



RENORBIO
Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Ponto Focal - Piauí

IRISDALVA SOUSA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GASTROPROTETOR E CICATRIZANTE DO
(-)-BORNEOL NÃO COMPLEXADO OU COMPLEXADO EM
 β -CICLODEXTRINA**

**TERESINA
2016**

IRISDALVA SOUSA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GASTROPROTETOR E CICATRIZANTE DO
(-)-BORNEOL NÃO COMPLEXADO OU COMPLEXADO
EM β -CICLODEXTRINA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO – Ponto Focal UFPI, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

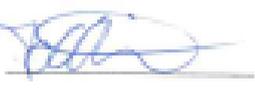
**TERESINA
2016**

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: IRISDALVA SOUSA OLIVEIRA

TÍTULO DO PROJETO: "Avaliação dos efeitos gastroprotetor e cicatrizante do (-)-Borneol não complexado ou complexado em β -ciclodextrina.

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

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira - UFPI (Presidente)	Satisfatório	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI (Examinador)	Satisfatório	
Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras – UFPI (Examinadora)	Satisfatório	
Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros - UFPI (Examinadora)	Satisfatório	

DATA DA AVALIAÇÃO: 19 de setembro de 2016.

HORÁRIO: 14h30min

LOCAL: Auditório do NUPC@BCCA/UFPI

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que sempre sonharam com meu futuro, desde o dia em que eu nasci. Que desde cedo entenderam o valor da educação e me fizeram entender também. Que usaram todos os recursos que tinham para me dar uma oportunidade de crescimento e sucesso. Que sempre estiveram presentes na minha trajetória e vibraram com cada vitória. Que sempre oraram por mim, para que eu pudesse receber as bênçãos de Deus. Essas pessoas tão especiais são meus pais, Antônio Neto e Jovita Oliveira (em memória). Paizinho e mãezinha, obrigada por me tornarem alguém de força e caráter, assim como vocês.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus por ter me dado a oportunidade de finalizar este trabalho, pela força diária para enfrentar as situações difíceis, pelo cuidado que foi sentido em cada momento, pela iluminação e capacitação para realização de mais esta etapa da vida aqui na terra.

Um trabalho concluído com sucesso resulta da colaboração mútua entre pessoas. Com este trabalho não foi diferente. Pessoas muito competentes participaram da construção do mesmo, trazendo contribuições que jamais seriam alcançadas de outra forma. Por este motivo, essas pessoas precisam receber palavras de reconhecimento e gratidão. Meus sinceros agradecimentos:

Ao Programa de pós-graduação RENORBIO (Ponto Focal Piauí) pela oportunidade da formação

A CAPES pelo fomento à pesquisa através da bolsa de doutorado.

Ao NPPM - UFPI pela disponibilização dos laboratórios e materiais utilizados na execução do trabalho.

A professora Dr^a Rita de Cássia M. Oliveira, por ter me orientado com tanta paciência neste e em outros projetos, contribuindo de forma essencial para minha formação como profissional, como pesquisadora e como pessoa. Por nunca ter deixado que o desânimo me fizesse desistir e por torcer pelo meu sucesso e vitória.

Aos meus companheiros de laboratório Francilene Vieira, Hélio Barros, Ana Flávia Viana, Kamila Lopes e Suylane Sobral pela parceria durante os experimentos e também na vida “ufpiana”. Amizades que quero levar para a vida toda.

As pessoas que realizaram uma colaboração essencial de grande parte deste trabalho: Lucas Antonio Duarte Nicolau, Ana Karina Marques Fortes Lustosa, Jand Venes Rolim Medeiros, Adriano Antunes de Sousa Araújo, Paula dos Passos Menezes, Dayanne Valéria Soares Santana, Jullyana de Souza Siqueira Quintans, Francisco das Chagas Alves Lima e em especial ao prof. Dr. Lucindo José Quintans-Júnior, pelas orientações, generosidade, geração de resultados que enriqueceram o trabalho e disponibilidade em ajudar em todas as etapas do mesmo.

Aos professores do RENORBIO que se dedicaram de maneira brilhante na construção do aprendizado, sempre buscando a melhor forma de cumprir os objetivos propostos para cada disciplina.

Aos professores que participaram da banca de qualificação e de defesa se dispuseram a ler o trabalho de maneira tão cuidadosa e assim, contribuíram com sugestões importantes para a melhoria do trabalho: Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras, Profa. Dra. Maria das Gracias Freire de Medeiros, Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Junior e Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima.

Existem também as pessoas que contribuíram de maneira indireta na conclusão desta etapa da minha vida, mas que sem elas, nada disso seria possível. Agradeço de maneira muito especial:

A minha família, Papai, Benia, Vania e Pedro, que sempre me apoiaram e trouxeram palavras de ânimo nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, que ajudavam a relaxar quando a tensão estava deixando a mente e o corpo desequilibrados e à igreja que me auxiliava a manter o equilíbrio espiritual.

EPÍGRAFE

“Gratidão vai além de um ‘muito obrigado’. Ultrapassa gentilezas e é superior a qualquer interesse. Gratidão é reconhecer em Deus e no outro o valor que ele tem e o que ele faz sem exigir nada em troca. Quem sabe agradecer está apto a crescer.”

Cecília Sfalsin

“Dando graças constantemente a Deus Pai por todas as coisas, em nome de nosso Senhor Jesus Cristo.”

Efésios 5:20

OLIVEIRA, I. S. **Avaliação dos efeitos gastroprotetor e cicatrizante do (-)-borneol não complexado ou complexado em β -ciclodextrina.** 2016, 96p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal UFPI. Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira.

O (-)-Borneol (1,7,7-Trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol) é um monoterpene bicíclico, presente nos óleos essenciais de numerosas plantas. O mesmo apresenta baixa solubilidade em água e esta característica pode diminuir sua absorção por via oral. Uma possível alternativa para minimizar esses problemas seria a inclusão deste monoterpene em um complexo de ciclodextrina, a qual é reconhecida na literatura por melhorar a biodisponibilidade e o aumento da solubilidade aquosa e estabilidade de fármacos. Neste estudo, realizou-se a preparação do (-)-Borneol complexado em β -CD pelos métodos de mistura física (MF) e co-evaporação (CE). Para caracterização físico-química, foram utilizadas as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), teor de umidade por titulação de Karl Fisher, espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Difractometria de Raios X (XRD). O método de CE indicou a formação do complexo de inclusão com melhor rendimento e taxa de complexação entre o monoterpene e a β -CD, sendo este o método escolhido para a realização dos testes *in vivo*. Avaliou-se, então, a atividade gastroprotetora e cicatrizante do Borneol livre (BOR) e do Borneol complexado em ciclodextrina (BOR-CD) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos, isquemia/reperfusão e ácido acético em ratos, e o efeito sobre a secreção de muco e parâmetros bioquímicos gástricos. Avaliou-se também sua ação sobre as atividades da enzima catalase (CAT), pela reação com o peróxido de hidrogênio, da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), através do bloqueador L-NAME e da enzima mieloperoxidase (MPO), pela reação com o brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB 0,5%). Foram quantificados os níveis de glutatona reduzida (GSH) através da reação com o 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico), os níveis de malondialdeído (MDA), reagindo como ácido tiobarbitúrico (TBA), a concentração de nitrito (NO^-), com o reagente de Griess bem como a participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na atividade gastroprotetora evidenciada (Protocolos experimentais aprovados pelo CEEA/UFPI: 008/12). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA, seguida do teste de Tukey e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos). Nos modelos de lesões gástricas por isquemia e reperfusão e por etanol absoluto, BOR e BOR-CD (25 e 50 mg/kg, v.o) reduziram as lesões gástricas quando comparados ao grupo controle. A atividade da catalase, uma enzima que degrada H_2O_2 em água e oxigênio, foi aumentada nos animais pré-tratados com BOR 25 mg/kg. Os níveis de MPO (marcador de infiltração/agregação de neutrófilos) foram reduzidos e os de nitrito foram aumentados por BOR e por BOR-CD 25 mg/kg quando comparados ao controle. BOR-CD 25 mg/kg foi capaz de aumentar os níveis de GSH e reduzir os níveis de MDA, mostrando seu papel na redução de substâncias oxidantes e na regulação da lipoperoxidação. O mesmo não foi observado no grupo tratado com BOR 25 mg/kg. BOR e BOR-CD 25 mg/kg mostraram reversão do efeito protetor ao utilizar-se o bloqueador da NO sintase (L-NAME) ou o bloqueador dos canais K_{ATP} (Glibenclamida). Esses resultados sugerem a importância do óxido nítrico (NO) e também dos canais K_{ATP} no efeito evidenciado. No modelo de lesões induzidas por ácido acético, a administração diária (7 dias), nas doses 50 e 100 mg/kg de BOR e de BOR-CD, reduziu significativamente a área de lesão em comparação ao controle. No modelo de ligadura de piloro, BOR e BOR-CD não mostraram alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e na produção de muco. Através desses resultados, evidenciam-se que o Borneol apresenta atividade gastroprotetora e cicatrizante, envolvendo mecanismos antioxidantes e antiperoxidativos e a complexação do mesmo em β -CD melhora suas propriedades químicas e farmacológicas.

Palavras-Chave: Borneol. β -ciclodextrina. Gastroproteção. Cicatrização. Antioxidante.

ABSTRACT

Oliveira, I. S. **Evaluation of the gastroprotective and healing effects of non complexed (-)-Borneol or complexed with β -cyclodextrin.** 2016, 96p. Doctoral Thesis, PhD Program in Biotechnology, RENORBIO, Focal Point UFPI

The (-)-Borneol (1,7,7-Trimethylbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol) is a bicyclic monoterpene present in the essential oils of many plants. It has low solubility in water and this feature may reduce their oral absorption. One possibility to minimize these problems would be the inclusion of monoterpene in a cyclodextrin complex, because it is known in the literature to improve the bioavailability and increased aqueous solubility and stability of drugs. In this study, there was the preparation of (-)-Borneol complexed with β -CD by physical mixture (PM) and slurry complex (SC) methods. For physicochemical characterization were used the techniques of differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry/ derivative thermogravimetry (TG/DTG), moisture content by Karl Fischer titration, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD). The SC method indicated the occurrence of the formation of the inclusion complex with better yield and complexation rate between the monoterpene and β -CD, this being the method chosen for the in vivo tests. We evaluated, then the gastroprotective activity and gastric healing of Borneol (BOR) and Borneol complexed cyclodextrin (BOR-CD) in the model of gastric lesions induced by absolute ethanol in mice, ischemia/reperfusion and acetic acid in rats and the effect on gastric mucus secretion and biochemical parameters. It was also evaluated its effect on the activity of catalase (CAT), by reaction with hydrogen peroxide, synthase of nitric oxide (NOS) by L-NAME blocker and myeloperoxidase (MPO), by reaction with hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB 0.5%). the levels of reduced glutathione (GSH) were quantified by reaction with 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), the malondialdehyde levels (MDA), by reaction with thiobarbituric acid (TBA), nitrite concentration (NO⁻), with Griess reagent and the participation of potassium channels ATP-sensitive in the evidenced gastroprotective activity (Experimental protocols approved by CEEA/UFPI: 008/12). The results were expressed as mean \pm S.E.M. (ANOVA, followed by Tukey test; significant values: * $p < 0,05$). In models of gastric injuries induced by ischemia-reperfusion and absolute ethanol, BOR 25 and 50 mg/kg reduced the gastric lesions compared to the control group. The activity of catalase, an enzyme that degrades H₂O₂ into water and oxygen, was increased in animals pretreated with BOR 25 mg/kg, when compared to the control. The MPO levels (marker infiltration/aggregation of neutrophils) were reduced while nitrite were increased by BOR and BOR-CD 25 mg/kg when compared to the control. BOR CD 25 mg / kg was able to increase GSH levels and reduce MDA levels, showing their role in reducing oxidizing substances and regulation of lipid peroxidation. These results weren't observed in the group treated with BOR 25 mg / kg. BOR and BOR-CD 25 mg / kg had their protective effect abolished when a blocker of NO synthase (L-NAME) or a blocker of K_{ATP} (glibenclamide) were used. These results suggest the importance of nitric oxide (NO) and K_{ATP} channels in evidenced effect. In injury model induced by acetic acid, daily administration (14 days), in doses 50 and 100 mg/kg of BOR and BOR-CD reduced lesion area as compared to the control. In pylorus ligation model, BOR and BOR-CD and don't showed changes in biochemical parameters and mucus production. From these results, it is concluded that Borneol has gastroprotective and healing activity, antioxidants and anti-peroxidation involving the complexation mechanisms and in the same β -CD enhances their chemical and pharmacological properties.

Keywords: Borneol. β -cyclodextrin; Gastroprotection. Healing. Antioxidant.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - Difosfato de adenosina

AMP - Monofosfato de adenosina

AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina

ATP - Trifosfato de adenosina

bFGF - Fator básico de crescimento de fibroblastos

BHE - Barreira hematoencefálica

CAT - Catalase

CD - Ciclodextrina

CI_s - Complexos de inclusão

COX-2 - Ciclo-oxigenase 2

DAG – Diacilglicerol

DAINEs - Drogas anti-inflamatórias não esteroidais

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSC - calorimetria exploratória diferencial

DTNB - Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico

ECL - Células do tipo enterocromafins

ECSOD - superóxido dismutase extracelular

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – Fator de crescimento epidermal

EP2 - Receptores de prostanóides E do tipo 2

EP4 - Receptores de prostanóides E do tipo 4

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FAD - dinucleótido de flavina e adenina

FTIR - espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

Gi – Proteína G inibitória

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduced

GSH-Px - glutathione peroxidase

GSSG - - Glutathione oxidized

G α q - Subunit α of the G protein, class q.

H⁺,K⁺-ATPase - proton pump

H2 - Histamine type 2 receptors

H₂O₂ - Hydrogen peroxide

H2RAs - Antagonists of the histamine type 2 receptor

HCl - Hydrochloric acid

HE - Hematoxylin/eosin

HGF - Hepatocyte growth factor

HOCl - Hypochlorous acid

HSP - Heat shock protein or thermal shock protein

IL-1 - Interleukin 1

IL-4 - Interleukin 4

IL-8 - Interleukin 8

IL-10 - Interleukin 10

IP - Prostacyclin receptor

KCl - Potassium chloride

L-NAME - L-NG-Nitroarginine methyl ester

M₁R - Muscarinic acetylcholine receptor type 1

MDA - Malondialdehyde

MEV - Scanning electron microscopy

MI - Myocardial infarction

MPO - Myeloperoxidase

Na⁺/K⁺-ATPase - bomba de sódio/potássio

NAC - N- acetilcisteína

NAD - dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado

NADH - dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

NADP - fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NO - Óxido nítrico

O₂⁻ - Ânion supeóxido

OE – Óleos essenciais

OH⁻ - Ânion hidroxila

ONOO⁻ - Ânion peroxinitrito

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE₂ - prostaglandina E₂

PIV - Polipeptídeo intestinal vasoativo

PKA - Proteína cinase dependente de AMPc

PKC - Proteína quinase dependente de calmodulina

PPIs – Inibidores da bomba de prótons

SNC – Sistema nervosa central

SOD - superóxido dismutase

SSTR2 - - receptor de somatostatina tipo 2

TFF – Fator trefoil

TG/DTG - termogravimetria/termogravimetria derivada

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

VEGF-R1 - Receptor para o fator de crescimento endotelial vascular tipo 1

VEGF-R2 - Receptor para o fator de crescimento endotelial vascular tipo 2

XD - Xantina desidrogenase

XO - Xantina oxidase

XRD - Difractometria de Raios X

α -CD – ciclodextrina alfa

β -CD – ciclodextrina beta

γ -CD – ciclodextrina gama

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Capítulo I

- Figura 1.** Diagrama da camada de muco no estômago alcalina com mecanismos de defesa da mucosa 22
- Figura 2.** Representação esquemática dos mecanismos oxidantes e antioxidantes celulares 23
- Figura 3.** Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) após um processo de isquemia tecidual, seguido por reperfusão sanguínea. 27
- Figura 4** Estrutura geral do isopreno 32
- Figura 5** Estrutura geral do Borneol 33
- Figura 6.** Estrutura química das ciclodextrinas α , β e γ 36
- Figura 7.** Representação do equilíbrio de ligação de uma droga com uma ciclodextrina para formar um complexo de inclusão na proporção de 1: 1. 37

Capítulo II

- Figura 1.** Curvas DSC do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (PM) e do complexo co-evaporado (CE) numa atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) e temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 60
- Figura 2.** Curvas TG do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (PM) e do complexo co-vaporado (CE) numa atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) e temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 61
- Figura 3.** Espectros de infravermelho do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (MF) e do co-evaporado (CE) 62
- Figura 4.** Fotomicrografias em MEV de seções transversais (1 e $10 \mu\text{m}$) do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (MF) e do complexo co-evaporado (CE) 63
- Figura 5.** Difração de raios X do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (MF) e do complexo co-evaporado (CE) 64
- Figura 6.** Efeito do tratamento crônico com Borneol, Borneol-CD ou cimetidina no modelo de lesão gástrica por ácido acético. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ comparados ao respectivo grupo controle (ANOVA one way e teste de Tukey's) 66

Figura 7. Efeitos macro e microscópicas de Borneol, Borneol-CD ou carbenoxolona na mucosa gástrica de camundongos submetidos a lesões gástricas induzidas por etanol. %. Fotografias de estômagos abertos ao longo da curvatura maior e análise microscópica com uma ampliação de 100×	67
Figura 8. Efeitos macro e microscópicas do tratamento por 7 dias com Borneol, Borneol-CD ou cimetidina na mucosa gástrica de ratos submetidos a lesões gástricas induzidas por ácido acético a 80%. Fotografias de estômagos abertos ao longo da curvatura maior e análise microscópica com uma ampliação de 100×	68
Tabela 1. Relação entre as doses do Borneol não complexado e do Borneol complexado em β -ciclodextrina	56
Tabela 2: Perda de massa do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (PM) e do complexo co-evaporado (CE) obtidos com termogravimetria/termogravimetria derivada e % de água obtida por titulação de Karl Fisher.	60
Tabela 3. Efeito do Borneol, Borneol-CD, carbenoxolona e NAC modelos agudos de lesões gástricas em roedores	65

Capítulo III

Figura 1. Efeito de Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg, sobre a atividade da catalase (A) e MPO (B) no tecido gástrico em ratos. SHAM: Não foi exposto ao agente estressor	87
Figura 2. Efeito de Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg, sobre (A) os grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH), (B) - o conteúdo de malondialdeído (MDA) e (C) de nitrito no tecido gástrico em ratos	89
Figura 3. Efeito de Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg ou da L-arginina (600 mg/kg) após pré-tratamento com L-NAME, 20 mg/kg, no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	90
Figura 4. Efeito de Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg ou do Diazóxido (3 mg/kg) após pré-tratamento com Glibenclamida 5 mg/kg, no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Geral	20
2.2. Específicos	20
CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA CIENTÍFICA	21
1. Úlcera péptica	21
2. Considerações gerais sobre os óleos essenciais	30
3. Considerações gerais sobre o monoterpene (-)-Borneol	31
4. Ciclodextrinas	35
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II: Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão de (-)-borneol com β-ciclodextrina e seus efeitos gastroprotetor e cicatrizante em roedores	51
RESUMO	52
ABSTRACT	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. METODOLOGIA	55
2.1. Substâncias químicas	55
2.2. Preparação dos complexos de (-)-Borneol/ β -CD	55
2.3. Análise térmica	56
2.4. Titulação de Karl Fisher	56
2.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	56
2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
2.7. XRD (Difração de raios X)	57
2.8. Animais	57
2.9. Lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos	57
2.10. Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	58
2.11. Lesões gástricas induzidas por ácido acético	58
2.12. Avaliação histopatológica	59
2.13. Análise estatística	59

3. RESULTADOS	59
3.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada (TG/DTG) e Titulação de Karl Fisher	59
3.2. Espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	61
3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
3.4. Difração de raios X	64
3.5. Efeito do Borneol sobre lesões gástricas induzidas por etanol	64
3.6. Efeitos do Borneol sobre lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos	65
3.7. Efeito do Borneol e Borneol-CD em lesões gástricas induzidas por ácido acético	66
3.8. Análise histopatológica	66
4. DISCUSSÃO	68
Referências	72
CAPÍTULO III: Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do (-)-Borneol livre não-complexado ou complexado em β-ciclodextrina sobre lesões gástricas agudas em camundongos	79
RESUMO	80
ABSTRACT	80
1. INTRODUÇÃO	81
2. METODOLOGIA	82
2.1. Substâncias químicas	82
2.2. Preparação dos complexos de (-)-Borneol/ β -CD	83
2.3. Animais	83
2.4. Atividade antioxidante	83
2.4.1 Análise de glutathione	83
2.4.2 Atividade da catalase	84
2.4.3 Medição dos níveis de nitritos totais	84
2.4.4 Atividade da mieloperoxidase	84
2.4.5 Análise de malondialdeído	85
2.5. Papel da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP)	85
2.6. Análise estatística	86

3. RESULTADOS	86
3.1. Determinação da atividade da catalase	86
3.2. Medição da atividade da mieloperoxidase (MPO)	86
3.3. Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH)	87
3.4. Medição da peroxidação lipídica	88
3.5. Conteúdo de nitrito na mucosa gástrica	88
3.6. Participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS)	89
3.7. Participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP)	90
4. DISCUSSÃO	91
Referências	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	99
OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	100

1 INTRODUÇÃO

A introdução de novos fármacos no mercado, além de requerer anos de pesquisa, envolve custos extremamente onerosos. Uma alternativa para contornar os altos custos do desenvolvimento de novos fármacos, bem como para atender os preceitos dos estudos de biodisponibilidade, seria o uso de tecnologias que permitam o aumento da eficiência de fármacos já utilizados na terapêutica, a reintrodução de outros anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos ativos, antes de serem utilizados na terapêutica (BRUM, 2008). Nesse sentido, pode-se citar o uso de sistemas de liberação controlada de fármacos, como por exemplo, os complexos com ciclodextrina (CD), pois as mesmas possuem propriedades capazes de promover o aumento da biodisponibilidade e solubilidade de fármacos poucos solúveis (GUEDES, et al., 2008, SCHMIDT et al., 2014).

Uma das substâncias que tem sido investigada farmacologicamente como possível fonte terapêutica é a biomolécula Endo-(1S)-1,7,7-Trimetilbicíclico[2.2.1]heptan-2-ol ou (-)-Borneol ($C_{10}H_{18}O$), um monoterpene bicíclico presente nos óleos essenciais de numerosas plantas medicinais, incluindo as espécies das famílias Dipterocarpaceae (*Dipterocarpus turbinatus* C. F. Gaertn. e *Dryobalanops* spp.), Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt.), Valerianaceae (*Valeriana officinalis* L.), Asteraceae (*Matricaria chamomilla* L. e *Blurnea balsamifera* L.) (HORVÁTHOVÁ et al., 2009), Cupressaceae, Zingiberaceae, Lauraceae (*Cinnamomum camphora* L.) (XIAO-FEI et al., 2008), Myristicaceae (*Myristica fragans* Houtt.), Pinaceae (*Pinus sylvestris* L.), Poaceae (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.), Apiaceae (*Coriandrum sativum* L.) e Verbenaceae (*Lippia adoensis* Hochst.) (RAVID et al., 1996).

