-Linalol

O linalol é um monoterpeno constituinte da *Aniba rosaeodora* Ducke (conhecida popularmente como pau rosa) e está presente em diversas plantas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil tais como: *Piper crassinervium* Kunth, *Croton cajucara* Benth e *Hyssopus officinalis* L. É um monoterpeno de extrema importância para as indústrias de cosméticos e alimentos, já que é utilizado, como fixador de fragrâncias (BAKKALI, et al., 2008). Aproximadamente 70 % dos compostos produzidos por essas indústrias contêm linalol em sua fórmula, os produtos e perfumes mais refinados utilizam somente o linalol natural (ROSA et al., 2003).

Sendo um monoterpeno alcoólico terciário de cadeia aberta, apresenta-se com fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$ (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol), naturalmente encontrado na forma de dois estereoisômeros, 3R-(-)-Linalol e 3S-(+)-Linalol, com odores distintos, com diferentes propriedades químicas e efeitos biológicos. O isômero levo-rotatório, lincareol, apresenta um aroma de lavanda e flores frescas, enquanto o dextro-rotatório, coriandrol, um cheiro herbáceo, com tons de folhas envelhecidas, frequentemente descritas com características cítricas (PEANA et al., 2006; ALVIANO et al., 2005).

O monoterpeno (-)-linalol (Figura 1) é um dos enantiômeros do linalol, sendo um composto natural de muitos óleos essenciais, que vem demonstrando várias atividades farmacológicas promissoras, tais como antinociceptiva, anti-inflamatória (PEANA et al., 2003; PEANA et al., 2002) e redução da alodinia em modelos de dor neuropática (BERLIOCCHI et al., 2009), adicionalmente, demonstrou que sua atividade antinociceptiva envolve modulação glutamatérgica mediada por mecanismos centrais, com a participação dos sistemas opióide, dopaminérgico e colinérgico (BATISTA et al., 2010; PEANA et al., 2006; PEANA et al., 2004).

Figura 1: Estrutura química do (-)-linalol (3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol) (SIGMA-ALDRICH, 2016).



O (-)-linalol também foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como “GRAS” (Generally Recognized as Safe), geralmente reconhecido como seguro, grupo de substâncias que podem ser utilizadas como especiarias e aditivos alimentares. Além disso, um estudo toxicológico agudo demonstrou que o pré-tratamento com o (-)-linalol até 375 mg/kg, por 5 dias, não produziu efeitos tóxicos em ratos (KAMATOU; VILJOEN, 2008).

Em um estudo sobre a tolerância à dor e sua relação com a morfina, linalol foi capaz de inibir significativamente a tolerância à morfina, assim como sua dependência (HOSSEINZADEH et al., 2012). É importante mencionar que o seu enantiômero (-)-linalol foi efetivo em modelos de dor crônica (BATISTA et al., 2008). Outro estudo afirma que a atividade antinociceptiva do (-)-linalol pode estar relacionada com a inibição da formação ou liberação de óxido nítrico, sendo o glutamato, um dos principais neurotransmissores envolvidos nesta nocicepção (PEANA et al., 2006). O (-)-linalol reduziu a hiperalgesia térmica, provocada pela carragenina e pelo glutamato no teste de retirada da pata. Houve também diminuição do edema e dor induzidos por formalina, sugerindo ação anti-inflamatória e antinociceptiva para esse monoterpene (PEANA et al., 2004).

Em estudo para verificar possíveis danos ao DNA presente no sangue e em tecidos cerebrais, foi possível constatar que não houve aumento no índice de danos nos grupos dos animais tratados com (-)-linalol, de modo a sugerir que ele não apresenta efeitos genotóxicos ou mutagênicos; apresentou também bons efeitos inibitórios contra células cancerígenas da mama, região colorretal e fígado (COELHO et al., 2013). Entretanto, não existem estudos sobre sua atuação em modelos de úlceras agudas ou crônicas ou qualquer atuação do mesmo sobre o sistema gastrointestinal.

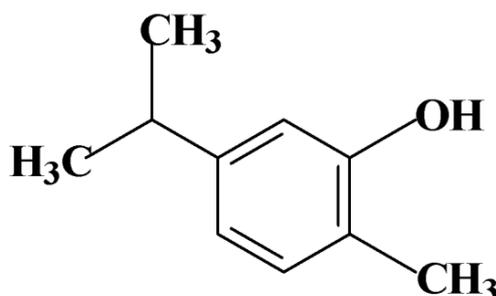
1.5 Carvacrol

O carvacrol é um monoterpene constituinte do óleo essencial produzido por numerosas plantas aromáticas e especiarias, como cominho preto (*Nigella sativa* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus*

vulgaris L.) (ENOMOTO et al., 2001; SKOCIBUSIC; BESIC, 2004; DE VICENZI et al., 2004).

Quimicamente, apresenta-se como um monoterpreno fenólico com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ (5-Isopropil-2-metilfenol- Figura 1), é isômero do timol (2-isopropil-5-metil-fenol), sendo biossintetizado a partir do γ -terpineno e do ρ -cimeno (NOSTRO; PAPALIA, 2012).

Figura 2: Estrutura química do carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol) (CANBEK et al. , 2008).



Carvacrol é reconhecido como um aditivo seguro para alimentos e agente aromatizante em bebidas e goma de mascar (OLIVEIRA et al., 2014). Em ratos, o carvacrol é rapidamente metabolizado e excretado. A principal via metabólica é a esterificação do grupo fenólico com ácido sulfúrico e ácido glicurônico. Outra via é a oxidação do grupo metil terminal para álcoois primários. Após 24 horas, apenas quantidades muito pequenas de carvacrol ou seus metabólitos podem ser encontrados na urina, indicando uma excreção quase completa dentro de um dia (AUSTGULEN et al., 1987).

Um número significativo de efeitos biológicos tem sido descrito para o carvacrol, por exemplo, antimicrobiano (BEN et al., 2006), vasorrelaxante (SILVA-FILHO et al., 2011), anti-inflamatório e antinociceptivo, antitrombótico (ENOMOTO et al., 2001), inibidor da acetilcolinesterase (JUKIC et al., 2007), ativador de PPAR α e γ (receptor ativado por proliferação de peroxissomos) (HOTTA et al., 2010), gastroprotetor (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al 2012). Importante salientar que não existe na literatura dados sobre o carvacrol incorporado em β -ciclodextrina na atividade gastroprotetora.

Adicionalmente, a atividade anti-inflamatória tópica do carvacrol tem sido relatada em edema de orelha induzido por óleo de *Croton argyrophylloides* Muell. Arg. (SOSA et al., 2005), além da sua atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, o que poderia reduzir o estresse oxidativo e a inflamação (GUIMARÃES et al., 2010; YANISHLIEVA et al., 1999). *Plectranthus amboinicus* Lour, cujo principal composto químico é o carvacrol,

apresentou atividade anti-inflamatória significativa no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, através da inibição da permeabilidade vascular, o que pode estar relacionado com a inibição da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e redução do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (CHIU et al., 2011).

Em um estudo que tinha como objetivo investigar os efeitos do carvacrol sobre lesões pulmonares agudas induzidas por lipopolissacarídeos em camundongos, foi observado que este melhorou a sobrevida atenuando a lesão, e os mecanismos anti-inflamatórios podem ser decorrentes da sua capacidade de inibir o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e as vias de sinalização de proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), inibindo assim a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β (FENG ; JIA, 2014).

O carvacrol se mostrou um monoterpreno com potencial para o tratamento de doenças dolorosas faciais e dentárias e afecções inflamatórias, considerando que este é capaz de atuar de forma efetiva sobre dois eventos importantes associados ao processo inflamatório, como o edema e a infiltração de leucócitos, bem como parece atuar na aceleração do processo de reparo e cicatrização de lesões gástricas (GUIMARÃES et al., 2012). Em outro estudo foi relatado que este monoterpreno possui a capacidade de estimular a apoptose em células cancerosas da próstata (HOTTA; NAKATA, 2010).

A aplicação local de gel dental com carvacrol isolado de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham) impediu a reabsorção óssea alveolar e teve um efeito antimicrobiano e anti-inflamatório na periodontite experimental (BOTELHO et al., 2008). Um estudo utilizando uma nanoemulsão de carvacrol, demonstrou que possuía a capacidade em inibir o crescimento de cepas de leveduras, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* e *Brettanomyces naardenensis*, e que esse efeito era dependente da concentração de carvacrol (CHANG; MCLANDBOROUGH; MCCLEMENTS, 2013).

Uma das grandes dificuldades tecnológicas em relação aos monoterpenos, tais como o (-)-linalol e o carvacrol, é a sua preservação durante o processamento e a estocagem, devido à sensibilidade ao calor e à oxidação, além de serem altamente voláteis. Apresentam fraca solubilidade em água e suas propriedades farmacológicas têm uma meia-vida curta, limitando sua utilização em patologias dolorosas (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013), porém, várias abordagens vêm sendo utilizadas para melhorar as propriedades farmacêuticas dos monoterpenos, incluindo o encapsulamento molecular (compostos de inclusão) ou vetorização, que promovem a estabilidade e liberação controlada dos materiais inclusos (HADARUGA, 2012; CHALLA et al., 2005). Dessa forma, as ciclodextrinas (CDs) constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos, com capacidade para formar

complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares. Este fato se deve à interação de regiões hidrofóbicas das moléculas de monoterpenos com a cavidade central das CDs (RUKTANONCHAI et. al., 2011; LI et. al., 2007).

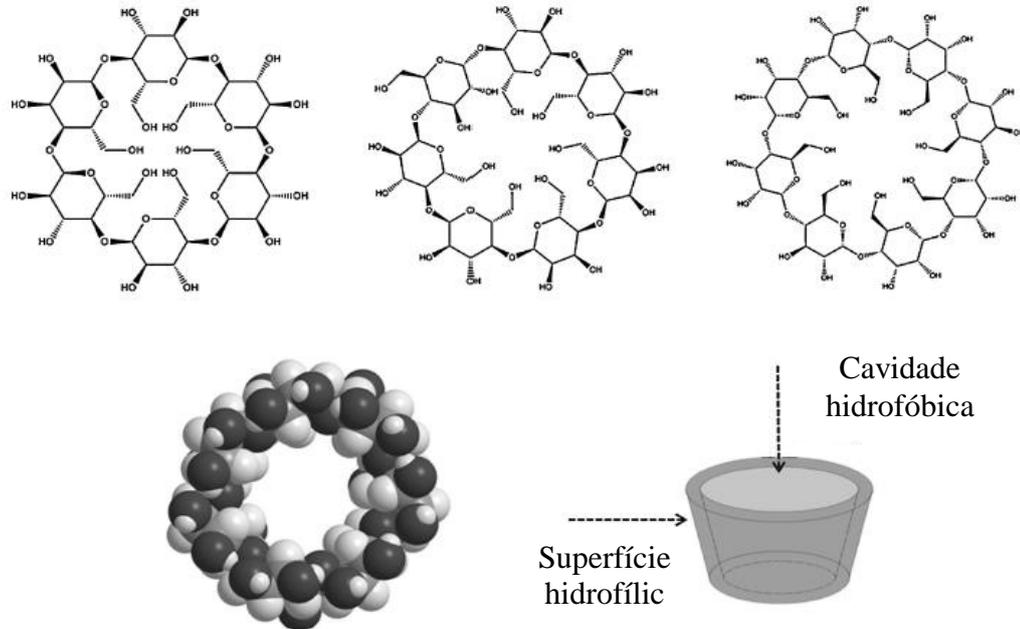
1.6 Ciclodextrinas (CDs)

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1,4)$, sendo obtidas pela degradação enzimática do amido por alguns micro-organismos (PINHO et al., 2014; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007). As CDs formam complexos de inclusão supramoleculares do tipo hospedeiro/hóspede (“host/guest”) (ABARCA et al., 2016; DEL VALLE, 2004). Foram caracterizadas estruturalmente e quimicamente em meados da década de 70 e sua primeira patente foi registrada em 1953. Figuram na lista de compostos seguros publicada pela *Food and Drug Administration-FDA*, órgão norte-americano responsável pelo controle de alimentos, drogas e outros suplementos (DEVI et al, 2010).

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), numerosos fármacos de importância clínica têm as ciclodextrinas presentes na sua composição, tais como as cefalosporinas, piroxicam e ácido tiaprofênico (SZEJTLI, 2005). As CDs (Figura 3) obtidas com maior rendimento são comumente conhecidas como CDs naturais e contêm seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrina (α CD), β -ciclodextrina (β CD) e γ -ciclodextrina (γ CD), respectivamente (PINHO et al., 2014; SÁ BARRETO; CUNHA-FILHO, 2008).

A escolha das CDs como excipiente farmacêutico é motivada pelo fato de melhorar a solubilidade e por diminuir a toxicidade causada pelas substâncias (CEBORSKA et al, 2013; DEVI et al, 2010). Além disso, outra vantagem de complexar compostos às CDs consiste no aumento da biodisponibilidade, permitindo que a substância complexada alcance concentrações terapêuticas nos fluidos biológicos com uma farmacocinética desejável (CEBORSKA et al, 2013; SEGURA-SANCHEZ et al, 2009). São capazes de proteger as substâncias da degradação do meio externo (CIOBANU et al, 2012; MOYA-ORTEGA et al, 2012), reduzir a volatilidade (CIOBANU et al, 2012) e conferir estabilidade química e física (DEVI et al, 2010), além disso, diminui as chances de polimorfismo (CEBORSKA et al, 2013).

Figura 3: Representação esquemática da α -CD, β -CD e γ -CD (esquerda para a direita) e representação esquemática do aspecto truncado da CD/software Chem3D Pro 12.0 (PINHO et al., 2014)



A força motriz que favorece a encapsulação molecular, consiste na substituição das moléculas de água, que possuem elevada entalpia por moléculas hóspedes de menor entalpia. Trata-se de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, fatores que contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado (ABARCA et al., 2016). Interações eletrostáticas de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão (LYRA et al., 2010). Contudo, o requisito mínimo para que se forme o complexo é a compatibilidade de tamanhos e geometrias entre a cavidade da ciclodextrina e a molécula hóspede. Esta compatibilidade de tamanhos pode não corresponder ao tamanho da molécula a ser complexada. Há casos em que apenas uma parte da estrutura do hóspede fica incluída na cavidade. A polaridade desse segmento é um fator condicionante da formação do complexo (CABRAL MARQUES, 2010; GUEDES et al., 2008).

A formação de complexos de inclusão altera significativamente as características da molécula complexada, estas alterações incluem modificações na reatividade química, diminuição da volatilidade, melhoria na solubilidade, estabilização da sensibilidade à luz, calor e oxidação, proteção da degradação por micro-organismos, mascaramento de corantes ou pigmentos (VENTURINI, 2008).

Vários trabalhos já realizaram a complexação de diversos produtos naturais, principalmente compostos não-polares, tais como óleos essenciais e monoterpenos, em β -ciclodextrina (NASCIMENTO et al., 2015; SANTOS et al., 2015; SIQUEIRA-LIMA et al., 2014; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013). Em um estudo sobre a atividade antinociceptica do (-)-linalol e (-)-linalol complexado em β -ciclodextrina (LIN- β CD), ambos apresentaram atividade antinociceptiva no modelo animal de hiperalgesia muscular crônica inflamatória em camundongos, em todas as doses testadas, tendo o LIN- β -CD atividade prolongada em relação a substância isolada, sugerindo que a complexação produziu uma melhoria significativa na ação terapêutica (NASCIMENTO, 2014).

Em outro estudo sobre a dor no câncer, carvacrol complexado em β -ciclodextrina (CARV- β CD) foi administrado (50 mg/kg;v.o) em ratos com tumor na pata traseira e foi capaz de reduzir a hiperalgesia durante 24 h, ao contrário do carvacrol não complexado (100 mg/kg, v.o), que promoveu redução de hiperalgesia por apenas 9 h. A administração em dias alternados do complexo CARV- β CD (12,5 e 50 mg/kg, v.o) reduziu a hiperalgesia diferente do carvacrol isolado que não causou alterações significativas nas respostas nociceptivas. Estes resultados evidenciam que a encapsulação de carvacrol em β -ciclodextrina pode ser útil para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o manejo da dor (GUIMARÃES et al., 2015) e outras patologias.

Portanto, com base nos resultados já encontrados na literatura sobre monoterpenos e sua incorporação em complexos de inclusão, e sabendo que não foram encontrados estudos sobre o possível efeito gastroprotetor do (-)-linalol ou de seu complexo com β -ciclodextrina (LIN- β CD), bem como do carvacrol incorporado em β -CD (CARV- β CD) em modelos de úlceras experimentais agudas ou crônicas em roedores, o presente estudo buscou determinar o possível efeito gastroprotetor e cicatrizante destes monoterpenos não complexados e incorporados em β -ciclodextrinas, assim como os mecanismos de ação envolvidos no efeito evidenciado, podendo, futuramente, se tornarem moléculas promissoras no desenvolvimento de novas propostas terapêuticas para o tratamento de úlceras gástricas.

Referências Bibliográficas

- ABARCA, R. L.; RODRÍGUEZ, F. J.; GUARDA, A.; GALOTTO, M. J.; BRUNA, J. E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p.968-975, 2016.
- ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; COSTA, S. M. O.; BANDEIRA, P. N.; SANTIAGO, G. M. P.; NETO, M. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. **Academia Brasileira de Ciências**, v.79, n.2, p. 209-213, 2007.
- ALFADDA, A.; SALLAM, R. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p.1-14, 2012.
- ANTONISAMY, P.; DURAIKANDIYAN, V.; ARAVINTHAN, A.; AL-DHABI, N. A.; IGNACIMUTHU, S.; CHOI, K. C.; KIM, J. H. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v.750, p.167–175, 2015.
- ANTONISAMY, P.; SUBASH-BABU, P.; ALSHATWI, A. A.; ARAVINTHAN, A.; IGNACIMUTHU, S.; CHOI, K. C.; KIM, J. H. Gastroprotective effect of nymphaol isolated from *Nymphaea stellate* (Willd.) flowers: Contribution of antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. **Chemico-Biological Interactions**, v.224, p.157–163, 2014.
- ARAWWAWALA, L. D.; THABREW, M. I.; ARAMBEWELA, L.S. Gastroprotective activity of *Trichosanthes cucumerina* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.750-754, 2010.
- ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth Linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.
- AUSTGULEN, L. T.; SOLHEIM, E.; SCHELIN, R. R. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. **Pharmacology and Toxicology**, v. 61, n. 2, p.98–102, 1987.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; ÇAKIR, A.; ASLAN A.; SVLEYMAN, H.; HALICI M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**, v. 13, p. 584-590, 2006.
- BANIĆ M, MALFERTHEINER P, BABIĆ Z, OSTOJIĆ R, KUJUNDZIC M, FATOVIĆ-FERENČIĆ S, PLESKO S, PETRIČUŠIĆ L. Historical impact to drive research in peptic ulcer disease. **Digestive Diseases**, v.29, p.444–453, 2011.

BATISTA, P. A.; WERNER, M. F.; OLIVEIRA, E. C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L. F.; SANTOS, A. R. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-Linalool in mice. **Neuroscience letters**, v. 440, n. 3, p. 299-303, 2008.

BATISTA, P. A.; WERNER, M. F.; OLIVEIRA, E. C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L. F.; STORY, G. M.; SANTOS, A. R. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. **Journal of Pain**, v. 11, n. 11, p. 1222-12229, 2010.

BEN, A. A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 149-154, 2006.

BERNAITIS, L.; SHOBHA, K. L.; ASHOK, M.; REVATHI, P. S.; JIJIM.; DIWAN, M. K. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of ethanol extract of *taxus baccata*, *phyllanthus debilis*, *plectranthus amboinicus* against multi drug resistant bacteria. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.4, p.3147-3150, 2013.

BERLIOCCI, L.; RUSSO, R.; LEVATO, A.; FRATTO, V.; BAGETTA, G.; SAKURADA, S.; SAKURADA, T.; MERCURI, N.B.; CORASANITI, M. T. (-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in c57/bl6 mice. **International Review of Neurobiology**, v. 85, p. 221-35, 2009.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **The world allergy organization journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BOEING, T.; DA SILVA, L. M.; SOMENSI, L. B.; CURY, B. J.; MICHELS COSTA A. P.; PETREANU, M.; NIERO, R.; DE ANDRADE, S. F. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.184, p.196-207, 2016.

BOLIGON AA, DE FREITAS RB, DE BRUM TF, WACZUK EP, KLIMACZEWSKI CV, DE ÁVILA DS, ATHAYDE ML, DE FREITAS BAUERMAN L. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v 4, p.358-367, 2014.

BONAMIN F, MORAES TM, DOS SANTOS RC, KUSHIMA H, FARIA FM, SILVAMA, JUNIOR IV, NOGUEIRA L, BAUAB TM, SOUZA BRITO ARM, DA ROCHA LRM, HIRUMA-LIMA CA. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: the role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-Biological Interactions**, v.212, p.11–19, 2014.

BOTELHO, M. A.; RAO, V. S.; MONTENEGRO, D.;BANDEIRA, M. A.;FONSECA, S.G.C.; NOGUEIRA, N.A.P.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A.C. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 442-449, 2008.

CABRAL MARQUES, H. M. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p.313–326, 2010.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems- a Review. **Food Control**, v.54, p.111-119, 2015.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: Thormar, H. (Ed.). **Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents**, p.203–238, 2011.

CRISTIANS, S., BYE, R., NAVARRETEA, A., MATA, R. Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.145, p.530–535, 2013.

CAMARGO, S. B.; VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpeno. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.13, n.3, p.381-387, 2014.

CANBEK, M.; UYANOGLU, M.; BAYRAMOGLU, G.; SENTURK, H.; ERKASAP, N.; KOKEN, T.; USLU, S.; DEMIRUSTU, C.; ARAL, E.; BASER, K. H. C. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. **Phytomedicine**, v.15, p.447–452. 2008.

CEBORSKA, M.; SZWED, K.; SUWINSKA K. Cyclodextrin as the suitable molecular container for isopulegol Enantiomers. **Carbohydrate Polymers**, n. 97, p.546– 550, 2013.

CIOBANU, A.; MALLARD, I.; LANDY, D.; BRABIE, G. et al. .Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, p.1963– 1970, 2012.

COELHO, V.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D. F.; SANTOS, A. R.; DA SILVA BRUM, L. F.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-Linalool in mice. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 67, n. 4, p. 876-880, 2013.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8906-8913, 2013.

CHIU, YUNG-JIA.; HUANG, TAI-HUNG.; CHIU, CHUAN-SUNG.; LU, TSUNG-CHUN.; CHEN, YA-WEN.; PENG, WEN-HUANG.; CHEN, CHIU-YUAN. Analgesic and Antiinflammatory Activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. both in vitro and in vivo, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2011.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Pharmscitech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.

DA SILVA LM, ALLEMAND A, MENDES DA, DOS SANTOS AC, ANDRÉ E, DE SOUZA LM, CIPRIANI TR, DARTORA N, MARQUES MC, BAGGIO CH, WERNER MF.

Ethanollic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p.179-187, 2013.

DACHA, S.; RAZVI, M.; MASSAAD, J.; CAI, Q.; WEHBI, M. Hypergastrinemia. **Gastroenterology Report (Oxf)**, v. 3, p.201-208, 2015.

DE CARVALHO, K. I.; BONAMIN, F.; DOS SANTOS, R. C.; PÉRICO, L. L.; BESERRA, F. P.; DE SOUSA, D. P.; FILHO, J. M.; DA ROCHA, L. R.; HIRUMA-LIMA, C. A. Geraniol-a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.387, p.355-365, 2014.

DEL VALLE, E. M. Ciclodextrinas and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1033–1046, 2004.

DE VICENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VICENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

DEVI, K.D.N.; RANI, P.A.; M, M. AVED; K, S. et al. .Cyclodextrins in pharmacy- an overview. **Journal of Global Pharma Technology**. v.2, n.11, p. 1-10. 2010.

DORDEVIC, S.; PETROVIC, S.; DOBRIC, S.; MILENKOVIC, M.; VUCICEVIC, D.; ZIZIC, S.; KUKIC, J. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 458–463, 2007.