De acordo com a Farmacopéia da República Popular da China, o Borneol está presente em cerca de 63 produtos à base de plantas (XIAO-FEI et al., 2008). Existem duas formas diferentes do Borneol. A primeira é o Borneol sintético, uma mistura dos dois enantiômeros naturais de borneol, D-(+)-Borneol e L-(-)-Borneol com o Isoborneol. Nessa mistura, o DL-Borneol é inferior a 55,0%. A segunda forma é o Borneol natural cujo principal componente é o D-(+)-Borneol, correspondendo a 95,0% do composto. Antes de 1949, o Borneol natural foi importado para a China e foi usado na tradicional medicina chinesa. Depois de 1949, houve uma escassez do Borneol natural, sendo gradualmente substituído pelo Borneol sintético (XIAO-FEI et al., 2008).

Na medicina popular, extratos das plantas contendo Borneol são usados tradicionalmente para aliviar sintomas de ansiedade, cansaço e insônia. O Borneol é usado

para provocar analgesia e anestesia (GRANGER et al., 2005), para o tratamento de dor abdominal, particularmente dor de estômago (WANG et al., 2006), para aplicação em ferimentos, queimaduras, para aliviar dores reumáticas, hemorróidas, doenças cutâneas, e ulcerações da boca, ouvidos, olhos ou nariz e na aromaterapia (SVOBODA; HAMPSON, 1999), para tratar dor de garganta, aftas, feridas, queimaduras e infecções da pele e para o tratamento da encefalopatia (ZHENG et al., 2008). É ainda utilizado como aditivo e adicionado em alguns alimentos, tais como doces, bebidas e produtos cosméticos como perfumes e produtos de cuidados com a pele (DAI et al., 2009).

Estudos farmacológicos comprovaram os efeitos do Borneol como sendo bacteriostáticos para vários microorganismos Gram positivos e Gram negativos (KNOBLOCH et al., 1989; TABANCA et al., 2001) e possuidor de atividade antifúngica (KNOBLOCH et al., 1989; WENQIANG et al., 2006). Também apresentou efeitos antioxidantes (KORDALI et al., 2005) e imunomodulatório (JUHÁ et al., 2008), atividade anti-trombótica e anti-agregante plaquetário (LI et al., 2008). Além disso, o Borneol (50 mg/kg, v.o.) apresentou significativo efeito antihipertensivo em ratos cuja hipertensão foi induzida por L-NAME (40 mg/kg, v.o.) (RAJA et al., 2010), efeito vasorrelaxante (SILVA-FILHO, 2012) atividades cicatrizante tópica (BARRETO et al., 2016), anti-inflamatória e antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2013) e baixa toxicidade (HORVÁTHOVÁ et al., 2009). Pesquisas mostraram que Borneol pode ser utilizado para melhorar a penetração de drogas através da pele, da mucosa gastrointestinal, da mucosa nasal, da córnea e da barreira hematoencefálica (ZHENG et al., 2008).

Neste contexto o monoterpene (-)-Borneol torna-se um aliado em potencial visto que diversos estudos farmacológicos mostram os efeitos do mesmo no tratamento de diversas enfermidades além do fato de não existirem estudos que mostrem o seu efeito, na forma livre ou complexada em ciclodextrina (CD), sobre o sistema gastrointestinal e atividade cicatrizante. A sua complexação em CD é justificada pelo fato do Borneol apresentar limitações de uso, como por exemplo, sua insolubilidade em água, fácil sublimação e transformação à cânfora, um composto potencialmente tóxico (BHATIA et al. 2008). As CDs são compostos já bastante utilizados para aplicações farmacêutica, por terem a capacidade de reduzir a volatilidade, viabilizar compostos líquidos na forma sólida, mascarar o odor e o sabor desagradável de alguns compostos, evitar incompatibilidades indesejáveis, aumentar a biodisponibilidade e a estabilidade na presença de luz, calor e condições oxidantes (SANTOS; BUERA; MAZZOBRE, 2012; ROCHA et al, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar as propriedades gastroprotetoras do (-)-Borneol livre ou complexado em β -ciclodextrina e avaliar o potencial cicatrizante da substância.

2.2 Específicos

- Preparar o (-)-Borneol complexado em β -CD pelos métodos de mistura física (MF) e co-evaporação (CE).
- Caracterizar o complexo de (-)-Borneol-CD pelas técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), teor de umidade por titulação de Karl Fisher, espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de Raios X (XRD).
- Avaliar o efeito gastroprotetor do (-)-Borneol (tratamento oral e parenteral), complexado ou não complexado em β -ciclodextrina em modelos agudos de lesões gástricas;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos farmacológicos evidenciados através da verificação dos níveis de malondialdeído (MDA), de nitrito e de grupos sulfidrílicos não-proteicos (NP-SH), da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), catalase (CAT) e óxido nítrico sintase (NOS) e da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}).
- Avaliar a atividade cicatrizante do (-)-Borneol complexado ou não complexado em β -ciclodextrina através da administração oral diária em animais submetidos ao modelo de lesões gástricas por ácido acético.

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA CIENTÍFICA

3 Úlcera péptica

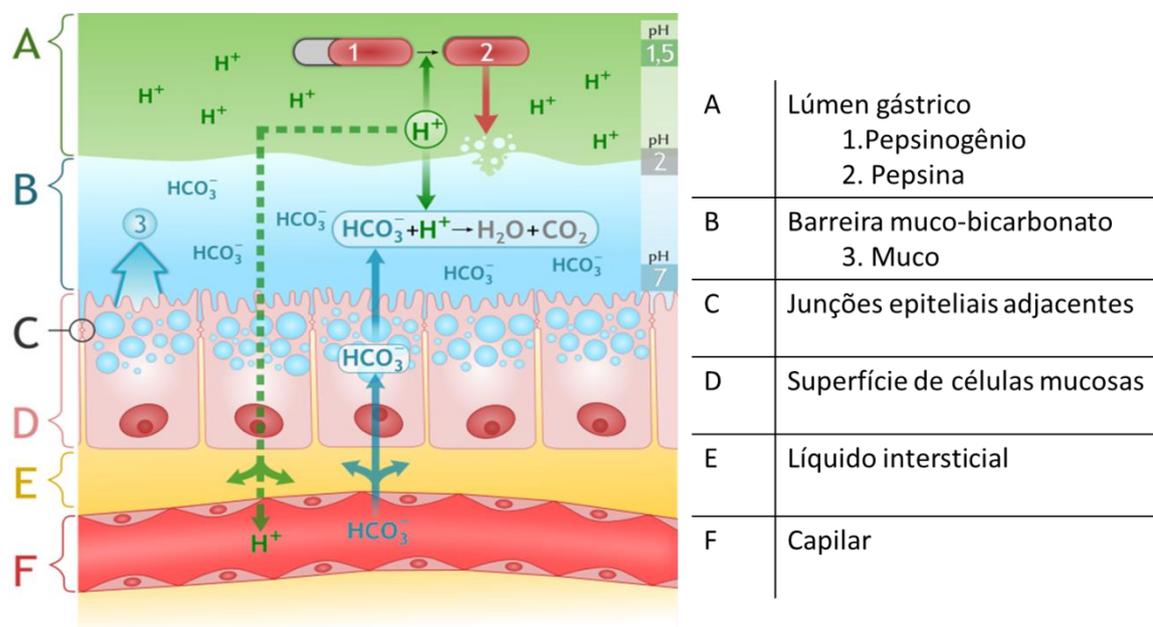
A integridade da mucosa gástrica pode ser influenciada por mecanismos periféricos e centrais. Nas últimas décadas esses mecanismos de defesa da mucosa gástrica têm sido intensamente estudados, e muitos detalhes foram esclarecidos. Alguns destes estudos serviram de base para o desenvolvimento de novas estratégias e alvos terapêuticos no tratamento das lesões da mucosa gástrica (GYIRES et al., 2015). Dados epidemiológicos têm mostrado uma redução da incidência e da etiologia da úlcera péptica e também das complicações relacionadas com a doença, como sangramento e perfuração. (MALMI et al., 2014). De acordo com Oliveira et al., 2015, a prevalência de casos de úlcera no Brasil, no ano em estudo, foi de 0,2% e 0,1%, em homens e mulheres, respectivamente, e, a taxa de mortalidade nacional, de 3,0/100 mil habitantes (3,6/100 mil em homens; 2,3/100 mil em mulheres); as prevalências e taxas de mortalidade aumentaram com a idade, independentemente do sexo, com maiores valores entre homens.

A homeostase gástrica é mantida através de equilíbrio entre os fatores de proteção tais como muco, bicarbonatos, e fluxo de sanguíneo da mucosa gástrica e os fatores agressivos, tais como ácido gástrico e pepsinas (WALLACE, 2008) (Figura 1).

Vários estudos têm mostrado que o aumento do fluxo sanguíneo durante a elevação dos níveis de secreção ácida, pode ser um mecanismo de defesa da mucosa a estímulos nocivos. A redução do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica exacerba lesões por agentes ulcerogênicos, enquanto pouco ou nenhum dano ocorre depois da ação de agentes necrotizantes se o fluxo sanguíneo for mantido em níveis apropriados, juntamente com a citoproteção das prostaglandinas (ABDEL-SALAM et al, 2001; HASGUL et al., 2014; PAWLIK et al., 2016).

As prostaglandinas das séries E e I são compostos vasodilatadores potentes e, a nível gástrico, produzem um efeito protetor através dos receptores EP₂/EP₄ e IP (TAKEUCHI, 2014; KOTANI, 2006). A PGE₂ do estômago estimula a produção de muco e bicarbonato, reduz a secreção ácida, regula o fluxo sanguíneo, estimula a renovação epitelial, além de inibir a expressão de TNF- α , contribuindo para a integridade da mucosa (BRZOZOWSKI et al., 2005). Além disso, elas reduzem a permeabilidade do epitélio gástrico, reduzindo a retrodifusão do ácido produzido (WALLACE, 2008; TARNAWSKI et al., 2013).

Figura 1. Diagrama da camada de muco no estômago alcalina com mecanismos de defesa da mucosa



Fonte: Michał Komorniczak (Medical illustrations), 23 April 2011 (UTC)

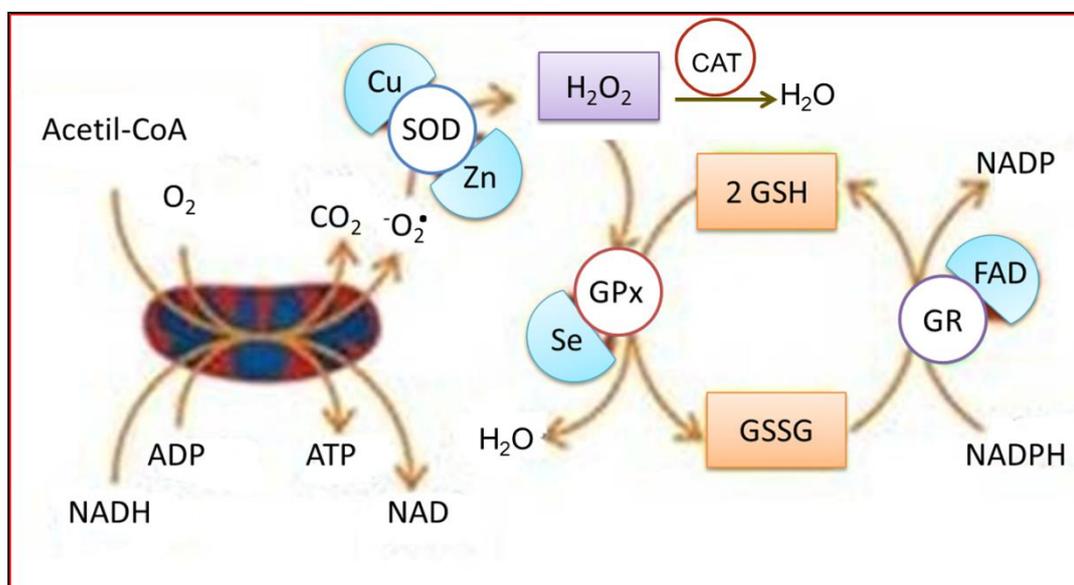
Outra substância que tem um papel na defesa da mucosa gástrica é o óxido nítrico, um mediador envolvido tanto na inflamação quanto na proteção e manutenção de determinadas funções fisiológicas. No estômago, promove o relaxamento do endotélio, regulando a microcirculação, inibindo a infiltração de neutrófilos e diminuindo a expressão de moléculas de adesão e algumas citocinas, tais como IL-4, IL-8 e IL-10 (GYIRES, 2004; ABOUL-ENEIN; KŁADNA; KRUK, 2011). Entretanto, em altas concentrações, o NO pode inibir enzimas de reparo do DNA e aquelas dependentes de grupamentos sulfidríla, além de formar peroxinitritos (ONOO⁻) após reagir com ânion superóxido (O₂⁻) e contribuir com o estresse oxidativo (CHO, 2001).

Além dos fatores que contribuem para o aumento da circulação sanguínea, compostos endógenos como grupos sulfidrílos proteicos e não proteicos (glutathiona reduzida, GSH) também participam como fatores protetores gástricos (SZABO; NAGY; PLEBANI, 1992; ALI, 1995). Os compostos com GSH são agentes antioxidantes não-enzimáticos que se ligam às EROs impedindo sua ação nociva sobre a mucosa gástrica (BAYIR et al., 2006).

Dentre os agentes antioxidantes enzimáticos, a enzima superóxido dismutase (SOD), que tem como co-fatores cobre e zinco, no caso das isoformas citoplasmática (CuZnSOD) e extracelular (ECSOD), ou manganês, no caso da enzima mitocondrial (MnSOD), catalisa a

dismutação do O_2^- em uma substância menos nociva, como o H_2O_2 , o qual é futuramente degradado pela catalase (CAT) ou glutaciona peroxidase (GSH-Px). A CAT é uma enzima que acelera a degradação do H_2O_2 em água e O_2 , requerendo ferro como co-fator, enquanto a GPx, cujo co-fator é o selênio, facilita a “varredura” de radicais livres, associada à oxidação de glutaciona (GSH). A glutaciona oxidada (GSSG) é reduzida pela enzima glutaciona redutase (GR) (BAKER; COOK; GOODWIN, 2004; ZABLOCKA; JANUSZ, 2008; ATIG et al., 2012; BINDU, et al. 2013). A diminuição da atividade da SOD e da catalase e da concentração de GSH contribui de forma significativa para os danos celulares (KWIECIEN et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática dos mecanismos oxidantes e antioxidantes celulares



O_2^- : ânion superóxido; O_2 : oxigênio molecular; CO_2 : Dióxido de carbono; H_2O : água; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx glutaciona peroxidase; GSH: glutaciona reduzida; GSSG glutaciona oxidada; GR: glutaciona redutase; NADH: dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido; NAD: dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado; NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; NADP: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado; FAD: dinucleótido de flavina e adenina; ATP: Adenosina trifosfato; ADP: Adenosina difosfato; Cu: cobre; Zn: zinco; Se: selênio
Fonte: adaptado de PREISER, J. C. Oxidative stress. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, v. 36, p. 147-154, 2012.

Os fatores funcionais de defesa da mucosa gástrica incluem a barreira contínua de muco e bicarbonato, secretada pelas células epiteliais superficiais e pelos fosfolípidios surfactantes que as recobrem. O bicarbonato mantém um microambiente neutro (pH 7.0), impedindo a retrodifusão de ácido e pepsina e a digestão proteolítica da superfície do epitélio (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008). A presença de bicarbonato na

camada de muco aderente é estável e cria um gradiente de pH na superfície do estômago e duodeno, provendo a primeira linha de defesa contra o ácido luminal. O bicarbonato produzido pelas células superficiais do estômago e pelas glândulas de Brunner no duodeno permanecem em grande parte, abaixo ou na camada mucosa (PHILLIPSON et al., 2008). Estudos experimentais de gradiente de pH provêm evidências da existência da barreira muco-bicarbonato in vivo e a presença de um pH próximo à neutralidade na superfície epitelial (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008).

A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrintestinais, incluindo gastrina e secretina, como também PGE_2 e agentes anticolinérgicos (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005). O muco gelatinoso é uma secreção espessa formada por aproximadamente 95% de água e 5% da proteína mucina e eletrólitos. As mucinas são os principais componentes da resposta imune inata da mucosa do trato gastrintestinal (DEY, LEJEUNE e CHADEE, 2006). Quimicamente, o muco é bastante resistente ao ataque das enzimas, como resultado, essa estrutura mantém a lubrificação da mucosa, a diferença de pH entre a superfície da mucosa e o lúmen gástrico, além de favorecer fluxo unidirecional de íons hidrogênio, neutralizando o ácido do suco gástrico. Dessa forma, a parede gástrica subjacente normal nunca é diretamente exposta à secreção gástrica proteolítica e altamente ácida (LAINE, TAKEUCHI, e TARNAWSKI, 2008). A camada de muco também protege as células epiteliais de danos provocados por radicais livres. Essa ação antioxidante do muco está relacionada às suas glicoproteínas que podem sequestrar ânion hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (REPETTO; LLESUY, 2002).

Um grupo de proteínas expressas pelas células epiteliais chamadas de proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *Heat Shock Protein*), representam mais uma linha de defesa da mucosa gástrica (TSUKIMI; OKABE, 2001). Sua principal função é promover a tolerância contra fatores estressantes, mantendo a homeostasia celular, bem como aumentando sua resistência contra agentes lesivos, como por exemplo, o ácido clorídrico endógeno, etanol, medicamentos, alimentação, componentes do cigarro, entre outros (CHANG et al., 2007). Estão envolvidas em eventos celulares, como empacotamento, montagem e transporte de proteínas, que protegem as células dos efeitos citotóxicos da agregação protéica produzida por pelos agentes lesivos da mucosa (KONTUREK et al., 2008). HSP-70 é uma das mais importantes HSPs na proteção da mucosa gástrica, pois sua superexpressão pode promover a cura da úlcera por aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa e a multiplicação celular. A superexpressão da HSP-70 tem sido observada em ratos com

úlceras gástricas agudas e crônicas, gastrite atrófica crônica e em pacientes com câncer gástrico. (TSUKIMI; OKABE, 2001).

A razão do surgimento das úlceras pépticas não é bem compreendida, no entanto, sabe-se que a maioria dos casos de úlcera gástrica e duodenal estão associados com a infecção por *H. pylori*. (NAPOLITANO, 2009; MARCUS et al., 2013). O segundo maior fator etiológico da úlcera gástrica é a utilização de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (DAINEs). Entre as DAINEs, estão os medicamentos utilizados para analgesia, agentes anti-inflamatórios e os que possuem efeitos anti-agregantes plaquetários. Essa classe de drogas está entre os medicamentos utilizados com maior frequência em todo o mundo (CHASON, R. D.; REISCH, J. S.; ROCKEY, 2013). Além desses fatores, a etiologia da doença pode estar relacionada com a doença de Chron, hipercalcemias, linfomas, mastocitose sistêmica, hiperfunção de células G, infecção por *Helicobacter heilmannii*, citomegalovírus ou herpes do tipo I (CASTRO et al., 2009). Para uma pequena parcela de indivíduos com úlcera gástrica não se identifica a causa etiológica da doença; são os casos de úlceras idiopáticas (CHOW; SUNG, 2007).

Essas condições patológicas provocam um aumento na produção de substâncias agressoras (HCl e pepsina) e redução de substâncias protetoras (prostaglandinas, muco e bicarbonato) da mucosa gástrica (BRZOZOWSKI, 2003). O ácido clorídrico é produzido nas glândulas gástricas do corpo e fundo do estômago numa concentração de 150 a 160 mEq/L, por um processo que possui como enzimas centrais a anidrase carbônica e a H⁺,K⁺-adenosina trifosfato (H⁺, K⁺-ATPase), cuja atividade é regulada por vários fatores neuroendócrinos que regulam a secreção ácida. Também produz fator intrínseco, importante na absorção da vitamina B12 (COLLARES-BUZATO; ARANA, 2005).

A produção do ácido depende também da secreção da histamina a partir das células enterocromafins de forma parácrina, da acetilcolina lançada a partir de neurônios entéricos pós-ganglionares de forma neuronal e da gastrina liberada das células G de forma hormonal (SCHUBERT; PEURA, 2008). Os receptores para acetilcolina e gastrina estão acoplados à proteína G α q (subunidade α da proteína G, classe q), que liberando cálcio dos reservatórios intracelulares para o citosol, ativa proteínas quinase dependentes de calmodulina (PKC); também aumentam os níveis de diacilglicerol (DAG) que também ativam PKC. A histamina, por sua vez, ativa a proteína G α s, acoplada à adenilato ciclase da membrana, aumentando os níveis de AMP cíclico. O aumento na concentração de AMPc intracelular (na ordem de 10 nM) culmina na ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA). Essa enzima é

composta por duas subunidades: uma reguladora (R), com alta afinidade pelo AMPc, e uma catalítica (C). Na ausência de AMPc, a subunidade C torna-se inativa pela formação de um complexo tetramérico R_2C_2 . A ligação do AMPc à subunidade R induz mudanças conformacionais que resultam na dissociação da haloenzima inibida e consequente ativação da PKA, que em seguida pode fosforilar estruturas intracelulares, obtendo uma resposta específica ao estímulo agonista (MOURA, P. R.; VIDAL, 2011).

Ambos os segundos mensageiros, Ca^{2+} intracelular e AMPc, ao ativar as cinases PKA e PKC, levam à translocação da bomba de prótons gástrica (H^+,K^+ -ATPase) das membranas tubulovesiculares da célula parietal, e dos canais para cloro, para a superfície celular apical, resultando em secreção ácida para o lúmen (SCHUBERT, 2005; COLLARES- BUZATO; ARANA, 2005).

O principal inibidor da secreção ácida gástrica é a somatostatina, que no estômago é liberada das células D do corpo e do antro gástrico (DIMALINE; VARRO, 2007). Atua inibindo a secreção de ácido agindo diretamente nas células parietais e indiretamente por inibir a secreção de histamina e de gastrina (HOU; SCHUBERT, 2006). Age também reduzindo os níveis de Substância P (neuropeptídeo envolvido em processos inflamatórios), de polipeptídeo intestinal vasoativo (PIV) e de leucotrienos em lesões gástricas induzida etanol (KARMELI et al., 1994), e também reduz lesões da mucosa induzidas por estresse através da indução de fatores antioxidantes, anti-inflamatórios e anti-apoptóticos (NASSAR et al., 2011). Suas ações são mediadas por receptores acoplados à proteína G inibitória (G_i), sendo o subtipo SSTR2 o regulador predominante da secreção ácida gástrica (SCHUBERT, 2005). O receptor de somatostatina, acoplado à proteína G_i , inibe a via acoplada à $G_{\alpha s}$, e, em algumas células, como às ECL, inibem também a via acoplada à $G_{\alpha q}$. A inibição desta última via explica o efeito do SSTR2 no bloqueio da estimulação da secreção ácida pela gastrina (ATHMAN et al., 2000).

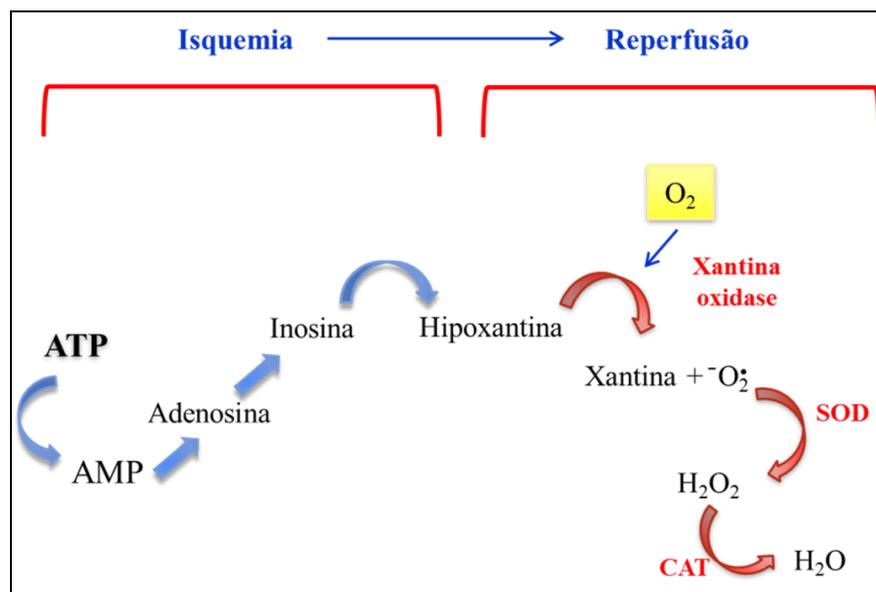
Outro fator que pode desencadear a formação de úlceras gástricas é a isquemia que resulta em necrose tecidual, formação de espécies reativas de oxigênio e inibição da condução de nutrientes. Todo este processo é provocado por lesões microvasculares e vasculares causadas por trombose, constrição e outras oclusões (TARNAWSKI; HOLLANDER; STACHURA, 1990; ANTONIUCCI, 2014)

Durante a fase de isquemia, ocorre diminuição do aporte de oxigênio para o tecido acometido, levando à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e à queda da produção e estoque de trifosfato de adenosina (ATP). No entanto, o estoque de ATP continua sendo

consumido e degradado à difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) e, posteriormente, em adenosina, inosina e hipoxantina. A falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio/potássio (Na^+/K^+ -ATPase) e, devido à falência da bomba, pode haver maior acúmulo de Na^+ intracelular e perda de canais para fora da célula, com consequente edema celular. Ao mesmo tempo, estará ocorrendo influxo de íon Ca^{2+} no citosol e este acúmulo provocará a ativação da protease calpaína que, por sua vez, promoverá a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), levando à formação da enzima xantina oxidase (XO), que necessita de oxigênio para realizar a conversão da hipoxantina em xantina. Assim, na fase de isquemia, ocorrerá acúmulo de hipoxantina e xantina oxidase (RIBEIRO; YOSHIDAW, 2005).

Paradoxalmente, a restauração do fornecimento sanguíneo provoca lesão celular adicional devido à reintrodução do oxigênio e consequente formação de EROs (PARKS, D. A.; GRANGER, 1986). Com a reperfusão, a hipoxantina será então oxidada à xantina, e esta, em ácido úrico, tendo como subproduto dessa reação a formação de ânion superóxido (O_2^-). O radical superóxido promove a liberação do íon ferroso da ferritina, o qual reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando ânion hidroxila (OH^-), que é altamente tóxico (Figura 3) (RIBEIRO; YOSHIDAW, 2005).

Figura 3. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) após um processo de isquemia tecidual, seguido por reperfusão sanguínea.



ATP: Adenosina trifosfato; AMP: Adenosina monofosfato; O_2^- : ânion superóxido; O_2 : oxigênio molecular; H_2O : água; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase;

Histologicamente, uma úlcera consiste de duas características principais: margem da úlcera, formada pela mucosa adjacente não necrótica, que é o componente epitelial; tecido de granulação, que é componente do tecido conectivo. Este último consiste de fibroblastos e macrófagos da proliferação de células endoteliais que formam microvasos (TARNAWSKI, 2005). A úlcera é, então, reparada através de crescimento e formação de glândulas gástricas, crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), reinervação da mucosa por nervos intrínsecos e extrínsecos, além de deposição de matriz extracelular; todos os eventos conduzem à formação da cicatriz (WALLACE; MA, 2001; TARNAWSKI, 2005).

Os fatores de crescimento são os principais estimuladores da proliferação, divisão, migração e re-epitelização (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1999). A ulceração desencadeia nas células da superfície da mucosa, da margem da úlcera, a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF), peptídeos trefoil (TFF) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2), de forma sincronizada espacial e temporalmente (MILANI; CALABRO, 2001). Estes fatores produzidos localmente ativam a proliferação e estimulam a migração celular, por induzirem rearranjos no esqueleto de actina, por vias endócrinas e parácrinas (TARNAWSKI, 2005).

O crescimento do tecido de granulação e a formação de novos microvasos através da angiogênese estimulada por bFGF, VEGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoietinas, e possivelmente outros fatores de crescimento e citoquinas IL-1 e TNF- α (TARNAWSKI, 2005) é essencial na resolução do processo. Dentre os peptídeos angiogênicos que têm sido identificados, VEGF é o mitógeno específico das células endoteliais, porque seus receptores VEGF-R1 ou VEGF-R2 são primariamente restritos às células endoteliais; sua ligação aos receptores inicia a fosforilação de numerosas proteínas citosólicas envolvidas na transdução do sinal que desencadeia proliferação de células endoteliais, migração e formação de tubos microvasculares (FERRARA, 2004).

A terapêutica da úlcera gástrica inclui o controle farmacológico da secreção ácida gástrica por bloqueio das ações da histamina em todos os receptores H₂. As drogas anti-H⁺ promovem cicatrização das úlceras duodenais, conforme evidenciado em estudos clínicos (WELAGE, 2005). Os anticolinérgicos também podem inibir a secreção ácida por si mesmos, através do bloqueio de receptores muscarínicos. No entanto, o uso de anticolinérgicos é geralmente limitado, uma vez que essas drogas, nas doses necessárias para a inibição de ácido gástrico, provocam vários efeitos adversos, como boca seca, visão turva,

taquicardia e disfunção da bexiga. Apenas os antagonistas seletivos dos receptores muscarínicos M_1 (M_1R), como pirenzepina e terenzepine, têm sido utilizados clinicamente, pois os efeitos colaterais ocorrem com menor frequência (AIHARA et al., 2002).

A descoberta dos antagonistas dos receptores H_2 em 1972 revolucionou a terapêutica da úlcera. Drogas como cimetidina, ranitidina e famotidina bloqueiam os receptores H_2 , impedindo a ligação da histamina no seu receptor e, conseqüentemente, promovem a redução da secreção ácida (BLACK et al., 1972). Os antagonistas dos receptores H_2 são bem tolerados, com efeitos adversos observados em apenas 1,5% dos pacientes, os quais incluem confusão mental, ginecomastia, nefrite intersticial, além de interagir com enzimas do complexo enzimático citocromo P450 (SHUBERT; PERUA, 2008).

A identificação da bomba de prótons, H^+/K^+ -ATPase, como a via final da secreção ácida gástrica proporcionou uma oportunidade única para desenvolver uma nova classe de agentes que inibem a secreção ácida. (FELLENIUS et al., 1981). Representam pró-drogas, que são convertidos em formas ativas em ambientes ácidos (NAGAYA et al, 1989; SATOH et al, 1989). Estudos clínicos em animais demonstraram que o efeito anti-secretor de drogas inibidores da bomba de ácido persiste por um longo tempo (> de 24 h após uma única dose), devido a uma ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+/K^+ -ATPase (LEE et al., 1992).

Os principais representantes dessa classe são omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol. Mesmo sendo seguros e eficazes, os inibidores da bomba de prótons têm manifestado efeitos adversos relacionados com hipergastrinemia, hipersecreção ácida rebote, má absorção, infecção e câncer (JAIN et al., 2007).

Quando a úlcera péptica está associada à infecção por *Helicobacter pylori*, o tratamento é feito através de uma combinação de inibidores de bomba protônica ou antagonistas de receptores H_2 com dois antibióticos por um período de 7 a 10 dias (MALFERTHEINER et al., 2002). O FDA (Food and Drug Administration) aprovou alguns regimes, que são aceitos internacionalmente, para o tratamento da infecção por *H. pylori* em pacientes com úlcera péptica gástrica ou duodenal. Estes regimes são também conhecidos como terapias triplas e apresentaram taxas de cura entre 85-90%. Infelizmente, com o crescente aumento da resistência antimicrobiana tem havido um aumento na taxa de falha da terapia tripla padrão para a infecção por *H. pylori* (HSU et al., 2014)

Entre os regimes de tratamento adotados estão: associação de omeprazol, amoxicilina e claritromicina (O-A-C) durante 10 dias; subsalicilato de bismuto, metronidazol e

tetraciclina (B-M-T) durante 14 dias; e lansoprazol, amoxicilina e claritromicina (L-A-C), durante 10 ou 14 dias de tratamento. A escolha de um regime eficaz de erradicação da *H. pylori* deve ser baseada em padrões de resistência anti-bacterianos locais. (TANG; CHAN, 2012; APOSTOLOPOULOS et al., 2016).

Além das drogas que promovem a inibição da secreção ácida, a terapia da úlcera gástrica envolve o uso de agentes farmacológicos que aumentam os fatores protetores da mucosa, como os citoprotetores. São representantes desta classe o sucralfato, misoprostol (análogo da prostaglandina E₂), e a carbenoxolona, entretanto todos induzem vários efeitos colaterais (MÖSSNER; CACA, 2005)

Os efeitos colaterais agravados pela utilização prolongada destes fármacos levam à busca de alternativas que associem múltiplas ações, reduzindo os mecanismos reflexos compensatórios. Uma das alternativas seria a descoberta e/ou o estudo de produtos derivados de plantas medicinais, como por exemplo, os óleos essenciais, pois espécies aromáticas contendo esses compostos têm sido usadas desde a antiguidade devido a suas propriedades terapêuticas (DE SOUSA, 2012)

1. Considerações gerais sobre os óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são uma mistura de compostos voláteis caracterizados por apresentarem sabor e odor intenso. Geralmente estão presentes em temperos, ervas aromáticas, frutas e flores (TROMBETTA et. al., 2005; SHERRY et. al., 2013). Os compostos que os compõem são lipofílicos, apresentando solubilidade em solventes orgânicos apolares com aparência oleosa à temperatura ambiente; são extraídos, principalmente, através de destilação por arraste com vapor d'água e, logo após a extração, são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados. Os OEs consistem, principalmente, de dois grupos biossinteticamente distintos de baixo peso molecular: terpenos e fenilpropanóides (BAKKALI et al. 2008).

A composição química dos óleos essenciais pode variar dependendo do clima, da estação do ano, das condições geográficas, do período de colheita e da técnica empregada na extração (enfloração, prensagem a frio, destilação a vapor, dentre outras) (SANTOS et. al., 2010). A concentração desses terpenos em uma determinada espécie vegetal funciona como repelentes naturais para alguns predadores, atrair insetos polinizadores e contribuir para a interação com outras espécies vegetais.

Os terpenos são produtos do metabolismo secundário de espécies vegetais e representados predominantemente por monoterpenos, sesquiterpenos e derivados fenilpropanóides (TIAN et. al., 2011). Quimicamente, os terpenos são usualmente caracterizados como hidrocarbonetos insaturados com diferentes quantidades de oxigênio ligados ao seu esqueleto isoprênico. A nomenclatura dos terpenóides depende basicamente do número de estruturas isoprênicas e dos átomos de carbono presentes na molécula (WAGNER; ELMADFA, 2003). Estudos anteriores mostram que os terpenos podem apresentar atividade antimicrobiana contra um grande número de espécies de microrganismos (fungos e bactérias) incluindo espécies resistentes aos antimicrobianos presentes no mercado, fazendo com que estas substâncias sejam de grande interesse para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (CARSON et. al., 1995; OLIVEIRA et. al., 2008).

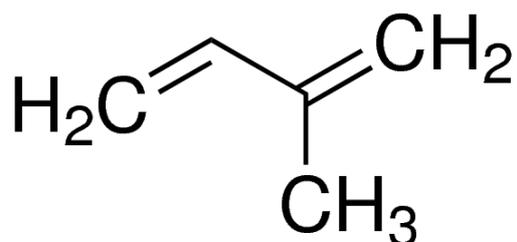
Diversos terpenóides, incluindo lactonas sesquiterpênicas, diterpenos e triterpenos, foram avaliados cientificamente quanto ao seu potencial antiulcerogênico (ALMEIDA et al., 2014). Estes compostos têm potencial para utilização em tratamento de úlcera péptica. A atividade gastroprotetora destes produtos naturais podem ser atribuídas a vários mecanismos, tais como varredura de radicais livres, inibição da secreção de ácido, atividade contra *H. pylori*, e fortalecimento da gástrica barreira mucosa (OLIVEIRA et al., 2014). Rozza e colaboradores (2013) examinaram a atividade de alguns óleos essenciais tradicionalmente utilizados no tratamento de úlceras gástricas, e considerou suas famílias e a parte da planta a partir da qual os óleos foram isolados. Entretanto, o único terpenóide já comercializado para o tratamento de úlceras gástricas foi a Carbenoxolona, um triterpeno pentacíclico derivado do ácido glicirretínico (U.S. Patent 3.070.623). Sintetizada em 1960, pela Biorex Laboratories, a Carbenoxolona foi amplamente usada na Europa para o tratamento de úlceras gástricas. Entretanto, seus efeitos benéficos eram acompanhados por graves efeitos colaterais em um número significativo de pacientes, atualmente é usada somente como ferramenta farmacológica em testes laboratoriais para estudos de novas drogas (BAKER, 1994; DZUBAK et al., 2006).

2. Considerações gerais sobre o monoterpeno (-)-Borneol

Estima-se que hajam aproximadamente 30.000 terpenos identificados. Entre estes estão os monoterpenos, substâncias originadas de produtos naturais e formadas por duas

unidades de isopreno (Figura 4). São lipofílicos, voláteis e quimicamente instáveis podendo ou não apresentar atividade biológica (KUPSKA et al, 2014).

Figura 4: Estrutura geral do isopreno.

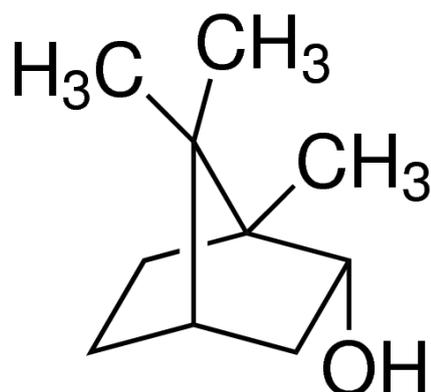


Fonte: KUZUYAMA E SETO, 2003.

Embora a atividade biológica dos monoterpenos esteja descrita na literatura, são poucos os relatos de atividade relacionada a substância isolada. É sabido que óleos essenciais que apresentam composição majoritária de monoterpenos como o β -mirceno, o citral, o limoneno e o 1,8-cineol, possuem atividade antimicrobiana frente a diferentes espécies de fungos e bactérias como *C. albicans*, *Aspergillus* sp., *C. perfringens*, *S. aureus*, *S. mutans*, entre outros (Unlu et. al., 2002; Saddig et. al., 2010; Singh et. al., 2010; Tavares et. al., 2010).

A substância Endo-(1S)-1,7,7-trimetilbicíclico[2.2.1]heptan-2-ol [(-)-Borneol (C₁₀H₁₈O)] (Figura 5) é um monoterpeno bicíclico presente em óleos essenciais de muitas plantas medicinais, incluindo espécies das famílias Dipterocarpaceae (*Dipterocarpus turbinatus* C. F. Gaertn. e *Dryobalanops* spp.), Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt.), Valerianaceae (*Valeriana officinalis* L.), Asteraceae (*Matricaria chamomilla* L. e *Blurnea balsamifera* L.) (HORVÁTHOVÁ et al., 2009), Lauraceae (*Cinnamomum camphora* L.) (XIAO-FEI, 2008), Myristicaceae (*Myristica fragans* Houtt.), Pinaceae (*Pinus sylvestris* L.), Poaceae (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.), Apiaceae (*Coriandrum sativum* L.) e Verbenaceae (*Lippia adoensis* Hochst) (RAVID et al., 1996)

Figura 5. Estrutura geral do Borneol.



Fonte: XIONG, et al., 2013

De acordo com a Farmacopeia da República Popular da China, o Borneol está presente em cerca de 63 produtos à base de plantas e pode ser encontrado em duas formas: o Borneol sintético que é uma mistura de (+)/(-)-Borneol (ou D/L-borneol) e isoborneol; e o Borneol natural (extraído da matéria prima), cujo principal componente é o (+)-Borneol (D-Borneol). O teor de (+)/(-)-Borneol na mistura sintética representa pelo menos 55,0% da composição e no Borneol natural, o teor de (+)-Borneol chega a ser maior que 95,0% (SILVA-FILHO et. al., 2012). Antes de 1949 o Borneol natural foi importado para a China e usado em tradicional Medicina chinesa. Depois de 1949, houve uma escassez de Borneol natural, por isso que foi gradualmente substituído por Borneol sintético (XIAO-FEI et al., 2008).

Estudos farmacológicos comprovaram os efeitos do Borneol como sendo bacteriostáticos para vários microorganismos Gram positivos e Gram negativos (KNOBLOCH et al., 1989; TABANCA et al., 2001) e possuidor de atividade antifúngica (KNOBLOCH et al., 1989; WENQIANG et al., 2006). Também apresentou efeitos antioxidantes (CANDAN et al., 2003; KORDALI et al., 2005) e imunomodulatório (JUHÁ et al., 2008), atividade anti-trombótica e anti-agregante plaquetário (LI et al., 2008). Além disso, o Borneol (50 mg/kg, v.o.) apresentou significativo efeito antihipertensivo em ratos cuja hipertensão foi induzida por L-NAME (40 mg/kg, v.o.) (RAJA et al., 2010), atividades cicatrizante tópica (BARRETO et al, 2016), anti-inflamatória e antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2013) e baixa toxicidade (HORVÁTHOVÁ et al., 2009). Pesquisas mostraram que Borneol pode ser utilizado para melhorar a penetração de drogas através da pele, da mucosa

gastrintestinal, da mucosa nasal, da córnea e da barreira hematoencefálica (ZHENG et al., 2008).

O Borneol é usado como um ingrediente importante em fórmulas de incenso japonesas com efeitos sobre o SNC (LEHRNER et al., 2005; KOMIYA et al., 2006) através da ativação do neurotransmissor GABA (GRANGER et al., 2005). Na medicina popular, o Borneol é usado para o tratamento de dor abdominal, particularmente dor de estômago (WANG et al., 2006), para aplicação em feridas, queimaduras, para aliviar dores reumáticas, hemorróidas, doenças de pele e ulcerações da boca, ouvidos, olhos ou nariz e na aromaterapia (SVOBODA; HAMPSON, 1999).

Mühlbauer et al. (2003) e Dolder et al. (2006) relataram que óleos essenciais contendo Borneol se mostraram eficazes na inibição da reabsorção óssea *in vivo* e *in vitro*, provavelmente através de um efeito direto sobre a formação de osteoclastos, agindo principalmente em células hematopoiéticas. Foi relatado na literatura que os óleos voláteis agem geralmente por meio de sua fração lipofílica que reagem com as membranas celulares, e como resultado, influenciam a atividade de enzimas, transportadores, canais iônicos e receptores (ZHENG, 2008). Efeitos imunomoduladores do Borneol foram estudados por Juhás et al. (2008) que demonstraram que o Borneol é capaz de suprimir a expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias no cólon de camundongos. Além disso, há relatos de que o Borneol age como substância bioativa no processo de transdução de sinal celular (PARK et al., 2003).

Além disso, Borneol (50 mg/kg, v.o.) mostrou efeito anti-hipertensor significativo em ratos hipertensos (RAJA et al., 2010) e efeito vasorelaxante em estudos *in vitro* com aorta de ratos (SILVA-FILHO et al., 2012). Possui baixa toxicidade, com uma DL50 oral para ratos de 5,800 mg/kg. Além disso, tem sido demonstrado que Borneol poderia melhorar a penetração de fármacos através da pele, da barreira gastrointestinal e mucosa nasal, da córnea e da barreira hematoencefálica (LI et al., 2007). Borneol tem efeitos sedativo e anticonvulsivo, com efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Por esse motivo, alguns pesquisadores têm mostrado seu potencial em acelerar a abertura da barreira hematoencefálica (BHE), e melhorar a distribuição de drogas no tecido nervoso (CAI et al., 2008; DAI et al., 2009; LU et al., 2011).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a viabilidade farmacológica e toxicológica para o desenvolvimento de novos produtos à base do Borneol. No entanto, o mesmo apresenta limitações como insolubilidade em água, fácil sublimação e transformação

à cânfora, um composto potencialmente tóxico (BHATIA et al. 2008). Assim, como a maioria dos fármacos, não poderia ser administrada na forma de substância química pura, sendo necessária sua veiculação em formulações farmacêuticas (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

A resposta biológica de um fármaco é resultado de sua interação com os receptores celulares de sistemas enzimáticos, sendo que a magnitude da resposta depende da concentração do fármaco que atinge o local de ação (SIEPMANN, 2012; GUREVICH, 2013). A concentração de fármaco biodisponível está relacionada com as propriedades físico-químicas e a estabilidade do produto final (GUAN et al, 2014). Fármacos poucos solúveis frequentemente apresentam comportamento de biodisponibilidade in vivo inferior quando comparados àqueles de alta solubilidade (SPRICIGO et al., 2008; LIMA et al., 2008).

De maneira geral, os fármacos ou compostos de interesses farmacêuticos não apresentam propriedades físico-químicas intrinsecamente adequadas para atravessar as barreiras biológicas e desenvolver a resposta terapêutica. Diante disso, artefatos tecnológicos são usados para aperfeiçoar a biodisponibilidade dos fármacos, ora interferindo na solubilidade, ora na estabilidade. A solubilidade de uma droga constitui um importante fator para que ocorram absorção e obtenção de resposta terapêutica, para a maioria dos fármacos administrados por via oral (RAMA et al., 2006). O confinamento de fármacos em sistemas de transporte e direcionamento, como os complexos de inclusões, lipossomas, nanopartículas, dispersão sólida, formação de sal e conjugações com moléculas de estrutura polimérica, além de sistemas multicomponentes solúveis em água, são algumas das estratégias adotadas (DAVIS, 2013). Por estas técnicas tenta-se aumentar a solubilidade aparente de compostos lipofílicos sem diminuir a otimização de seu potencial (LIMA et al., 2011).