ENOMOTO, S.; ASANO, R.; IWAHORI, Y.; NARUI, T.; OKADA, Y. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 307-310, 2001.

FALCÃO, H. S.; MAIA, G. L. A.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; MORAES, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; TAKAYAMA, C.; FERREIRA, A.L.; BRITO, A.R.M.S.; AGRA, M.,F.; FILHO, J.M.B.; BATISTA, L.M. Gastroprotective mechanisms of the chloroform and ethyl acetate phases of *Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson (Asteraceae). **Journal of Natural Medicines**, v.67, p.480–491, 2013.

FALOWO, A. B.; FAYEMI, P. O.; MUCHENJE, V. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: a review. **Food Research International**, v.64,p.171-181, 2014.

FENG, X.; JIA, A. Protective Effect of Carvacrol on Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice. **Inflammation**, v.37, p.1091 -1101, 2014.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; FERREIRA, A. F. R. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo 37 multidisciplinar**.

Universidade Estadual de Campinas, Divisão de Fitoquímica, Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas, 2006.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**, 2012.

GILL, N. S.; DHAWAN, S.; JAIN, A.; ARORA, R.; BALI, M. Antioxidant and antiulcerogenic activity of wild *Punica granatum* ethanolic seed extracts. **Research Journal of Medicinal Plant**, v.6, p.47–55, 2012.

GOMES, A. S.; LIMA, L.M.; SANTOS, C. L.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. LPS from *Escherichia coli* protects against indomethacin-induced gastropathy in rats: Role of ATP-sensitive potassium channels. **European Journal of Pharmacology**, 547, 136–142, 2006.

GUEDES FL, ALVES GMC, SANTOS FLA, LIMA FL, ROLIM LA, ROLIM NETO PJ. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p.220-225, 2008.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F. ; MELO, M. S. ; CAVALCANTI, S. C. H. ; ANTONIOLLI, A. R. ; BONJARDIM, L. R. ; SILVA, F. A. ; SANTOS, J. P. A. ; ROCHA, R. F. ; MOREIRA, J. C. F. ; ARAUJO, A. A. S. ; GELAIN, D. P. ; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, p. 949 –957, 2010.

GUIMARÃES A. G. ; SILVA, F. V.; XAVIER, M. A. ; SANTOS, M. R. V. ; OLIVEIRA, R. C. M. ; OLIVEIRA, M. G. B. ; OLIVEIRA, A. P. ; MORAIS, C. ; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Orofacial Analgesic-Like Activity of Carvacrol in Rodents. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 67, p. 481-485, 2012.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M.A.; ALVES, R.S.; MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S.; BEZERRA, D.P.; QUINTANS JÚNIOR, L.J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with b-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.

HADARUGA, N. G. Ficaria verna Huds. extracts and their β -cyclodextrin supramolecular systems. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2012.

HOSSEINZADEH, H.; IMENSHAHIDI, M.; HOSSEINI, M.; RAZAVI, B. M. Effect of linalool on morphine tolerance and dependence in mice. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 9, p. 1399-1404, 2012.

HOTTA, M.; NAKATA, R.; KATSUKAWA, M.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 132-139, 2010.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; HUSSAIN S. S.T.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v.108, 986–995, 2008.

JUNIOR, F. E. B.; OLIVEIRA, D. R.; BENTO, E. B.; LEITE, L. H. I.; SOUZA, D. O.; SIEBRA, A. L.; SAMPAIO, R. S.; MARTINS, A. O. P. B.; RAMOS, A. G. B.; TINTINO, S. R.; LACERDA-NETO, L. J.; FIGUEIREDO, P. R. L.; OLIVEIRA, L. R.; RODRIGUES, C. K. S.; SALES, V. S.; FIGUEIREDO, F. R. S. D. N.; NASCIMENTO, E. P.; MONTEIRO, A. B.; AMARO, E. N.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M. R. Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, V. 2013. 2013.

JÚNIOR, F. E. B.; OLIVEIRA, D. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; KAMDEM, J. P.; MACEDO, G. E.; SILVA, G. F.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; POSSER, T. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in diferente ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p.469–477, 2014.

JURISCHKA, C.; STOLLBERG, C.; SMIESZEK, M.; AY, P.; KAY, M.; GERATH, H. Isolation of Highly Pure Substances from Essential Oils: Efficiency Improvement by Combination of Different Thermal Separation Processes. **Chemie-Ingenieur-Technik**, v.84, p. 1350 -1350, 2012.

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 259-261, 2007.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. Linalool - A review of a biologically active compound of commercial importance. **Natural Product Communications**, v. 3,p.1183–1192, 2008.

KANETO, H.; KATAKAMI, N.; MATSUHISA, M.; MATSUOKA, T. A Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. **Mediators of Inflammation**, p.1-11, 2010.

KANGWAN, N.; PARK, J. M.; KIM, E. H.; HAHM, K. B. Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**. v.5, p.40–47, 2014.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v.74, n.6, p.1539-1555, 2011.

KIRKMAN, H. N.; ROLFO, M.; FERRARIS, A. M.; GAETANI, G. F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 13908-13914, 1999.

LI, Y.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; CHEMAT, F. Essential Oils as Reagents in Green Chemistry (eBook), Springer: London, 2014.

LI, L.F.; CHAN, R.L.; LU, L.; SHEN, J.; ZHANG, L.; WU, W.K.; WANG, L.; HU, T.; LI, M.X.; CHO, C.H. Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: the causal relationship and

underlying molecular mechanisms (review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, n. 2, p. 372-380, 2014.

LI, X.; JIN, Z.; WANG, J. Complexation of allyl isothiocyanate by α - and β -cyclodextrin and its controlled release characteristics. **Food Chemistry**, v.103, p.461-466, 2007.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

LIU, Y.; TIAN, X.; GOU, L.; FU, X.; LI, S.; LAN, N.; YIN X. Protective effect of L-citrulline against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.34, p.280-287, 2012.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.117-124, 2010.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, p.1-11, 2007.

LORENZI, H. C.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2002.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, dez. 2014.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v.374, p.1449-1461, 2009.

MELO, A.; MONTEIRO, L.; LIMA, R. M.; OLIVEIRA, D. M.; CERQUEIRA, M. D.; EL-BACHÁ, R. S. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, p. 1-14, 2011.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v.15, p.9252-9287, 2010.

MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F. C.; SANTOS, R. C.; ROCHA, L. R.; MARQUES, M. O.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v.180, p.499-505, 2009.

MOTA, C. S.; FREITAS, R. B.; ATHAYDE, M. L.; BOLIGON, A. A.; AUGUSTI, P.; SOMACAL, S.; ROCHA, M. P.; BAUERMAN, L. F. Effect of *Vernonia cognata* on oxidative damage induced by ethanol in rats. **Human & Experimental Toxicology**, v.30, p.675-84, 2011.

MONTEIRO, M. V. B.; LEITE, A. K. R. de M.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M. de, PINHEIRO, D. C. N. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of

the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 378–382, 2007.

MOYA-ORTEGA, M. D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.428, p.152 – 163, 2012.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H.; FADAEINASAB, M.; ABDULLA, M. A.; KADIR, H. A. Gastroprotective activity of *Annona muricata* leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement. **Drug Design, Development and Therapy**, v.8, p.2099–2110, 2014.

MORAIS, S. L.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, M. M. da S. **Extraction and characterization of Natural Antioxidants from Brewing Industry By-products**. Doutorado em Química Sustentável, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free radical biology & medicine**, v. 33, p. 323-336, 2002.

NAKATSU, T.; LUPO, A. T.; CHINN, J. W.; KANG, R. K. L. Biological activity of essential oils and their constituents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.21, p.571–631, 2000.

NASCIMENTO, S.S.; ARAÚJO, A.A.S.; BRITO, R.G.; SERAFINI, M.R.; MENEZES, P.P.; DE SANTANA, J.M.; LUCCA, W.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, A.P.; AL-BUQUERQUE, R.L.C.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS, L.J. Cyclodextrin-complexed *Ocimum basilicum* leaves essential oil increases Fos protein expression in the central nervous system and produce an antihyperalgesic effect in animal models for fibromyalgia. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p.547–563, 2015.

NASCIMENTO, S. S.; CAMARGO, E. A.; DESANTANA, J. M.; ARAÚJO, A. A. S.; MENEZES, P. P.; LUCCA-JÚNIOR, W.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BONJARDIM, L. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Linalool and linalool complexed in β -cyclodextrin produce anti-hyperalgesic activity and increase Fos protein expression in animal model for fibromyalgia. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.387, p.935-942, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v.7, p.28-35, 2012.

OMOJA, V. U.; IHEDIOHA, T. E.; EKE, G. I.; PETER-AJUZIE, I. K.; OKEZIE, S. E. Evaluation of the acute toxicity, phytochemical constituents and anti-ulcer properties of

methanolic leaf extract of *Annona muricata* in mice. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v.3, p.37–43, 2014.

OLIVEIRA, F. A. ; ANDRADE, L.N. ; SOUSA, E. B. V.; SOUSA, D. P. Anti-Ulcer Activity of Essential Oil Constituents. **Molecules**, v.19, p.5717-5747, 2014.

OLIVEIRA, I.S.; SILVA, F.V.; VIANA, A.F.S.C.; SANTOS, M.R.V.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; MARTINS, M.C.C.; NUNES, P.H.M.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R.C.M. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v, 385, p.899-908, 2012.

PANDAY, K.; GONA, A.; HUMPHREY, M. B. Medication-induced osteoporosis: screening and treatment strategies. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 6, p.185–202, 2014.

PASSOS G. F.; FERNANDES E. S.; CUNHA F. M.; FERREIRA J.; PIANOWSKI L. F.; CAMPOSA, M. M.; CALIXTO J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 330- 332, 2007.

PEANA, A. T; D'AQUILA, P. S; PANIN, F; SERRA, G; PIPPIA, P; MORETTI, M. D. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 721-726, 2002.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S; CHESSA, M. L; MORETTI, M. D; SERRA, G; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, n. 1, p. 37-41, 2003.

PEANA, A.T; DE MONTIS, M. G; SECHI, S; SIRCANA, G; D'AQUILA, P.S; PIPPIA, P. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, n. 3, p. 279-84, 2004.

PEANA, A. T; RUBATTU, P; PIGA, G.G; FUMAGALLI, S; BOATTO, G; PIPPIA, P; DE MONTIS, M.G. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. **Life Sciences**, v. 78, n. 21, p. 2471-4, 2006.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 11 p., 2014.

PESKAR, B.M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B.A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.301, p.969–974, 2002.

PINHEIRO M. A.; MAGALHÃES, R. M.; TORRES, D. M.; CAVALCANTE, R. C.; MOTA, F. S.; OLIVEIRA, C. E. M.; MOREIRA, H. P.; LIMA, G. C.; ARAÚJO, P. C.; CARDOSO, J. H.; DE SOUZA, A. N.; DINIZ, L. R. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. **Pharmacognosy Magazine**, v.41, p.123-30, 2015.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.121–135, 2014.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BARRETO, R. S.; MENEZES, P. P.; ALMEIDA, J. R.; VIANA, A. F.; OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, A. P.; GELAIN, D. P.; DE LUCCA JÚNIOR, W.; ARAÚJO, A. A. β -Cyclodextrin complexed (–)-linalool produces antinociceptive and anti-inflammatory effects superior to those of (–)-linalool in experimental protocols. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.113, p.167-72, 2013.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p. 250–264, 2014.

RIBEIRO, A. L.; SHIMADA, A. L.; HEBEDA, C. B.; DE OLIVEIRA, T. F.; DE MELO LOUREIRO, A. P.; DOS REIS, W. P. F.; SANTOS, A. M.; DE LIMA, W. T.; FARSKY, S. H. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activity and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. **Toxicology**, v.288, p.1–7, 2011.

ROCHA CALDAS, G. F.; OLIVEIRA, A. R.; ARAÚJO, A. V.; LAFAYETTE, S. S.; ALBUQUERQUE, G. S.; SILVA-NETO, J. D. C.; COSTA-SILVA, J. H.; FERREIRA, F.; COSTA, J. G.; WANDERLEY, A. G. Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). **PLoS One**, v.10, e0134558, 2015.

ROMANO, B.; PGANO, E.; MONTANARO, V.; FORTUNATO, A. L.; MILIC, N.; BORRELLI, F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytotherapy Research**, v.27, p.1588–1596, 2013.

ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; DE ALMEIDA RODRIGUES, I.; SOARES, R.M.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.1895-901, 2003.

ROZZA, A. L.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TAKAHIRA, R. K.; PADOVANI, C. R.; PELLIZZON, C. H. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: pathways of gastroprotection. **Chemico-Biological Interactions**, v.206, p.272-278, 2013.

RUKTANONCHAI, U. R.; SRINUANCHAI, W.; SAESOO, S.; SRAMALA, I.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A. Encapsulation of Citral Isomers in Extracted Lemongrass Oil with Cyclodextrins: Molecular Modeling and Physicochemical Characterizations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.75, p.2340-2345, 2011;

SÁ BARRETO, L.C.L.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, p.629-36, 2008.

SANTOS, P. L.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS, J. S. S.; OLIVEIRA, M. G. B.; BRITO, R. G.; SERAFINI, M. R.; MENEZES, P. P.; SANTOS, M. R. V.; ALVES, P. B.; DE LUCCA JÚNIOR, W.; BLANK, A. F.; LAROCCHA, V.; ALMEIDA, R. N.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Preparation, characterization, and pharmacological activity of *Cymbopogon winterianus*

Jowitt ex Bor (Poaceae) leaf essential oil of β -cyclodextrin inclusion complexes. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, doi: 10.1155/2015/502454.

SATHISH, R.; VYAWAHARE, R.; NATARAJAN, K. Antiulcerogenic activity of *Lantana camara* leaves on gastric and duodenal ulcers in experimental rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.134, p.195–7, 2011.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, p.621-632, 2005.

SEGURA-SANCHEZ, F.; BOUCHEMALA, K; LEBASA, G.; VAUTHIERC, C.; SANTOS-MAGALHAES, N. S.; PONCHEL, G. Elucidation of the complexation mechanism between (+)-usnic acid and cyclodextrins studied by isothermal titration calorimetry and phase-solubility diagram experiments. **Journal of Molecular Recognition**, v.22, p.232–241, 2009.

SIDAHMED, H. M.; HASHIM, N. M.; AMIR, J.; ABDULLA, M. A.; HADI, A. H.; ABDELWAHAB, S. I.; TAHA, M. M.; HASSANDARVISH, P.; THE, X.; LOKE, M. F.; VADIVELU, J.; RAHMANI, M.; MOHAN, S. Pyranocycloartobioxanthone A, a novel gastroprotective compound from *Artocarpus obtusus* Jarret, against ethanol-induced acute gastric ulcer in vivo. **Phytomedicine**, v.20, p.834-843, 2013.

SHEEN, E.; TRIADAFILOPOULOS, G. Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. **Digestive Diseases and Sciences**, v.56, p.931–950, 2011.

SHERRY, M.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H.; GREIGE-GERGES, H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. **Journal of Liposome Research**, v.23, p.268-275, 2013

SINGH, J.; KUMAR-VR, S.; KADAM, V. 2012. Antiulcer activity of *Annona reticulata* leaves extract in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p.412–414, 2012.

SILVA, F. V.; OLIVEIRA, I. S.; FIGUEIREDO, K. A.; JÚNIOR, F. B.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; AMARAL, M. P.; ALMEIDA, F. R.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Sterculia striata* A. St.-Hil. & Naudin (Malvaceae) in rodents, **Journal of Medicinal Food**, v.17, p.694-700, 2014.

SILVA, F. V.; GUIMARAES, A. G.; SILVA, E. R. S.; SOUSA-NETO, B. P.; MACHADO, F. D. F.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ARCANJO, D. D. R.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of Oregano. **Journal of Medicinal Food**, v.15, p.984–991, 2012.

SILVA-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, N. N. P. M.; ARCANJO, D. D. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, M. R. V.; OLIVEIRA R. C. M.; OLIEIRA, A. P. Investigation of mechanisms involved in (–)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.110, p.171-177, 2011.

SILVA, M. I.; MOURA, B. A.; NETO, M. R.; TOMÉ ADA, R.; ROCHA, N. F.; DE CARVALHO, A. M.; MACÊDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M.; DE SOUSA, D. P.;

VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.380, p.233-2345, 2009.

SIQUEIRA-LIMA, P.S.; ARAÚJO, A.A.S.; LUCCHESI, A.M.; QUINTANS, J.S.S.; MENEZES, P.P.; ALVES, P.B.; DE LUCCA JÚNIOR, W.; SANTOS, M.R.V.; BONJARDIM, L.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. β -cyclodextrin complex containing *Lippia grata* leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice -evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol**, v.114, p.188–196, 2014.

SIQUEIRA, B.P.J.; MENEZES, C. T.; SILVA, J. P.; DE SOUSA, D. P.; BATISTA, J. S. Antiulcer effect of epoxy-carvone. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22 p.144-149, 2012.

SKOCIBUSIC, M.; BESIC, N. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two Satureja species essential oils. **Phytotherapy Research.**, v. 18, p. 967-970, 2004.

STYSKAL, J.; REMMEN, H.V.; RICHARDSON, A.; SALMON, A. B. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? **Free Radical Biology & Medicine**, v.52, p.46-58, 2012.

SOFIDIYA, M. O.; ORISAREMI, C. O.; SANSALIYU, I.; ADETUNDE, T. O. Gastroprotective and antioxidant potentials of ethanolic stem bark extract of *Margaritaria discoidea* (Euphorbiaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.171, p.240-246, 2015.

SOSA, S.; ALTINIER, G.; POLITI, M.; BRACAB, A.; MORELLI, I.; LOGGIAA, R. D. Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 271-277, 2005

SOSA V, MOLINÉ T, SOMOZA R, PACIUCCI R, KONDOH H, LEONART ME. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, p.376-390, 2013.

SOUSA, R.G.; FALCÃO, H.S.; BARBOSA FILHO, J.M.; MELO DINIZ, M.M.F.; BATISTA, L.M. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.15, n.2, p.287-292, 2013.

SOWNDHARARAJAN, K; KANG, S. C. Protective effect of ethyl acetate fraction of *Acacia ferruginea* DC. against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148: p.175–181, 2013.

SUNG, C. C.; HSU, Y. C.; CHEN, C. C.; LIN, Y. F.; WU, C. C. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2013, 2013.

SUZUKI, H.; MATSUZAKI, J.; HIBI, T. Ghrelin and oxidative stress in gastrointestinal tract. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.48, p.122–125, 2011.

SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, v.36, 2005.

TAKEUCHI, K. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. **World Journal of Gastroenterology**, v.18, p.2147-2160, 2012.

TARNAWSKI, A.; HOLLANDER, D.; KRAUSE, W. J.; DABROS, W.; STACHURA, J., GERGELY, H. "Healed" experimental gastric ulcers remain histologically and ultra structurally abnormal. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.12, p.139-147,1990.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.43, p.587-595, 2013.

TOSCANO RICO, J. M. **Plantas Medicinais**. Academia das Ciências de Lisboa, Instituto de Estudos Acadêmicos para Seniores, Lisboa, 2011.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, p.65-74, 2009.

WONG JY, ABDULLA MA, RAMAN J, PHAN CW, KUPPUSAMY UR, GOLBABAPOUR S, SABARATNAM V. Gastroprotective Effects of Lion's Mane Mushroom *Herichium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers. (Aphyllphoromycetidae) Extract against Ethanol-Induced Ulcer in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 492976, 2013.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p.360-368, 2008.

VIANA, A. F.; FERNANDES, H. B.; SILVA, F. V.; OLIVEIRA, I. S.; FREITAS, F. F.; MACHADO, F. D.; COSTA, C. L.; ARCANJO, D. D.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire leaves on experimental ulcer models, **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, p.316-323, 2013.

VONKEMAN, H. E.; KLOK, R. M.; POSTMA, M. J.; BROUWERS, J. R.; VAN DE LAAR, M. A. Direct medical costs of serious gastrointestinal ulcers among users of NSAIDs. **Drugs Aging**, v.24, p.681-690, 2007

ZAKARIA, Z. A.; BALANA, T.; SUPPAIAHB, V.; AHMADC, S.; JAMALUDIN, F. Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of *Muntingia calabura*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, p.1184-1193, 2014.

ZHAO, Z.; GONG, S.; WANG, S.; MA, C. Effect and mechanism of evodiamine against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing Rho/NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 28, p.588-595, 2015.

ZHANG, J.; MA, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.1215-1233, 2013.

YILDIRIM, E.; SAGIROGLU, O.; KILIÇ, F. S.; EROL, K. Effects of nabumetone and dipyron on experimentally induced gastric ulcers in rats. **Inflammation**. v.36; p.476-481, 2013.

YANISHLIEVA, N.; MARINOVA, E. M.; GORDON, M. H.; RANEVA, V. G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, p. 59–66, 1999.

CAPITULO 2

**β -CICLODEXTRINA REFORÇA O EFEITO
GASTROPROTETOR DO (-)-LINALOL, UM MONOTERPENO
PRESENTE NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aniba roseadora* Ducke,
EM MODELOS DE LESÕES GÁSTRICAS**

Este capítulo corresponde ao artigo (short communication) publicado no periódico internacional **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** (Fator de Impacto 2,471; Qualis B1 Biotecnologia).

BETA-CYCLODEXTRIN ENHANCED GASTROPROTECTIVE EFFECT OF (-)-LINALOOL, A MONOTERPENE PRESENT IN ROSEWOOD ESSENTIAL OIL, IN GASTRIC LESION MODELS

Francilene Vieira da Silva ^a, Hélio Barros Fernandes ^a, Irisdalva Sousa Oliveira ^a, Ana Flávia Seraine Custódio Viana ^b, Douglas S. Costa ^a, Jand V. R. Medeiros ^{a,d}, Kamila Lopes de Lira ^d, Lucindo José Quintans-Júnior ^c, Adriano Antunes de Sousa ^c, Rita de Cássia Meneses Oliveira ^{a,d} *

a Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Ponto Focal - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

b Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

c Departamento de Fisiologia (DFS), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

d Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

* Autor Correspondente:

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, *Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, Av. Nossa Senhora de Fátima s/n, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil*

E-mail: menesesoliveira@gmail.com

RESUMO

(-)-Linalol, um monoterpene constituinte de diversos óleos essenciais possui atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antimicrobiana já comprovadas. A fraca estabilidade química e meia-vida curta impedem as aplicações clínicas de óleos essenciais e monoterpenos, incluindo o (-)-Linalol. No entanto, β - ciclodextrina (β -CD) é usada para aumentar a solubilidade, estabilidade e melhorar os efeitos farmacológicos dos compostos lipofílicos. Neste estudo, as atividades gastroprotetora do (-)-Linalol (LIN) e do Linalol incorporado em complexo de inclusão contendo β -ciclodextrina (LIN- β CD) foram avaliadas usando os modelos de úlceras gástricas agudas e crônicas em roedores. LIN e LIN- β CD demonstraram forte atividade gastroprotetora ($p < 0,001$). O complexo LIN- β CD revelou que o efeito gastroprotetor foi significativamente melhorado, quando comparado com LIN não complexado, sugerindo que essa melhora esteja relacionada ao aumento da sua solubilidade e estabilidade, bem como pela potencialização do perfil antioxidante deste monoterpene. Em conjunto, os nossos resultados sugerem que a β -CD pode representar uma ferramenta importante para a melhoria da atividade gastroprotetora do (-)-linalol e outros compostos insolúveis em água.

Palavras Chaves: Linalol. β -ciclodextrina. Danos gástricos. Etanol. Ácido acético.

2.1 Introdução

As úlceras gástricas configuram-se como lesões na mucosa estomacal decorrentes do desequilíbrio entre os fatores defensivos e fatores agressivos no trato digestivo (LI et al., 2014). A incidência de úlcera gástrica é aumentada devido ao estresse, tabagismo, álcool, infecção por *Helicobacter pylori* e a ingestão de anti-inflamatórios não-esteroidais (VONKEMAN et al., 2007; SOWNDHARARAJAN; KANG, 2013). A terapia de úlcera gástrica enfrenta uma grande desvantagem, porque a maior parte dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado, mostram eficácia limitada contra as doenças gástricas e são frequentemente associados a graves efeitos colaterais (MOTA et al., 2009). Os produtos naturais, do ponto de vista molecular, são bastante diversificados, o que representa novas possibilidades de investigação e descoberta de atividades biológicas favoráveis ao tratamento e prevenção desta doença.

O (-)-Linalol (LIN) é um dos enantiômeros do monoterpene Linalol, constituinte de vários óleos essenciais, obtidos de espécies vegetais como *Aniba roseadora* Ducke (Sampaio

et al. 2012), *Piper crassinervium* Kunth, *Croton cajucara* Benth, *Hyssopus officinalis* L, dentre outras (BAKKALI, et al., 2008). Tem demonstrado várias atividades farmacológicas promissoras, tais como moduladora do SNC, atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos animais (PEANA et al., 2003; PEANA et al., 2002) e redução da alodinia em modelos de dor neuropática (BERLIOCCHI et al., 2009). Adicionalmente, demonstrou atividade antinociceptiva e modulação glutamatérgica mediada por mecanismos centrais, com envolvimento dos sistemas opióide, dopaminérgico e colinérgico (BATISTA et al., 2010; BERLIOCCHI et al., 2009; PEANA et al., 2004; PEANA et al., 2006).

Este monoterpreno é de extrema importância para as indústrias de cosméticos e alimentícios, uma vez que é utilizado, como fixador de fragrâncias (BAKKALI, et al., 2008), foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como “GRAS” (geralmente reconhecido como seguro), substâncias utilizadas como especiarias e aditivos alimentares. Além disso, um estudo toxicológico agudo demonstrou que o pré-tratamento com o (-)-linalol em dose de até 375 mg/kg, por 5 dias, não produziu efeitos tóxicos em ratos (KAMATOU; VILJOEN, 2008).

Apesar dos benefícios supracitados, o LIN, assim como os monoterpenos em geral, exibe baixa solubilidade em água, alta volatilidade e curta meia vida plasmática (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013), desta forma a incorporação em ciclodextrinas (CDs), especialmente a β -CD, vem se destacando como uma ferramenta importante para melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas de diversos monoterpenos (BRITO et al. 2015; OLIVEIRA et al. 2015).

Até o presente momento, não foram encontrados estudos sobre o possível efeito gastroprotetor do LIN ou de seu complexo com β -CD (LIN- β CD), em modelos de úlceras experimentais aguda ou crônica em roedores. Desta forma, o presente estudo buscou avaliar o potencial deste monoterpreno nas formas livre e complexado, assim como os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos evidenciados.

2.2 Materiais e Métodos

Neste estudo utilizamos o monoterpreno (-)-Linalool não complexado ou incorporado em complexo de inclusão em β -ciclodextrina, fornecido pelo Professor Dr. Lucindo José Quintans-Júnior do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Sergipe. A preparação do complexo (-) - linalol / beta-CD foi realizada previamente de acordo com um estudo anterior (Menezes et al. 2014).

2.2.1 Animais

Foram mantidos camundongos swiss (25-30 g) e ratos Wistar (180-220 g) fêmeas, sob condições controladas (24 ± 1 ° C, ciclo escuro/luz de 12 horas), com alimento e água *ad libitum*. Eles foram mantidos em jejum durante 18 h e depois aclimatizados ao ambiente de teste 2 h antes de cada experiência. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos diferentes. No modelo de lesões gástricas induzidas pelo ácido acético, os animais foram anestesiados com cetamina e cloreto de xilazina (50 e 5 mg/kg, i.p., respectivamente). Após procedimentos experimentais, os animais foram eutanaziados com tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil (CEEAP-PI número 096/14).

2.2.2 Úlcera Gástrica induzida por etanol absoluto em Camundongos

As lesões gástricas agudas foram induzidas em camundongos por via oral (0,2 mL / animal) de etanol absoluto (Robert et al. 1979). Veículo (NaCl 0.9%, 10 mL/kg), (-)-Linalol (LIN) ou (-)-Linalol- β CD (LIN- β CD) (5; 10; 20 or 40 mg/kg), ou carbenoxolona (100 mg/kg). Foram administrados oralmente 1 hora antes da aplicação do agente ulcerogênico. Os animais foram eutanasiados 30 minutos após a administração do etanol e os estômagos foram removidos e abertos ao longo da curvatura maior. A área de lesões gástricas foi medida usando o ImageJ-NIH®. A área da lesão foi calculada como se segue: Área da lesão (em percentagem) = área da lesão (em milímetros quadrados) \times 100 / área total (em milímetros quadrados) (Bhargava and Gupta and Tangri, 1973).

2.2.3 Atividade Antioxidante

Para esses protocolos, a menor dose de (-) - linalol não complexado e com atividade gastroprotetora significativa foi utilizada. As menor dose com atividade gastroprotetora no protocolo de úlcera induzida pelo etanol, foi utilizadas para avaliar sua potência quando incorporado em β -ciclodextrina. Ambos os estômagos removidos dos animais do grupo sham e dos grupos tratados oralmente com o veículo, LIN ou LIN-pCD (10 mg/ kg), foram utilizados para quantificar os seguintes parâmetros:

Análise dos grupos sulfidrilicos não-proteicos: Os níveis reduzidos dos grupos sulfidrilos não proteicos (NP-SH) foram estimados de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Os níveis de grupamentos sulfidrilos não proteicos da mucosa gástrica foram determinados em homogeneizados de tecido de estômago com reação de Ellman utilizando ácido 5'5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB). Os resultados em NP-SH foram expressos em microgramas por grama de proteína de tecido estomacal

Determinação da atividade da mieloperoxidase: A extensão da acumulação de neutrófilos na mucosa gástrica foi medida a partir da avaliação da atividade da MPO como anteriormente descrito (Bradley et al., 1982). As medidas foram realizadas em amostras gástricas e a reação entre a amostra e HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) e Seguido por o-dianisidina. Os resultados são expressos em unidades de MPO por miligrama (U/mg) de tecido.

Análise de malondialdeído

A concentração de peroxidação lipídica mucosa gástrica foi determinada através da estimativa do malondialdeído (MDA). Os homogeneizados de cada grupo, foram medidos utilizando o método de Mihara e Uchiyama (1978), que se baseia na reação com ácido tiobarbitúrico. Os resultados foram expressos em nanomol de MDA por miligrama de tecido (nmol/g de tecido).

2.2.4 Lesões Gástricas induzidas por Ácido Acético

Ratos fêmeas Wistar (n = 5) foram colocados em jejum por 18 h e depois anestesiados com cetamina e xilazina, a cavidade abdominal foi aberta (uma incisão de aproximadamente 2 cm) e o estômago foi exposto. Para induzir a úlcera gástrica, utilizou-se um tubo de vidro de 8 mm de diâmetro e 2 cm de comprimento, em contato com a serosa do estômago para limitar a área da lesão. Adicionaram-se setenta microlitros de ácido acético a 80% ao tubo, que permaneceu em contato com a serosa do estômago durante 1 min. Depois de remover o ácido acético com a ajuda de uma pipeta automática, lavou-se o local com solução salina (Okabe, et al., 1972). O estômago foi acomodado na cavidade abdominal, e a região abdominal foi suturada. Um dia após a indução da úlcera, iniciou-se o tratamento oral diário com veículo, cimetidina (100 mg/kg) ou LIN ou LIN- β CD (40 mg/kg) durante 14 dias. Após o tratamento crônico, os animais foram eutanaziados e o estômago foi removido (aberto na maior curvatura), lavado com água destilada e esticado para medir a área ulcerada (com a ajuda de um compasso). O cálculo da área ulcerada (Em milímetros quadrados) foi realizada medindo

o comprimento x altura; O volume da úlcera (em milímetros cúbicos) foi calculado medindo a área ulcerada x profundidade da úlcera (Potrich et al., 2010).

2.2.5 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média \pm SEM. A significância estatística para as diferenças entre os grupos foi calculada por análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism™ 5.0 (San Diego, CA,USA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Efeito do (-)-Linalol e (-)-Linalol- β CD sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto

A administração de etanol absoluto aos animais que foram previamente tratados com veículo produziu grande porcentagem de área ulcerada ($15,58 \pm 0,8\%$). LIN apresentou efeito gastroprotetor significativo nas doses de 10 ($2,26 \pm 0,54\%$), 20 ($3,7 \pm 1,19\%$) e 40 ($1,66 \pm 0,44\%$) mg/kg, obtendo-se uma gastroproteção de 85,50; 76,26; e 89,35%, respectivamente, em relação aos animais tratados com veículo. A dose de 5 mg/kg ($13,97 \pm 1,50\%$) não reduziu as lesões gástricas quando comparado ao veículo. Lin- β CD nas doses de 5 ($6,74 \pm 1,5\%$), 10 ($1,54 \pm 0,68\%$), 20 ($2,52 \pm 0,07\%$) e 40 ($0,9 \pm 0,19\%$) mg/kg foi capaz de reduzir a área de lesões gástricas em 56,74; 90,11; 83 e 94,2%, respectivamente, demonstrando que possivelmente a complexação melhora sua atividade gastroprotetora. Os animais que receberam carbenoxolona (100 mg/kg) tiveram a área de lesão reduzida em 93,92% ($4,68 \pm 0,68\%$) (FIGURA 1).

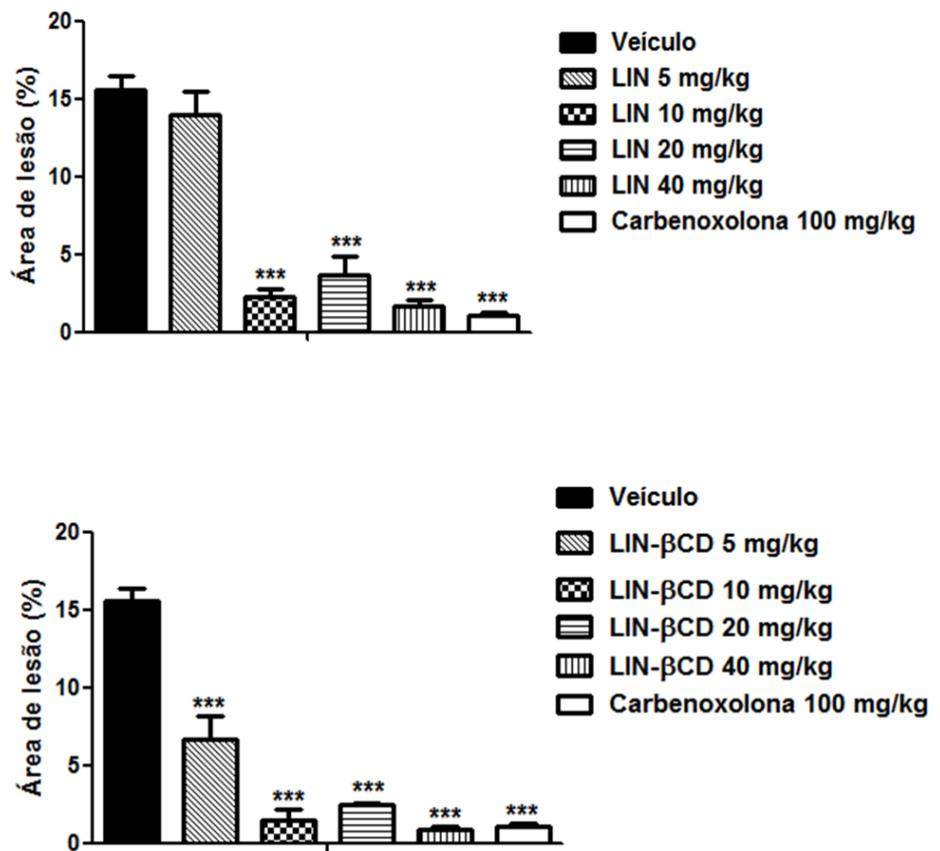


FIGURA 4: Efeito do LIN e (-)-LIN-βCD nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg e da carbenoxolona (100 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os dados estão expressos como média ± E.P.M., *** $p < 0,001$, comparados ao grupo veículo (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey).

PARTICIPAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRÍLICOS NÃO- PROTEICOS (NP-SH) NO EFEITO GASTROPROTETOR DO (-)-LINALOL E (-)-LINALOL-βCD NO MODELO DE ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ABSOLUTO.

A administração de etanol reduziu o conteúdo gástrico de grupamentos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH) nos animais pré-tratados com veículo ($302,86 \pm 27$ μg/g proteína; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo sham ($425,56 \pm 38$ μg/g proteína). O pré-tratamento com LIN na dose de 10 mg/kg não alterou os níveis do conteúdo gástrico de NP-SH ($221,98 \pm 11$ μg/g proteína) quando comparado ao grupo que recebeu apenas veículo antes da indução de úlcera por etanol absoluto. Diferentemente o LIN-βCD na dose de 10 mg/kg exibiu um aumento significativo do conteúdo gástrico de NP-SH ($454,22 \pm 24$ μg/g proteína; ** $p < 0,01$) quando comparado ao veículo (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade antioxidante LIN e LIN-BCD na mucosa do estômago de camundongos submetidos a lesão gástrica por etanol.

| TRATAMENTO DOSE (mg/kg) | NP-SH ($\mu\text{g/g}$ de proteína) | MPO (U/mg de tecido) | MDA (nmol/g de tecido) |
|-------------------------------|---|-------------------------|------------------------------|
| Sham | 425,56 \pm 38 * | 2,70 \pm 0,7** | 85,62 \pm 3,3* |
| Veículo | 302,86 \pm 27 | 7,13 \pm 1,2 | 114,40 \pm 5,5 |
| LIN 40 mg/kg | 221,98 \pm 11 | 1,66 \pm 0,7*** | 75,79 \pm 4,3** |
| LIN- β CD 40 mg/kg | 454,22 \pm 24** | 0,88 \pm 0,3*** | 78,47 \pm 11,0** |

Os dados são analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey e expressos como média \pm SEM. * P <0,05. ** P <0,01. *** P <0,001

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO EFEITO GASTROPROTETOR DO (-)-LINALOL E (-)-LINALOL- β CD NO MODELO DE ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ABSOLUTO.

A atividade da MPO nos estômagos dos animais pré-tratados com veículo (7,13 \pm 1,2 U/ mg de tecido; **p<0,01) foi significamente maior quando comparado ao grupo sham (2,7 \pm 0,7 U/ mg de tecido). Nos estômagos pré-tratados com LIN (1,6 \pm 0,7 U/ mg de tecido; ***p<0,001) e LIN- β CD (0,8 \pm 0,3 U/ mg de tecido ***p<0,001) ambos na dose de 10mg/kg demonstraram uma redução na atividade da MPO quando comparado ao controle ulcerado (Tabela 1).

ENVOLVIMENTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO EFEITO GASTROPROTETOR DO (-)-LINALOL E (-)-LINALOL- β CD NO MODELO DE ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ABSOLUTO.

A peroxidação lipídica nos estômagos pré-tratados apenas com veículo (114,4 \pm 6 nmol/g de tecido) foi maior quando comparado ao grupo não ulcerado (sham) 85,6 \pm 3 nmol/g de tecido. LIN e LIN- β CD na dose de 10 mg/kg foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica em 75,7 \pm 4 (**p<0,01) e 78,4 \pm 11(**p<0,01) respectivamente (Tabela 1).

EFEITO DO (-)-LINALOL E (-)-LINALOL- β CD SOBRE ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

No modelo de lesões gástricas induzidas por ácido acético, o tratamento oral por 14 dias consecutivos demonstrou que tanto o LIN quanto LIN- β CD aceleram a cicatrização da úlcera gástrica crônica em ratos. Como pode ser visto nas figuras 5 e 6, LIN e LIN- β CD na dose de 40 mg/kg diminuíram significativamente a área da lesão ulcerativa 48%(67,1 \pm 5,7) e

83% ($21 \pm 7,9$), respectivamente, em comparação ao grupo veículo ($131,2 \pm 17$), sendo que o LIN- β CD produziu efeito cicatrizante superior ao Linalol não complexado. Cimetidina também foi capaz de reduzir de maneira significativa a área de lesão (64%; $47,8 \pm 13$). No tratamento com veículo, LIN e LIN- β CD ou cimetidina durante os 14 dias não ocorreu mortalidade.

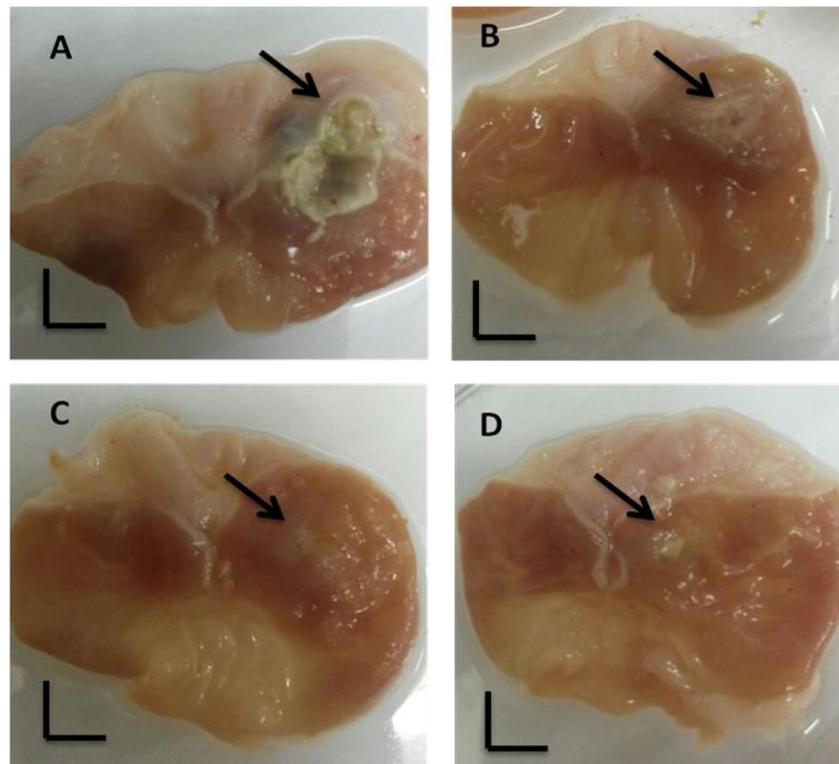
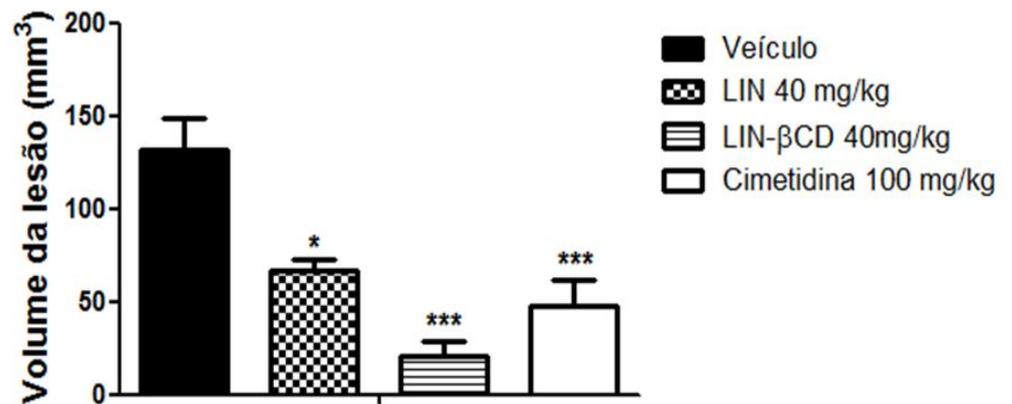


Figura 5: Efeito de (-) Linalol livre e complexado sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético (80%) em ratos. Os animais foram tratados por via oral com veículo, LIN e LIN- β CD (40 mg/kg) ou cimetidina (100 mg/kg), durante 14 dias. $p < 0,005^*$; $p < 0,001^{***}$ quando comparado ao controle. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. ANOVA one-way seguido do teste de Tukey. Imagens ilustrativas dos estômagos (setas indicaram a área de úlcera): (A) veículo; (B) LIN 40 mg/kg; (C) LIN- β CD 40 mg/kg; (D) cimetidina 100 mg/kg. Barra de escala = 5 mm.

2.4 Discussão

O etanol absoluto promove lesões necróticas de maneira multifatorial na mucosa gástrica, ocorrendo liberação de ânions superóxido e radicais livres que levam a um aumento da peroxidação lipídica resultante do metabolismo do etanol. No modelo de úlcera gástrica induzida por etanol tanto o (-)-Linalol não complexado (LIN), como na forma complexada em β -Ciclodextrina (LIN- β CD) demonstraram uma redução acentuada da área de lesão gástrica, melhorando a resposta farmacológica em doses menores, além de promover aumento da solubilidade e da estabilidade, demonstrando que β -ciclodextrina aumentou consideravelmente o efeito gastroprotetor do (-)-Linalol. As ciclodextrinas (CDs) representam um dos sistemas encapsulantes mais simples para medicamentos, porque eles são altamente solúveis em água, e melhoraram as propriedades físico-químicas e as propriedades biofarmacêuticas, principalmente para os compostos não-polares, tais como a biodisponibilidade e a irritação local de medicamentos (ARIMA et al., 2015). Assim, estas características das CDs tornam estas adequadas para aplicações em abordagens farmacológicas para usos de terpenos, nos modelos avaliados.

Além disso, de acordo com estudos anteriores da eficiência da complexação entre LIN e β -CD no método de co-evaporação é 85-92%, de modo que a dose utilizada neste estudo no complexo LIN/ β -CD (5 mg/ kg), a dose de LIN no complexo é de cerca de 0,05 mg/kg, portanto, dez vezes menor e obtendo um efeito significativamente maior quando comparado com ao LIN não complexado na dose de 5 mg/kg, a melhoria das propriedades farmacológicas do LIN, incluindo a eficácia provavelmente é devido as propriedades descritas para as ciclodextrinas, tais como uma maior biodisponibilidade, a estabilidade química do composto, a proteção contra a oxidação e por reduzir a volatilidade (ARIMA et al. 2015).

Estes dados corroboram com outros estudos com o Linalol incorporado em β -CD, que sugerem que a β -CD pode representar uma ferramenta importante para a melhoria dos perfis analgésico e anti-inflamatório (QUINTANS-JUNIOR et al., 2013) e anti-hiperalgesia em modelos animais de fibromialgia com o aumento da expressão da proteína Fos no controle razoável de áreas de dor, como a substância cinzenta periaquedutal e núcleo magno da rafe (NASCIMENTO et al., 2014). Portanto, justifica-se que a complexação deste monoterpene em complexos de inclusão contendo β -ciclodextrina potencializa o perfil farmacológico do mesmo, assim como foi observado em outros estudos de complexos de inclusão contendo monoterpene e β CD, que demonstraram os benefícios da complexação na resposta farmacológica em modelos experimentais de nocicepção e inflamação (MENESES 2012; SERAFINI et al., 2012; QUINTANS et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2015).

Após a constatação da atividade gastroprotetora do LIN e LIN- β CD em modelos de úlceras induzidas por etanol absoluto, investigou-se os possíveis mecanismos envolvidos nesta ação. Para isso, foram realizados protocolos para avaliar sua atividade antioxidante devido aos radicais livres desempenharem um importante papel na patogênese da úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, pois as mesmas promovem severas mudanças celulares, conduzindo à morte celular.

Compostos sulfidrilas estão significativamente implicados na manutenção da integridade da mucosa gástrica, particularmente quando espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na fisiopatologia do tecido lesado nos modelos de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto ou por isquemia e reperfusão (KIMURA et al., 2001). LIN não foi capaz de alterar os níveis de compostos sulfidrilas, no entanto LIN- β CD foi capaz de aumentar significativamente esses níveis, sugerindo que a incorporação deste monoterpene em β -ciclodextrina melhora o perfil antioxidante deste monoterpene.