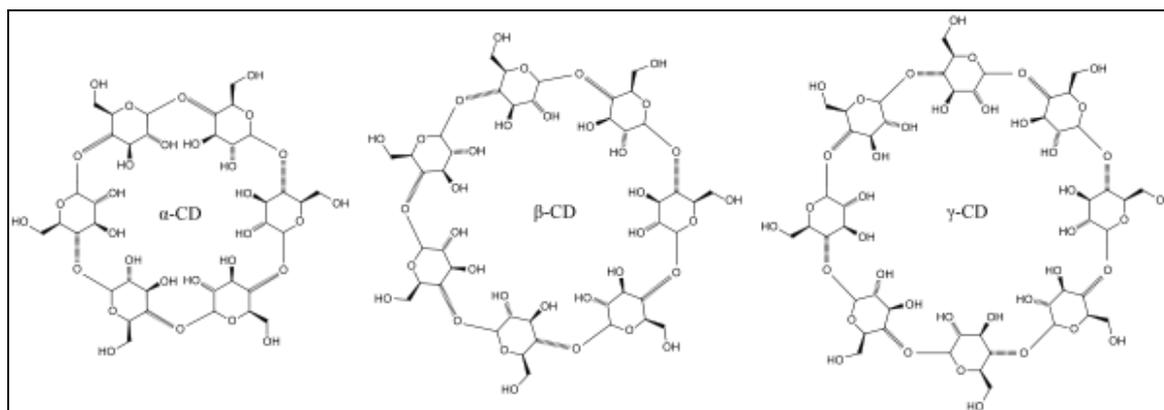
3. Ciclodextrinas

As Ciclodextrinas (CD) são compostos não tóxicos, capazes de formar complexos de inclusão e conseqüentemente estabilizar um largo espectro de substâncias. Essa característica, juntamente com outras propriedades, faz delas um grande atrativo para variado numero de aplicações industriais (KURKOV; LOFTSSON, 2013). As vantagens em relação ao uso e a disponibilidade das ciclodextrinas explicam o crescente interesse pelas mesmas. São aplicadas na indústria alimentícia, farmacêutica, em cosméticos, pesticidas, em

tecnologia química, em química analítica, etc (DUCHENE *et al.*, 1999; DAVIS e BREWSTER, 2004; YANG *et al.*, 2012).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4, originados da degradação do amido pelas enzimas glicosiltransferases, sintetizadas por alguns microrganismos (JUN *et al.*, 2007). As que são obtidas com maior rendimento são comumente conhecidas como CDs naturais e contém seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrinas (γ -CD) respectivamente (CANNAVÀ *et al.*, 2008) (Figura 6). Nessas moléculas, os grupos hidroxilas primários e secundários estão orientados para o exterior do anel formado, na porção estreita e larga respectivamente, conferindo-lhe um exterior bastante hidrofílico e uma cavidade hidrofóbica, onde as moléculas hóspedes ou parte delas são encapsuladas (SÁ-BARRETO; CUNHA-FILHO, 2008).

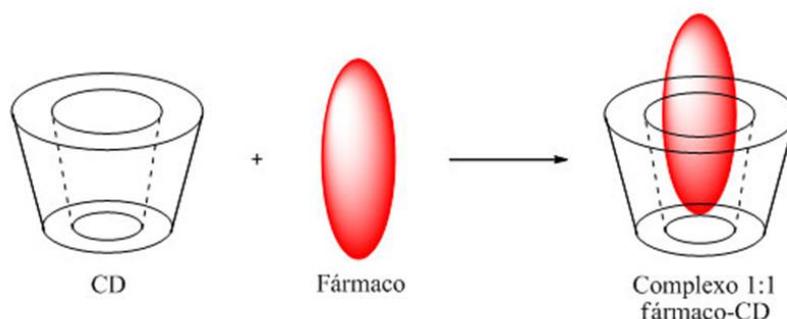
Figura 6. Estrutura química das ciclodextrinas α , β e γ .



Fonte: Laza-Knoerr, A. L.; Gref, R.; Couvreur, P. Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, v. 18, n. 9, p. 645–656, 2010.

Na complexação, vários fenômenos estão envolvidos, como: substituição de um estado energeticamente desfavorável para um estado mais estável, causado pela saída de água e entrada da substância ativa; Interações eletrostáticas de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão (CIs) (GORNAS *et al.*, 2009) (Figura 7). É necessário ter condições ideais para se obter a efetiva encapsulação molecular. Isso significa dizer que, nem toda molécula com limitações de solubilidade seja complexada.

Figura 7. Representação do equilíbrio de ligação de uma droga com uma ciclodextrina para formar um complexo de inclusão na proporção de 1: 1.



Fonte: adaptado de STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, v. 36, p. 30-42, 2008.

A solubilidade da CD, o método de complexação e a proporção de fármaco/CD no complexo são fatores que podem determinar o grau de dissolução do fármaco. O aumento da solubilidade resultante da complexação com as CD's está associado à sua capacidade de reduzir a tensão interfacial entre o fármaco e o meio de dissolução, devido às suas propriedades molhantes e também à redução da cristalinidade dos compostos, uma vez que compostos com características amorfas são mais facilmente solúveis que compostos mais cristalinos (RAMA et al., 2006; SOARES-SOBRINHO et al., 2011). Os métodos mais comuns utilizados na preparação de CI's no estado sólido são a malaxagem, a liofilização, a rotaevaporação, a co-precipitação, a secagem por pulverização, o aquecimento em recipiente fechado, a aplicação de fluidos supercríticos, entre outros. A escolha do método de preparação de CI's terá de ser desenvolvido e investigado para cada sistema de complexação em estudo. Aspectos importantes como o rendimento do produto obtido, podem condicionar a escolha do método de complexação, assim como a facilidade de transposição de escala laboratorial para industrial (STELLA; HE, 2008). A preparação de CI's fármaco-CD envolve a formação de pós microcristalinos ou amorfos. Porém não existe nenhuma segurança de que o fármaco realmente tenha sido incorporado ao CI, pois a formação dos complexos em solução não garante a sua obtenção e isolamento no estado sólido. O produto sólido resultante pode ser apenas uma dispersão fina do fármaco na superfície da CD sob a forma hidratada. Por essa razão, a caracterização físico-química dos produtos resultantes no estado sólido torna-se indispensável, para que se faça uma avaliação da eficiência de complexação dos diferentes métodos de preparação utilizados (RIBEIRO, 2005).

Ao aumentar a solubilidade de uma substância, pode-se favorecer o desenvolvimento de formulações com eficácia em doses menores, já que isso significaria um maior percentual

de fármaco absorvido. Com isso, as formulações obtidas teriam seus custos reduzidos, possibilitando maior acesso aos fármacos, menores investimentos em medicamentos adicionais para tratar efeitos colaterais, maior adesão ao tratamento visto que os efeitos adversos estariam reduzidos e maiores investimentos na melhoria dos serviços de atenção à saúde (SOARES-SOBRINHO et al., 2011).

As β -ciclodextrinas são as CDs naturais com maior aplicação no setor farmacêutico, pois apesar da sua limitada solubilidade em água (solubilidade em água a 20 °C; 1,85 g/100 mL), apresenta um elevado rendimento e baixo custo (GAVINI, 2011; KRANAWETVOGL et al, 2013).

A toxicidade das CDs esta diretamente vinculada à absorção sistêmica e consequentemente é dependente da via de administração. Na administração oral de CDs, estudos comprovam sua inocuidade a elevadas doses (American Pharmaceutical Association, 2006). Em um estudo feito por Le, et al. (2014) a β -CD, administrada oralmente, não induziu alterações no peso corporal, no crescimento, nos valores bioquímicos e hematológicos de ratos e cães em doses superiores a 600 mg/kg. Não foi observado também mutagenicidade ou teratogenicidade com doses inferiores a 400 mg/kg. Para a β -CD, a administração de preparados por via endovenosa e parenteral provoca precipitação microcristalina desta CD nos rins devido a sua limitada solubilidade, além da formação de complexos com o colesterol, provocando nefrotoxicidade grave (DAVIS, BREWSTER, 2004; LE et al, 2014; YAO et al, 2014; KURKOV; LOFTSSON, 2013).

REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, p. 105-127, 2001.

ABOUL-ENEIN, H. Y.; KŁADNA, A.; KRUK, I. Radical scavenging ability of some compounds isolated from Piper cubeba towards free radicals. **Luminescence**. v. 26, n. 3, p. 202-7, 2011.

AIHARA, T.; FUJISHITA, T.; KATAOKA, N.; KANATANI, K.; AMAGASE, K.; OKABE, S.; MATSUI, M.; TAKETO, M. M.; CHEN, D. Role of muscarinic acetylcholine M3- and M1-receptors in gastric acid secretion in mice; studies with receptor knockout mice. **Gastroenterology** v. 122, p. A-252, 2002.

ALI, A. T. The role of nitric oxide and sulphydryls in gastric mucosal protection induced by sodium cromoglycate in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, p. 739-743, 1995.

ALLEN A.; FLEMSTRÖM G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 288, p. C1-19, 2005.

ALMEIDA, A. B.; LUIZ-FERREIRA, A.; COLA, M.; DI PIETRO MAGRI, L.; BATISTA, L. M.; PAIVA, J. A.; TRIGO, J. R.; SOUZA-BRITO, A. R. Anti-ulcerogenic mechanisms of the sesquiterpene lactone onopordopicrin-enriched fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): role of somatostatin, gastrin, and endogenous sulphydryls and nitric oxide. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, p. 378-383, 2012.

ALMEIDA, J. R. G. S. ; SOUZA, G. R. ; Silva, J.C. ; SARAIVA, S. R. G. L. ; OLIVEIRA JUNIOR, R. G. ; QUINTANS, J.S.S. ; BARRETO, R. S. S. ; BONJARDIM, L. R. ; Cavalcanti, S.C.H. ; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. . Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. **Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th.ed. London: **Pharmaceutical Press**. p. 918, 2006.

ANTONIUCCI, D. Block the Ischemia and Reperfusion Damage: An Old Adjunctive Drug for a New Reperfusion Strategy. **Journal of the American College of Cardiology**, v.63, n. 22, p.2363-2364, 2014.

APOSTOLOPOULOS, P.; KOUMOUTSOS, I.; EKMEKTZOGLOU, K.; et al. Concomitant versus sequential therapy for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: a Greek randomized prospective study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 2, p.145-51,2016.

ATHMANN, C., ZENG, N., SCOTT, D.R., SACHS, G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. **American Journal of Physiology**, v. 279, p. G1048-G1058, 2000.

ATIG, F.; RAFFA, M.; ALI, H. B.; ABDELHAMID, K.; SAAD, A.; AJINA, M. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 139-149, 2012.

BAKER, M. E. Licorice and enzymes other than 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: an evolutionary perspective. **Steroids**, v. 59, n. 2, p. 136-141, 1994.

BAKER, R. D.; COOK, C. O.; GOODWIN, D. C. Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 3, p. 833-839, 2004.

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

BARRETO, ROSANA SS ; QUINTANS, JULLYANA SS ; BARRETO, ANDRÉ S ; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, RICARDO LC ; GALVÃO, JULIANA G ; GONSALVES, JOICE KMC ; NUNES, ROGÉRIA S ; CAMARGO, ENILTON A ; LUCCA-JÚNIOR, WALDECY ; SOARES, ROSILENE C ; FEITOSA, VERA LÚCIA C ; QUINTANS-JÚNIOR, LUCINDO J . Improvement of wound tissue repair by chitosan films containing (-)-Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, in rats. **International Wound Journal** (Print), v. 13, p. n/a-n/a, 2016.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, 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.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; DEY, S.; PAL, C.; GOYAL, M.; ALAM, A.; IQBAL, M. S.; SARKAR, S.; AZHAR SIDDIQUI, A.; BANERJEE, C.; BANDYOPADHYAY, U. Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NFkappaB activation and neutrophil infiltration: anti-inflammatory role of heme oxygenase1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 456-467, 2013.

BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A.; DURANT, C. J.; GANELLIN, C. R.; PARSONS, E. M. Definition and antagonism of histamine H2-receptors. **Nature**, v. 236, p. 385- 390, 1972.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment - Polish achievements. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 3, p. 99-126, 2003.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKA, I.; PAWLIK, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 33-55, 2005.

CAI, Z., HOU, S., LI, Y., ZHAO, B., YANG, Z., XU, S., PU, J. Effect of Borneol on the distribution of gastrodin to the brain in mice via oral administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 2, p. 178-184, 2008.

CANDAN, F.; UNLÜ, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, H. A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215–220, 2003.

CANNAVÀ, C.; CRUPI, V.; FICARRA, P.; GUARDO, M.; MAJOLINO, D.; STANCANELLI, R.; VENUTI, V. Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV–vis and FTIR-ATR spectroscopies. **Vibrational Spectroscopy**, 48:172–8, 2008.

CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 35, 421-424, 1995.

CASTRO, L. P.; COELHO, L. G. V.; VIEIRA, W. L. S. V.; RODRIGUES, M. A. G. **Úlcera Péptica Gastroduodenal**. Tratado de Clínica Médica. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Roca, 2009.

CHANG, XIAO-RONG, LA PENG; SHOU-XIANG YI; YAN PENG; JIE YAN. Association of high expression in rat gastric mucosal heat shock protein 70 induced by moxibustion pretreatment with protection against stress injury. **World Journal Gastroenterology**. v. 13, p. 4355-4359, 2007.

CHASON, R. D.; REISCH, J. S.; ROCKEY, D. C. More Favorable Outcomes with Peptic Ulcer Bleeding Due to *Helicobacter Pylori*. **The American Journal of Medicine**, v. 126, n. 9, p. 811-818, 2013.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **Journal of Physiology, Paris**, v. 95, p. 253-256, 2001.

CHOW, D.K., SUNG, J.J. Is the prevalence of idiopathic ulcers really on the increase? **Natural Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, p. 176-177, 2007.

COLLARES-BUZATO, C. B.; ARANA, S. Célula Oxíntica. in: CARVALHO, H.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células-uma abordagem multidisciplinar**. Manole: São Paulo, p. 112-125, 2005.

COTRAN RS, KUMAR V, ROBBINS SL: Gastric ulceration. In Robbins **Pathologic Basis of Disease**. 5th Edition. RS Cotran, V Kumar, SL Robbins (eds). Philadelphia, Saunders, p. 298–299, 773–777. 1999.

CURI, R.; PROCÓPIO, J. **Fisiologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

DAI, J.P., CHEN, J., BEI, Y.F., HAN, B.X., WANG, S. Influence of Borneol on primary mice oral fibroblasts: a penetration enhancer may be used in oral submucous fibrosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 3, p. 276-281, 2009.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 3, n. 12, p. 1023-1035, 2004.

DAVIS, S. S. Drug delivery systems. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. 25, n. 3, p. 175-183, 2013.

DE SOUSA, D.P. **Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects**, 1st ed.; Nova Science Publishers: New York, NY, USA, 2012; pp. 1–236.

DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p.611-623, 2006.

DOLDER, S., HOFSTETTER, W., WETTERWALD, A., MÜHLBAUER, R.C., FELIX, R. Effect of monoterpenes on the formation and activation of osteoclasts in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, p. 647–655, 2006.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 3, p. 394-411, 2006.

FELLENIUS, E.; BERGLINDH, T.; SACHS, G.; OLBE, L.; ELANDER, B.; SJOSTRAND, S. E.; WALLMARK, B. Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking H⁺/K⁺-ATPase. **Nature**, v. 290, p. 159-161, 1981.

FERRARA, N., HOUCK, K., JAKEMAN, L. AND LEUNG, D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocrinological Review**, v. 13, p. 18-32, 1992.

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. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.63, p.472-82, 2011.

GORNAS, P.; NEUNERT, G.; BACZYNSKI, K.; POLEWSKI, K. Beta cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. **Food Chemistry**, v. 114, p. 190–196, 2009.

GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E. L.; JOHNSON, G. A. R. (+)- and (-)-Borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant α_1 β_2 γ_{2L} GABA_A receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1101–1111, 2005.

GUAN, J.; HAN, J.; ZHANG, D.; CHU, C.; LIU, H.; SUN, J.; HE, Z.; ZHANG, T. Increased dissolution rate and oral bioavailability of hydrophobic drug glyburide tablets produced using supercritical CO₂ silica dispersion technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 376–382, 2014.

GUREVICH, K. G. Effect of blood protein concentrations on drug-dosing regimes: practical guidance. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.

GYIRES, K. Neuropeptides and gastric mucosal homeostasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 63-73, 2004.

GYIRES, K.; TOTH, V. E.; ZADORI, Z. S. Gastric mucosal protection: from the periphery to the central nervous system. **Journal of Physiology and Pharmacology**, n. 3, p. 1-3, 2015.

HASGUL, R.; UYSAL, S.; HALTAS, H.; AKYOL, S.; YUKSEL, Y.; GUREL, A.; ARMUTCU, F. Protective effects of Ankaferd blood stopper on aspirin-induced oxidative mucosal damage in a rat model of gastric injury. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, p. 888-895, 2014.

HSU, P. I.; WU, D. C.; CHEN, W. C. et al. Randomized controlled trial comparing 7-day triple, 10-day sequential, and 7-day concomitant therapies for Helicobacter pylori infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5936-5942, 2014.

JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S. M.; KALE, A. P.; JAGTAPS, J. R.; BHOSALE, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.

JUHÁS, Š.; ČIKOŠ, Š.; CZIKKOVÁ, S.; VESELÁ, J.; ILKOVÁ, G.; HÁJEK, T.; DOMORACKÁ, K.; DOMORACKÝ, M.; BUJNÁKOVÁ, D.; REHÁK, P.; KOPPEL, J. Effects of Borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. **Folia Biologica (Praha)**, v. 54, p. 1-7, 2008.

KARMELI, F.; ELIAKIM, R.; OKON, E.; RACHMILEWITZ, D. Somatostatin effectively prevents ethanol and NSAID induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 39, p. 617-625, 1994.

KNOBLOCH, K.; PAUI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119-28, 1989.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 172, p. 240-249, 2006.

KONTUREK, P. C.; BURNAT, G.; BRZOZOWSKI, T.; ZOPF, Y.; KONTUREK, S. J. Tryptophan free diet delays healing of chronic gastric ulcer in rat. **Journal Physiology Pharmacology**, v. 59, S. 2, p. 53-65, 2008.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; OCHMAŃSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 19, p. 15-27, 2004.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A.; ÇAKIR, A.; ALA, A.; YILDRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculoides and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, Artemisia dracunculoides, Artemisia santonicum and Artemisia spicigera essential oils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 53, p. 9452-9458, 2005.

KOTANI, T.; KOBATA, A.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TAKEUCHI, K. Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against

ischemia/reperfusion injury in mouse stomach. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, p. 547 – 555, 2006.

KRANAWETVOGL, A.; SCHÜLER, J.; MÜLLER, S.; THIERMANN, H.; WOREK, F.; REITER, G. Elimination pathways of cyclosarin (GF) mediated by β -cyclodextrin in vitro: Pharmacokinetic and toxicokinetic aspects. **Toxicology Letters**. v.222, p.164–170, 2013.

KUPSKA, M.; CHMIEL, T.; JEDRKIEWICZ, R.; WARDENCKI, W.; NAMIESNIK, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries. **Food Chemistry**. v.152, p.88–93, 2014.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, p.167–180, 2013.

KUZUYAMA, T.; SETO, H. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. **Natural product reports**. v. 20, n. 2, p. 171-183, 2003.

KWIECIEN, S.; JASNOS, K.; MAGIEROWSKI, M.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; BRZOSOWSKI, B.; MACH, T.; WOJCIK, D.; BRZOSOWSKI, T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress induced gastric injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, p. 613-622, 2014.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41–60, 2008.

LE, H.T.; JEON, H.M.; LIM, C.W.; KIM, T.W. 6-Triazolyl-6-deoxy- β -cyclodextrin derivatives: Synthesis, cellular toxicity, and phase-solubility study, **Carbohydrate Research**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2014.03.020>. 2014.

LEE, H.; HAKANSON, R.; KARLSSON, A.; MATTSSON, H.; SUNDLER, F. Lansoprazole and omeprazole have similar effects on plasma gastrin levels, enterochromaffin-like cells, gastrin cells and somatostatin cells in the rat stomach. **Digestion**, v. 51, p.125-132, 1992.

LEHRNER, J.; MARWINSKI, G.; LEHR, S.; JOHREN, P.; DEECKE, L. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. **Physiology & Behavior**, v. 86, p. 92–95, 2005.

LI, F.; FENG, J.; CHENG, Q.; ZHU, W.; JIN, Y. Delivery of ¹²⁵I-cobrotoxin after intranasal administration to the brain: a microdialysis study in freely moving rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 161-167, 2007.

LIMA, A.A.; SOARES SOBRINHO, J.L.; SILVA, J.L.; CORRÊA JR, R.A.; LYRA, M.A., SANTOS, F.L.; OLIVEIRA, B.G.; HERNANDES, M.Z.; ROLIM, L.A.; ROLIM NETO, P.J. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benzimidazole solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.6, p. 2443-2451, 2011.

LIMA, A. N.; SOBRINHO, J. L. S.; CORRÊA-Jr, R. A. C.; ROLIM NETO, P. J. Alternative Technologies to Improve Solubility of Poorly Water Soluble Drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 789-97, 2008.

LU, Y., DU, S.Y., CHEN, X.L., WU, Q., SONG, X., XU, B., ZHAI, Y.S., Enhancing effect of natural Borneol on the absorption of geniposide in rat via intranasal administration. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B (Biomed. & Biotechnol.)**, v. 12, n. 2, p. 143-148, 2011.

MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN C, HUNGIN AP, JONES R, AXON A, GRAHAM DY, TYTGAT G. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report., **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**; v. 16, p. 167-80, 2002.

MALMI, H.; KAUTIAINEN, H.; VIRTA, L. J.; FÄRKKILÄ, N.; KOSKENPATO, J.; FÄRKKILÄ, M. A. Incidence and complications of peptic ulcer disease requiring hospitalisation have markedly decreased in Finland. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 39, p. 496–506, 2014.

MARCUS, E. A.; VAGIN, O.; TOKHTAEVA, E.; SACHS, G.; SCOTT, D. R. Helicobacter pylori impedes acid-induced tightening of gastric epithelial junctions. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, p. G731–G739, 2013.

MILANI, S., CALABRO, A. Role of Growth Factors and Their Receptors in Gastric Ulcer Healing. **Microscopy Research And Technique**. v. 53, p. 360-371, 2001.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, p. 469-475, 2005.

MOURA, P. R.; VIDAL, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.

MÜHLBAUER, R. C.; LOZANO, A.; PALACIO, S.; REINLI, A.; FELIX, R. Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. **Bone**, v. 32, p. 372–380, 2003.