Outro parâmetro que envolve a atividade antioxidante é a enzima mieloperoxidase (MPO), que está presente dentro dos lisossomos dos neutrófilos, podendo ser utilizada como índice de infiltração de neutrófilos (KRAWISZ et al., 1984). LIN e LIN- β CD foram capazes de diminuir os níveis de MPO, sugerindo que possivelmente interferiram diretamente na redução da infiltração de neutrófilos. A úlcera gástrica também está intimamente associada com o estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, a peroxidação de lipídios, que pode ser mensurada por marcadores como o malondialdeído (MDA). LIN e LIN- β CD foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica de maneira significativa, sugerindo que estejam agindo como varredores de espécies reativas de oxigênio. Estes dados demonstram que a atividade gastroprotetora deste monoterpene livre e incorporado em β -ciclodextrina possivelmente esteja relacionada com o aumento da atividade antioxidante.

No entanto, a importância do estudo das lesões agudas na espécie humana é pequena comparada ao estudo das lesões crônicas recidivantes. Por conseguinte, é necessário verificar a atividade do LIN e LIN- β CD em um modelo crônico como o de úlceras gástricas induzidas por ácido acético (LAPA et al., 2003). Já foi demonstrado que a aplicação de ácido acético na superfície da serosa de estômagos de ratos, resulta em úlceras muito semelhantes às observadas em humanos em termos de localização, severidade e cronicidade, bem como no que diz respeito ao processo de cicatrização (OKABE; PFEIFFER, 1972).

As úlceras gástricas provocadas por ácido acético são induzidas por alteração de vários fatores incluindo fatores de crescimento, aderência de muco, microcirculação, óxido nítrico,

citocinas, além da produção de prostaglandinas derivadas da enzima ciclo-oxigenase-2 (KOBAYASHI et al., 2001; SHAHIN et al., 2001). Portanto, a cura da úlcera é um processo complexo que envolve a migração e proliferação de células epiteliais e inflamatórias, a síntese e degradação de moléculas da matriz extracelular e componentes de tecido conectivo, além da síntese de fatores de crescimento e citocinas que, juntos fazem da cicatrização um processo bem orquestrado (TARNASWSKI et al., 1995).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o tratamento dos animais por 14 dias com a cimetidina reduziu significativamente a úlcera gástrica induzida por ácido acético. De maneira semelhante, o tratamento com o LIN ou LIN- β CD também protegeram a mucosa gástrica das lesões causadas pelo ácido acético, sendo que LIN- β CD demonstrou efeito gastroprotetor mais potente quando comparado ao LIN não complexado, revelando que a inclusão do monoterpeno em β -ciclodextrina melhora a sua resposta cicatrizante.

Interessantemente, a administração oral do LIN e LIN- β CD nas doses testadas não provocou alterações que demonstrassem sinais de toxicidade nos animais tratados por 14 dias, como morte ou alteração macroscópica no fígado, estômago, coração, pulmão, baço e rins (dados não mostrados).

Os dados fornecem evidências para propor que tanto LIN não complexado, como incorporado em complexos de inclusão contendo β -ciclodextrinas tem uma possível aplicabilidade no tratamento de úlceras gástricas agudas e crônicas. Estes efeitos parecem estar relacionados com um aumento da atividade antioxidante. Assim, LIN- β -CD pode ser uma alternativa interessante para o desenvolvimento biotecnológico de novas opções terapêuticas para o tratamento de úlceras gástricas.

Referências Bibliográficas

Arima H, Hayashi Y, Higashi T, Motoyama K (2015) Recent advances in cyclodextrin delivery techniques. *Expert Opin Drug Deliv* 12:1425–41. doi: 10.1517/17425247.2015.1026893

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al. (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 46:446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106

Batista PA, de Paula Werner MF, Oliveira EC, et al (2010) The Antinociceptive Effect of (-)-Linalool in Models of Chronic Inflammatory and Neuropathic Hypersensitivity in Mice. *J Pain* 11:1222–1229. doi: 10.1016/j.jpain.2010.02.022

Berliocchi L, Russo R, Levato A, et al (2009) (-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in c57/bl6 mice. *Int Rev Neurobiol* 85:221–35. doi: 10.1016/S0074-7742(09)85017-4

Bhargava KP, Gupta MB, Tangri KK (1973) Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *Eur J Pharmacol* 22:191–5.

Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G (1982) Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60:618–22.

Brito RG, Araújo AA, Quintans JS, et al (2015) Enhanced analgesic activity by cyclodextrins - a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Deliv* 12:1677–88. doi: 10.1517/17425247.2015.1046835

Guimarães AG, Oliveira MA, Alves Rdos S, et al. (2015) Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chem Biol Interact* 227:69–76. doi:10.1016/j.cbi.2014.12.020

Kamatou, G.P.P., Viljoen AM (2008) Linalool - A review of a biologically active compound of commercial importance. *Nat Prod Commun* 3:1183–1192.

Kimura M, Goto S, Ihara Y, et al (2001) Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog* 31:29–36. doi: 10.1006/mpat.2001.0446

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87:1344–50.

Li WF, Huang HM, Niu XF, Fang T, Mu QL, Li HN (2013) Protective effect of tetrahydrocoptisine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 272:21–29. doi:10.1016/j.taap.2013.05.035

Loftsson T, Jarho P, Masson M, Jarvinen T (2005) Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv* 2:335–351. doi:10.1517/17425247.2.1.335.

Menezes PP, Serafini MR, Santana B V., et al (2012) Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochim Acta* 548:45–50. doi: 10.1016/j.tca.2012.08.023

Menezes PP, Serafini MR, Quintans-Junior LJ, et al. (2014) Inclusion complex of (-)-linalool and B-cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim* 115:2429–2437. doi:10.1007/s10973-013-3367-x

Mihara M, Uchiyama M (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271–8.

Mota KS de L, Dias GEN, Pinto MEF, et al (2009) Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 14:979–1012. doi: 10.3390/molecules14030979

Nascimento SS, Camargo EA, DeSantana JM, et al (2014) Linalool and linalool complexed in β -cyclodextrin produce anti-hyperalgesic activity and increase Fos protein expression in animal model for fibromyalgia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 387:935–942. doi: 10.1007/s00210-014-1007-z

Okabe S, Pfeiffer CJ (1972) Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. *Am J Dig Dis* 17:619–629. doi: 10.1007/BF02231748

Oliveira MGB, Guimarães AG, Araújo AAS, et al. (2015) Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 25:897–907. doi:10.1517/13543776.2015.1045412

Peana AT, D'Aquila PS, Chessa ML, et al (2003) (–)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur J Pharmacol* 460:37–41. doi: 10.1016/S0014-2999(02)02856-X

Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, et al (2002) Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* 9:721–6. doi: 10.1078/094471102321621322

Peana AT, De Montis MG, Sechi S, et al (2004) Effects of (–)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. *Eur J Pharmacol* 497:279–84. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.06.006

Peana AT, Rubattu P, Piga GG, et al (2006) Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (–)-linalool-induced antinociception. *Life Sci* 78:2471–4. doi: 10.1016/j.lfs.2005.10.025

Potrich FB, Allemand A, da Silva LM, et al (2010) Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. *J Ethnopharmacol* 130:85–92. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.014

Quintans JSS, Menezes PP, Santos MRV, et al. (2013) Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine* 20:436–440. doi:10.1016/j.phymed.2012.12.009

Quintans-Júnior LJ, Barreto RSS, Menezes PP, et al (2013) β -Cyclodextrin-complexed (–)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (–)-linalool in experimental pain protocols. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 113:167–72. doi: 10.1111/bcpt.12087

Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ (1979) Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology* 77:433–443

Sampaio LDFS, Maia JGS, Parijós AM De, et al (2012) Linalool from Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) Oil Inhibits Adenylate Cyclase in the Retina , Contributing to Understanding its Biological Activity. *77:73–77*.

Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192–205.

Serafini MR, Menezes PP, Costa LP, Lima CM, Quintans LJ Jr, Cardoso JC, et al. (2012) Interaction of p-cymene with β -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim*. doi:10.1007/s10973-011-1736-x

Shahin M, Konturek JW, Pohle T, et al (2001) Remodeling of extracellular matrix in gastric ulceration. *Microsc Res Tech* 53:396–408. doi: 10.1002/jemt.1108

Sowndhararajan K, Kang SC (2013) Protective effect of ethyl acetate fraction of *Acacia Ferruginea* DC. against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 148:175–181. doi:10.1016/j.jep.2013.04.007

Tarnawski A, Tanoue K, Santos AM, Sarfeh IJ (1995) Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? *Scand J Gastroenterol Suppl* 210:9–14.

Vonkeman HE, Fernandes RW, Van der Palen J, Van Room EN, Van der Laar MAFJ (2007) Proton-pump inhibitors are associated with a reduced risk for bleeding and perforated gastroduodenal ulcers attributable to non-steroidal anti-inflammatory drugs: a nested case-control study. *Arthritis Res Ther* 9:1–8. doi:10.1186/ar2207

CAPITULO 3

β-CICLODEXTRINA MELHORA A RESPOSTA GASTROPROTETORA E ANTIOXIDANTE DO CARVACROL, UM MONOTERPENO PRESENTE NO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM MODELOS ANIMAIS

Este capítulo corresponde ao artigo submetido ao periódico internacional
Chemico-Biological Interactions (Fator de Impacto 2,618; Qualis A2
Biotecnologia).

**β -CYCLODEXTRIN IMPROVES THE GASTROPROTECTIVE AND
ANTIOXIDANT RESPONSE OF CARVACROL, A MONOTERPENE PRESENT IN
OREGANO ESSENTIAL OIL IN ANIMAL MODELS**

Francilene Vieira da Silva ^a, Irisdalva Sousa Oliveira^a, Hélio Barros Fernandes ^a, Suylane Sobral Sousa^d, Francisca Beatriz de Melo Sousa ^a, Lucindo José Quintans-Júnior ^b, Adriano Antunes de Sousa Araújo^c, Rita de Cássia Meneses Oliveira ^{a,d} *

a Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Ponto Focal - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

b Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

c Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

d Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

* Correspondente:

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira Medicinal Plants Research Center, Federal University of Piauí, Av. Nossa Senhora de Fátima s/n, 64049-550, Teresina, Piauí, Brazil
Phone: +55 86 32155872
E-mail: menesesoliveira@gmail.com

RESUMO

Carvacrol é um monoterpeneo fenólico constituinte do óleo essencial produzido por algumas plantas aromáticas, tais como o cominho preto (*Nigella sativa* L.) e a manjerona (*Origanum majorana* L.). Tem atividades biológicas importantes como anti-inflamatória e antiulcerogênica. No entanto, a sua baixa solubilidade em água, meia-vida curta e elevada volatilidade podem limitar a sua utilização. As ciclodextrinas têm se destacado como uma ferramenta importante para melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas de vários monoterpeneos. O carvacrol incorporado em β -ciclodextrina (CARV- β CD) reduziu significativamente as lesões gástricas induzidas por etanol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg (v.o), mostrando uma gastroprotecção de 54, 82 e 87%, respectivamente, em comparação com os animais tratados com veículo, este efeito foi superior em relação ao carvacrol na forma não-complexada, mostrada em estudos anteriores de nosso grupo. Nas lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão, o índice de lesão foi reduzido em 68% na dose de 12,5 mg/kg (v.o) e em 81% na dose de 25 mg/kg (v.o). Neste modelo, o CARV- β CD mostrou alta redução da área de lesão gástrica e resposta efetiva em doses menores, quando comparado ao seu resultado na forma não-complexada. Este efeito parece estar relacionado com a redução de 70% da atividade da mieloperoxidase por CARV- β CD (25 mg / kg), um aumento de 55% na atividade da catalase, uma redução de 31% na peroxidação oxidativa, quando comparado com o veículo, sugerindo uma melhora na atividade antioxidante em relação ao carvacrol não complexado. Na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na melhora da resposta gastroprotetora pelo complexo (CARV- β CD), os animais foram submetidos à indução de lesão gástrica por etanol após pré-tratamento com L-NOARG ou glibenclamida, revelando a participação do óxido nítrico e dos canais de potássio sensíveis a ATP, respectivamente. Deste modo, o CARV- β CD aumenta a atividade gastroprotetora em relação ao carvacrol na forma não complexada, potencializando sua atividade antioxidante e os seus fatores citoprotetores, o que o torna nesta forma, agente terapêutico considerável para o tratamento de úlceras gástricas.

Palavras-chave: Carvacrol, β -ciclodextrina, atividade antiulcerogênica, antioxidante

3.1 Introdução

As úlceras gástricas são prevalentes em todo o mundo, e estão sendo consideradas um problema de saúde global [1], que atinge cerca de 5 a 10 % da população mundial [2]. Essas lesões podem surgir quando ocorre sobreposição de agentes agressores frente à uma mucosa íntegra ou quando os mecanismos de defesa da mucosa tornam-se deficientes [3].

A terapia antiúlcera consiste em drogas supressoras do ácido gástrico, principalmente, os antagonistas dos receptores tipo 2 da histamina e inibidores da bomba de prótons [4]. No entanto, nos casos de úlceras ocasionadas por infecção por *Helicobacter Pylori*, é necessário utilizar uma abordagem que consiste em antibióticos e inibidores da secreção gástrica [5].

Recentemente, vários estudos têm focado em novas abordagens para melhorar a resistência da mucosa gástrica à lesão. Uma variedade de compostos químicos, ervas, extratos de plantas e seus metabólitos secundários, como os monoterpenos, têm provado possuir propriedades terapêuticas em modelos experimentais de úlcera gástrica. O efeito gastroprotetor destes compostos ou extratos tem sido atribuído a sua ação anti-secretora, citoprotetora, anti-inflamatória e antioxidante [6,7].

O carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol/ $C_{10}H_{14}O$, MM = 150,217 g/mol), um monoterpeno presente nos óleos essenciais produzidos pelas plantas aromáticas da família Lamiaceae [8], tem vários efeitos biológicos descritos, por exemplo, anti-inflamatório e antinociceptivo [9], anti-câncer [10,11], gastroprotetor [12], antimicrobiano [13]. Além disso, este monoterpeno é geralmente considerado seguro para o consumo e é aprovado pela Food and Drug Administration para uso alimentar como um “GRAS” (geralmente reconhecido como seguro). Algumas das aplicações diretas de carvacrol na indústria de alimentos estão em refrigerantes e goma de mascar [14,15].

Entretanto, uma das grandes dificuldades tecnológicas em relação aos monoterpenos como o carvacrol, é a sua preservação durante o processamento e a estocagem, devido à sensibilidade ao calor e à oxidação, além de serem altamente voláteis. Entre as várias estratégias empregadas para prolongar a estabilidade dos monoterpenos, modelar a cinética de liberação e melhorar a absorção, destaca-se a microencapsulação, caracterizada por encapsular sólidos ou líquidos dentro de matrizes ou sistemas reservatórios poliméricos, formando complexos de inclusão [16,17].

Ciclodextrinas (CDs) são uma família de compostos feitos de moléculas de açúcar ligadas em conjunto por um anel cíclico que promove melhorias na solubilidade e na biodisponibilidade de compostos polares, como os terpenos [17,18]. A presença de grupos hidroxilas primários e secundários sobre a parte exterior das CDs aumentam a solubilidade em água destes compostos e os complexos hospede-hospedeiro correspondentes [19,20].

A capacidade das ciclodextrinas melhorarem as propriedades farmacológicas dos compostos apolares tais como os monoterpenos, tem sido descritas por estudos que destacam um aumento da biodisponibilidade dos compostos ativos, mesmo em doses mais baixas do que quando o composto é administrado na forma não complexada [21,22,23,24,25].

Até o presente momento não existem dados na literatura sobre a atividade gastroprotetora em modelos de úlceras gástricas do carvacrol associado com β -ciclodextrina em roedores. Além disso, nosso estudo foi desenhado para investigar se o carvacrol incorporado em β -ciclodextrina (CARV- β CD) poderia melhorar as respostas na atividade gastroprotetora, bem como elucidar os possíveis mecanismos envolvidos, quando comparado ao estudo anterior deste monoterpene na forma não complexada, também realizado pelo nosso grupo de pesquisa [12].

3.2 Metodologia

Neste estudo foi utilizado o monoterpene carvacrol complexado em β -ciclodextrina, fornecido pelo Professor Dr. Lucindo José Quintans–Junior, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. A Preparação e caracterização físico-química do complexo de carvacrol/ β -ciclodextrina (CARV- β CD) foi realizada de acordo com estudos anteriores [16].

3.2.1 Animais

Foram mantidos camundongos swiss (25-30 g) e ratos Wistar (180-220 g) fêmeas, sob condições controladas (24 ± 1 ° C, ciclo escuro/luz de 12 horas), com alimento e água *ad libitum*. Eles foram mantidos em jejum durante 18 h e depois aclimatizados ao ambiente de teste 2 h antes de cada experiência. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos diferentes. No modelo de lesões gástricas induzidas pelo ácido acético e por isquemia e reperfusão, os animais foram anestesiados com cetamina e cloreto de xilazina (50 e 5 mg/kg, i.p., respectivamente). Após procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil (CEEA-PI número 096/14).

3.2.3 Úlcera Gástrica induzida por etanol absoluto em Camundongos

As lesões gástricas agudas foram induzidas em camundongos por via oral (0,2 mL/animal) de etanol absoluto [26]. Veículo (NaCl 0.9%, 10 mL/kg), CARV- β CD (12,5; 25 e 50 mg/kg), carbenoxolona (100 mg/kg) ou ciclodextrina (50 mg/kg). Foram administrados

oralmente 1 hora antes da aplicação do agente ulcerogênico. Os animais foram eutanaziados 30 minutos após a administração do etanol e os estômagos foram removidos e abertos ao longo da curvatura maior. A área de lesões gástricas foi medida usando o ImageJ-NIH®. A área da lesão foi calculada como se segue: Área da lesão (em porcentagem) área da lesão (em milímetros quadrados) \times 100 / área total (em milímetros quadrados) [27].

3.2.4 Úlcera Gástrica induzida por Isquemia e Reperfusão em ratos

Ratos wistar (n =5 animais/grupo) foram tratados por via oral com o veículo, N-acetilcisteína (NAC 200 mg/kg) ou CARV- β CD (6,25; 12,5 e 25 mg/kg). Depois de 30 minutos os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (50 mg/kg e 5,0 mg/kg, i.m., respectivamente). Os animais foram submetidos a 30 minutos de isquemia induzida pela oclusão da artéria celiaca por um “clamp” microvascular e seguido por uma reperfusão de 1 hora [28]. A seguir, os animais foram eutanasiados, seus estômagos foram removidos, abertos ao longo da curvatura maior e a área de lesões gástricas foi medido por planimetria como descrito anteriormente.

3.2.5 Atividade Antioxidante do Complexo (Carv-Bcd)

Para esses protocolos foi utilizada como parâmetro a melhor dose (25 mg/kg) do carvacrol na forma não complexada (CARV) administrada oralmente, com atividade gastroprotetora significativa nos modelos de lesão gástrica por etanol e por isquemia/reperfusão, objetivando avaliar a melhora do perfil gastroprotetor do mesmo quando incorporado em β -ciclodextrina.

Os estômagos removidos dos animais veículo e tratados com CARV- β CD (25 mg/kg), submetidos a lesão gástrica no protocolo de etanol foram usadas para analisar os seguintes parâmetros: atividade da mieloperoxidase [29]; análise do envolvimento dos grupos sulfidrílicos não proteicos [30]; análise do malondialdeído[31], atividade da catalase [32].

3.2.6 Determinação do conteúdo de Muco na parede Gástrica

Segmentos glandulares dos estômagos retirados de ratos submetidos à ligadura do piloro (veículo, CARV- β CD 25 mg/kg e carbenoxolona 100 mg/kg, via intraduodenal) (n = 5 animais/grupo) foram pesados e transferidos para 7 mL de solução de Alcian blue 0,1%

(acetato de sódio/HCl 0,05 M, pH 5,8 em solução aquosa de sacarose 0,16 M) e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. O corante foi retirado através de duas lavagens sucessivas de 15 e 45 minutos em solução aquosa de sacarose 0,25 M. O corante aderido ao muco da parede gástrica foi extraído por imersão em 5 mL de 0,5 M de cloreto de magnésio por 2 horas com 1 minuto de agitação a cada 30 minutos. Em seguida, uma amostra de 4 mL do extrato azul foi agitada vigorosamente com volume igual de éter etílico e a emulsão resultante foi centrifugada a 3.000 rpm/10 minutos. A fase aquosa foi separada e a absorvância de cada amostra foi lida a 598 nm em um espectrofotômetro visível. A quantidade de mucina foi expressa em μg do Alcian blue extraído por peso (g) de tecido glandular do estômago [33].

3.2.7 Avaliação do papel do Óxido Nítrico (NO), canais de Potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Para estudar os possíveis mecanismos de ação, foram utilizados camundongos Swiss (n =5 animais/grupo). Os experimentos foram realizados utilizando-se CARV- β CD (25 mg/kg) e as seguintes ferramentas farmacológicas: L-NOARG, um inibidor da atividade da NO-sintase (70 mg/kg, i.p.) [34], glibenclamida, um bloqueador dos canais K_{ATP} (5 mg/kg, i.p.) [35]. Veículo, L-NOARG ou glibenclamida foram administrados 30 min antes da administração de veículo, CARV- β CD (25 mg/kg, v.o.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou diazóxido (3 mg/kg, i.p.). Após 1 h dos tratamentos, todos os animais receberam etanol absoluto (0,2 mL) para a indução das lesões. 30 minutos depois, os animais foram eutanasiados, os estômagos foram removidos para exame como já descrito anteriormente.

3.2.8 Análise Estatística

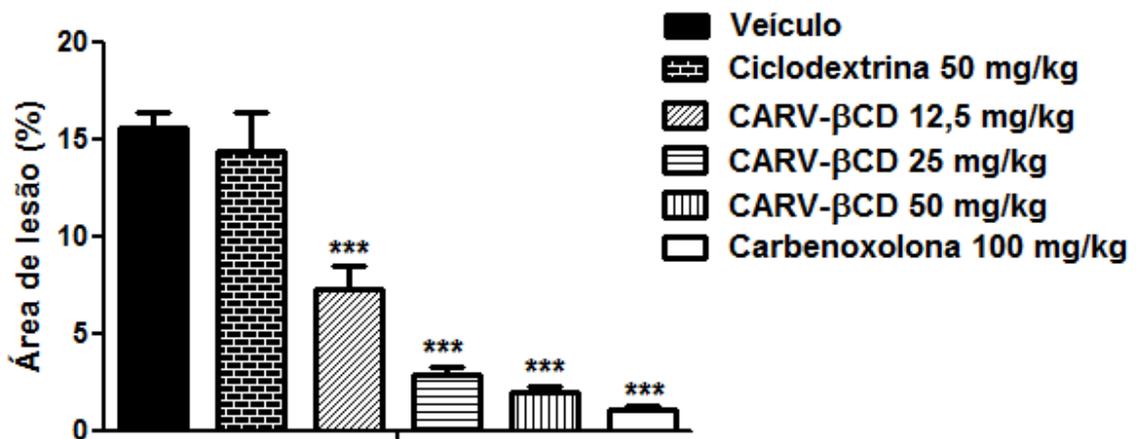
Os resultados estão expressos como média \pm SEM. A significância estatística para as diferenças entre os grupos foi calculada por análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism™ 5.0 (San Diego, CA,USA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

3.3 Resultados

3.3.1 Efeito do Carv-βcd sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto

A administração oral do etanol ao grupo veículo produziu extensas lesões na forma de erosões hemorrágicas na porção glandular da mucosa gástrica ($15,58 \pm 0,8\%$), bem como no grupo que recebeu ciclodextrina na dose de 50 mg/kg ($14,38 \pm 2,0\%$). CARV-βCD apresentou efeito gastroprotetor significativo nas doses de 12,5 ($7,32 \pm 1,1\%$), 25 ($2,9 \pm 0,4\%$) e 50 ($2,06 \pm 0,2\%$) mg/kg, mostrando uma gastroproteção de 54, 82 e 87%, respectivamente, em relação aos animais tratados com veículo ($***p < 0,001$). Os animais que receberam carbenoxolona (100 mg/kg) tiveram a área de lesão reduzida para $1,14 \pm 0,1\%$ (inibição de 93%, $***p < 0,001$).

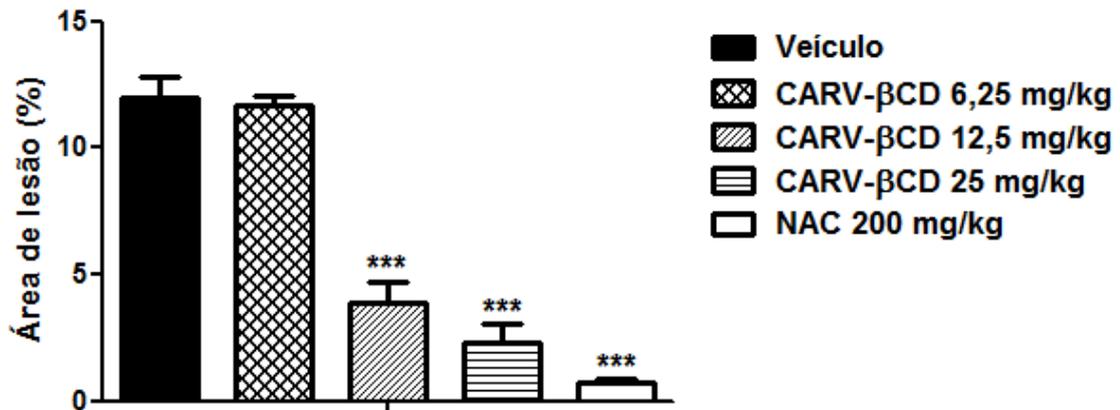
Figura 6: Efeito do CARV-βCD (12,5; 25 e 50 mg/kg), ciclodextrina (50 mg/kg) e da carbenoxolona (100 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., $***p < 0,001$, comparados ao grupo veículo (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey).



3.3.2 Efeito do carv-βCD sobre lesões gástricas induzidas por Isquemia e Reperfusão

CARV-βCD inibiu o aparecimento de lesões gástricas no modelo de isquemia induzida por oclusão da artéria celíaca, seguida por reperfusão nas doses de 12,5 mg/kg (v.o) ($3,86 \pm 0,8\%$; $***p < 0,001$) em 68%, na dose de 25 mg/kg foi capaz de reduzir em 81% ($23 \pm 0,7\%$; $**p < 0,01$), quando comparado com o grupo veículo ($11,83 \pm 0,6\%$). Os animais tratados com N-acetilcisteína (NAC, v.o) na dose de 200 mg/kg, apresentaram um índice de lesão significativamente menor que o grupo veículo, com a inibição de 94% ($0,7 \pm 0,1\%$; $***p < 0,001$).

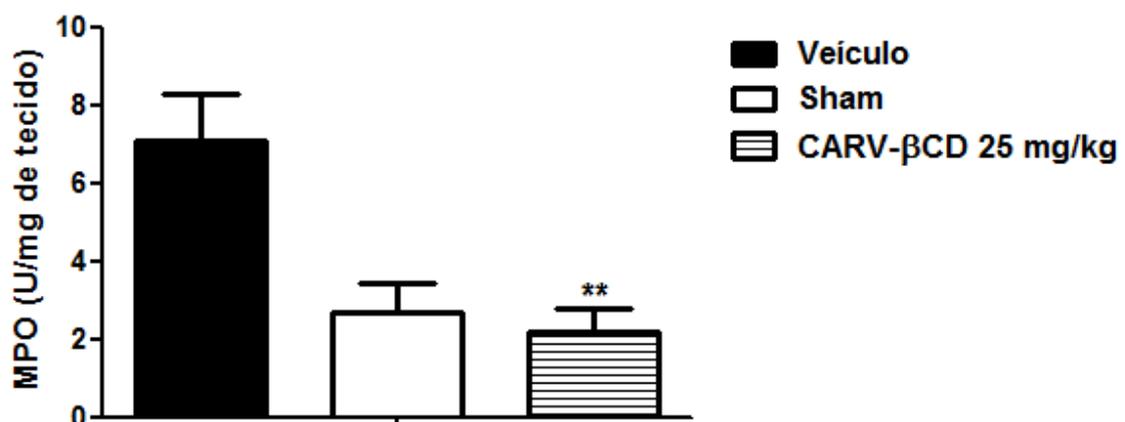
Figura 7: Efeito do CARV- β CD (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) ou NAC (200 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por isquemia seguida de reperusão em ratos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparados ao grupo veículo (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey).



3.3.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no efeito gastroprotetor do Carv- β CD no modelo de Úlcera induzida por etanol absoluto.

A atividade da MPO nos estômagos ulcerados dos animais pré-tratados apenas com veículo ($7,13 \pm 1,2$ U/mg de tecido, ^{##} $p < 0,01$) foi significamente maior quando comparado ao grupo não ulcerado ($2,7 \pm 0,7$ U/mg de tecido). Nos estômagos dos animais pré-tratados CARV- β CD ($2,1 \pm 0,5$ U/mg de tecido, ** $p < 0,01$) na dose de 25 mg/kg (v.o) a atividade da MPO foi reduzida quando comparada ao controle ulcerado.

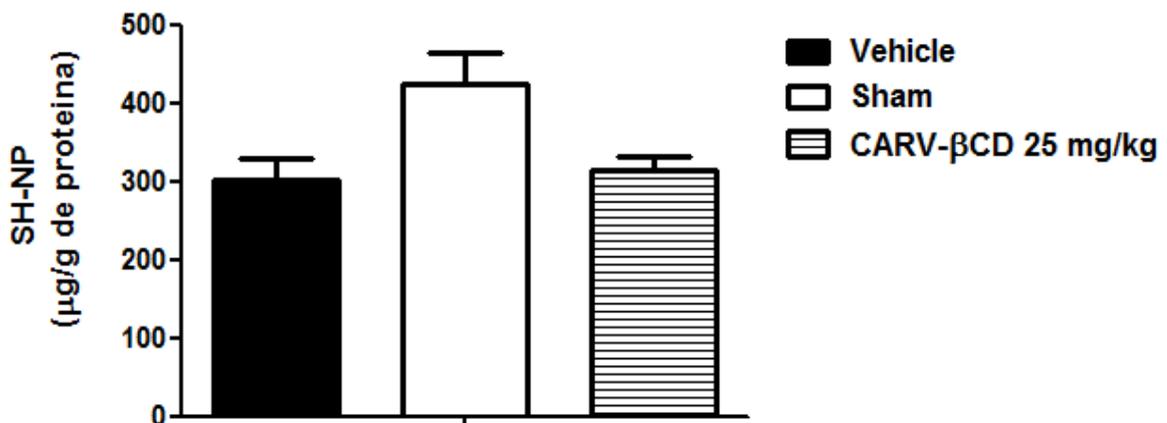
Figura 8: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) na atividade da mieloperoxidase (MPO) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., ** $p < 0,01$, comparados ao grupo veículo, (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey).



3.3.4 Participação dos Grupos Sulfidrílicos Não- Proteicos (SH-NP) no efeito Gastroprotetor do Carv-βCD no modelo de Úlcera Induzida por etanol absoluto.

A administração de etanol reduziu o conteúdo gástrico dos grupos sulfidrílicos não proteicos (SH- NP) nos animais pré-tratados com veículo ($302,86 \pm 27 \mu\text{g/g}$ proteína; $^{##}p<0,05$) quando comparado ao grupo controle não ulcerado ($425,56 \pm 38 \mu\text{g/g}$ proteína). O pré-tratamento dos animais com CARV-βCD (25 mg/kg, v.o) não alterou o conteúdo gástrico de SH- NP ($315,16 \pm 18 \mu\text{g/g}$ proteína) quando comparado ao grupo que recebeu apenas veículo antes da indução de úlcera por etanol.

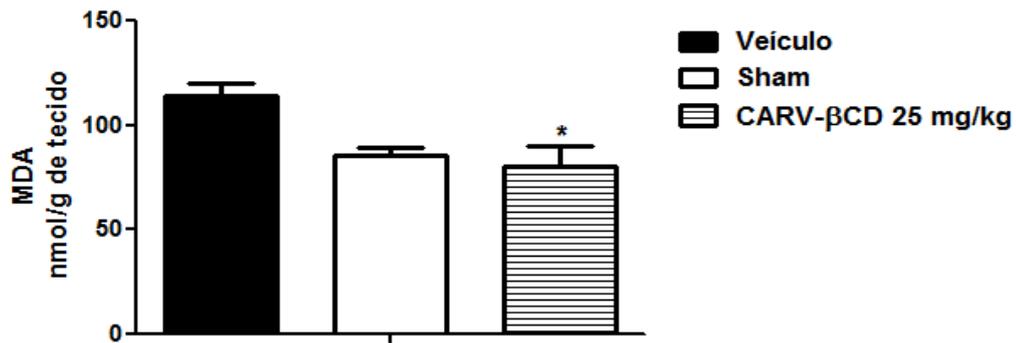
Figura 9: Efeito do CARV-βCD (25 mg/kg) no conteúdo gástrico de SH-NP no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey).



3.3.5 Envolvimento da Peroxidação Lipídica no efeito Gastroprotetor do Carv-βCD no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

A peroxidação lipídica nos estômagos ulcerados dos animais pré-tratados apenas com veículo ($114,4 \pm 6 \text{ nmol/g}$ de tecido, $^{#}p<0,05$) foi maior quando comparado ao grupo não ulcerado (Sham) $85,6 \pm 3 \text{ nmol/g}$ de tecido. CARV-βCD (25 mg/kg, v.o) foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica em $80,2 \pm 9 \text{ nmol/g}$ de tecido ($^{*}p<0,05$).

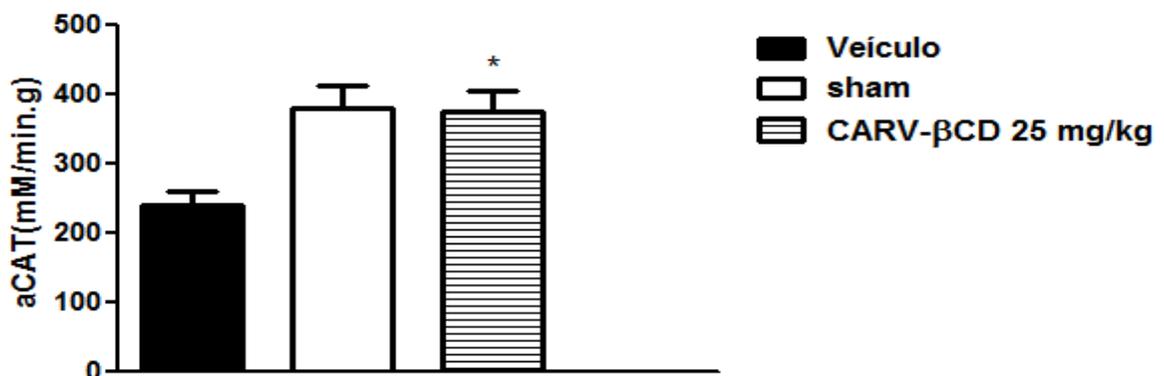
Figura 10: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) no envolvimento da peroxidação lipídica no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$, comparados ao grupo veículo (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey).



3.3.6 Participação da Enzima Catalase no Efeito Gastroprotetor do Carv- β cd no Modelo de Úlcera Induzida por etanol absoluto.

A atividade da catalase (CAT) no estômago dos ratos foi $379,31 \pm 31$ mM/min.g (Sham) e após a administração de etanol, foi reduzida em (57%, # $p < 0,05$) para $240,06 \pm 18$ (mM/min.g) no grupo controle. Após o tratamento prévio com CARV- β CD na dose de 25 mg/kg (v.o), a atividade da catalase aumentou significativamente para $374,12 \pm 30,8$ mM/min.g (55%, * $p < 0,05$), respectivamente, comparados ao grupo veículo.

Figura 11: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) sobre a atividade da catalase no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle, (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

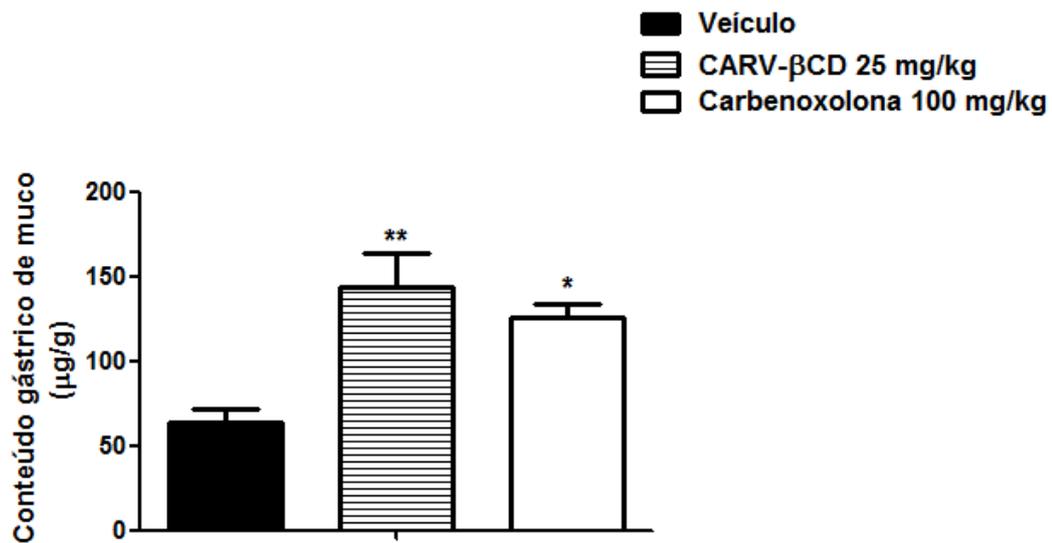


3.3.7 Efeito do Carv- β CD sobre a produção de Muco Gástrico

O gráfico demonstra o efeito do CARV- β CD na dose de 25 mg/kg (v.o) sobre as mudanças nas quantidades de muco da parede gástrica em quatro horas de ligadura do piloro

em ratos. A administração intraduodenal do CARV- β CD na dose de 25 mg/kg provocou um aumento significativo 100 % ($126,52 \pm 24 \mu\text{g/g}$, $**p < 0,01$) na quantidade de muco gástrico quando comparado ao veículo ($63,26 \pm 7 \mu\text{g/g}$). A carbenoxolona aumentou a porcentagem de muco gástrico em 98% ($125,4 \pm 8 \mu\text{g/g}$, $*p < 0,05$).

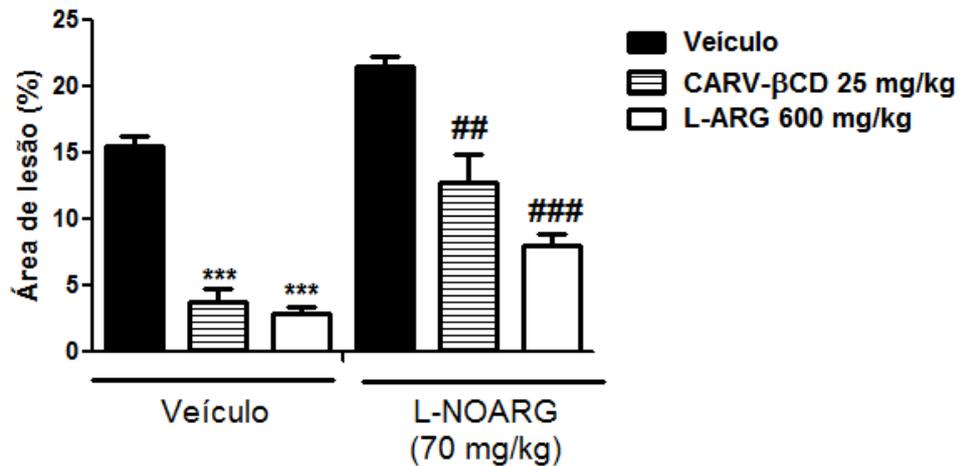
Figura 12: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) e da carbenoxolona (100 mg/kg) sobre a secreção de muco gástrico em ratos submetidos ao modelo de ligadura do piloro. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ comparados ao grupo veículo (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey).



3.3.8 Participação do Óxido Nítrico (NO) e dos canais de Potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor do Carv- β CD no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

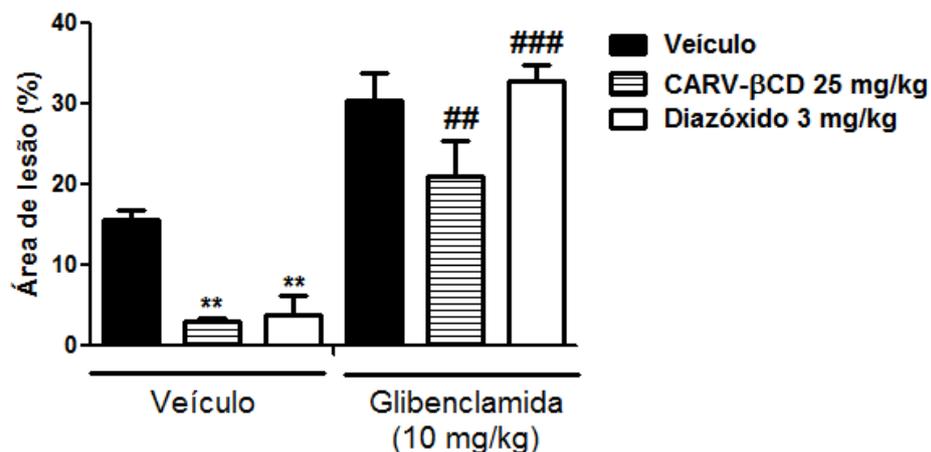
No grupo veículo, o etanol absoluto produziu lesões gástricas ($15,58 \pm 0,8\%$) que foram reduzidas significativamente nos grupos de animais tratados com o CARV- β CD (25 mg/kg, v.o) e a L-arginina (L-ARG, 600 mg/kg, i.p), para $2,9 \pm 0,4\%$ e $2,9 \pm 0,3\%$, respectivamente. O pré-tratamento com L-NOARG (70 mg/kg, i.p) foi capaz de reverter parcialmente a gastroproteção promovida pelo CARV- β CD e pela L-ARG para $12,78 \pm 2,1\%$ e $7,9 \pm 0,8\%$, quando comparados com o grupo L-NOARG + veículo ($21,55 \pm 0,7\%$) (Figura 8).

Figure 13: Efeito do CARV- β CD na dose de 25 mg/kg e da L-arginina (600 mg/kg) após pré-tratamento com L-NOARG (70 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., *** p <0,001, comparados ao grupo veículo + veículo; ## p <0,01, ### p <0,001 comparados ao grupo L-NOARG + veículo (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey).



Os grupos previamente tratados com CARV- β CD (25 mg/kg, v.o.) ou diazóxido (3 mg/kg, i.p), mostraram uma redução significativa na área de lesão gástrica ($2,9 \pm 0,4\%$ e $3,8 \pm 2,3\%$, respectivamente) após a indução de úlcera por etanol, quando comparados ao veículo ($15,58 \pm 0,8\%$). Nos grupos pré-tratados com glibenclamida (10 mg/kg, i.p), o efeito gastroprotetor do CARV- β CD e do diazóxido foi revertido ($21 \pm 4,3\%$ e $32,8 \pm 2\%$, respectivamente) quando comparado ao grupo glibenclamida + veículo ($30,4 \pm 3,4\%$) (Figura 9).

Figure 14: Efeito do CARV- β CD (25 mg/kg) ou do diazóxido (3 mg/kg) após pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., *** p <0,001, comparados ao grupo veículo + veículo; ## p <0,01, ### p <0,001 comparados ao grupo glibenclamida + veículo (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey).



3.4 Discussão

Carvacrol, assim como outros monoterpenos, exibe baixa solubilidade em água, alta volatilidade e curta meia vida plasmática [21]. Estudos demonstraram que o encapsulamento de compostos bioativos de plantas, tais como os monoterpenos, promove o aumento da estabilidade, solubilidade em meio aquoso, e também melhora a atividade farmacológica [36, 37, 38]. Nosso estudo demonstra que a complexação do carvacrol com β -Ciclodextrina (CARV- β CD) foi capaz de melhorar a resposta gastroprotetora frente a modelos de úlceras agudas, possivelmente por potencializar seus fatores antioxidantes e citoprotetores (muco, óxido nítrico e canais K_{ATP}).

Úlcera gástrica é uma doença crônica que afeta muitas pessoas no mundo todo [39], embora a etiologia exata da doença seja desconhecida, um desequilíbrio entre fatores defensivos e agressivos na mucosa resulta em úlcera gástrica [3,40]. Apesar da baixa mortalidade associada a esta doença, a qualidade de vida dos doentes é bastante afetada, implicando em elevados custos diretos ou indiretos [41].

Existem muitos modelos experimentais diferentes de indução de úlcera gástrica, incluindo etanol, isquemia/reperfusão e ácido acético [42], além de outros. Usando tais modelos animais, os investigadores conseguem simular as condições a que os humanos podem ser expostos e, como resultado, o desenvolvimento de úlceras gástricas. O etanol é conhecido como um agente causador de danos gástricos, alterando fatores de proteção, incluindo a diminuição da produção de muco e circulação de sangue dentro da mucosa [43, 44]. Além disso, o dano gástrico causado pelo etanol pode ser devido à geração de espécies reativas do oxigênio (EROs), diminuição da proliferação celular, e uma exacerbada resposta inflamatória [45].

O complexo CARV- β CD promoveu redução significativa das lesões gástricas no modelo de úlcera induzida por etanol (76%), contribuindo para a manutenção da integridade da mucosa gástrica. Com base nos resultados de OLIVEIRA (2012) podemos verificar que este efeito gastroprotetor do carvacrol incorporado em β -ciclodextrina é superior em relação ao mesmo na forma não complexada (43%), sugerindo que possivelmente sua incorporação em β -ciclodextrina melhore sua atividade gastroprotetora frente às lesões induzidas por etanol, sendo que esse efeito pode ser devido ao fato de que os complexos de β -CD solúveis em água aumentam a sua difusão para a superfície da mucosa do trato gastrointestinal, levando a uma maior biodisponibilidade oral [46] e por esses complexos aumentarem a solubilidade, a dissolução e taxas de entrega, resultam na ampliação da intensidade ou duração da atividade

terapêutica [47, 48]. Esses dados corroboram com o estudo da eficiência da complexação do carvacrol com β -ciclodextrina (CARV- β CD) pelos métodos de eficiência de aprisionamento, docagem molecular, Karl Fischer e análise de titulação, que mostraram claramente a formação de um complexo supramolecular entre o carvacrol e a β -CD, em que a molécula hóspede, carvacrol, foi retida no interior da sua cavidade [49].

Assim, é também fortemente sugerido que a complexação do carvacrol com β -CD contenha cerca de 10% do princípio ativo (na razão molar 1:1) [50]. Portanto, na dose utilizada em nosso estudo do complexo CARV- β CD (25 mg/kg), a real dose do CARV no complexo é cerca de 2,5 mg/kg, portanto, dez vezes menor, com um resultado significativamente superior quando comparado com o CARV não complexado na dose de 25 mg/kg.

Estes dados corroboram com outros estudos que também já relataram que a inclusão em complexos de β -ciclodextrina melhora diversas atividades do carvacrol, como por exemplo, inibe o crescimento bacteriano em concentrações mais baixas em comparação com o carvacrol não complexado, melhorando sua atividade antimicrobiana [50]. O carvacrol complexado em β -CD (CARV- β CD) tem apresentado aumento da atividade biológica quando comparado ao carvacrol não complexado (CARV) em modelos de inflamação e de dor oncológica, aumentando a eficácia farmacológica e produzindo efeitos mais duradouros [16], também reduziu a resposta nociceptiva durante as duas fases do teste de formalina em modelos de dor orofacial, enquanto carvacrol não complexado não produziu a mesma redução na fase inicial do teste [24]. Essas evidências sugerem que a encapsulação do carvacrol em β -ciclodextrina pode ser útil para o desenvolvimento de novas opções farmacológicas.

Outro modelo de indução de úlcera aguda é por isquemia e reperfusão, onde a liberação de EROs é relatada como um evento patológico central e a utilização de compostos antioxidantes e sequestradores de radicais livres, têm se mostrado benéfica em animais expostos a este modelo [51]. A isquemia, por si só, é capaz de provocar lesões no tecido gástrico; entretanto, é após a reperfusão que ocorrem os principais eventos lesivos, após a reoxigenização da mucosa gástrica as lesões são aumentadas em cerca de três vezes em relação àquelas ocasionadas pelo período de isquemia [52].