NAGAYA, H.; SATOH, H.; KUBO, K.; MAKI, Y. Possible mechanism for the inhibition of gastric (H⁺ + K⁺)-adenosine triphosphatase by the proton pump inhibitor AG-1749. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, p. 799-805, 1989.

NAPOLITANO, L. Refractory Peptic Ulcer Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 38, p. 267-288, 2009.

NASSAR, N. N.; SCHAALAN, M. F.; ZAKI, H. F.; ABDALLAH, D. M. Octreotide ameliorates gastric lesions in chronically mild stressed rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, p. 1135-1142, 2011.

OLIVEIRA, F. A.; ANDRADE, L. N.; SOUSA, E. B.; SOUSA, D. P. Anti-ulcer activity of essential oil constituents. **Molecules**. v. 19, n. 5, p. 5717-5747, 2014.

OLIVEIRA, S. M. M.; LORSCHIEDER, J. A.; NOGUEIRA, M. A. Avaliação In Vitro de Gel Dentifrício Contendo Óleos Essenciais sobre Bactérias Cariogênicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 266-269, 2008.

PARK, T. J.; PARK, Y. S.; LEE, T. G.; HA, H., KIM, K. T. Inhibition of acetylcholinemediated effects by Borneol. **Biochemical Pharmacology**. v. 65, p. 83–90, 2003.

PAWLIK, M. W.; KWIECIEN, S.; PTAK-BELOWSKA, A.; PAJDO, R.; OLSZANECKI, R.; SUSKI, M.; MADEJ, J.; TARGOSZ, A.; KONTUREK, S. J.; KORBUT, R.; BRZOZOWSKI, T. The renin-angiotensin system and its vasoactive metabolite angiotensin-(1-7) in the mechanism of the healing of preexisting gastric ulcers. The involvement of Mas receptors, nitric oxide, prostaglandins and proinflammatory cytokines. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 67, n. 1, p. 75-91, 2016.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M. E.; HENRIKSNÄS, J.; PETERSSON, J.; GENDLER, S. J.; SANDLER, S.; PERSSON, A. E.; HANSSON, G. C.; HOLM, L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 295 n. 4, p. G806-G812, 2008.

PREISER, J. C. Oxidative stress. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 36, p. 147-154, 2012.

RAMA, A.C.R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil - β ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, 2006.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

RIBEIRO, L.S.S. **Sistemas Multicomponentes com ciclodextrinas como estratégia para otimizar a biodisponibilidade oral de fármacos**. Coimbra, 2005. 287 p. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

ROCHA, B.A.; RODRIGUES, M.R.; BUENO, P.C.P.; COSTA-MACHADO, A.R.M.; VAZ, M.M.O.L.L.; NASCIMENTO, A.P.; BARUD, H.S.; BERRETTA-SILVA, A.A. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin Increased water solubility of the chemical constituents and antioxidant activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 108, p. 87–94, 2012.

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.

SÁ-BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, 27(4):629-36, 2008.

SANTOS, C.; BUERA, M.P.; MAZZOBRE, M.F. Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. **Food Chemistry**. v. 132, p. 2030–2036, 2012.

SANTOS, E. S. I.; PEREIRA, D. F. A.; TEODORO, G. R.; DEL CIAMPO, J. O.; OGASAWARA, M. S.; CANETTIERI, A. C. V.; KHOURI, S.; SALVADOR, M. J. Essential oil of *Thymus vulgaris*: preparation of pharmaceutical mouthwash formulation and in vitro evaluation of the bacterial plaque-inhibiting properties. **Latin American Journal of Pharmacy**, 29, 941-947, 2010.

SATOH, H.; INATOMI, N.; NAGAYA, H.; INADA, I.; NOHARA, A.; NAKAMURA, N.; MAKI, Y. Antisecretory and anti-ulcer activities of a novel proton pump inhibitor AG-1749 in dogs and rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, p. 806-815, 1989.

SCHMIDT, B. V.K.J.; HETZERC, M.; RITTERC, H.; BARNER-KOWOLLIK, C. Complex macromolecular architecture design via cyclodextrin host/guest complexes. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 235– 249, 2014.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 21, p. 636-643, 2005.

SCHUBERT, M. L.; PERUA, D. A. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1842-1860, 2008.

SHERRY, M.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H.; GREIGE-GERGES, H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. **Journal of Liposome Research**, v. 23, n. 4, p. 268-275, 2013.

SIEPMANN J. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 351–362, 2012.

SILVA-FILHO JC, OLIVEIRA NN, ARCANJO DD, QUINTANS-JÚNIOR LJ, CAVALCANTI SC, SANTOS MR, OLIVEIRA RDE C, OLIVEIRA AP. Investigation of mechanisms involved in (-)-Borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 171-177, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKE, L E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC; 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC; 2004.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; SOARES, M. F. R.; ROLIM-NETO, P. J.; LABANDEIRA, J. J. T. Physicochemical study of solid-state benznidazole–cyclodextrin complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 319–325, 2011.

SPRICIGO, R.; BOTELHO, K. C. A; CONSIGLIERI, V. O.; SERRA, C. H. R. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 645-53, 2008.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, v. 36, p. 30-42, 2008.

SVOBODA, K. P.; HAMPSON, J. B. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. In: *Speciality Chemicals for the 21st Century*, **ADEME/IENTICA**, p. 1–17, 1999.

SZABO, S.; NAGY, L.; PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clinica Chimica Acta**, v. 206, p. 95-105, 1992.

TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; BASER, K. H.; AYTAC, Z.; EKICI, M.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; WEDGE, D. E. Chemical composition and antifungal activity of *Salvia macrochlamys* and *Salvia recognita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6593– 6597, 2006.

TABANCA, N.; KIRIMER, N.; DEMIRCI, B.; DEMIRCI, F.; BASER, K. H. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of Borneol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 49, p. 4300–4303, 2001.

TAKEUCHI, K. Gastric cytoprotection by prostaglandin E2 and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 65, p. 314, 2014.

TANG, R. S.; CHAN, F. K. Therapeutic management of recurrent peptic ulcer disease. **Drugs**, v. 72, n. 12, p. 1605-1616, 2012.

TARNAWSKI, A.; HOLLANDER, D.; STACHURA, J.; KRAUSE, W. J.; ELTORAI, M.; DABROS, W.; GERGELY, H. Vascular and microvascular changes—key factors in the development of acetic acid induced gastric ulcers in rats. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 12, S148–S157, 1990.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, K. M. Gastric Cytoprotection Beyond Prostaglandins: Cellular and Molecular Mechanisms of Gastroprotective and Ulcer Healing Actions of Antacids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 1, p. 126-132, 2013.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, S. 1, p. S24-S33. 2005.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HE, J.; HUANG, B.; WANG O. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 464-470, 2011.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTINI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2474-2478, 2005.

TSUKIMI, Y; OKABE, S. Recent Advances in Gastrointestinal Pathophysiology: Role of Heat Shock Proteins in Mucosal Defense and Ulcer Healing. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v. 24, p. 1-9, 2001.

TUBEROSO, C. I.; KOWALCZYK, A.; CORONEO, V.; RUSSO, M. T.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and antifungal activities of the essential oil of *Achillea ligustica* all. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 10148– 10153, 2005.

WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 47, n. (3-4), p. 95-106, 2003.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WALLACE, J. L.; MA, L. Inflammatory Mediators in Gastrointestinal Defense and Injury. **Experimental Biology and Medicine**. v. 226, p. 1003–1015, 2001.

WANG, G.; WANG, L.; XIONG, Z. Y.; MAO, B.; LI, T. Q. Compound salvia pellet, a traditional Chinese medicine, for the treatment of chronic stable angina pectoris compared with nitrates: a meta-analysis. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 1–7, 2006.

WELAGE, L. S. Overview of pharmacologic agents for acid suppression in critically ill patients. **American Journal of Health-Sistem Pharmacy**. v. 62, p. S4-S10, 2005.

WENQIANG, G.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, Y.; YANFENG, H. Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Levl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. **Natural Product Research**, v. 20, p. 992–998, 2006.

XIONG, Z.; XIAO, F.; XU, X; WU, Y.; JIANG, X. Studies on pharmacological activity of borneol. **China journal of Chinese materia medica**. v. 38, n. 6, p. 786-790, 2013.

YANG, H.; PARNIAK, M. A.; HILLIER, S. L.; ROHAN, L. C. A thermodynamic study of the cyclodextrin – UC781 inclusion complex using a HPLC method. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, Dordrecht**, v. 72, n. 3-4, p. 459-465, 2012.

YAO, Y.; XIE, Y.; HONG, C.; LI, G.; SHEN, H.; JI, G. Development of a myricetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization and evaluation. **Carbohydrate Polymers** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.006>.

ZABLOCKA, A.; JANUSZ, M. The two faces of reactive oxygen species. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 62, p. 118-124, 2008.

ZHENG, C.; SHIXIANG, H.; YUANBO, L.; BINBIN, Z.; ZHAOXIANG, Y.; SHUGUANG, X.; et al. Effect of Borneol on the distribution of gastrodin to the brain in mice via oral administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, 2008.

Capítulo II – Resultados submetidos à publicação

Este capítulo abordará os resultados obtidos neste trabalho na forma de artigo submetido ao periódico internacional *Chemico-Biological Interactions* em Setembro de 2016 (Fator de impacto 2.577; Qualis A2 em Biotecnologia)

Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão de (-)-Borneol com β -ciclodextrina e seus efeitos gastroprotetor e cicatrizante em roedores

Preparation and physicochemical characterization of inclusion complexes of (-) - Borneol with β -cyclodextrin and its gastroprotective effect and healing in rodents

Irisdalva Sousa Oliveira^a, Francilene Vieira Oliveira^a, Hélio Barros Fernandes^a, Paula dos Passos Menezes^b, Dayanne Valéria Soares Santana^b, Jullyana de Souza Siqueira Quintans^c, Lucindo José Quintans-Júnior^c, Adriano Antunes de Souza Araújo^b, Rita de Cássia Meneses Oliveira^{a,d,*}

^a*Postgraduate Program in Biotechnology - RENORBIO, Focal Point - Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil*

^b*Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil;*

^c*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil*

^d*Medicinal Plants Research Center, Health Sciences Center, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil*

*Corresponding author: Rita de Cássia Meneses Oliveira, PhD, Medicinal Plants Research Center, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina, Brazil. Phone: +55 86 3215-5872, E-mail: menesesoliveira@gmail.com

RESUMO

Este trabalho descreve as ações gastroprotetoras do (-)-Borneol (1,7,7-Trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol) e do Borneol complexado em β -ciclodextrina (Borneol-CD) contra lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos ou isquemia e reperfusão em ratos. Além disso, investigou-se o potencial cicatrizante em modelo crônico de lesões gástricas produzidas por ácido acético. A preparação do (-)-Borneol complexado em β -CD foi realizada pelos métodos de mistura física (MF) e co-evaporação (CE). Para a caracterização físico-química, foram utilizadas as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), teor de umidade por titulação de Karl Fisher, espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Difractometria de Raios X (XRD). O método de CE indicou a ocorrência da formação do complexo de inclusão entre o monoterpene e a β -CD, sendo este o escolhido para a realização dos testes *in vivo*. A administração intragástrica de Borneol ou de Borneol-CD (25 e 50 mg/kg), antes da indução das lesões por etanol ou por isquemia e reperfusão, mostrou uma proteção significativa. No modelo de indução de lesões gástricas por ácido acético em ratos, o Borneol e o Borneol-CD (50 e 100 mg/kg) mostraram um efeito na aceleração da cicatrização, em relação ao grupo controle, quando administrados durante 7 dias consecutivos. Através desses resultados, pode-se concluir que o Borneol apresenta potencial atividade gastroprotetora e cicatrizante e a complexação do mesmo em β -CD parece melhorar suas propriedades químicas e farmacológicas.

Palavras-chave: Borneol, β -ciclodextrina, gastroproteção, cicatrização gástrica, antioxidante

ABSTRACT

This work describes the gastroprotective actions of (-)-Borneol (1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol) and Borneol complexed in β -ciclodextrina (Borneol-CD) against ethanol induced lesions in mice or ischemia and reperfusion in rats. Furthermore, were investigated the healing clinical potential in gastric lesions model produced by acetic acid. The preparation of (-)-Borneol complexed with β -CD was made by

physical mixture (PM) and slurry complex (SC) methods. For physicochemical characterization, were used the techniques of differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG), moisture content by Karl Fischer titration, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD). The SC method indicated the occurrence of the formation of the inclusion complex between the monoterpene and β -CD, which is chosen for the in vivo tests. The intragastric administration of Borneol or Borneol-CD (25 and 50 mg/kg), before inducing gastric ulcers by ethanol or ischemia and reperfusion, showed a significant protection. In the model of gastric lesions induction by acetic acid in rats, both Borneol and Borneol-CD (50 and 100 mg/kg) display an effect in the acceleration of the healing, in relation to the control group, when administered for 14 consecutive days. Through these results it can be concluded that Borneol has potential gastroprotective and healing activity and its complexed in β -CD appear to improves its chemical and pharmacologic properties.

Keywords: Borneol, β -cyclodextrin, gastroprotection, gastric healing, antioxidant

1. Introdução

A úlcera péptica é uma doença que representa um problema de Saúde Pública, pois a mesma está associada à perda na qualidade de vida, perda de produtividade no trabalho e crescentes gastos no tratamento das complicações da doença. Entre as complicações mais frequentes estão os casos de hemorragia gastrointestinal (sangramento), que ocorrem em até 15% das úlceras, e os de úlcera perfurada, referida em cerca de 7% de seus pacientes. Ambas as complicações são causas frequentes de internação e de mortalidade pela doença (BARKUN; LEONTIADIS, 2010). De acordo com Oliveira et al., 2015, a prevalência de casos de úlcera no Brasil, no ano em estudo, foi de 0,2% e 0,1%, em homens e mulheres, respectivamente e a taxa de mortalidade nacional, de 3,0/100 mil habitantes (3,6/100 mil em homens; 2,3/100 mil em mulheres); as prevalências e taxas de mortalidade aumentaram com a idade, independentemente do sexo, com maiores valores entre homens.

Entre as drogas protetoras gástricas mais utilizadas na prática clínica estão os inibidores da secreção ácida como os antagonistas do receptor H₂ (H₂RAs) e inibidores da bomba de prótons (PPIs). No entanto, vários estudos têm relatado que os PPIs estão associados com o aumento do risco de osteoporose e de infarto no miocárdio (MI),

deficiências de vitaminas e interações medicamentosas com drogas anti-agregantes plaquetares, reduzindo sua eficácia, como por exemplo, o clopidogrel (TARGOWNIK et al., 2008; REN et al., 2011; WEDEMEYER et al., 2014; SHAH et al., 2015). Produtos naturais, tais como plantas medicinais, têm sido amplamente utilizados na pesquisa de novas alternativas medicamentosas de doenças em todo o mundo (LI et al., 2011, ROZZA; PELLIZZON, 2013; KANGWAN et al., 2014).

Neste contexto, podemos citar o Borneol (1,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol), um monoterpene bicíclico presente nos óleos essenciais de diversas plantas medicinais, que são utilizadas como um agentes terapêuticos na China há mais de 1500 anos (HATTORI, 2000). Seus usos na medicina popular incluem tratamento da dor abdominal, especialmente o estômago; aplicação para feridas e queimaduras; alívio de dores reumáticas; hemorróidas; ulcerações da pele na boca, orelhas, olhos ou nariz; e aromaterapia (HORVÁTHOVÁ et al., 2009; WANG et al., 2006).

Estudos têm demonstrado ações farmacológicas do Borneol ligadas as atividades antibacteriana e antifúngica (KNOBLOCH et al., 1989; TABANCA et al., 2001; WENQIANG et al., 2006), antioxidante (KORDALI et al., 2015; CANDAN et al., 2003), imunomodulatória (JUHA et al., 2008), efeito anti-hipertensivo (RAJA et al., 2010; SILVA-FILHO et al., 2011), cicatrizante tópico (BARRETO et al., 2014), antitrombótico e antiplaquetário (LI et al., 2008), anti-inflamatória e antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2013). Outras aplicabilidades para o Borneol tem sido seu uso como adjunto tecnológico para melhorar a penetração de fármacos através da pele, mucosas gastrintestinais e nasais, barreira córneo e hemato-encefálica (ZHENG et al., 2008).

No entanto, algumas limitações têm impossibilitado o seu uso, como por exemplo, a instabilidade na preparação e no processo de armazenamento, devido à sua alta sublimação e degradação fácil à cânfora, que é um composto altamente tóxico. Outra limitação importante é a sua insolubilidade em água (BHATIA et al., 2008). Fármacos pouco solúveis em água apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a dissolução o fator limitante para a absorção dos mesmos. Dentre as técnicas empregadas para aumentar a dissolução e diminuição de toxicidade, destaca-se o emprego da complexação de fármacos com ciclodextrinas. Um possível caminho para melhorar as essas propriedades seria a complexação com ciclodextrina (CD) hidrofílicas, já bastante disseminadas no mercado, com um elevado número de formulações derivadas de CD disponíveis comercialmente, como por exemplo, o fármaco Abilify® (aripiprazol) (BREWSTER et al., 2007). As

ciclodextrinas (CDs) são uma família de oligossacarídeos cíclicos composta de subunidades de glucopiranosose α -1,4-ligadas. As três CDs mais comuns que ocorrem naturalmente, α -CD, β -CD e γ -CD, consistem em 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, e são produzidos por conversão enzimática do amido. As CDs podem formar complexos de inclusão tanto em meio líquido quanto no estado sólido (YUAN et al, 2014), onde após a complexação são capazes de melhorar as características físico-químicas da “molécula hóspede” (CASTRONUOVO; NICCOLI, 2013). As CDs podem reduzir a volatilidade, viabilizar compostos líquidos na forma sólida, mascarar o odor e o sabor desagradável de alguns compostos, evitar incompatibilidades indesejáveis, aumentar a biodisponibilidade e a estabilidade na presença de luz, calor e condições oxidantes (SANTOS; BUERA; MAZZOBRE, 2012; ROCHA et al, 2012).

Com base nessas informações e, levando em consideração que não existem estudos farmacológicos do (-)-Borneol em doenças digestivas, o objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar físico-quimicamente complexos de inclusão de (-)-Borneol em β -ciclodextrina e avaliar seus efeitos em lesões gástricas fazendo uma comparação de sua forma não complexada com a forma complexada em β -ciclodextrina.

2. Metodologia

2.1. Substâncias químicas

As substâncias utilizadas foram (-)-Borneol, β -CD, carbenoxolona, N-acetilcisteína (NAC), ácido acético e cimetidina (Sigma-Aldrich, EUA); etanol absoluto (MULTILAB, Brasil). O Borneol foi dissolvido em Tween 80 a 1% e diluído numa solução salina (NaCl 0,9%) e Borneol-CD apenas em solução salina. O Borneol e outras concentrações de droga foram ajustadas para o tratamento para se obter um volume de 10 mL/kg.

2.2. Preparação dos complexos de (-)-Borneol/ β -CD

Uma mistura física (MF) foi preparada através da mistura mecânica de (-)-Borneol (154 mg) com β -CD (1135 mg) pulverizado, sob agitação manual numa razão molar de 1:1. Após a mistura, a amostra foi mantida em um recipiente de vidro hermeticamente fechado. Um complexo por co-evaporação (CE) foi preparado pela adição de água (20 mL) em um almofariz contendo β -CD (1135 mg) e (-)-Borneol (154 mg), também numa razão molar de 1:1. A mistura foi sujeita a agitação magnética em 15 g durante 36h. Posteriormente, a amostra foi transferida para um recipiente e seca em um dessecador. Baseando-se na proporção molar entre o Borneol e a β -CD, estima-se que 12% da massa do complexo,

represente a quantidade de Borneol. As doses utilizadas no estudo estão representadas na tabela 1.

Tabela 1. Relação entre as doses do Borneol não complexado e do Borneol complexado em β -ciclodextrina.

Borneol	Borneol-CD
12,5 mg/kg	12,5 mg/kg (1,5 mg/kg de Borneol)*
25 mg/kg	25 mg/kg (3 mg/kg de Borneol)*
50 mg/kg	50 mg/kg (6 mg/kg de Borneol)*
100 mg/kg	100 mg/kg (12 mg/kg de Borneol)*

*Quantidade de borneol no complexo

2.3. Análise térmica

As curvas DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) e TG/DTG (Termogravimetria/Termogravimetria Derivada) foram obtidas em temperaturas entre de 25 a 500°C e de 25 a 900°C, respectivamente, utilizando um aparelho Shimadzu DSC-60 e TGA-60, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min) e a taxa de aquecimento de 10°C/min utilizando cadinhos de alumínio (DSC) e platina (TG/DTG) com aproximadamente 2 mg da amostra. Os aparelhos foram previamente calibrados e/ou verificados usando o padrão oxalato de cálcio para TG (pureza 99,99%) e do metal índio para DSC.

2.4. Titulação de Karl Fisher

Os teores de umidade da mistura física e do co-evaporado foram determinados através do método Karl Fischer Titrino Plus KF 870 (Metrohm), utilizando o metanol (Fluka) como solução de titulação. As análises foram realizadas em triplicata.

2.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho do (-)-Borneol, β -CD, MF e CE foram obtidos na faixa de 4000-500 cm^{-1} em pastilhas de KBr, utilizando um espectrômetro de transformada de Fourier modelo Shimadzu IRTracer-100 à temperatura ambiente.

2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de β -CD, MF e CE foram montadas em suportes de alumínio, posteriormente metalizados com feixes de ouro e visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390- modelo LV) em aceleração de voltagem de 8 kV, para a captura de imagem.

2.7. XRD (Difração de raios X)

Os resultados do Difractômetro de Raios X para pós, foram obtidos através de um Rigaku com um tubo de CuK, na faixa de 3–65 θ (2 θ) e 1 seg. da passagem do tempo, realizado com o método de difração de pó XRD powder (difração de raio X).

2.8. Animais

Camundongos Swiss (25-30 g) e ratos Wistar (180-220 g), fêmeas, foram mantidos sob condições controladas (24 \pm 1°C, ciclo de claro/escuro de 12 h), com comida e água *ad libitum*. Antes de cada experimento, foram mantidos em jejum por 18 h e em seguida, aclimatizados ao ambiente de teste por 2 h. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos diferentes (n = 7 animais). No modelo de lesões gástricas induzidas por ácido acético ou isquemia e reperfusão, os animais foram anestesiados com cetamina e cloreto de xilazina (50 e 5 mg/kg, i.p., respectivamente). Após todos os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados por 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 008/12).

2.9. Lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos

Os ratos foram tratados oralmente com veículo (NaCl 0,9%, 10 mL/kg), Borneol ou Borneol-CD (12,5; 25 ou 50 mg/kg), ou N-acetilcisteína (200 mg/kg). Após 30 min, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e submetidos à isquemia induzida por oclusão da artéria celíaca (clamp microvascular), durante 30 min, seguido de reperfusão durante 1 h (UEDA; OKADA, 1989). Os animais foram então eutanasiados, seus estômagos foram removidos e as lesões gástricas foram analisadas. A área das lesões gástricas foi medida utilizando 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) (BHARGAVA; GUPTA; TANGRI, 1973).

2.10. Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos

Os camundongos foram tratados oralmente com veículo (NaCl 0,9%, 10 mL/kg), Borneol ou Borneol-CD (12,5; 25 ou 50 mg/kg), ou carbenoxolona (100 mg/kg). Após 1 hora, os animais receberam etanol absoluto (0,2 mL/animal) e depois de 30 min, foram eutanasiados, seus estômagos foram removidos e as lesões gástricas foram analisadas. (ROBERT et al., 1979). A área das lesões gástricas foi medida utilizando 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) (BHARGAVA; GUPTA; TANGRI, 1973).

2.11. Lesões gástricas induzidas por ácido acético

Ratos foram anestesiados com cetamina e xilazina, a cavidade abdominal foi aberta (aproximadamente 2 cm de incisão), e o estômago foi exposto. Para induzir uma úlcera gástrica, de um tubo de plástico de 8 mm de diâmetro e 2 cm de comprimento foi utilizado, em contato com a serosa do estômago para limitar a área que seria ferido. Setenta microlitros de ácido acético a 80% foram adicionados ao tubo, que manteve contato com a serosa do estômago durante 1 min. Após o ácido acético ser removido com a ajuda de uma pipeta automática, o sítio foi lavado com solução salina (OKABE et al., 1972). O estômago foi acomodada na cavidade abdominal, e a região abdominal foi suturada. Um dia após a indução da úlcera, o tratamento por via oral com veículo foi iniciado com cimetidina (100 mg/kg), Borneol ou Borneol-CD (25, 50, e 100 mg/kg) durante 7 dias consecutivos. Após o tratamento crônico, os animais foram eutanasiados e o estômago foi removido (aberta ao longo da curvatura maior). Lavou-se com água destilada, para então medir a área ulcerada (com o auxílio de um paquímetro). O cálculo da área ulcerada (em milímetros quadrados) foi realizada por medição da altura \times o comprimento. O volume da úlcera (em milímetros cúbicos) foi calculada pela medição da área ulcerada \times profundidade da úlcera (POTRICH et al., 2010).

2.12. Avaliação histopatológica

Os estômagos dos animais submetidos ao protocolo de lesões induzidas por etanol ou por ácido acético, foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura. Após a medição das lesões, foram retiradas amostras dos tecidos lesionados. Estes foram fixados em solução de formaldeído a 10%, desidratados com álcool e xileno e embebidos em parafina. Em seguida, foram seccionados a 5 μ m para avaliação histológica após a coloração com hematoxilina/eosina (HE). As seções gástricas foram observadas e fotografadas sob um microscópio estereoscópico com ampliação de 100x.

2.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm SEM. A significância estatística para as diferenças entre grupos foi calculada por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism™ 5.0 (San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada (TG/DTG) e Titulação de Karl Fisher

As curvas de DSC do (-)-Borneol, do β -CD, da mistura física (MF) e do complexo co-evaporado (CE) estão apresentadas na Figura 1. A curva do monoterpeno exibiu um evento endotérmico a 76,03 °C relacionadas com o ponto de sublimação da amostra, enquanto a curva de β -CD apresentou três eventos endotérmicos: 30-136 °C, 218-230 °C e 294-360 °C. Estes eventos foram atribuídos à desidratação, à transição de fase e ao ponto de fusão da molécula, respectivamente. A mistura física mostrou uma sobreposição de eventos de desidratação e sublimação do β -CD e (-)-Borneol, respectivamente. O aparecimento deste evento sugere a presença de moléculas do monoterpeno adsorvidas na superfície de β -CD e sem formação de complexo de inclusão, uma vez que a curva do complexo co-evaporado mostrou ter apenas os eventos de desidratação e de fusão, caracterizando a presença de β -CD, sugere-se a formação de complexo de inclusão.

As curvas TG/DTG (Figura 2 e Tabela 1) corroboram com estes resultados, mostrando que, na primeira fase (30-150 °C) todo o conteúdo do β -CD corresponde à liberação de água da molécula como evidenciado no teor de umidade e na segunda fase, não houve perda de peso da molécula hospedeira, referindo-se à fase de transição do β -CD. Assim como na primeira fase, todo o (-)-Borneol foi sublimado, então a perda de peso da segunda fase (150-

294 °C) deve estar relacionada com o monoterpeneo complexado, levando em consideração que, nesta fase, não há (-)-Borneol livre ou perda de massa significativa da β -CD. Portanto, houve formação de complexo de inclusão apenas pelo método de co-evaporação.

Tabela 2: Perda de massa do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (PM) e do complexo co-evaporado (CE) obtidos com termogravimetria/termogravimetria derivada e % de água obtida por titulação de Karl Fisher.

Amostra	$\Delta m1$ % 30-150°C	$\Delta m2$ (%) 150-294°C	$\Delta m3$ (%) 294-500°C	$\Delta m4$ (%) 500-900°C	Karl Fisher % H ₂ O*
(-)-Borneol	98.28	-	-	-	0.62 ± 0.24
β -CD	12.19	0.60	73.43	13.78	13.75±0.39
Mistura física	20.63	0.1	74.53	10.86	12.48 ± 0.65
Complexo co-evaporado	12.02	4.90	84.33	8.20	13.18 ± 0.44

* Resultados expressos como média e desvio padrão da média (SD).

Figura 1. Curvas DSC do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (PM) e do complexo co-evaporado (CE) numa atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 ml•min⁻¹) e temperatura de 10 °C•min⁻¹.

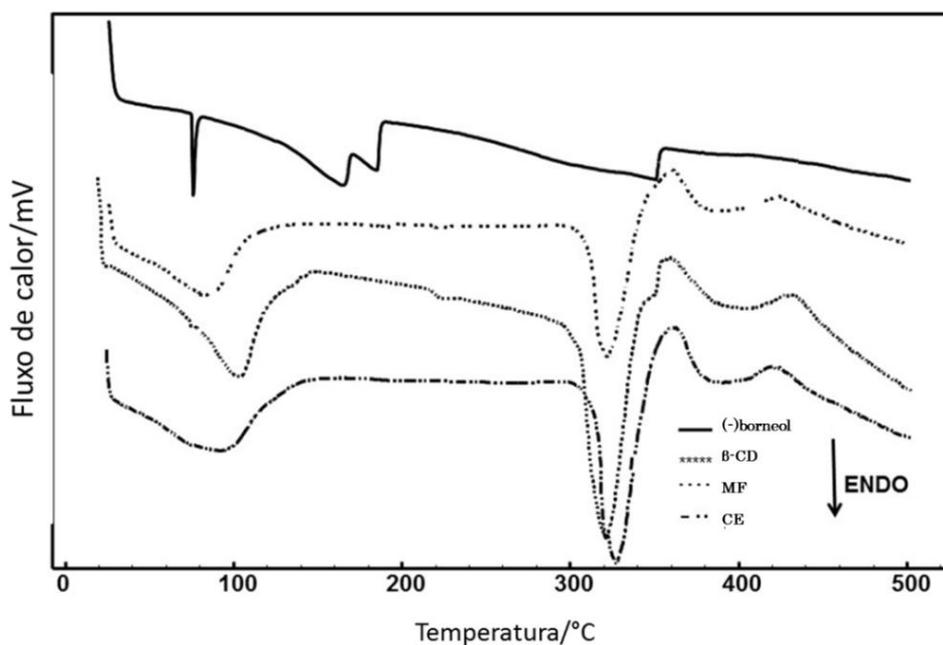
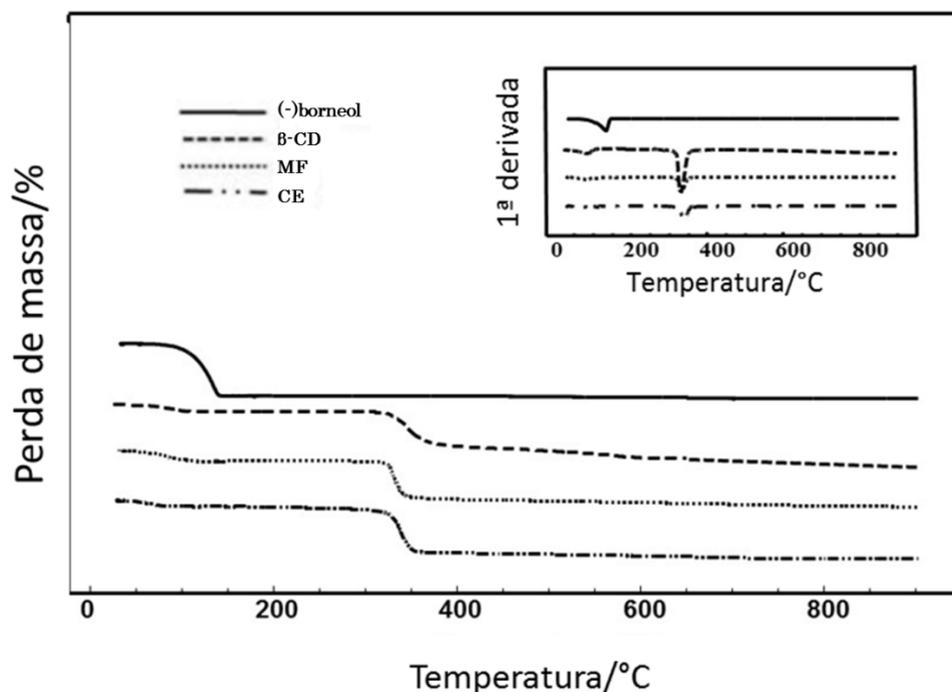


Figura 2. Curvas TG do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (PM) e do complexo co-vaporado (CE) numa atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) e temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$



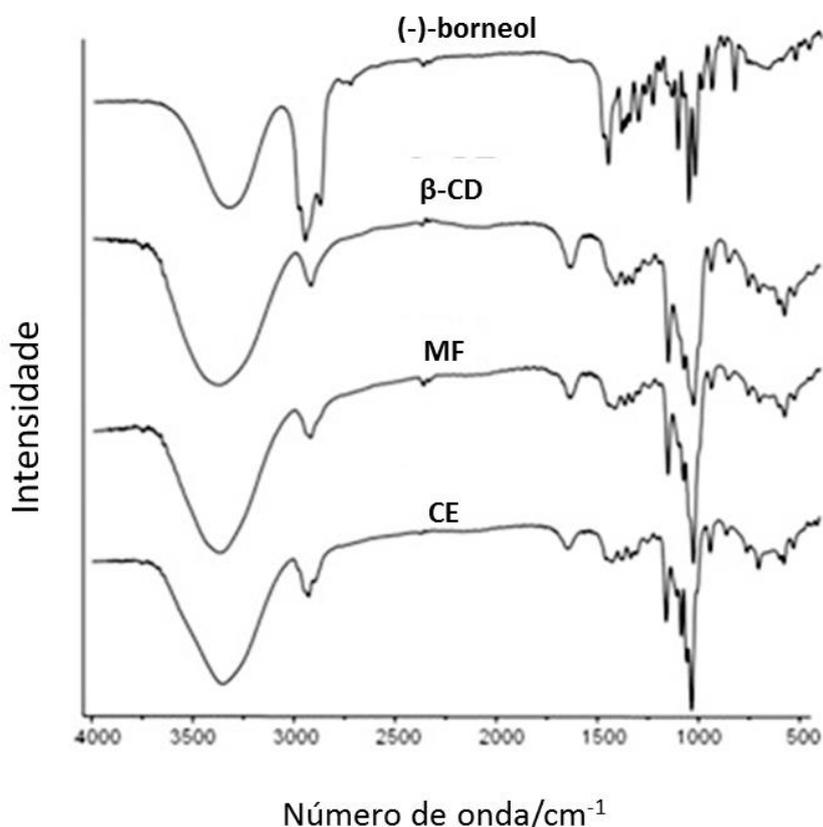
3.2. Espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 3 mostra o espectro de FTIR do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física e do complexo co-evaporado. Para o (-)-Borneol, foi possível observar uma banda de larga intensidade entre $3488\text{-}3182 \text{ cm}^{-1}$, que está relacionado com o estiramento assimétrico do grupo funcional -OH. A banda encontrada na região espectral de $2944\text{-}2866 \text{ cm}^{-1}$ correspondente ao modo de estiramento CH dos grupos $\text{CH}_2\text{-CH}_3$. Foi possível observar uma banda na região de 1453 cm^{-1} , que está relacionada com o modo de deformação angular em CH_2 . A absorção observada na região de $1394\text{-}1340 \text{ cm}^{-1}$ foi relacionada com a deflexão angular CH_3 . As bandas observadas em 1139 , 1109 e 1056 cm^{-1} foram relacionados com modo de estiramento CO de álcoois. No espectro de infravermelho do β -CD puro pode ser observado uma banda extensa com absorção máxima em cerca de 3340 cm^{-1} , referente ao estiramento simétrico dos grupos hidroxilas da β -CD. A banda em 1647 cm^{-1} foi relacionada com as vibrações desses grupos OH. O espectro mostra outras bandas, especialmente 2926 cm^{-1} (vibrações C-H e de alongamento dos grupos CH e CH_2) em 1411 , 1368 , 1335 , 1301 e

1246 cm^{-1} devido a vibrações de estiramento C-H e, a 1154 , 1080 e 1027 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações estiramento CO, as ligações entre grupos C-O-C éter e hidroxila.

Finalmente faixas típicas da região $1000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, pertencentes as vibrações das ligações C-H e as vibrações do esqueleto C-C no anel de glicopiranosose, também estão presentes. Na análise das bandas que representam a MF e CE, é possível observar algumas diferenças quando comparado com os espectros da β -CD e (-)-Borneol, essa mudança pode ser atribuída à afinidade do (-)-Borneol pela β -CD. Em todas as bandas em 1010 cm^{-1} observou-se um aumento na intensidade quando comparadas com (-)-Borneol, principalmente pelo método de CE. Esta banda é característica do grupamento O-H presente na molécula hóspede, além disso, a banda na faixa espectral de 2900 cm^{-1} , descrita no espectro do (-)-Borneol, apresentou-se com maior intensidade no espectro do CE, demonstrando a presença do monoterpene no complexo de inclusão.

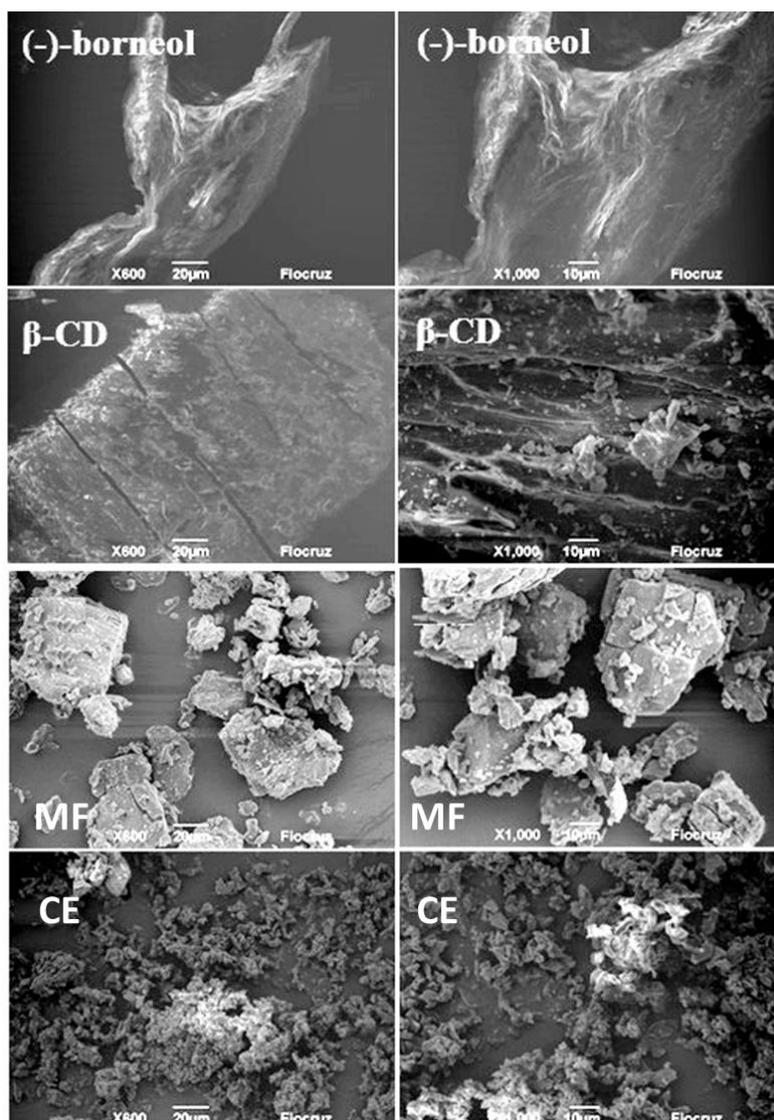
Figura 3. Espectros de infravermelho do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (MF) e do co-evaporado (CE)



3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 4 mostra as imagens de MEV do (-)-Borneol, do β -CD, da mistura física (MF) e do complexo co-evaporado (CE) nos aumentos de 600x e 1000x. A partir das imagens, pode-se observar a sublimação do monoterpeno, dependendo da temperatura resultante da energia dos elétrons durante a análise. No que se refere a β -CD, observa-se sua superfície retangular, e o tamanho bem definida de aproximadamente $160 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Já a mistura física e o complexo co-evaporado tiveram tamanhos na ordem de $80 \pm 1,7$ a $3,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$, respectivamente. Além disso, alterações morfológicas foram observadas na amostra da mistura física em relação a β -CD, mas o complexo co-evaporado de tamanho reduzido apresentou-se com amorfias.

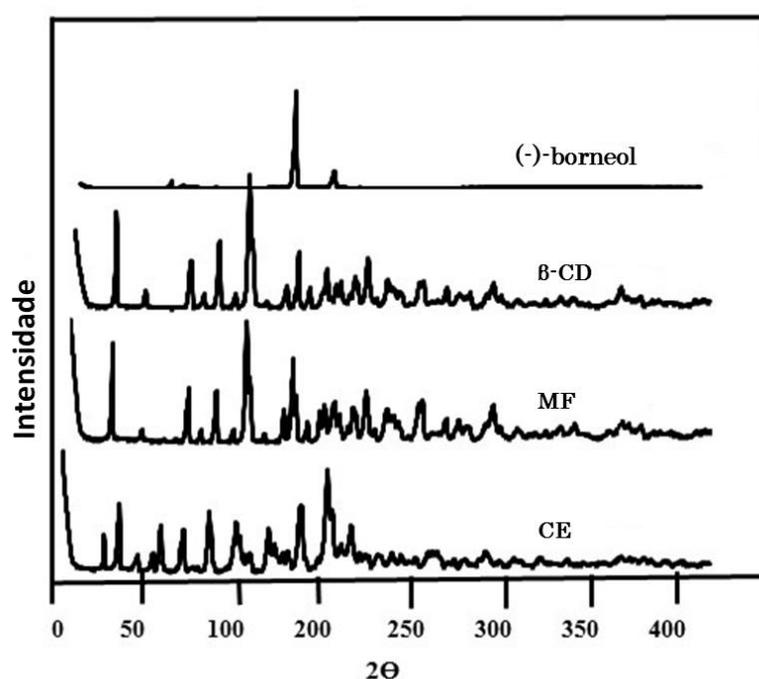
Figura 4. Fotomicrografias em MEV de seções transversais (1 e 10 μm) do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (MF) e do complexo co-evaporado (CE).



3.4. Difração de raios X

Como mostrado na Figura 5, o (-)-Borneol praticamente não apresentou linhas de difração, demonstrando assim que a sua estrutura não tem um perfil muito cristalino. Já β -CD apresentou um perfil muito cristalino e este foi também observado na mistura física. Além disso, no difratograma da redução do co-evaporado em linhas de difração, também foi observado o aparecimento de novas linhas de difração como em $39,3^\circ$, caracterizando assim, nova formação de fase sólida, que caracteriza a formação do complexo de inclusão.

Figura 5. Difração de raios X do (-)-Borneol, da β -CD, da mistura física (MF) e do complexo co-evaporado (CE).



3.5. Efeito do Borneol sobre lesões gástricas induzidas por etanol

Em análise macroscópica, no grupo tratado com veículo, foram observadas lesões do tipo hemorrágicas. Este grupo apresentou uma área ulcerada com média de $26,33 \pm 2,39\%$ em relação à área total da porção glandular gástrica. O controle positivo carbenoxolona forneceu gastroproteção $87,17\%$ ($3,35 \pm 0,77\%$) e os grupos tratados com Borneol (25 e 50 mg/kg) demonstraram gastroproteção de $60,39$ ($10,43 \pm 2,24\%$) e $39,08\%$ ($16,04 \pm 3,48\%$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle. O grupo tratado com Borneol-CD também exibiu gastroproteção de $55,37\%$ na dosagem de 25 mg/kg ($11,74 \pm 2,81\%$) e de $70,91\%$ na dosagem de 50 mg/kg ($7,66 \pm 1,64\%$). No entanto, nenhuma das substâncias mostrou efetiva proteção gástrica na dose de 12,5 mg/kg. Dados representados na tabela 3.