Os resultados demonstraram danos em grande parte da porção glandular dos estômagos dos animais após isquemia e reperfusão, o que foi efetivamente reduzido com a administração de CARV- β CD. A atividade gastroprotetora nesse modelo pode indicar atividade antioxidante ou sequestradora de EROs já que a lesão, no modelo de isquemia e reperfusão, é derivada da liberação de radicais livres. O CARV- β CD demonstrou redução da

área de lesão de úlcera gástrica induzida por isquemia/reperfusão e respostas em doses menores (12,5 mg/kg) quando comparado ao seu resultado na forma não complexada, como demonstrados no trabalho de Oliveira (2012). Essa melhora na resposta evidenciada pode ser em decorrência das CDs serem capazes de formar complexos de inclusão com moléculas insolúveis em água, tais como o carvacrol, melhorando sua solubilidade, como já demonstrado em diversos estudos [53, 54, 55].

Sabe-se que tanto o modelo de úlcera induzida por etanol, quanto o modelo de isquemia/reperfusão estão diretamente ligados à liberação de espécies reativas de oxigênio, que causam danos oxidativos em componentes celulares essenciais resultando em lesão tecidual [56]. Além disso, a atividade anti-úlcera dos monoterpênicos pode ser atribuída a vários mecanismos, tais como o sequestro de radicais livres, a inibição da secreção de ácido, a atividade contra a bactéria *Helicobacter pylori* e o fortalecimento da barreira da mucosa gástrica [57]. Baseado nessas premissas, buscou-se avaliar também a ação do CARV- β CD em diferentes sistemas antioxidantes e na produção de muco da mucosa gástrica, bem como avaliar os mediadores endógenos envolvidos na melhora da resposta gastroprotetora pela investigação do envolvimento do óxido nítrico (NO) e dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}).

A atividade da mieloperoxidase (MPO) é considerada um biomarcador para a infiltração de neutrófilos no tecido [58], esta infiltração é relatada como um dos processos envolvidos na geração de úlceras gástricas [59]. Observou-se um aumento na atividade da MPO no estômago de ratos expostos à indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, nas condições experimentais desse trabalho. Nos animais tratados com CARV- β CD esse aumento foi evitado, o que indica menor infiltração de neutrófilos para o tecido, conseqüentemente, menor liberação de radicais livres e substâncias lesivas no tecido, o que contribui para a melhora no perfil gastroprotetor, demonstrada para este monoterpênic associado ao complexo de inclusão.

Outro fato observado no modelo de indução de úlceras induzidas por etanol é o decréscimo na quantidade de grupos sulfidrilas não proteicos (SH-NP), este decréscimo pode estar ligado à sua oxidação por metabólitos tóxicos do etanol ou por sua ligação ao acetaldeído, sintetizado pela enzima álcool desidrogenase ou, ainda, por uma diminuição na síntese de glutathiona [60], assim a redução dos níveis de SH-NP torna o tecido mais suscetível a lesões.

Diante disto, o presente estudo avaliou o papel dos grupos sulfidrilas não proteicos na proteção gástrica promovida pelo complexo CARV- β CD no modelo de úlcera gástrica

induzida por etanol. A administração do etanol reduziu os níveis de SH-NP, enquanto o CARV- β CD não foi capaz de conservar esses níveis normais frente às lesões gástricas induzidas por etanol, demonstrando que as medidas de proteção do complexo CARV- β CD não envolvem o aumento destes grupos, diferentemente do carvacrol não complexado [12], este resultado sugere que possivelmente a incorporação do carvacrol em β -ciclodextrina possa ter mudado sua ação sobre os grupos sulfidrilas não proteicos. Isso pode ser devido as CDs formarem complexos com as moléculas e isto conseqüentemente altere a sua química, física ou comportamento biológico [61].

Nesse sentido, os SH-NP têm importância na redução do estresse oxidativo por eliminar radicais livres, reduzir os peróxidos e formar complexos com compostos eletrofílicos, de maneira a proteger estruturas celulares protéicas, além de proteger a célula de outros produtos tóxicos. A peroxidação de lípidos no tecido gástrico desempenha um papel significativo na patogênese de lesões gástricas induzidas por etanol [62, 64].

O principal produto da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), sendo um marcador estável da peroxidação de lípidos da membrana. Podendo ser quantificado, este é suficientemente estável para se difundir do seu sítio de formação (ex. membranas) para outro sítio (ex. núcleo), podendo causar danos ao DNA [63]. No ensaio de peroxidação lipídica em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, é verificado que CARV- β CD é capaz de inibir a peroxidação lipídica por diminuir os níveis do MDA na ausência do sistema antioxidante em 50%. Verificou-se, portanto que CARV- β CD atua como um antioxidante, pois é capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por etanol absoluto.

A catalase está localizada principalmente nos peroxissomos, onde catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, tendo a função também de detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois, pela redução do peróxido de hidrogênio [64]. Neste estudo foi observado que houve redução na atividade da catalase após a lesão com etanol absoluto no grupo veículo, sendo que nos animais tratados com CARV- β CD houve um aumento da atividade dessa enzima, restabelecendo-a aos níveis semelhantes ao grupo Sham, assim pode-se sugerir que a atividade da catalase provavelmente está envolvida na atividade antioxidante deste monoterpene incorporado em β -ciclodextrina.

O epitélio do estômago é coberto por uma camada de muco, que contém glicoproteínas e apresenta um importante papel na proteção da mucosa gástrica [65]. Além de ser uma barreira à ação lesiva do ácido luminal, o muco apresenta atividade antioxidante [66]. O tratamento com etanol provoca redução no muco aderido ao epitélio do estômago [67], o que intensifica o processo lesivo. No modelo de indução de úlcera gástrica por ligadura de piloro,

observou-se um aumento da camada de muco no estômago de ratos pré-tratados com CARV- β CD, sendo este resultado significativamente maior quando comparado aos resultados já observados pelo nosso grupo com o CARV na forma não complexada, estando entre seus mecanismos de gastroproteção, minimizando as lesões epiteliais.

Um dos componentes responsáveis por aumentar a secreção de muco no epitélio gástrico e por contribuir na manutenção da integridade do epitélio gástrico é o óxido nítrico (NO) [68, 69], inibindo a adesão de leucócitos e a agregação de neutrófilos no endotélio. Além disso, o NO é um vasodilatador e medeia o fluxo de sangue na mucosa gástrica [70]. Nos animais submetidos ao modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto com ou sem pré-tratamento com L-NOARG, um inibidor não específico da atividade da óxido nítrico sintetase (NOS), observou-se que no grupo pré-tratado com L-NOARG e após com CARV- β CD, houve um aumento no percentual de lesões, diminuindo a gastroproteção promovida anteriormente por CARV- β CD, sugerindo que a melhora na resposta gastroprotetora provavelmente também seja mediado pela via da sintase do óxido nítrico.

O NO pode aumentar o fluxo sanguíneo através da abertura dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) [71]. O envolvimento dos canais K_{ATP} na proteção gástrica já foi descrito em estudos anteriores [72,73]. Para investigar o envolvimento dos canais K_{ATP} na melhora da resposta gastroprotetora por CARV- β CD, utilizou-se a glibenclamida, uma fármaco capaz de bloquear os canais K_{ATP} . As lesões gástricas foram induzidas por etanol absoluto em camundongos pré-tratados ou não com a glibenclamida. A gastroproteção de CARV- β CD e diazóxido (3mg/kg) em úlcera gástrica induzida por etanol foi reduzida após os canais K_{ATP} serem bloqueados com glibenclamida, mostrando o possível envolvimento dos canais K_{ATP} no mecanismo da melhora no perfil protetor da mucosa gástrica por CARV- β CD. Por conseguinte, os resultados também indicam o envolvimento do NO na melhora da atividade gastroprotetora induzida por CARV- β CD quando comparado com o CARV na forma não complexada, o que está provavelmente relacionado com a abertura dos canais K_{ATP} que conduzem a um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa.

O melhoramento das propriedades farmacológicas do CARV nos modelos de lesões agudas, na produção de muco, bem como aumento na atividade antioxidante, se deu devido a uma melhora na eficácia, e isto provavelmente ocorreu devido às propriedades amplamente descritas para as ciclodextrinas, tais como melhorar a biodisponibilidade, estabilidade química do composto, proteção contra oxidação e redução da volatilidade[74], além de aumentar a sua vida útil e reduzir as concentrações da molécula incorporada necessária para alcançar o efeito biológico, como já demonstrado em outros trabalhos [75, 76].

O carvacrol incorporado em β -ciclodextrina (CARV- β CD) apresenta significativo efeito gastroprotetor frente a lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, isquemia/reperfusão e atividade antioxidante superior quando comparado aos seus resultados na gastroproteção na forma não complexada. O CARV- β CD atua localmente aumentando a secreção de muco e potencializando o sistema antioxidante através da diminuição dos níveis de MDA e da atividade da mieloperoxidase, e por aumentar defesas antioxidantes endógenas como a catalase. Essa melhora se mostrou dependente do NO e dos canais de K_{ATP} , sugerindo que sua incorporação em complexos de inclusão contendo β -ciclodextrina pode ser uma alternativa interessante para o desenvolvimento biotecnológico de novas opções terapêuticas para o tratamento de úlceras gástricas.

Referências Bibliográficas

- [1] K. Thorsen, J.A. Soreide, J.T. Kvaloy, T. Glomsaker, K. Soreide, Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality, *World J. Gastroenterol.* 19 (2013) 347–354, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i3.347>
- [2] S. Sumbul, M.A. Ahmad, A. Mohd, Role of phenolic compounds in peptic ulcer: an overview, *J. Pharm. Bioall. Sci.* 3 (2011) 361–367, <http://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.84437>
- [3] L. Laine, K. Takeuchi, A. Tarnawski, Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside, *Gastroenterol.* 135 (2008) 41–60, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.030>
- [4] E. Sheen, G. Triadafilopoulos, Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. *Dig. Dis. Sci.* 56 (2011) 931–950., <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-010-1560-3>
- [5] P. Malfertheiner, F.K.L. Chan, K.E.L. McColl, Peptic ulcer disease, *The Lancet* 374 (2009) 1449–1461, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60938-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60938-7).
- [6] W.F. Li, H.M. Huang, X.F. Niu, T. Fang, Q.L. Mu, H.N. Li, Protective effect of tetrahydrocoptisine against ethanol-induced gastric ulcer in mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272 (2013) 21–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.035>
- [7] B. Adzu, S.O. Balogun, E. Pavan, S.D. Ascêncio, I.M. Soares, R.W. Aguiar, R.V. Ribeiro, Â.M. Beserra, R.G. de Oliveira, L.I. da Silva, A.S. Damazo, D.T. Martins, Evaluation of the safety, gastroprotective activity and mechanism of action of standardised leaves infusion extract of *Copaifera malmei* Harms., *J. Ethnopharmacol.* 175 (2015) 378–389, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.027>.

- [8] K.H. Baser, Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils, *Curr. Pharm. Des.* 14 (2008) 3106-3119, <http://dx.doi.org/10.2174/138161208786404227>
- [9] F.V. Silva, A.G. Guimaraes, E.R.S. Silva, B.P. Sousa-Neto, F.D.F. Machado, L. J. Quintans-Junior, D.D.R. Arcanjo, F.A. Oliveira, R.C.M. Oliveira, Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of Oregano, *J. Med. Food* 15 (2012) 984–991, <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2012.0102>.
- [10] S. Karkabounas, O.K. Kostoula, T. Daskalou, P. Veltsistas, M. Karamouzis, I. Zelovitis, A. Metsios, P. Lekkas, A.M. Evangelou, N. Kotsis, I. Skoufos, Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol, *Exp. Oncol.* 28 (2006) 121-125.
- [11] J. Subramaniyan, G. Krishnan, R. Balan, D. Mgi, E. Ramasamy, S. Ramalingam, R. Veerabathiran, P. Thandavamoorthy, G.K. Mani, D. Thiruvengadam, Carvacrol modulates instability of xenobiotic metabolizing enzymes and downregulates the expressions of PCNA, MMP-2, and MMP-9 during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats, *Mol. Cell. Biochem.* 395 (2014) 65-76, <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-014-2112-5>.
- [12] I. S. Oliveira, F.V. Silva, A.F.S.C. Viana, M.R.V. Santos, L.J. Quintans-Júnior, M.C.C. Martins, P.H.M. Nunes, F.A. Oliveira, R.C.M. Oliveira, Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 385 (2012) 899–908, <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0771-x>.
- [13] A.A. Ben, S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gontard, P. Chalier, Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *Lett. Appl. Microbiol.* 43 (2006) 149-154, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>.
- [14] A. Ultee, E.P. Kets, E.J. Smid, Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4606-4610.
- [15] C.L. Del Toro-Sanchez, J.F. Ayala-Zavala, L. Machi, H. Santacruz, M.A. Villegas-Ochoa, E. Alvarez-Parrilha, G.A. Gonzales-Aguilas, Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from b-cyclodextrin capsules, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 67 (2010) 431-441, <http://dx.doi.org/10.1007/s10847-009-9726-3>.
- [16] A.G. Guimarães, M.A. Oliveira, R.S. Alves, P.P. Menezes, M.R. Serafini, A.A.S. Araújo, D.P. Bezerra, L.J. Quintans-Júnior, Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with b-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols, *Chem. Biol. Interact.* 227 (2015) 69-76, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.020>.
- [17] P.S. Lima, A.M. Lucchese, H.G. Araújo-Filho, P.P. Menezes, A.A. Araújo, L.J. Quintans-Júnior, J.S. Quintans, Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches, *Carbohydr. Polym.* 151 (2016) 965-987, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.040>.

- [18] M.G. Oliveira, A.G. Guimarães, A.A.S. Araújo, J. S. Quintans, M. R. Santos, L. J. Quintans-Júnior, Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review, *Expert. Opin. Ther. Pat.* 25 (2015) 897–907, <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2015.1045412>.
- [19] C.S. Mangolim, C. Moriwaki, A.C. Nogueira, F. Sato, M.L. Baesso, A.M. Neto, G. Matioli, Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application, *Food Chem.* 15 (2014) 361-370, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.067>
- [20] P.P. Menezes, M.R. Serafini, L.J. Quintans-Júnior, G.F. Silva, J.F. Oliveira, F.M.S. Carvalho, J.C.C. Souza, J.R. Matos, P.B. Alves, I.L. Matos, D.I. Hadaruga, A.A.S. Araújo, Inclusion complex of (-)-linalool and β -cyclodextrin, *J. Therm. Anal. Calorim.* 115 (2014) 2429-2437, <http://dx.doi.org/10.1007/s10973-013-3367-x>.
- [21] L.J. Quintans-Júnior, R.S. Barreto, P.P. Menezes, J.R. Almeida, A.F. Viana, R.C. Oliveira, A.P. Oliveira, D.P. Gelain, W. de Lucca Júnior, A.A. Araújo, β -Cyclodextrin complexed (-)-linalool produces antinociceptive and anti-inflammatory effects superior to those of (-)-linalool in experimental protocols, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 113 (2013) 167-172, <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12087>.
- [22] R.G. Brito, A.A.S. Araújo, J.S.S. Quintans, K.A. Sluka, L.J. Quintans-Júnior, Enhanced analgesic activity by cyclodextrins—a systematic review and meta-analysis, *Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 1677-1688, <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2015.1046835>.
- [23] P.P. Menezes, P.B.P. Santos, G.A.A. Doria, B.M.H. Sousa, M.R. Serafini, P.S. Nunes, L.J. Quintans-Júnior, I.L. Matos, P.B. Alves, D.P. Bezerra, F.J.B. Mendonça Júnior, G.F. Silva, T.M. Aquino, E.S. Bento, M.T. Scotti, L. Scotti; A.A.S. Araujo, Molecular modeling and physicochemical properties of supramolecular complexes of limonene with α - and β -cyclodextrins, *AAPS PharmSciTech.* (2016) 1-9, <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-016-0516-0>.
- [24] J.C. Silva, J.R.G.S. Almeida, J.S.S. Quintans, R.G. Gopalsamy, S. Shanmugam, M.R. Serafini, M.R.C. Oliveira, B.A.F. Silva, A.O.B.P.B. Martins, F.F. Castro, I.R.A. Menezes, H.D.M. Coutinho, R.C.M. Oliveira, P. Thangaraj, A.A.S. Araújo, L.J. Quintans-Júnior, Enhancement of orofacial antinociceptive effect of carvacrol, a monoterpene present in oregano and thyme oils, by β -cyclodextrin inclusion complex in mice, *Biomed. Pharmacother.* 84 (2016) 454-461, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.065>.
- [25] F.V. Silva, H.B. Fernandes, I.S. Oliveira, A.F.S.C. Viana, D.S. Costa, M.T.P. Lopes, K.L. Lira, L.J. Quintans-Júnior, A.A. Sousa, R.C.M. Oliveira, Beta-cyclodextrin enhanced gastroprotective effect of (-)-linalool, a monoterpene present in rosewood essential oil, in gastric lesion models, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 389 (2016) 1245-1251, <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-016-1298-3>.
- [26] A. Robert, J.E. Nezamis, C. Lancaster, A. J. Hanchar, Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury, *Gastroenterol* 77 (1979) 433-443.

- [27] K.P. Bhargava, M.B. Gupta, K.K. Tangri, Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone, *Eur. J. Pharmacol.* 22 (1973) 191-195, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(73\)90012-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(73)90012-5).
- [28] S. Ueda, Y. Okada, Acid secretagogues induce Ca^{++} mobilization coupled to K^{+} conductance activation in rat parietal cells in tissue culture, *Biochim. Biophys. Acta* 1012 (1989) 254-260, [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4889\(89\)90105-5](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4889(89)90105-5).
- [29] P.P. Bradley, R.D. Christensen, G. Rothstein, Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation, *Blood*. 60 (1982) 618-622.
- [30] J. Sedlak, R.H. Lindsay, Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Anal. Biochem.* 25 (1968) 1192-1205, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).
- [31] M. Mihara, M. Uchiyama, Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Anal. Biochem.* 86 (1978) 271-278, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1).
- [32] R.F. Beers, I.W. Sizer, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.* 95 (1952) 133-140.
- [33] S.J. Corne, S.M. Morrisey, R.J. Woods, A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucous, *J. Physiol.* 242 (1974) 116-117.
- [34] V. Gürbüz, I. Alican, Berrak; C. Yegen, A. Bozkurt. B. Oktar, G. Haklar, M. Yüksel, H. Kurtel, Role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric mucosal dysfunction in the rat, *Exp. Physiol.* 84 n.2 (1999) 319-332.
- [35] B.M. Peskar, K. Ehrlich, B.A. Peskar, Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat, *J. Pharm. Exp. Ther.* 301 (2002) 969-974, <https://doi.org/10.1124/jpet.301.3.969>.
- [36] J.S.S. Quintans, P.P. Menezes, M.R.V. Santos, L.R. Bonjardim, J.R.G.S. Almeida, D.P. Gelain, A.A.S. Araújo, L.J. Quintans-Júnior, Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin, *Phytomedicine* 20 (2013) 436-440, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.009>
- [37] P.S. Siqueira-Lima, A.A. Araújo, A.M. Lucchese, J.S. Quintans, P.P. Menezes, P.B. Alves, W. Lucca Júnior, M. R. Santos, L. R. Bonjardim, L. J. Quintans-Júnior, β -Cyclodextrin complex containing *Lippia grata* leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice—evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 114 (2014) 188-196, <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12145>
- [38] E. Pinho, M. Grootveld, G. Soares, M. Henriques, Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds, *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 121-135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.078>.

- [39] N. Kangwan, J.M. Park, E.H. Kim, K.B. Hahm, Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression, *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 5 (2014) 40-47, <http://dx.doi.org/10.4291/wjgp.v5.i1.40>.
- [40] L.C.Jr. Klein, R.B. Gandolfi, J.R. Santin, M. Lemos, V. Cechinel Filho, S.F. de Andrade, Anti-ulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 381 (2010) 121-126, <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-009-0485-x>.
- [41] A.P. Martins, P. Ascensão, C.P. Ceia, M.L. Silva, P. Ferreira, I.M. Falcão, B. Madureira, J. Cabrita, A.S. Guerreiro, Regimes terapêuticos para a úlcera péptica e erradicação de *Helicobacter pylori* nos utentes da Rede Médicos-Sentinela, *Ver. Port. Clin. Geral*, 21 (2005) 431-444.
- [42] E. Shaker, H. Mahmoud, S. Mnaa, Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of the extract from *Alhagi maurorum* (camelthorn), *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2785-2790, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.007>.
- [43] R.P. Ineu, M.E. Pereira, M. Aschner, C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: involvement of oxidative stress, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 3023-3029, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.007>.
- [44] E. Choi, H. Hwang, I. Kim, T. Nam, Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 134-139, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00011-9>.
- [45] G.P. Amaral, N.R. Carvalho, R.P. Barcelos, F. Dobrachinski, R.L. Portella, M.H. Silva, T.H. Lugokenski, G.R.M. Dias, S.C.A. Luz, A.A. Boligon, M.L. Athayde, M.A. Villetti, F.A.A. Soares, R. Fachineto, Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats, *Food Chem. Toxicol.* 55 (2013) 48-55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.038>.
- [46] T. Loftsson, P. Jarho, M. Masson, T. Jarvinen, Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv*, 2 (2005) 335-351, <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2.1.335>
- [47] H.M.C. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, *Flavour Frag. J.* 25 (2010) 313-326, <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2019>
- [48] S.V. Kurkov, T. Loftsson, Cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 167-180, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>.
- [49] P.P. Menezes, M.R. Serafini, Y.M.B.G. Carvalho, D.V.S. Santana, B.S. Lima, L.J. Quintans-Júnior, R.N. Marreto, T.M. Aquino, A.R. Sabino, L. Scotti, M.T. Scotti, S. Grangeiro-Júnior, A.A.S. Araújo, Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of β -cyclodextrin containing carvacrol, *J. Mol. Struct.* 1125 (2016) 323-330, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.06.062>.

[50] E.H. Santos, J.A. Kamimura, L.E. Hill, C.L. Gomes, Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications, *LWT - Food Sci. Technol.* 60 (2015) 583-592, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.046>

[51] N. Derin, A. Agac, Z. Bayram, M. Asar, V. N. Izgut-Uysal, Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach, *Cell Biochem. Funct.* 24 (2006) 437-442, <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1251>.

[52] M. Kitano, M. Bernsand, Y. Kishimoto, P. Norlen, R. Hakanson, Y. Haenuki, M. Kudo, J. Hasegawa, Ischemia of rat stomach mobilizes ECL cell histamine, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288 (2005)1084-1090, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00004.2004>.

[53] H.J. Buschmann, E. Schollmeyer, Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review, *J. Cosm. Sci.* 53 (2002)185–191.

[54] T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm* 329 (2007) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>.

[55] M. Singh, R. Sharma, U.C. Banerjee, Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 341–359, [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00020-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00020-4).

[56] S.A. El-Maraghy, S.M. Rizk, N.N. Shahin, Gastroprotective effect of crocin in ethanol-induced gastric injury in rats, *Chem. Biol. Interact.* 229 (2015) 26-35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.015>.

[57] F.A. Oliveira, L.N. Andrade, E.B.V. Sousa, D.P. Sousa, Anti-Ulcer Activity of Essential Oil Constituents, *Molecules* 19 (2014) 5717-5747, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19055717>.

[58] M. Baseri, R. Heidari, B. Mahaki, Y. Hajizadeh, A. Momenizadeh, M. Sadeghi, Myeloperoxidase levels predicts angiographic severity of coronary artery disease in patients with chronic stable angina, *Adv. Biomed. Res.* 25 (2014) 3:139, <http://dx.doi.org/10.4103/2277-9175.135155>.

[59] Y. Bayir, F. Odabasoglu, A. Cakir, A. Aslan, H. Svleyman, M. Halici, C. Kazaz, The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid, *Phytomedicine* 13 (2006) 584-590, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2005.07.002>.

[60] D. Bilici, H. Suleyman, Z.N. Banoglu, A. Kiziltunc, B. Avci, A. Ciftcioglu, S. Bilici, Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect, *Dig. Dis. Sci.* 47 (2002) 856-861.

- [61] A. Rasheed, C.K. Ashok Kumar, V.V.N.S.S. Sravanthi, Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review, *Sci. Pharm.* 76 (2008) 567-598, <http://dx.doi.org/10.3797/scipharm.0808-05>.
- [62] A. Kaharaman, N. Erkasap, T. Köken, M. Serteser, F. Aktepe, S. Erkasap, The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions, *Toxicology* 183 (2003) 133–142.
- [63] J. STYSKAL, H.V. REMMEN, A. RICHARDSON, A.B. SALMON, Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models?, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 46-58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.441>.
- [64] H.N. Kirkman, M. Rolfo, A.M. Ferraris, G.F. Gaetani, Mechanisms of protection of catalase by NADPH, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 13908-13914, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.20.13908>
- [65] J. Mojzis, R. Hegedusova, L. Mirossay, Role of mucus in ischemia/reperfusion induced gastric mucosal injury in rats, *Physiol. Res.* 49 n. 4 (2000) 441-446.
- [66] M.G. Repetto, S.F. Llesuy, Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 523-534, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2002000500003>.
- [67] J.H. Lee, S.J. Lee, Y.H. Choi, K.T. Chung, Y.K. Jeong, B.T. Choi, Effects of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol-induced gastric ulcer in rats, *Phytother. Res.* 20 (2006) 396-402, <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1868>.
- [68] A.S. Tarnawski, A. Ahluwalia, M.K. Jones, The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 4–15, <http://dx.doi.org/10.2174/092986712803414079>.
- [69] F.E.B. Júnior, D.R. De Oliveira, A.A. Boligon, M.L. Athayde, J.P. Kamdem, G.E. Macedo, G.F. Da Silva, I.R.A. De Menezes, J.G.M. Costa, H.D.M. Coutinho, M.R. Kerntopf, T. Posser, Protective effects of *Croton campestris* A.St-Hill in different ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. *J. Ethnopharmacol.* 153 (2014) 469–477, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.005>.
- [70] A.L. Rozza, C.A. Hiruma-Lima, R.K. Takahira, C.R. Padovani, C.H. Pellizzon, Effect of menthol in experimentally induced ulcers: pathways of gastroprotection. *Chem. Biol. Interact.* 206 (2013) 272–278, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.10.003>.
- [71] E.M. MURPHY, J.E. BRAYDEN, Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels, *J. Physiol.* 486 (1995) 47–58, <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020789>.

[72] E.R.V. Rios, N.F.M. Rocha, E.T. Venâncio, B.A. Moura, M.L. Feitosa, G.S. Cerqueira, P.M.G. Soares, D.J. Woods, F.C.S. De Sousa, L.K.A.M. Leal, M.M.F. Fonteles, Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice, *Chem. Biol. Interact.* 188(1) (2010.) 246-54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.020>.

[73] A.R.S. Ribeiro, P.B.F. Diniz, M.S. Pinheiro, R.L.R. Albuquerque-Júnior, S.M. Thomazzi, Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K(+) channels, and gastric mucus secretion, *Chem. Biol. Interact.* 244 (2016) 121-128, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.004>.

[74] H. Arima, Y. Hayashi, T. Higashi, K. Motoyama, Recent advances in cyclodextrin delivery techniques, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 1425–41, <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2015.1026893>.

[75] M. E. Carlotti, S. Sapino, E. Ugazio, G. Caron, On the complexation of quercetin with methyl- β -cyclodextrin: Photostability and antioxidant studies, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 70 (2010) 81–90, <http://dx.doi.org/10.1007/s10847-010-9864-7>.

[76] Z. Fang, B. Bhandari, Encapsulation of polyphenols – A review, *Trends Food Sci. Tech.* 21 (2010) 510–523, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>.

CAPITULO 4

PATENTE: Este capítulo corresponde a patente desenvolvida pela Universidade Federal do Piauí em parceria com a Universidade Federal de Sergipe, em fase de finalização para submissão ao INPI

**“FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO TERPENOS PARA
APLICAÇÃO EM FERIDAS”**

Depositante(s): Universidade Federal do Piauí (UFPI) / Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Inventor(es): Francilene Vieira da Silva; Irisdalva Sousa Oliveira; Ana Karina Marques Fortes Lustosa; Rita de Cássia Meneses Oliveira; Lucindo José Quintans-Júnior; Priscila Laíse dos Santos

“FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO TERPENOS PARA APLICAÇÃO EM FERIDAS”

REIVINDICAÇÕES

1. “USO DO CARVACROL (5-ISOPROPIL-2-METIL-FENOL) EM FORMULAÇÃO TÓPICA E APLICAÇÃO PREFERENCIALMENTE EM FERIDAS CIRÚRGICAS”, **caracterizados** por ser composto como carvacrol puro, derivado ou em mistura com potente atividade cicatrizante
2. “USO DO CARVACROL (5-ISOPROPIL-2-METIL-FENOL) EM FORMULAÇÃO TÓPICA E APLICAÇÃO PREFERENCIALMENTE EM FERIDAS CIRÚRGICAS”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de apresentarem atividade cicatrizante e com constituintes ativos padronizados nas formulações de uso tópico e sem registro de toxicidade aparente.
2. “USO DO CARVACROL (5-ISOPROPIL-2-METIL-FENOL) EM FORMULAÇÃO TÓPICA E APLICAÇÃO PREFERENCIALMENTE EM FERIDAS CIRÚRGICAS”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** pelo fato de que administração na forma de creme, gel, gel-creme, dentre outras formas de suspensões e emulsões.
4. “USO DO CARVACROL (5-ISOPROPIL-2-METIL-FENOL) EM FORMULAÇÃO TÓPICA E APLICAÇÃO PREFERENCIALMENTE EM FERIDAS CIRÚRGICAS”, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizados** pelo fato de apresentarem potente ação anti-inflamatória preferencialmente quando administrado por via tópica.
5. “USO DO CARVACROL (5-ISOPROPIL-2-METIL-FENOL) EM FORMULAÇÃO TÓPICA E APLICAÇÃO PREFERENCIALMENTE EM FERIDAS CIRÚRGICAS”, de acordo com a reivindicação 1 e 2, em formas semi-sólidas, como creme, loções, pomadas, pastas, géis e outras preparações.
6. “USO DO CARVACROL (5-ISOPROPIL-2-METIL-FENOL) EM FORMULAÇÃO TÓPICA E APLICAÇÃO PREFERENCIALMENTE EM FERIDAS CIRÚRGICAS”, de acordo com a reivindicação 1 e 2, em formas sólidas, como pós, granulados, cápsulas, comprimidos, tabletes, comprimidos revestidos e drágeas, e formas de liberação controlada.

7. “USO DO CARVACROL (5-ISOPROPIL-2-METIL-FENOL) EM FORMULAÇÃO TÓPICA E APLICAÇÃO PREFERENCIALMENTE EM FERIDAS CIRÚRGICAS”, de acordo com a reivindicação 1 e 2, em formas estéreis, como injetáveis, colírios e outras preparações.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- ✓ (-)-linalol complexado em β -ciclodextrina possui efeito gastroprotetor em modelos clássicos de lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto e isquemia/reperfusão superior em relação à forma não complexada;
- ✓ (-)-linalol complexado em β -ciclodextrina possui ação antioxidante superior ao linalol na forma não complexada por potencializar sua ação sobre os grupamentos sulfidrílicos não proteicos, diminuir os níveis de MPO e MDA de forma superior ao mesmo na forma livre
- ✓ O carvacrol incorporado em β -ciclodextrina possui efeito gastroprotetor em modelos clássicos de lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto e isquemia/reperfusão superior em relação à forma não complexada;
- ✓ O carvacrol incorporado em β -ciclodextrina atua localmente aumentando a secreção de muco e potencializando o sistema antioxidante através da diminuição dos níveis de MDA e da atividade da mieloperoxidase, e por aumentar as defesas antioxidantes endógenas como a catalase. A participação do óxido nítrico e dos canais de potássio sensíveis ao ATP estão entre os prováveis mecanismos envolvidos neste efeito gastroprotetor.
- ✓ Tanto o carvacrol quanto o (-)-linalol incorporado em β -ciclodextrina parecem atuar na aceleração do processo de reparo e cicatrização celular, no modelo crônico de lesões gástricas induzidas por ácido acético, de forma superior à sua forma não complexada
- ✓ A formulação tópica à base de carvacrol a 5% mostrou boa estabilidade, bem como reduziu significativamente a área da ferida cirúrgica induzida em ratos.
- ✓ A incorporação de carvacrol e do (-)-linalol em complexos de inclusão contendo β -ciclodextrina pode ser uma alternativa interessante para o desenvolvimento biotecnológico de novas opções terapêuticas para o tratamento de úlceras gástricas.

6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados na tese: Investigação do potencial farmacológico dos monoterpênos carvacrol e (-)-linalol livres ou complexados e o desenvolvimento de formulação tópica para aplicações farmacêuticas, apresenta-se as seguintes perspectivas:

- ✓ Investigar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pelo efeito gastroprotetor do (-)-linalol na forma livre e complexada, avaliando o envolvimento da participação de prostaglandinas, óxido nítrico, canais de potássio dependentes de ATP e do envolvimento da bomba H⁺/K⁺-ATPase;
- ✓ Investigar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pelo efeito gastroprotetor do complexo β-ciclodextrina do carvacrol avaliando o envolvimento da participação de prostaglandinas e do envolvimento da bomba H⁺/K⁺-ATPase;
- ✓ Avaliar o efeito do complexo β-ciclodextrina do carvacrol e (-)-linalol na forma livre e complexada sobre o volume, o pH e a concentração ácida do suco gástrico em modelo de ligadura de piloro.
- ✓ Análise do tecido gástrico através de cortes histológicos, verificando se o (-)-linalol na forma livre e complexada e o complexo β-ciclodextrina do carvacrol também é capaz de reduzir as lesões nas microestruturas das células gástricas.
- ✓ Averiguar o efeito do complexo β-ciclodextrina do carvacrol no reparo e cicatrização de úlceras gástricas em modelos de migração e proliferação celular.
- ✓ Desenvolver uma formulação tópica com o complexo β-ciclodextrina do carvacrol ou do (-)-linalol na forma livre e complexada;
- ✓ Avaliar o efeito da formulação tópica que apresentar melhor estabilidade, no reparo e cicatrização de feridas cirúrgicas.

ANEXOS

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol
DOI 10.1007/s00210-016-1298-3



BRIEF COMMUNICATION

Beta-cyclodextrin enhanced gastroprotective effect of (–)-linalool, a monoterpene present in rosewood essential oil, in gastric lesion models

Francilene Vieira da Silva¹ · Hêlio de Barros Fernandes¹ · Irisdalva Sousa Oliveira¹ · Ana Flávia Seraine Custódio Viana² · Douglas Soares da Costa¹ · Miriam Teresa Paz Lopes³ · Kamila Lopes de Lira⁴ · Lucindo José Quintans-Júnior⁵ · Adriano Antunes de Sousa⁶ · Rita de Cássia Meneses Oliveira^{1,4}

Received: 12 May 2016 / Accepted: 2 September 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract (–)-Linalool is a monoterpene constituent of many essential oils. This particular monoterpene has both anti-inflammatory and antimicrobial activity. Moreover, this compound has been shown to be antinociceptive. However, the poor chemical stability and short half-life prevents the clinical application of (–)-linalool and many other essential oils. Important to the topic of this study, β -cyclodextrin (β -CD) has been used to increase the solubility, stability, and pharmacological effects of numerous lipophilic compounds in vivo. In this study, the gastroprotective activities of (–)-linalool (LIN) and linalool incorporated into inclusion complex containing β -cyclodextrin (LIN- β CD) were evaluated using models of acute and chronic gastric ulcers in rodents. LIN and LIN- β CD showed strong gastroprotective activity ($p < 0.001$). The LIN- β CD complex revealed that the gastroprotective effect was significantly improved compared

with LIN uncomplexed, suggesting that this improvement is related to increased solubility and stability. Taking together the potentiation of the antioxidant profile of this monoterpene, our results suggest that β -CD may represent an important tool for improved gastroprotective activity of (–)-linalool and other water-insoluble compounds.

Keywords Linalool · β -cyclodextrin · Gastric damage · Ethanol · Acetic acid

Introduction

Gastric ulcers are configured as mucosal lesions in the stomach resulting from an imbalance between aggressive and defensive factors in the digestive tract (Li et al. 2013). The incidence of gastric ulcer is increased due to stress, smoking, alcohol, *Helicobacter pylori* infection, and anti-inflammatory intake of non-steroidal drugs (Vonkeman et al. 2007; Sowndhararajan and Kang 2013). Gastric ulcer therapy faces a great disadvantage because most of the currently commercially available drugs show limited effectiveness against gastric disorders and are often associated with serious side effects (Mota et al. 2009). Natural products, under the molecular point of view, are quite diversified representing new possibilities for research and discovery of biological activities favorable to the treatment and prevention of this disease.

(–)-Linalool (LIN) is one of the enantiomers of linalool monoterpene, constituent of various essential oils obtained from the plant species *Aniba roseodora* Ducke (Sampaio et al. 2012) *Piper crassinervium* Kunth., *Croton cajucara* Benth., *Hyssopus officinalis* L., among others (Bakkali et al. 2008). It has shown several promising pharmacological

✉ Rita de Cássia Meneses Oliveira
menesesoliveira@gmail.com

¹ Postgraduate Program in Biotechnology – RENORBIO, Focal Point - Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

² Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

³ Laboratory of Tumoral Cell, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴ Medicinal Plants Research Center, Health Sciences Center, Federal University of Piauí, Av. Nossa Senhora de Fátima s/n, Teresina, Piauí 64049-550, Brazil

⁵ Department of Physiology, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil

⁶ Department of Pharmacia, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil

activities such as a modulator of central nervous system, antinociceptive and anti-inflammatory activities in animal models (Peana et al. 2002, 2003), as well as the capacity to reduce allodynia in neuropathic pain models (Berliocchi et al. 2009). Additionally, it showed antinociceptive activity and glutamatergic modulation mediated by central mechanisms, with the involvement of opioid systems, dopaminergic and cholinergic (Batista et al. 2010; Berliocchi et al. 2009; Peana et al. 2004, 2006).

This monoterpene is extremely important for the cosmetic and food industries, as it is used as a fixative for fragrance (Bakkali et al. 2008). It was approved by the Food and Drug Administration (FDA) as "GRAS" (generally recognized as safe), substances used as spices and food additives. Additionally, an acute toxicity study showed that pretreatment with the (–)-linalool (LIN) at doses up to 375 mg/kg for 5 days produced no toxic effects in rats (Kamatou and Viljoen 2008).

In spite of the benefits above, LIN, as well as monoterpenes, generally exhibits low solubility in water, high volatility and short half-life in the plasma (Quintans-Júnior et al. 2013). Thus, the incorporation of cyclodextrins (CDs), especially β -CD, has emerged as an important tool to improve the physicochemical and biological properties of several monoterpenes (Brito et al. 2015; Oliveira et al. 2015).

Up to the present date, there have been no studies on the possible gastroprotective effect of LIN or its complex with β -CD (LIN- β CD) on experimental models of acute or chronic ulcers in rodents. Thus, this study aimed to evaluate the potential of this monoterpene in uncomplexed and complexed forms, as well as the possible mechanisms involved in the effects evidenced.

Materials and methods

In this study, we used the monoterpene (–)-linalool uncomplexed or the inclusion complex of β -cyclodextrin, supplied by Professor Dr. Lucindo José Quintans-Júnior from the Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Sergipe. Preparation of the (–)-linalool/ β -CD complex was carried in accordance with a previous study (Menezes et al. 2014).

Animals

Female Swiss mice (25–30 g) and Wistar rats (180–220 g) were kept under controlled conditions (24 ± 1 °C, 12-h dark/light cycle), with food and water ad libitum. They fasted for 18 h and then were acclimatized to the test environment for 2 h prior to each experiment. The animals were randomly assigned to different groups. In the model of gastric lesions induced by acetic acid, animals were anesthetized with ketamine and xylazine hydrochloride (50 and 5 mg/kg, i.m.,

respectively). After experimental procedures, animals were euthanized by means of sodium thiopental (100 mg/kg, i.p.). All experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Research at the Federal University of Piauí, Teresina, Brazil (CEEA-PI number 096/14).

Absolute ethanol-induced gastric ulcer in mice

Acute gastric lesions were induced in mice ($n = 5$ animals/group) by oral route (0.2 mL/animal) of absolute ethanol (Robert et al. 1979). Vehicle (NaCl 0.9 %, 10 mL/kg), LIN or LIN- β CD (5; 10; 20 or 40 mg/kg) or carbenoxolone (100 mg/kg) were administered orally 1 h before application of the ulcerogenic agent. Animals were euthanized 30 min after ethanol administration and stomachs were removed and opened along the greater curvature. The area of gastric lesions was measured using Image J software-NIH® and was calculated as follows: lesion area (%) = lesion area (in square millimeters) \times 100/total area (in square millimeters), as described by Bhargava et al. (1973).

Antioxidant activity

For those protocols, the lowest dose of the (–)-linalool not complexed and with significant gastroprotective activity was used. The dose underwent ethanol-induced gastric damage protocol in order to assess its potency when incorporated into β -cyclodextrin. Both the stomachs removed from the animals of the sham group and the groups treated orally with vehicle, LIN or LIN- β CD (10 mg/kg), were used to quantify the following parameters:

Determination of non-protein sulfhydryl groups

The reduced levels of the non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) were estimated according to the method described by Sedlak and Lindsay (1968). The gastric mucosal non-protein sulfhydryls were determined in stomach tissue homogenates with Ellman's reaction using 5'5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). The results on NP-SH were expressed as microgram per gram of protein of stomach tissue.

Determination of myeloperoxidase activity

The extent of neutrophil accumulation in the gastric mucosa was measured from MPO activity evaluation as previously described (Bradley et al. 1982). Measurements were performed in gastric samples and the reaction between the sample and HTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) and followed by *o*-dianisidine. Results are expressed as MPO units per milligram (U/mg) of wet tissue.

Malondialdehyde analysis

The concentration of gastric mucosal lipid peroxidation was determined through estimating malondialdehyde (MDA) in the homogenates from each group, measured using the method of Mihara and Uchiyama (1978), which is based on the reaction with thiobarbituric acid. The results were expressed as nanomoles MDA per milligram of wet tissue (nmol/g of wet tissue).

Gastric lesions induced by acetic acid

Female Wistar rats ($n = 5$ animals/group) fasted for 18 h and then were anesthetized with ketamine and xylazine hydrochloride. The abdominal cavity was opened (an approximate 2-cm incision), and the stomach was exposed. To induce gastric ulcer, a glass tube 8 mm in diameter and 2 cm long was used, in contact with the serosa of the stomach to limit the area that would be injured. Seventy microliters of 80 % acetic acid was added to the tube, which remained in contact with the serosa of the stomach for 1 min. After the acetic acid was removed with the help of an automatic pipette, the site was washed with saline solution (Okabe et al. 1972). The stomach was accommodated in the abdominal cavity, and the abdominal region was sutured. One day after ulcer induction, daily oral treatment was begun with vehicle, cimetidine (100 mg/kg), or LIN or LIN- β CD (40 mg/kg) for 14 days. After the chronic treatment, the animals were euthanized, and the stomach was removed (opened at the greater curvature), washed with distilled water, and stretched to measure the ulcerated area (with the aid of a caliper). The calculation of the ulcerated area (in square millimeters) was performed by measuring the length \times the height; the ulcer volume (in cubic millimeters) was calculated by measuring the ulcerated area \times depth of the ulcer (Potrich et al. 2010).

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SEM. The statistical significance for differences between groups was calculated through the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test using the GraphPad Prism™ 5.0 software (San Diego, CA, USA). The differences between groups were regarded as significant at $p < 0.05$.

Results

Effect of LIN and LIN- β CD on absolute ethanol-induced gastric ulcer in mice

The administration of absolute ethanol to the animals that had been previously treated with vehicle produced a large

percentage of ulcerated area (15.58 ± 0.8 %). LIN showed significant gastroprotective effect on doses of 10 (2.26 ± 0.54 %), 20 (3.7 ± 1.19 %), and 40 (1.66 ± 0.44) mg/kg, producing gastroprotection of 85.50, 76.26, and 89.35 %, respectively, compared to vehicle-treated animals. The dose of 5 mg/kg (13.97 ± 1.50 %) did not reduce gastric lesions when compared to vehicle. LIN- β CD at doses of 5 (1.5 ± 6.74 %), 10 (1.54 ± 0.68 %), 20 (2.52 ± 0.07 %), and 40 (0.9 ± 0.19 %) mg/kg was able to reduce the gastric lesion area 56.74, 90.11, 83.0, and 94.2 %, respectively, demonstrating that possibly complexation improves its gastroprotective activity. Animals receiving carbenoxolone (100 mg/kg) showed reduced lesion area at 93.92 % (4.68 ± 0.68 %) (Fig. 1).

Participation of non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) in gastroprotective effect of LIN and LIN- β CD on absolute ethanol-induced gastric ulcer in mice

Ethanol administration reduced the gastric content of non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) in animals pretreated with vehicle (302.86 ± 27 μ g/g protein, $p < 0.05$) compared to the sham group (425.56 ± 38 μ g/g protein). Pretreatment with LIN at a dose of 10 mg/kg did not alter the levels of gastric contents NP-SH (221.98 ± 11 μ g/g protein) compared to the group that received only vehicle before induction of absolute ethanol ulcer. Unlike the LIN- β CD at the dose of 10 mg/kg exhibited a significantly increased rate of gastric contents NP-SH (454.22 ± 24 μ g/g protein, $** p < 0.01$) compared to vehicle (Table 1).

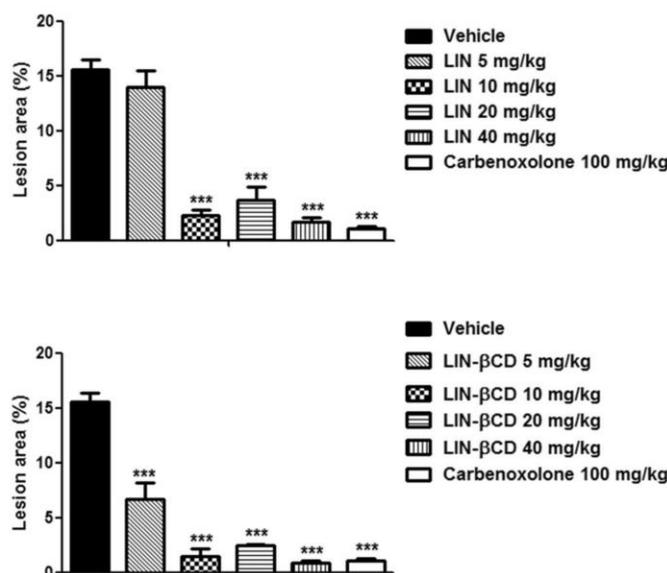
Myeloperoxidase activity assessment (MPO) in gastroprotective effect of LIN and LIN- β CD on absolute ethanol-induced gastric ulcer in mice

MPO activity in the stomachs of animals pretreated with vehicle (7.13 ± 1.2 U/mg tissue, $** p < 0.01$) was significantly higher when compared to Sham group (2.7 ± 0.7 U/mg tissue). Stomachs pretreated with LIN (1.6 ± 0.7 U/mg tissue, $*** p < 0.001$) and LIN- β CD (0.8 ± 0.3 U/mg tissue, $*** p < 0.001$) both at the dose of 10 mg/kg showed a reduction in MPO activity compared to ulcerated control (Table 1).

Involvement of lipid in peroxidation in the gastroprotective effect of LIN and LIN- β CD on absolute ethanol-induced gastric ulcer in mice

Lipid peroxidation in the stomachs pretreated with vehicle alone (114.4 ± 6 nmol/g tissue) was greater when compared to non-ulcerated group (Sham) 85.6 ± 3 nmol/g of tissue. LIN and LIN- β CD at a dose of 10 mg/kg were able to reduce lipid peroxidation in 75.7 ± 4 nmol/g of tissue ($**p < 0.01$) and 78.4 ± 11 nmol/g of tissue ($**p < 0.01$), respectively (Table 1).

Fig. 1 Effect of LIN and LIN- β CD at doses of 5, 10, 20, and 40 mg/kg or carbenoxolone (100 mg/kg) in the model of ethanol-induced gastric ulcer in mice. Data are mean \pm SEM values. Statistical analysis was carried through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. *** $p < .001$ compared with vehicle



Effect of LIN and LIN- β CD on gastric lesions induced by acetic acid

In the model of gastric lesions induced by acetic acid, oral treatment for 14 consecutive days showed that both the LIN as LIN- β CD accelerate the healing of chronic gastric ulcer in rats. As it can be seen in Fig. 2a–e, LIN and LIN- β CD at a dose of 40 mg/kg significantly decreased the area of the ulcerative lesion in 48 % (67.1 ± 5.7) and 83 % (21 ± 7.9), respectively, compared to vehicle group (131.2 ± 17). It can also be seen that LIN- β CD produced higher healing effect than LIN. Cimetidine was also able to significantly reduce the area of injury (64 %, 47.8 ± 13). In the treatment with vehicle, LIN and LIN- β CD or cimetidine during the 14 days, there was neither mortality nor macroscopic changes in the

liver, stomach, heart, lungs, spleen, and kidneys (data not shown).

Discussion

Absolute ethanol promotes, in a multifactorial fashion, necrotic lesions in the gastric mucosa occurring release of superoxide anions and free radicals that lead to increased lipid peroxidation resulting from the metabolism of ethanol. In the gastric ulcer model induced by ethanol, both (–)-linalool uncomplexed (LIN) and as in the complexed form of β -cyclodextrin (LIN- β CD) showed a sharp reduction of gastric lesion area, improving the pharmacological response at smaller doses. They also promoted increased solubility and stability, demonstrating that β -cyclodextrin greatly increased the gastroprotective effect of (–)-linalool. That effect may be due to these cases, the complexes of water-soluble β -CD enhance their diffusion to the surface of the gastrointestinal mucosa leading to greater oral bioavailability (Loftsson et al. 2005). Thus, the CDs have proved to be promising for applications in pharmacological approaches on the use of terpene in the evaluated models.

Furthermore, in accordance with previous studies, the complexation efficiency between LIN and β -CD in the co-evaporation method is 85–92 %. Thus, in the doses used in this study, the LIN dose in the complex is about ten times lower with a significantly greater effect as compared to the LIN uncomplexed. Increased gastroprotective response of LIN and its efficacy is probably because of the properties

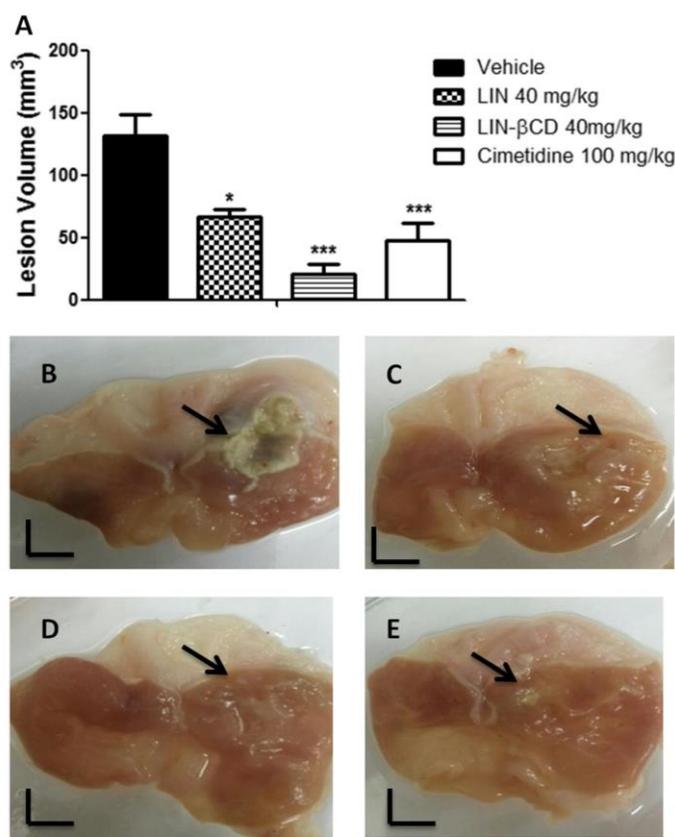
Table 1 Antioxidant activity LIN and LIN-BCD in stomach mucosa of mice undergoing gastric injury by ethanol

| Treatment dose (mg/kg) | NP-SH (μ g/g protein) | MPO (U/mg tissue) | MDA (nmol/g tissue) |
|--------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------|
| Sham | $425.56 \pm 38^*$ | $2.70 \pm 0.7^{**}$ | $85.62 \pm 3.3^*$ |
| Vehicle | 302.86 ± 27 | 7.13 ± 1.2 | 114.40 ± 5.5 |
| LIN 10 mg/kg | 221.98 ± 11 | $1.66 \pm 0.7^{***}$ | $75.79 \pm 4.3^{**}$ |
| LIN- β CD 10 mg/kg | $454.22 \pm 24^{**}$ | $0.88 \pm 0.3^{***}$ | $78.47 \pm 11.0^{**}$ |

Data is analyzed by one-way ANOVA followed by tukey and expressed as mean \pm SEM

*Indicates $p < 0.05$, when compared with vehicle group; **indicates $p < 0.01$, when compared with vehicle group; ***indicates $p < 0.001$ when compared with vehicle group

Fig. 2 a Effects of daily oral treatment with LIN and LIN- β CD at doses of 40 mg/kg or cimetidine (100 mg/kg) for 14 days on gastric lesions induced by 80 % acetic acid in rats. Data are mean \pm SEM values. Statistical analysis was carried through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. * $p < 0.005$; *** $p < 0.001$ compared with vehicle. Illustrative photographs of stomachs (arrows indicated the area of injury): vehicle (b), LIN (c) and LIN- β CD (d) at doses of 40 mg/kg or cimetidine (e) 100 mg/kg (scale bars = 5 mm)



described for the cyclodextrins, such as greater bioavailability, better chemical stability, protection against rust, and reduction of the volatility of the compound (Arima et al. 2015).

These data corroborate other studies with linalool incorporated to β -CD, suggesting that β -CD may represent an important tool for improving analgesic and anti-inflammatory profiles (Quintans-Júnior et al. 2013) and anti-fibromyalgia hyperalgesia in animal models with increased expression of Fos protein in reasonable control of pain areas like the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus (Nascimento et al. 2014). Therefore, it is appropriate that the complexation of this monoterpene in inclusion complexes containing β -cyclodextrin enhances its pharmacological profile, as it has been observed in other studies of inclusion complexes containing monoterpenes and β CD, which demonstrated the benefits of complexation in the pharmacological response in experimental models of nociception and inflammation (Menezes et al. 2012; Serafini et al. 2012; Quintans et al. 2013; Guimarães et al. 2015).

After finding the gastroprotective activity of LIN and LIN- β CD in models of ulcers induced by absolute ethanol,

we investigated the possible mechanisms involved in this action. For so, protocols were performed to evaluate their antioxidant activity due to the fact that free radicals play an important role in the pathogenesis of gastric ulcers induced by absolute ethanol. Free radicals also promote severe cell changes, leading to cell death.

Sulfhydryl compounds are significantly involved in the maintenance of the integrity of the gastric mucosa, particularly when reactive oxygen species are involved in the physiopathology of damaged tissue in models of gastric ulcers induced by absolute ethanol or ischemia and reperfusion (Kimura et al. 2001). LIN has not been able to alter the levels of sulfhydryls compounds; however, LIN- β CD was able to significantly increase these levels, suggesting that the incorporation of this monoterpene in β -cyclodextrin improves its antioxidant profile.

Another parameter that involves the antioxidant activity is the enzyme myeloperoxidase (MPO), which is present in the lysosomes of neutrophils, can be used as neutrophil infiltration index (Krawisz et al. 1984). LIN and

LIN- β CD were able to lower the MPO levels, suggesting that they potentially interfere directly in the reduction of neutrophil infiltration. Gastric ulcer is closely associated with oxidative stress caused by reactive oxygen species, such as lipid peroxidation, which can be measured by markers such as malondialdehyde (MDA). LIN and LIN- β CD were able to reduce lipid peroxidation significantly, suggesting that they are acting as scavengers of reactive oxygen species. These data show that the gastroprotective activity of uncomplexed monoterpene and also those complexed into β -cyclodextrin is probably related to the increased antioxidant activity.

However, the importance of the study of acute lesions in humans is small compared to the relapsing study of chronic lesions. It is therefore necessary to check the activity of LIN and LIN- β CD in a chronic model such as gastric ulcers induced by acetic acid. It has been shown that the application of acetic acid on the surface of serosal rat stomachs results in ulcers that are very similar to those seen in humans in terms of location, severity and chronicity, as well as regarding healing (Okabe and Pfeiffer 1972).

Gastric ulcers induced by acetic acid are caused by changes in various factors, including growth factors, mucus adhesion, microcirculation, nitric oxide, and cytokines, besides the production of derived prostaglandins of the enzyme cyclooxygenase-2 (Kobayashi et al. 2001; Shahin et al. 2001). Therefore, ulcer healing is a complex process involving proliferation and migration of epithelial and inflammatory cells, synthesis and degradation of extracellular matrix molecules and connective tissue components, as well as the synthesis of growth factors and cytokines, which together make healing a well-orchestrated process (Tarnawski et al. 1995).

The results obtained in this study demonstrated that the treatment of animals for 14 days with cimetidine significantly reduced the gastric ulcer induced by acetic acid. Similarly, treatment with LIN or LIN- β CD also protected the gastric mucosa from lesions caused by acetic acid, and LIN- β CD was shown to have a more potent gastroprotective effect when compared to LIN uncomplexed, revealing that the incorporation of monoterpene in β -cyclodextrin improves the healing response. Interestingly, the oral administration of LIN or LIN- β CD at the doses tested did not cause changes to demonstrate signs of toxicity in animals treated for 14 days, as death or macroscopic changes in the liver, stomach, heart, lungs, spleen, and kidneys (data not shown).

The data provides evidence to suggest that both LIN uncomplexed as that incorporated into inclusion complexes containing β -cyclodextrins have a potential applicability in the treatment of acute and chronic gastric ulcers. These effects appear to be related to an increase in antioxidant activity. Thus, LIN- β CD can be an interesting alternative for the biotechnological development of new therapeutic options for the treatment of gastric ulcers.

Acknowledgments We are thankful to the UFPI (Federal University of Piauí, Brazil), UFS (Federal University of Sergipe, Brazil), and UFMG (Federal University of Minas Gerais, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil- process number 311460/2014-3), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for the financial support. Additionally, there is no conflict of interest associated with this study.

References

- Arima H, Hayashi Y, Higashi T, Motoyama K (2015) Recent advances in cyclodextrin delivery techniques. *Expert Opin Drug Deliv* 12:1425–1441. doi:10.1517/17425247.2015.1026893
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al. (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 46:446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Batista PA, de Paula Werner MF, Oliveira EC, et al. (2010) The antinociceptive effect of (–)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *J Pain* 11:1222–1229. doi:10.1016/j.jpain.2010.02.022
- Berliocchi L, Russo R, Levato A, et al. (2009) (–)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in c57/bl6 mice. *Int Rev Neurobiol* 85:221–235. doi:10.1016/S0074-7742(09)85017-4
- Bhargava KP, Gupta MB, Tangri KK (1973) Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *Eur J Pharmacol* 22:191–195
- Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G (1982) Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60:618–622
- Brito RG, Araújo AA, Quintans JS, et al. (2015) Enhanced analgesic activity by cyclodextrins—a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Deliv* 12:1677–1688. doi:10.1517/17425247.2015.1046835
- Guimarães AG, Oliveira MA, Alves Rdos S, et al. (2015) Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chem Biol Interact* 227:69–76. doi:10.1016/j.cbi.2014.12.020
- Kamatou GPP, Viljoen AM (2008) Linalool—a review of a biologically active compound of commercial importance. *Nat Prod Commun* 3:1183–1192
- Kimura M, Goto S, Ihara Y, et al. (2001) Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog* 31:29–36. doi:10.1006/mpat.2001.0446
- Kobayashi G, Moriya S, Wada C (2001) Deficiency of essential GTP-binding protein ObgE in *Escherichia coli* inhibits chromosome partition. *Mol Microbiol* 41(5):1037–1051
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87:1344–1350
- Li WF, Huang HM, Niu XF, Fang T, Mu QL, Li HN (2013) Protective effect of tetrahydrocoptisine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 272:21–29. doi:10.1016/j.taap.2013.05.035
- Lofsson T, Jarho P, Masson M, Jarvinen T (2005) Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv* 2:335–351. doi:10.1517/17425247.2.1.335
- Menezes PP, Serafini MR, Santana BV, et al. (2012) Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochim Acta* 548:45–50. doi:10.1016/j.tca.2012.08.023

- Menezes PP, Serafini MR, Quintans-Junior LJ, et al. (2014) Inclusion complex of (–)-linalool and B-cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim* 115:2429–2437. doi:10.1007/s10973-013-3367-x
- Mihara M, Uchiyama M (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271–278
- Mota KS, Dias GE, Pinto ME, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR, Hiruma-Lima CA, Barbosa-Filho JM, Batista LM (2009) Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 14:979–1012. doi:10.3390/molecules14030979
- Nascimento SS, Camargo EA, DeSantana JM, et al. (2014) Linalool and linalool complexed in β -cyclodextrin produce anti-hyperalgesic activity and increase Fos protein expression in animal model for fibromyalgia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 387:935–942. doi:10.1007/s00210-014-1007-z
- Okabe S, Pfeiffer CJ (1972) Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. *Am J Dig Dis* 17:619–629. doi:10.1007/BF02231748
- Oliveira MGB, Guimarães AG, Araújo AAS, et al. (2015) Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 25:897–907. doi:10.1517/13543776.2015.1045412
- Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, et al. (2002) Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* 9:721–726. doi:10.1078/094471102321621322
- Peana AT, D'Aquila PS, Chessa ML, et al. (2003) (–)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur J Pharmacol* 460:37–41. doi:10.1016/S0014-2999(02)02856-X
- Peana AT, De Montis MG, Sechi S, et al. (2004) Effects of (–)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E₂. *Eur J Pharmacol* 497:279–284. doi:10.1016/j.ejphar.2004.06.006
- Peana AT, Rubattu P, Piga GG, et al. (2006) Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (–)-linalool-induced antinociception. *Life Sci* 78:2471–2474. doi:10.1016/j.lfs.2005.10.025
- Potrich FB, Allemand A, da Silva LM, et al. (2010) Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. *J Ethnopharmacol* 130:85–92. doi:10.1016/j.jep.2010.04.014
- Quintans JSS, Menezes PP, Santos MRV, et al. (2013) Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine* 20:436–440. doi:10.1016/j.phymed.2012.12.009
- Quintans-Junior LJ, Barreto RSS, Menezes PP, et al. (2013) β -cyclodextrin-complexed (–)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (–)-linalool in experimental pain protocols. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 113:167–172. doi:10.1111/bcpt.12087
- Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ (1979) Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology* 77:433–443
- Sampaio LDFS, Maia JGS, De Parijós AM, et al. (2012) Linalool from rosewood (*Aniba rosaceodora* Ducke) oil inhibits Adenylate Cyclase in the retina, contributing to understanding its biological activity. *Phytother Res* 77:73–77
- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192–205
- Serafini MR, Menezes PP, Costa LP, Lima CM, Quintans LJ Jr, Cardoso JC, et al. (2012) Interaction of p-cymene with β -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim*. doi:10.1007/s10973-011-1736-x
- Shahin M, Konturek JW, Pohle T, et al. (2001) Remodeling of extracellular matrix in gastric ulceration. *Microsc Res Tech* 53:396–408. doi:10.1002/jemt.1108
- Sowndhararajan K, Kang SC (2013) Protective effect of ethyl acetate fraction of *Acacia Ferruginea* DC. against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 148:175–181. doi:10.1016/j.jep.2013.04.007
- Tarnawski A, Tanoue K, Santos AM, Sarfeh IJ (1995) Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? *Scand J Gastroenterol Suppl* 210:9–14
- Vonkeman HE, Fernandes RW, Van der Palen J, Van Room EN, Van der Laar MAFJ (2007) Proton-pump inhibitors are associated with a reduced risk for bleeding and perforated gastroduodenal ulcers attributable to non-steroidal anti-inflammatory drugs: a nested case-control study. *Arthritis Res Ther* 9:1–8. doi:10.1186/ar2207

20/12/2016

Gmail - Fwd: Submission CHEMBIOINT_2016_205 received by Chemico-Biological Interactions



Francilene Vieira da Silva <francilenev@gmail.com>

Fwd: Submission CHEMBIOINT_2016_205 received by Chemico-Biological Interactions

Rita de Cássia Meneses Oliveira <menesesoliveira@gmail.com>
Para: Francilene Vieira da Silva <francilenev@gmail.com>

20 de dezembro de 2016 14:26

----- Forwarded message -----

From: **Chemico-Biological Interactions** <Evisesupport@elsevier.com>
Date: 2016-12-20 12:48 GMT-03:00
Subject: Submission CHEMBIOINT_2016_205 received by Chemico-Biological Interactions
To: menesesoliveira@gmail.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: CHEMBIOINT_2016_205
Title: β -CYCLODEXTRIN IMPROVES THE GASTROPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT RESPONSE OF CARVACROL, A MONOTERPENE PRESENT IN OREGANO ESSENTIAL OIL IN ANIMAL MODELS
Journal: Chemico-Biological Interactions

Dear Dr. Oliveira,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Chemico-Biological Interactions. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=CHEMBIOINT and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Chemico-Biological Interactions

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

Universidade Federal do Piauí
Centro de Ciências da Saúde
Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais - NPPM
Coordenação do Mestrado em Farmacologia
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela
SG-15 Fone/Fax: 86-3215-58-72
64.049-550 Teresina-PI



SIGAA - Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas
UFPI - Universidade Federal do Piauí
PRPG - PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO



Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga

Histórico Escolar - Emitido em: 06/07/2016 às 12:21h

Dados Pessoais

Nome: **FRANCILENE VIEIRA DA SILVA** Matrícula: **2013100731**
 Data de Nascimento: **19/11/1983** Nacionalidade: **BRASILEIRA**
 Local de Nascimento: **TERESINA/PI**
 Nome do Pai: **MOACIR ALVES DA SILVA** RG: **2098264 - PI**
 Nome da Mãe: **MARIA DAS GRAÇAS RODRIGUES VIEIRA DA SILVA**
 Endereço: **RUA RAIMUNDO PORTELA, 0 - Q. 77 LT. 25. A** Bairro: **PROMORAR**
 Município: **TERESINA** UF: **PI**

Dados do Curso

Programa: **DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO** IRA: **8.79565**
 Curso: **DOUTORADO** Currículo: **1** Status: **ATIVO**
 Área de Concentração: **BIOTECNOLOGIA EM RECURSOS NATURAIS**
 Linha de Pesquisa: **BIOPROSPECÇÃO, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**
 Orientador: **423551 - RITA DE CASSIA MENESES OLIVEIRA**
 Co-Orientador:
 Forma de Ingresso: **SELECAO POS-GRADUACAO**
 Mês/Ano Inicial: **MAR/2013** Mês Atual: **41º**
 Trancamentos: **0 meses** Prazo para Conclusão: **FEV/2017**
 Prorrogações: **0 meses** Tipo Saída:
 Mês/Ano de Saída: Data da Defesa:

Disciplinas/Atividades Cursadas/Cursando

| Início | Fim | Componente Curricular | Turma | CR | Freq % | Nota | Situação |
|--------|---------|--|-------|----|--------|------|-------------|
| 4/2013 | 7/2013 | RENORBI O113 COMPUTAÇÃO APLICADA AO ESTUDO DOS RECURSOS NATURAIS | 01 | 4 | 100.0 | 8.0 | APROVADO |
| 4/2013 | 7/2013 | RENORBI O040 BIOINFORMÁTICA | 01 | 3 | 100.0 | 8.5 | APROVADO |
| 4/2013 | 4/2013 | RENORBI O029 PROFICIÊNCIA EM LÍNGUA ESTRANGEIRA I (INGLES) | -- | -- | -- | -- | APROVADO |
| -- | -- | RENORBI O131 PROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS | -- | 2 | 100.0 | 10.0 | CUMPRIU |
| 6/2013 | 6/2013 | RENORBI O031 ESTÁGIO-DOCÊNCIA I | -- | -- | -- | -- | CUMPRIU |
| 6/2013 | 6/2013 | RENORBI O030 ESTÁGIO-DOCÊNCIA II | -- | -- | -- | -- | CUMPRIU |
| 8/2013 | 1/2014 | RENORBI O009 FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA PRÉ-CLINICA DE PRODUTOS NATURAIS | 01 | 3 | 91.11 | 8.0 | APROVADO |
| 8/2013 | 4/2014 | RENORBI O036 AVANÇOS EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR | 01 | 4 | 100.0 | 9.0 | APROVADO |
| 8/2013 | 1/2014 | RENORBI O037 AVANÇOS EM BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA | 01 | 4 | 100.0 | 9.3 | APROVADO |
| 3/2014 | 7/2014 | RENORBI O035 BIONEGÓCIOS E MARCOS LEGAIS EM BIOTECNOLOGIA | 01 | 3 | 100.0 | 9.2 | APROVADO |
| 3/2014 | 4/2014 | RENORBI O023 SEMINÁRIOS DE TESE EM ANDAMENTO I | -- | -- | -- | -- | APROVADO |
| 9/2014 | 12/2014 | RENORBI O022 SEMINÁRIOS DE TESE EM ANDAMENTO II | -- | -- | -- | -- | APROVADO |
| 8/2014 | 8/2014 | RENORBI O046 PROFICIÊNCIA EM LÍNGUA ESTRANGEIRA II | -- | -- | -- | -- | APROVADO |
| 3/2015 | 7/2015 | RENORBI O020 ATIVIDADE DE PESQUISA | -- | -- | -- | -- | APROVADO |
| 8/2015 | 12/2015 | RENORBI O144 ATIVIDADE DE PESQUISA II | -- | -- | -- | -- | APROVADO |
| 3/2016 | 6/2016 | RENORBI O044 QUALIFICAÇÃO | -- | -- | -- | -- | APROVADO |
| 3/2016 | -- | RENORBI O146 ATIVIDADE DE PESQUISA IV | -- | -- | -- | -- | MATRICULADO |
| -- | -- | APROVEITAMENTO DE CRÉDITOS | -- | 9 | -- | --- | CUMPRIU |

| | | | | | |
|--------------------|----|--------------------------|----|---------------------|---|
| Créditos Exigidos: | 16 | Créditos Integralizados: | 36 | Créditos Pendentes: | 0 |
|--------------------|----|--------------------------|----|---------------------|---|

Disciplinas/Atividades Obrigatórias Pendentes: 1

| Código | Componente Curricular | CH |
|-------------|-----------------------|-------|
| RENORBIO021 | TESE | 180 h |



SIGAA - Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas
UFPI - Universidade Federal do Piauí
PRPG - PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO



Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga

Histórico Escolar - Emitido em: 06/07/2016 às 12:21h

Nome: **FRANCILENE VIEIRA DA SILVA**

Matrícula: **2013100731**

Cada unidade de crédito equivale a 15 horas/aulas teóricas, práticas ou de estágio. Para avaliação qualitativa utilizar os seguintes conceitos/valores: NL (Nulo)=0, MU (Mau)=1, IF (Insuficiente)=2, SF (Suficiente)=3, BM (Bom)=4, PL (Pleno)=5. Estará habilitado o aluno que obtiver conceito não inferior a SF. Outros símbolos: CC (Crédito Consignado), CA (Crédito Automático), CV (Crédito Vestibular). A partir de 1994 foi adotado o sistema de notas numa escala de 0 a 10. Considerado apto o aluno que obtiver nota não inferior a 6. Novos símbolos: EF (Aprovado por Exame Final), AM (Aprovado por Média), RN (Reprovado por Nota), RF (Reprovado por Falta).

Atenção, agora o histórico possui uma verificação automática de autenticidade e consistência, sendo portanto dispensável a assinatura da coordenação do curso ou PRPG. Favor, ler instruções no rodapé.