3.6. Efeitos do Borneol sobre lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos

Os resultados mostram que um estado de isquemia por 30 min seguida de um período de reperfusão por 60 min induz lesões na mucosa gástrica e que estas foram reduzidas ($p < 0,05$) em animais pré-tratados com Borneol 25 mg/kg ($7,82 \pm 1,67\%$) ou 50 mg/kg ($8,56 \pm 1,47\%$); Borneol-CD 25 mg/kg ($6,51 \pm 1,69\%$) ou 50 mg/kg ($4,78 \pm 0,62\%$) ou NAC 200 mg/kg ($2,13 \pm 0,61\%$), quando comparados ao grupo controle ($16,93 \pm 2,12\%$). Dados mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Efeito do Borneol, Borneol-CD, carbenoxolona e NAC modelos agudos de lesões gástricas em roedores

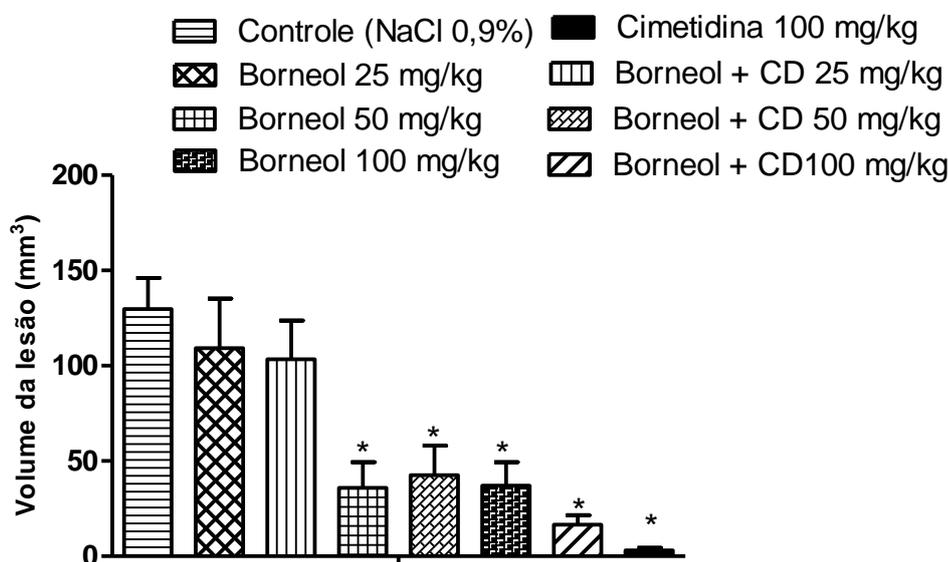
Modelo de lesão gástrica	Tratamento	Dose (mg/kg)	Area de lesão gástrica (%)	Inibição da lesão (Proteção) %	
Etanol absoluto (camundongos)	Controle (NaCl 0,9%)	-	26,33 \pm 2,39	0,00	
	Borneol	12,5	17,680 \pm 2,05	32,85	
		25	10,43 \pm 2,24*	60,39	
		50	16,04 \pm 3,48*	39,08	
	Borneol-CD	12,5	18,19 \pm 1,78	30,91	
		25	11,74 \pm 2,81*	55,37	
		50	7,66 \pm 1,64*	70,91	
	Carbenoxolona	100	3,35 \pm 0,77*	87,17	
	Isquemia/Reperfusão (ratos)	Controle (NaCl 0,9%)	-	16,93 \pm 2,12	0,00
		Borneol	12,5	16,48 \pm 1,45	2,66
25			7,82 \pm 1,67*	53,81	
50			8,56 \pm 1,47*	49,44	
Borneol-CD		12,5	12,26 \pm 1,02	27,58	
		25	6,51 \pm 1,69*	61,55	
		50	4,78 \pm 0,62*	71,77	
N-acetilcisteína		200	2,13 \pm 0,61*	87,42	

Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo grupo controle (ANOVA one way e teste de Tukey's).

3.7. Efeito do Borneol e Borneol-CD em lesões gástricas induzidas por ácido acético

O tratamento oral durante 7 dias consecutivos, demonstraram que Borneol e Borneol-CD acelera a cicatrização de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos, como se mostra na Figura 6. Borneol 50 e 100 mg/kg ($35,94 \pm 13,39$ e $37,02 \pm 12,37$ mm³, respectivamente) e Borneol CD 50 e 100 mg/kg ($42,67 \pm 15,41$ e $16,59 \pm 4,91$ mm³, respectivamente) reduziram significativamente a área da lesão em comparação com o veículo ($129,81 \pm 16,35$ mm³).

Figura 6. Efeito do tratamento crônico com Borneol, Borneol-CD ou cimetidina no modelo de lesão gástrica por ácido acético.



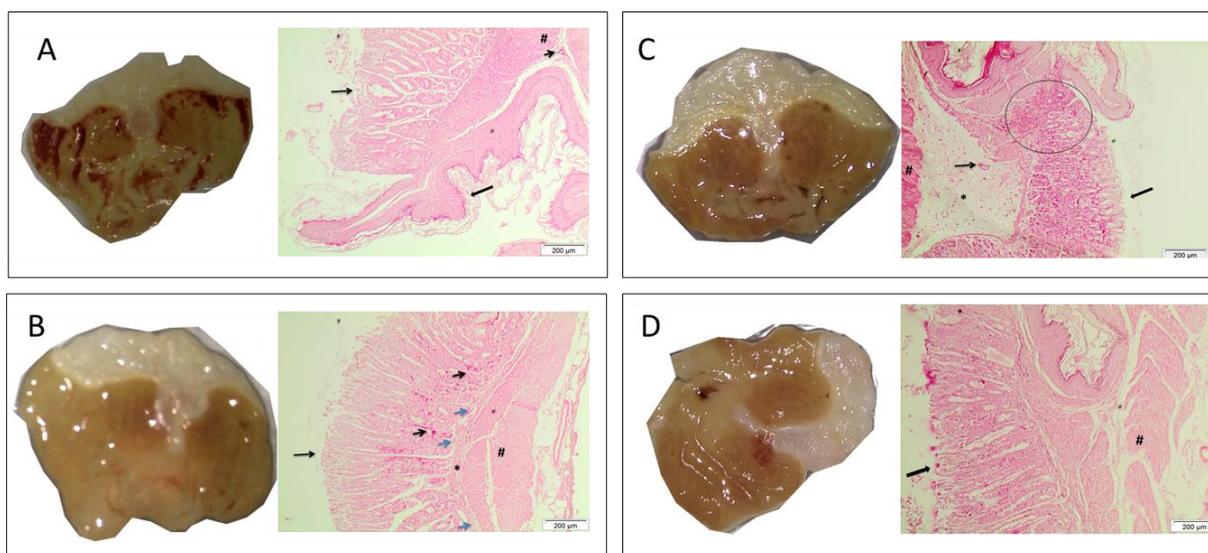
Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparados ao respectivo grupo controle (ANOVA one way e teste de Tukey's).

3.8. Análise histopatológica

As fotomicrografias dos cortes de estômagos de animais submetidos ao modelo de lesões gástricas induzidas por etanol (0,2 mL/animal) podem ser observadas na figura 7, no aumento de 100x. Nos animais que foram tratados apenas com salina (7A), pode-se observar grande quantidade de infiltrado inflamatório e pronunciada atrofia das células parietais e principais. O pré-tratamento com Borneol (7B), Borneol-CD (7C) ou carbenoxolona (7D) reduziu os danos provocados pelo etanol, mostrando uma conservação de vasos sanguíneos e preservação da das células da mucosa gástrica. As fotomicrografias dos cortes de estômagos de animais submetidos ao modelo de lesões gástricas induzidas por

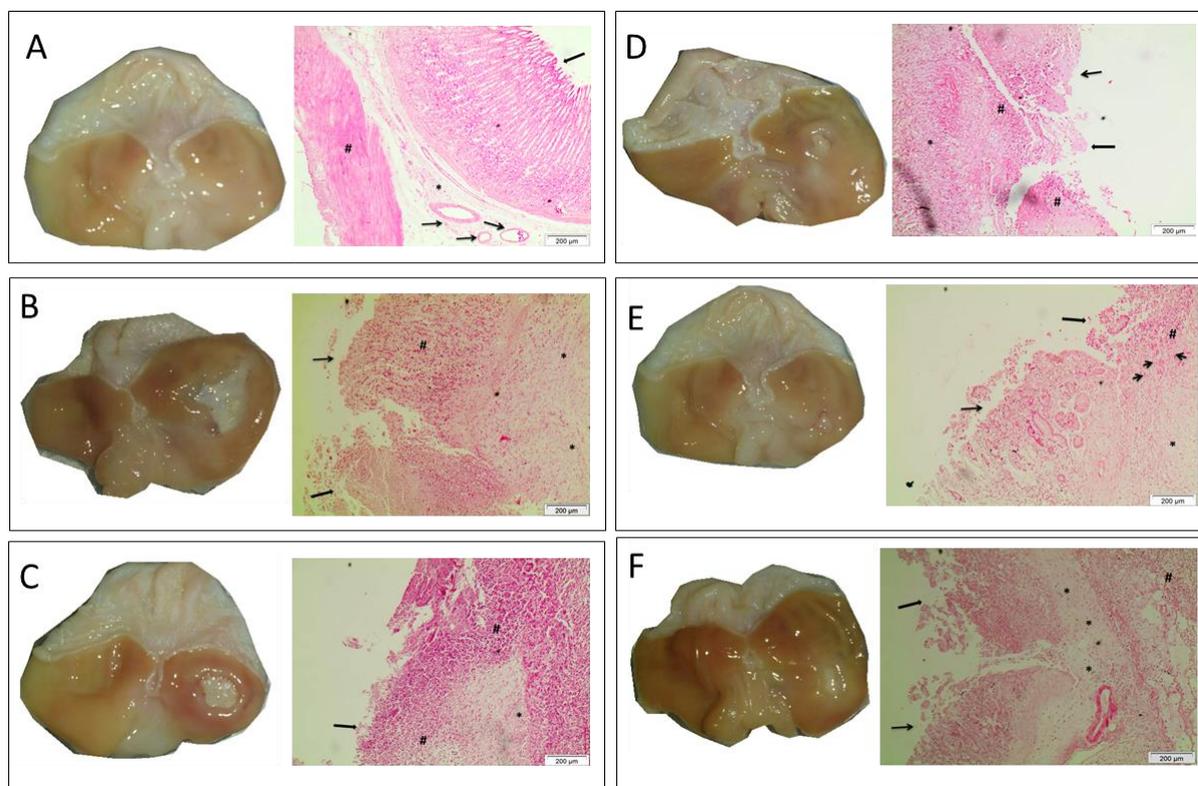
ácido acético podem ser observadas na figura 8, no aumento de 100x. Nos animais que foram tratados apenas com salina (8B), pode-se observar a destruição da camada mucosa, uma desorganização das células epiteliais, grande quantidade de exsudato fibrinopurulento e atrofia das células parietais e principais. O grupo tratado com ciclodextrina (8C) apresentou características semelhantes ao grupo tratado com salina. Nos grupos pré-tratados com Borneol (8D), Borneol-CD (8E) ou cimetidina (8D), observa-se um aumento na quantidade de fibroblastos, menor quantidade de exsudato fibrinopurulento e início de formação de novos vasos, indicando um processo de cicatrização da lesão.

Figura 7. Efeitos macro e microscópicas de Borneol, Borneol-CD ou carbenoxolona na mucosa gástrica de camundongos submetidos a lesões gástricas induzidas por etanol. %. Fotografias de estômagos abertos ao longo da curvatura maior e análise microscópica com uma ampliação de 100 \times .



(A) Animais tratados com etanol (0,2 mL/animal): Seta grossa: epitélio simples. Seta fina: túnica mucosa com atrofia das células parietais e principais. Seta pequena: vaso sanguíneo. # infiltrado inflamatório. (B) Animais tratados com carbenoxolona 100 mg/kg antes da administração do etanol: Seta fina: túnica mucosa com atrofia das células parietais e principais. Seta pequena: congestão. Seta azul: vasos sanguíneos. * fibroblastos. # musculo liso. (C) Animais tratados com Borneol 25 mg/kg antes da administração do etanol: Seta grossa: túnica mucosa. Seta fina: vasos sanguíneos. * fibroblastos. # musculo liso. Circulo: congestão. (D) Animais tratados com Borneol-CD 25 mg/kg antes da administração do etanol: Seta grossa: túnica mucosa com atrofia das células parietais e principais. # muscular da mucosa.

Figura 8. Efeitos macro e microscópicas do tratamento por 07 dias com Borneol, Borneol-CD ou cimetidina na mucosa gástrica de ratos submetidos a lesões gástricas induzidas por ácido acético a 80%. Fotografias de estômagos abertos ao longo da curvatura maior e análise microscópica com uma ampliação de 100 \times .



(A) Animais do grupo SHAM (sem indução de lesões e sem tratamento): Seta grossa: túnica mucosa. Seta fina: vasos sanguíneos. * fibroblastos. # musculo liso. (B) Animais tratados com salina: Seta grossa: exsudato fibrinopurulento. Seta fina: atrofia das células parietais e principais. * fibroblastos. # infiltrado inflamatório. (C) Animais tratados com β -ciclodextrina 50 mg/kg: Seta grossa: exsudato fibrinopurulento. * fibroblastos. # infiltrado inflamatório. (D) Animais tratados com Borneol 50 mg/kg antes: Seta grossa: exsudato fibrinopurulento. Seta fina: atrofia das células parietais e principais. * fibroblastos. # infiltrado inflamatório. (E) Animais tratados com Borneol-CD 50 mg/kg: Seta grossa: exsudato fibrinopurulento. Seta fina: atrofia das células parietais e principais. Seta pequena: neovascularização. *fibroblastos. #infiltrado inflamatório. (F) Animais tratados com cimetidina 100 mg/kg: exsudato fibrinopurulento. Seta grossa: exsudato fibrinopurulento. Seta fina: atrofia das células parietais e principais. * fibroblastos. # infiltrado inflamatório.

4. DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, tem havido grande interesse em explorar novas técnicas para aumentar a solubilidade de fármacos. O complexo de inclusão com ciclodextrinas é um dos métodos mais amplamente utilizados para melhorar a taxa de dissolução das drogas (AL OMARI et al., 2011; DREASSI et al., 2010; AI et al., 2014). Além disso, as ciclodextrinas (CDs) têm sido amplamente utilizadas para melhorar a estabilidade de substâncias, modificar a liberação dos fármacos e transformar substâncias líquidas em pós estáveis e de

fluxo adequado (SIQUEIRA-LIMA et al., 2016; PINHO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). A partir desta perspectiva, estudos envolvendo métodos analíticos para a caracterização de complexos de inclusão são de fundamental importância para melhorar as aplicações dos complexos de inclusão com ciclodextrinas (MURA, 2014). O método de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) pode ser utilizado para o reconhecimento de complexos de inclusão. Quando as moléculas hóspedes encontram-se embutidas em cavidades de β -CD, os seus pontos de fusão, ebulição ou sublimação geralmente são deslocados para diferentes temperaturas ou desaparecem (SU et al., 2012a). No presente estudo, foi demonstrado por DSC um evento endotérmico em torno de 76,03 °C, relatado por Su et al. (2012b) como característica do ponto de sublimação do (-)-Borneol.

Sobre a β -CD, os eventos relatados na sessão de resultados já são eventos bem conhecidos na literatura e discutidos por vários autores (KAYACIE; AYTAC; UYAR, 2013; MARRETO et al, 2008; MENEZES et al., 2012). O primeiro evento endotérmico é geralmente associado a perdas de água das cavidades da CD. Na mistura física, a intensidade do pico correspondente ao ponto de sublimação do (-)-Borneol foi reduzida. Por outro, o completo desaparecimento do pico, característico de sublimação da droga, nas curvas de DSC do complexo de inclusão obtido pelo método de co-evaporação, é um indicativo de uma forte interação entre o fármaco e a CD (KAYACIE; AYTAC; UYAR, 2013). Os dados obtidos na análise termogravimétrica confirmam os resultados obtidos a partir da análise por DSC. Nas curvas obtidas por TG (150-294°C), não se observou perda significativa de massa do (-)-Borneol, da mistura física e da β -CD. No entanto, o complexo co-evaporado mostrou uma perda de massa de 4,90% (Tabela 2), indicando que na interação entre o (-)-Borneol e a β -CD através deste método, o monoterpeneo fica protegido de sofrer sublimação, caracterizando a formação do complexo de inclusão.

De acordo com Hădărugă (2012), a análise de água nos complexos de ciclodextrina é uma ferramenta de suma importância para a avaliação da qualidade do processo de complexação. Se a interação biocomposto-ciclodextrina for adequada, as moléculas de água no interior da cavidade interna da ciclodextrina são substituídas e o teor final de água é baixo; caso contrário, estas moléculas de água permanecem na cavidade e um elevado teor de água nos complexos de ciclodextrina pode ser determinado. Assim, foi observado que na primeira etapa das curvas TG, os teores de β -CD e CE foram designados para liberar água. No entanto, a mistura física apresentou perda de massa de 20,63% e a percentagem de água obtida pelo método de Karl Fischer foi de $12,48 \pm 0,65\%$. Desta forma, foi possível deduzir

que a perda de massa da mistura física estaria relacionada com a água e o (-)-Borneol adsorvidos na superfície da ciclodextrina.

Um estudo realizado por Freitas (2012), foi realizada a complexação de olanzepina a CD, e foi utilizado Espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) como técnica de confirmação de formação do complexo de inclusão. Os dados forneceram evidências da formação de um complexo entre a olanzapina e CD tanto em solução como no estado sólido (FREITAS et al., 2012). Os estudos de Su et al (2012), com Borneol natural e ciclodextrinas mostraram resultados similares com os do presente estudo, indicando que as alterações nestes espectros podem ser relacionadas com a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre o Borneol natural e a β -CD (SU et al., 2012a; SU et al., 2012b).

As análises de MEV foram realizadas nas magnitudes de 600-1000 \times . Mais uma vez, os dados obtidos a partir da MEV corroboram com resultados anteriores, sugerindo a formação de complexo de inclusão entre o (-)-Borneol e β -CD pelo método de co-evaporação. As alterações morfológicas podem ser utilizadas como evidências para verificar as interações entre as moléculas. Embora os estudos de MEV indiquem a formação de complexos de inclusão, as mudanças conformacionais nas partículas, tanto na aparência como no tamanho, são fortes indícios de ocorrência de formação de complexo de inclusão (FREITAS et al., 2012; FERNANDES et al., 2002; TOROPAINEN et al., 2006).

O método de DRX é útil para a detecção da complexação com ciclodextrina em estados de pó ou microcristais. O padrão de difração do complexo deve mostrar clara distinção da sobreposição de cada um dos componentes se um complexo de inclusão real for formado. No presente estudo, a complexação foi evidenciada pela formação de novas linhas de difrações como descrito por Toropainen et al (2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Su et al (2012 a, b).

Estudos recentes têm demonstrado vários efeitos farmacológicos benéficos da complexação com CD de produtos naturais apolares, tais como terpenos e óleos essenciais (SIQUEIRA-LIMA et al., 2016; PINHO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2015; QUINTANS et al., 2013; SIQUEIRA-LIMA et al., 2014). Ainda não existem registros da complexação com o Borneol para o estudo de sua atividade gastroprotetora contra agentes lesivos, após tratamento agudo e crônico.

O etanol é um dos agentes capaz de causar danos à mucosa gástrica através da ruptura da barreira muco/bicarbonato, provocando um aumento da peroxidação lipídica,

formação de radicais livres, estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade e despolarização da membrana mitocondrial, as quais precedem a morte celular (MARROTTA et al., 1999; REPETTO; LLESUY, 2002; HIRUMA-LIMA et al., 2009; MASSIGNANI et al., 2009). Já as lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão, ocorrem como consequência da excessiva formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), adesão de neutrófilos por células endoteliais e disfunção microvascular (KAWAI et al. 1994). Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o monoterpeneo (-)-Borneol é capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões provocadas por etanol em camundongos e também contra os efeitos de um período de isquemia seguido por reperfusão sanguínea em ratos. Estudos anteriores com o monoterpeneo carvacrol, um isômero do Borneol, mostraram que este possui efeito protetor gástrico nos mesmos modelos de indução de lesões (OLIVEIRA et al., 2012).

Esse efeito protetor foi comparado à ação do Borneol complexado à β -ciclodextrina, que mostrou uma proteção gástrica de eficácia semelhante, com uma quantidade bem menor de Borneol. No entanto, vale ressaltar que a quantidade de Borneol incorporada ao complexo de inclusão, torna-se menor que as doses utilizadas para o Borneol não complexado, pois a razão molar da complexação foi de 1:1 (154 mg:1135 mg de Borneol CD), fazendo com que a dose de Borneol, incorporada na unidade de CD, seja menor. Portanto, a melhor dose testada para Borneol (25 mg/kg) torna-se cerca de 3,0 mg/kg em complexo com CD (ANDRADE et al., 2014). Estes resultados mostram que a utilização da β -CD aumenta a eficácia do borneol, possivelmente por melhorar sua biodisponibilidade, aumentando a potência do mesmo (MOSHER; THOMPSON, 2002). Os dados obtidos por Su et al. (2012) mostram que a formação de um complexo de inclusão com β -CD aumentou significativamente a estabilidade e solubilidade aquosa do Borneol natural.

De acordo com Ishihara et al. (2008), a formação de EROs e a alteração dos fatores antioxidantes, como por exemplo, as enzimas catalase e superóxido dismutase e os grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) também têm um papel importante na patogênese de úlceras induzidas por ácido acético. Além disso, as úlceras gástricas provocadas por esse agente envolvem alterações em fatores de crescimento, aderência de muco, microcirculação, óxido nítrico, citocinas e produção de prostaglandinas derivadas da enzima ciclooxigenase-2 (KOBAYASHI et al., 2001; SHAHIN et al., 2001). O processo de cura desse tipo de lesão torna-se difícil, uma vez que há o envolvimento de migração e proliferação de células epiteliais e inflamatórias, a síntese e degradação de moléculas da matriz extracelular e

componentes de tecido conectivo, além do aumento de fatores de crescimento e produção de citocinas que, juntos fazem da cicatrização um processo de grande complexidade (TARNASWSKI et al., 1995). Tanto o Borneol (BOR) como o Borneol-CD (BOR-CD), administrados diariamente por 7 dias, foram capazes de produzir uma cicatrização significativa das lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratos.

Através desses resultados, pode-se concluir que o Borneol apresenta potencial atividade gastroprotetora e cicatrizante e a complexação do mesmo em β -CD parece melhorar suas propriedades químicas e farmacológicas.

Agradecimentos

Somos gratos à RENORBIO-UFPI (Rede Nordeste de Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí, Brasil), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), à FAPITEC-SE (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) pelo apoio financeiro. Não há conflitos de interesses relacionados com este estudo.

Referências

- AI, F.; MA, Y.; WANG, J.; LI, Y. Preparation, Physicochemical Characterization and In-vitro Dissolution Studies of Diosmin-cyclodextrin Inclusion Complexes. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, IJPR, v. 13, p. 1115-1123, 2014.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; SOUZA, G. R. ; Silva, J.C. ; SARAIVA, S. R. G. L. ; OLIVEIRA JUNIOR, R. G. ; QUINTANS, J.S.S. ; BARRETO, R. S. S. ; BONJARDIM, L. R. ; Cavalcanti, S.C.H. ; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. . Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-5, 2013.
- AL OMARI, A. A.; AL OMARI, M. M.; BADWAN, A. A.; AL-SOU'OD, K. A. Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of candesartan cilexetil in solution and solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 503-509, 2011.
- ANDRADE, T. A., SOUSA, B.M. H., MENEZES, P.P., DORIA, G.A.A., LIMA, B.S., SILVA, F.A., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., SILVA, G.F., SANTOS, M.R.V., ARAUJO, A.A.S., 2014. **Inclusão molecular do (-)-Borneol em β -ciclodextrina: preparação e caracterização físicoquímica**. In: IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria (CBRATEC), 2014, Serra NegraSP. CDROM do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria. Serra Negra SP: Editora do CEBRATEC, v. 1. p. 13. 2014.
- BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **American Journal of Medicine**, v. 123, n. 4, p. 358-66, 2010.

BARRETO, R.S.S., QUINTANS, J.S.S., BARRETO, A.S., ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C., GALVÃO, J.G., GONSALVES, J.K.M.C., NUNES, R.S., CAMARGO, E.A., LUCCA-JÚNIOR, W., SOARES, R.C., FEITOSA, V., L.C., QUINTANS-JÚNIOR, L.J., Improvement of wound tissue repair by chitosan films containing (-)-Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, in rats. **International Wound Journal**, 2014. doi: 10.1111/iwj.12385

BHARGAVA, K. P.; GUPTA, M. B.; TANGRI, K. K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 191-195, 1973.

BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API. A. M. Fragrance material review on Borneol. n, v. 46 (Suppl 1), s77-s80, 2008. doi:10.1016/j.fct.2008.06.031

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645-666, 2007.

CANDAN, F., UNLU, M., TEPE, B., DAFERERA, D., POLISSIOU, M., SOKMEN, A. et al., Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215-20, 2003.

CASTRONUOVO, G.; NICCOLI, M. Thermodynamics of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrins with acetylsalicylic acid and ibuprofen in aqueous solution at 298 K. **Thermochimica Acta**. v.557, p.44-49, 2013.

DREASSI, E.; ZIZZARI, A. T.; MORI, M.; FILIPPI, I.; BELFIORE, A.; NALDINI, A.; CARRARO, F.; SANTUCCI, A.; SCHENONE, S.; BOTTA, M. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin strongly improves water solubility and anti-proliferative activity of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines Src-Abl dual inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, p. 5958-5964, 2010.

FERNANDES, C. M.; VIEIRA, M. T.; VEIGA, F. J. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrins inclusion compounds, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 79-88, 2002.

FREITAS, M. R.; ROLIM, L. A.; SOARES, M. F.; ROLIM-NETO, P. J.; ALBUQUERQUE, M. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L. Inclusion complex of methyl-beta-cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate polymers**, v. 89, p.1095-1100, 2012.

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

HĂDĂRUGĂ, N.G. Ficaria verna Huds. extracts and their β -cyclodextrin supramolecular systems. **Chemistry Central Journal**, v. 6 p. 6-16, 2012.

HATTORI, A. Camphor in the Edo era – camphor and Borneol for medicines. **Yakushigaku Zasshi**; v. 35, p. 49-54, 2000.

HIRUMA-LIMA, C. A.; BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B.; MAGRI, L. P.; SANTOS, VILEGAS, L. C. W.; SOUZA BRITO, A. R. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p. 406–409, 2009.

HORVÁTHOVÁ, E., SLAMENOVÁ, D., MARSÁLKOVÁ, L., SRAMKOVÁ, M., WSÓLOVÁ, L. Effects of Borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1318–23, 2009.

ISHIHARA, M.; KOJIMA, R.; ITO, M. Influence of aging on gastric ulcer healing activities of the antioxidants α -tocopherol and probucol. **European Journal of Pharmacology**, v. 601, p. 143-147, 2008.

JUHA, Š., CIKOŠ, Š., CZIKKOVÁ, S., VESELÁ, J., ILKOVÁ, G., DOMORACKA, K., et al., Effects of Borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. **Folia Biologica**, v. 54, p. 1–7, 2008.

KANGWAN, N.; PARK, J. M.; HAHM, K. B. Development of GI-safe NSAID: progression from the bark of willow tree to modern pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 19, p. 17–23, 2014.

KAWAI, T.; JOH, T.; IWATA, F.; ITOH, M. Gastric epithelial damage induced by local ischemia–reperfusion with or without exogenous acid. **American Physiological Society**, v. 266, p. 263–270, 1994.

KAYACI, F.; AYTAC, Z.; UYAR, T. Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 286-294, 2013.

KNOBLOCH, K., PAUI, A., IBERL, B., WEIGAND, H., WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119–28, 1989.

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO, J.; NAKAZAWA, S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 23 – 30, 2001.

KORDALI, S., KOTAN, R., MAVI, A., CAKIR, A., ALA, A., YILDRIM, A., Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 53, p. 9452–8, 2005.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of era or an endless frontier? **Biomeditsinskaia khimiia.**, v. 57, p. 148–60, 2011.

LI, Y.H.; SUN, X.P.; ZHANG, Y.Q.; WANG, N.S. The antithrombotic effect of Borneol related to its anticoagulant property. **The American journal of Chinese medicine**, v. 36, p. 719–27, 2008.

MARRETO, R. N.; ALMEIDA, E. E. C. V.; ALVES, P. B.; NICULAU, E. S.; NUNES, R. S.; MATOS, C. R. S.; ARAÚJO, A. A. S. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**, v. 475, p. 53–58, 2008.

MARROTTA, F.; TAJIRI, H.; SAFRAN, P.; FESCE, E.; IDEO, G. Ethanol related gastric mucosal damage: evidence of a free radical mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bio normalizer, a novel natural antioxidant. **Digestion**, v. 60, p. 538–543, 1999.

MASSIGNANI, J. J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; SCHAPHAUSER, H. P.; JORGE, R. F.; SOUSA, J. P.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats, **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1355–1360, 2009.

MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; SANTANA, B. V.; NUNES, R. S.; QUINTANS-JÚNIOR L. J.; SILVA, G. F.; MEDEIROS, I. A.; MARCHIORO, M.; FRAGA, B. P.; SANTOS, M. R. V.; ARAUJO, A. A. S. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45–50, 2012.

MOSHER, G.; THOMPSON, D. O. Complexation and cyclodextrins. In: Swarbrick, J. B. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. New York, Marcel Dekker, pp 531–558, 2002.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.

OKABE, S., PFEIFFER, C.J., Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 7, p. 619–629, 1972.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, M. F. S.; LOBATO, L. C. P.; SILVA, R. S.; SCHRAMM, J. M. A. Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 1, p. 145–154, 2015.

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.

OLIVEIRA, M. G.; BRITO, R. G.; SANTOS, P. L.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; CARVALHO, Y. M. B. G.; SILVA, J. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Alpha-Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with β -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 254, p. 54–62, 2016.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 21–135, 2014.

POTRICH, F. B.; ALLEMAND, A.; SILVA, L. M.; SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MENDES, D. A. G. B.; ANDRE, E.; WERNER, M. F. P.; MARQUES, M. C. A. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 130, n. 1, p. 85-92, 2010.

QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; SANTOS, M. R.; BONJARDIM, L. R.; ALMEIDA, J. R.; GELAIN, D. P.; ARAÚJO, A. A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. **Phytomedicine**. v. 20, p. 436-440, 2013.

RAJA, B., KUMAR, M.S., KUMAR, S. Antihypertensive and antioxidant potential of Borneol-A NATURAL TERPENE in L-NAME induced hypertensive rats. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive**, v. 1, p. 271-9, 2010.

REN, Y.H., ZHAO, M., CHEN, Y.D., et al. Omeprazole affects clopidogrel efficacy but not ischemic events in patients with acute coronary syndrome undergoing elective percutaneous coronary intervention. **Chinese Medical Journal**, v. 124, p. 856-861, 2011.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433, 1979.

ROCHA, B.A.; RODRIGUES, M.R.; BUENO, P.C.P.; COSTA-MACHADO, A.R.M.; VAZ, M.M.O.L.L.; NASCIMENTO, A.P.; BARUD, H.S.; BERRETTA-SILVA, A.A. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin Increased water solubility of the chemical constituents and antioxidant activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 108, p. 87-94, 2012.

ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. **Fundamental & Clinical Pharmacology** v. 27, p.51-63, 2013.

SANTOS, C.; BUERA, M.P.; MAZZOBRE, M.F. Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. **Food Chemistry**. v. 132, p. 2030-2036, 2012.

SHAH, N.H.; LEPENDU, P.; BAUER-MEHREN, A.; GHEBREMARIAM, Y. T.; IYER, S. V.; MARCUS, J.; NEAD, K. T.; COOKE, J. P.; LEEPER, N. J. Proton pump inhibitor usage and the risk of myocardial infarction in the general population. **PLoS One**, v.10, n. 6:e0124653, 2015.

SHAHIN, M.; KONTUREK, P. W.; POHLE, T.; SCHUPPAN, D.; HERBST, H.; DOMSCHKE, W. Remodeling of extracellular matrix in gastric ulceration. **Microscopy Research and Technique**, v. 15, n. 53, p. 396-408, 2001.

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., OLIVEIRA, 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.

SIQUEIRA-LIMA, P. S.; ARAÚJO, A. A.; LUCCHESI, A. M.; QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; ALVES, P. B.; LUCCA-JUNIOR, W.; SANTOS, M. R.; 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 & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, p. 188-96, 2014.

SIQUEIRA-LIMA, P. S.; LUCCHESI, A. M.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; MENEZES, P. P.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965-987, 2016.

SU, J.; CHEN, J.; LI, L.; LI, B.; SHI, L.; CHEN, L.; XU, Z. Formation of beta-cyclodextrin inclusion enhances the stability and aqueous solubility of natural Borneol. **Journal of food science**, v. 77, p. C658-664, 2012a.

SU, J.; CHEN, J.; LI, L.; LI, B.; SHI, L.; ZHANG, H.; DING, X. Preparation of natural Borneol/2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex and its effect on the absorption of tetramethylpyrazine phosphate in mouse. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 60, p. 736-742, 2012b.

TABANCA, N., KIRIMER, N., DEMIRCI, B., DEMIRCI, F., BASER, K.H., Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of Borneol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 49, p. 4300–3, 2001.

TARGOWNIK, L.E., LIX, L.M., METGE, C.J., PRIOR, H.J., LEUNG, S., LESLIE, W.D. Use of proton pump inhibitors and risk of osteoporosis-related fractures. **Canadian Medical Association Journal**, v. 179, p. 319–326, 2008.

TARNAWSKI, A.; TANQUE, K.; SANTOS, M. A.; SARFEH, I. J. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 30, p. 9-14, 1995.

TOROPAINEN, T.; VELAGA, S.; HEIKKILA, T.; MATILAINEN, L.; JARHO, P.; CARLFORS, J.; LEHTO, V. P.; JARVINEN, T.; JARVINEN, K. Preparation of budesonide/gamma-cyclodextrin complexes in supercritical fluids with a novel SEDS method. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, p. 2235-2245, 2006.

UEDA, S.; OKADA, Y. Acid secretagogues induce Ca^{++} mobilization coupled to K^{+} conductance activation in rat parietal cells in tissue culture. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1012, p. 254-260, 1989.

WANG, G., WANG, L., XIONG, Z.Y., MAO, B., LI, T.Q., Compound salvia pellet, a traditional Chinese medicine, for the treatment of chronic stable angina pectoris compared with nitrates: a meta-analysis. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. SR1–SR7, 2006.

WEDEMEYER, R.S., BLUME, H. Pharmacokinetic drug interaction pro-files of proton pump inhibitors: an update. **Drug Safety**, v. 37, p. 201–211, 2014.

WENQIANG, G., SHUFEN, L., RUIXIANG, Y., YANFENG, H. Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Levl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 20, p. 992–8, 2006.

YUAN, C.; LU, Z.; JIN, Z. Characterization of an inclusion complex of ethyl benzoate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Food Chemistry**. v.152, p.140–145, 2014.

ZHENG, C.; SHIXIANG, H.; YUANBO, L.; BINBIN, Z.; ZHAOXIANG, Y.; SHUGUANG, X.; et al. Effect of Borneol on the distribution of gastrodin to the brain in mice via oral administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, 2008.

Capítulo III – Resultados submetidos à publicação

Este capítulo abordará os resultados obtidos neste trabalho na forma de artigo submetido ao periódico internacional *Phytomedicine* em Setembro de 2016 (Fator de impacto 2.08; Qualis B1 em Biotecnologia)

Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do (-)-Borneol livre não-complexado ou complexado em β -ciclodextrina sobre lesões gástricas agudas em camundongos

Mechanisms involved in the gastroprotective activity of of non-complexed (-)-Borneol and complexed with β -cyclodextrin on acute gastric lesions in mice

Irisdalva Sousa Oliveira^a, Francilene Vieira da Silva^a, Hélio Barros Fernandes^a, Ana Flávia Seraine Custódio Viana^b, Kamila Lopes de Lira^d, Lucas Antonio Duarte Nicolau^b, Jand Venes Rolim Medeiros^a, Adriano Antunes de Sousa Araújo^c, Lucindo José Quintans-Júnior^c, Rita de Cássia Meneses Oliveira^{a,d*}

^a*Postgraduate Program in Biotechnology - RENORBIO, Focal Point - Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil*

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

^c*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil*

^d*Medicinal Plants Research Center, Health Sciences Center, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil*

*Corresponding author: Rita de Cássia Meneses Oliveira, PhD, Medicinal Plants Research Center, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina, Brazil. Phone: +55 86 3215-5872, E-mail: menesesoliveira@gmail.com

RESUMO

Este trabalho descreve os mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do (-)-Borneol comparando com a sua forma complexada em β -ciclodextrina. Para isso verificou-se os fatores que indicam lesão na mucosa, como o nível de malondialdeído (MDA), que é um produto da lipoperoxidação e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), utilizada como substância marcadora de infiltração/agregação de neutrófilos no tecido inflamado. Investigou-se também a participação de mecanismos antioxidantes como a enzimas catalase (CAT) e os grupos sulfidrílicos não-proteícos (NP-SH). Os fatores que regulam o fluxo sanguíneo da mucosa, como óxido nítrico (NO) e potássio, foram avaliados pela quantificação de nitrito, bloqueio da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e bloqueio de canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). A atividade da CAT foi aumentada nos animais pré-tratados com BOR 25 mg/kg. A atividade da MPO foi reduzida e os níveis de nitrito foram aumentados por BOR e por BOR-CD 25 mg/kg quando comparados ao grupo controle. BOR-CD 25 mg/kg foi capaz de aumentar os níveis de GSH e reduzir os níveis de MDA, mostrando seu papel na redução de substâncias oxidantes e na regulação da lipoperoxidação. O mesmo não foi observado no grupo tratado com BOR 25 mg/kg. BOR e BOR-CD 25 mg/kg mostraram reversão do efeito protetor ao utilizar-se o bloqueador da NO sintase (L-NAME) ou o bloqueador dos canais K_{ATP} (Glibenclamida). Esses resultados sugerem a importância do óxido nítrico (NO) e também dos canais K_{ATP} no efeito evidenciado.

Palavras-chave: Borneol. β -ciclodextrina. Gastroproteção. Mecanismos antioxidantes. Fluxo sanguíneo gástrico.

ABSTRACT

This work describes the mechanisms of action involved in the gastroprotective activity of (-) - Borneol compared with its form complexed with β -cyclodextrin. Were verified factors that indicate mucosal damage, as the level of malondialdehyde (MDA), which is a lipid peroxidation product, and activity of the myeloperoxidase enzyme (MPO), used as a infiltration/aggregation marker of neutrophils in the inflamed tissue. It also investigated the participation of antioxidants mechanisms such as catalase (CAT) and non-protein sulfhydryl groups (NP-SH). The factors that regulate the blood flow in gastric mucosal, such as nitric oxide (NO) and potassium were evaluated by quantitation of nitrite,

blocking of nitric oxide synthase (NOS) and blocking of ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}). The activity of catalase was increased in animals pretreated with BOR 25 mg/kg. The activity of MPO was reduced while nitrite levels were increased by BOR and BOR-CD 25 mg/kg when compared to the control group. BOR CD 25 mg/kg was able to increase GSH levels and reduce MDA levels, showing their role in reducing oxidizing substances and regulation of lipid peroxidation. These results weren't observed in the group treated with BOR 25 mg / kg. BOR and BOR-CD 25 mg / kg had their protective effect abolished when a blocker of NO synthase (L-NAME) or a blocker of K_{ATP} (glibenclamide) were used. These results suggest the importance of nitric oxide (NO) and K_{ATP} channels in evidenced effect.

Keywords: Borneol, β -cyclodextrin, gastroprotection, antioxidant mechanisms, gastric blood flow

1. INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica é uma doença que afeta milhares de pessoas, e é considerada uma das mais importantes doenças do sistema digestivo e um problema médico-social da importância econômica global devido a suas altas taxas de morbidade e mortalidade (BUCCIARELLI et al., 2010; CHATURVEDI et al., 2007; RASHEED et al., 2010, JI et al., 2012). Os medicamentos utilizados no tratamento da úlcera gástrica são antiácidos, anticolinérgicos, inibidores da bomba de prótons e antagonistas do receptor de histamina H₂. No entanto, há vários efeitos adversos associados a estes medicamentos, como por exemplo, hipersensibilidade, ginecomastia, impotência, arritmia e alterações hematopoiéticas. (SANTIN et al., 2010). Esses efeitos são agravados pela utilização prolongada destes fármacos, sendo necessária a busca de alternativas que associem múltiplas ações, reduzindo os mecanismos reflexos compensatórios. O estudo dos óleos essenciais e seus componentes representa uma possível alternativa para estes problemas, pois espécies aromáticas contendo esses compostos têm sido usadas desde a antiguidade devido a suas propriedades terapêuticas (DE SOUSA, 2012)

O (-)-Borneol (1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol) é um monoterpeneo bicíclico, presente nos óleos essenciais de numerosas plantas. Estudos anteriores mostraram que o mesmo possui ações farmacológicas ligadas às atividades antibacteriana e antifúngica (KNOBLOCH et al., 1989; TABANCA et al., 2001; WENQIANG et al., 2006), antioxidante (KORDALI et al., 2015; CANDAN et al., 2003), imunomodulatória (JUHA et al., 2008), efeito anti-hipertensivo (RAJA et al., 2010; SILVA-FILHO et al., 2011), cicatrizante tópico

(BARRETO et al., 2014), antitrombótico e antiplaquetário (LI et al., 2008), anti-inflamatória e antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2013). Além disso, o borneol apresenta baixa toxicidade celular em condições *in vitro* e *ex vivo* com o valor de IC50 (concentração inibidora média que provoca aproximadamente 50% de morte celular,) calculado para uma concentração de 2,5-3 mM. Em baixas concentrações (0,5-1,5 mM), também é capaz de inibir danos ao DNA quando aplicado em hepatócitos após o tratamento com o agente genotóxico H₂O₂ (HORVÁTHOVÁ et al., 2009; XIONG et al., 2013). Por ser insolúvel em água e sofrer sublimação facilmente, o uso farmacológico do Borneol é limitado (BHATIA et al., 2008). A utilização de ciclodextrinas (CD) hidrofílicas já é bastante disseminada no mercado para melhorar características de solubilidade e estabilidade de fármacos (BREWSTER et al., 2007).

Estudos já realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o (-)-Borneol, não complexado (Borneol) ou complexado em β -ciclodextrina (Borneol-CD) possuem atividade gastroprotera contra lesões gástricas produzidas por etanol absoluto (OLIVEIRA et al., 2015). Entre as doses testadas, a de 25 mg/kg foi a que a mostrou o melhor efeito protetor, tanto para o Borneol quanto para o Borneol-CD, sendo esta a dose utilizada neste trabalho para a investigação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito evidenciado.

2. METODOLOGIA

2.1. Substâncias químicas

As substâncias utilizadas foram (-)-Borneol, β -Ciclodextrina (β -CD), carbenoxolona, L-arginina (L-ARG), N-acetilcisteína (NAC), N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), glibenclamida, diazóxido, 5,50 ditiobis (2-nitrobenzoic acid), reagente de Griess, nitrito de sódio (NaNO₂), brometo de hexadeciltrimetil-amônio, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, ácido fosfórico (H₃PO₄) e dicloridrato de o-dianisidina, (Sigma-Aldrich, EUA); éter dietílico (Chemco, Brasil); hidróxido de sódio (Isofar, Brasil); fosfato de potássio, peróxido de hidrogênio, cloreto de magnésio, fosfato de potássio e EDTA (Dinâmica, Brasil); n-butanol e etanol absoluto (MULTILAB, Brasil). Borneol foi dissolvido em Tween 80 a 1% e diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e Borneol-CD em apenas solução salina. O Borneol e outras concentrações de droga foram ajustadas para o tratamento para se obter um volume de 10 mL/kg.

2.2. Preparação dos complexos de (-)-Borneol/ β -CD

Um complexo por co-evaporação (CE) foi preparado pela adição de água (20 mL) em um almofariz contendo β -CD (1.135 mg) e (-) - Borneol (154 mg), também numa razão molar de 1:1. A mistura foi sujeita a agitação magnética em 15 g durante 36h. Posteriormente, a amostra foi transferida para um recipiente e seca em um dessecador. Baseando-se na proporção molar entre o Borneol e a β -CD, estima-se que 12% da massa do complexo, represente a quantidade de Borneol. Assim, a dose de 25 mg/kg de BOR-CD utilizada neste estudo, equivale a uma quantidade de 3 mg/kg de (-)-Borneol.

2.3. Animais

Camundongos Swiss (25-30 g), fêmeas, foram mantidos sob condições controladas ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de claro/escuro de 12 h), com comida e água *ad libitum*. Antes de cada experimento, foram mantidos em jejum por 18 h e em seguida, aclimatizados ao ambiente de teste por 2 h. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos diferentes ($n = 7$ animais). Após todos os 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 008/12).

2.4. Atividade antioxidante

Lesões gástricas agudas foram induzidos em camundongos por tratamento oral com etanol absoluto (0,2 mL/animal) com veículo (NaCl 0,9%, 10 mL/kg) (ROBERT et al., 1979). Veículo, Borneol ou Borneol-CD (25 mg/kg), ou N-acetilcisteína (200 mg/kg) foram administrados oralmente 1 hora antes da aplicação do agente ulcerogénico. Os animais foram eutanasiados 30 minutos após a administração do etanol, seus estômagos foram removidos, abertos ao longo da curvatura maior e utilizados para a quantificação dos seguintes parâmetros:

2.4.1. Análise de glutathiona

O teor de glutathiona reduzida (GSH) nos tecidos gástricos foi estimado de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Resumidamente, 50-100 mg de tecido gástrico congelado foi homogeneizado em 1 mL de EDTA 0,02 M para cada 100 mg de tecido. Aliquotas (400 μL) do homogenato foram misturados com 320 μL de água destilada

e 80 mL de ácido tricloroacético 50% (m/v), para precipitar as proteínas. Os tubos foram centrifugados a 850 g durante 15 min a 4°C. Os sobrenadantes (400 μ L) foram misturados com 800 μ L de tampão Tris (0,4 M, pH 8,9) e 20 μ L de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, 0,01 M). A mistura foi, em seguida, agitada durante 3 min e a absorbância foi lida a 412 nm utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em microgramas de GSH por grama de tecido.

2.4.2. Atividade da catalase

Os estômagos foram pesados e homogeneizados numa solução tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 7,4) e centrifugados a 850 g por 15 min. Uma solução de peróxido de hidrogênio (0,059 M) foi preparado com a solução tampão e utilizada como substrato para o ensaio. Numa cubeta de quartzo, 0,1 mL da amostra de sobrenadante foi misturado com 1 mL de tampão/peróxido de hidrogênio e 1,9 mL de água destilada. A atividade da enzima foi medida a 240 nm por espectrofotometria durante 6 minutos, através da leitura da variação de absorbância entre o primeiro e sexto minuto. Os resultados são expressos em millimolars por minuto por 100 mg de tecido (mM/min/100 g e tecido) (Beers e Sizer, 1952).

2.4.3. Medição dos níveis de nitritos totais

A quantidade de nitrito estável, o produto final do metabolismo do NO, na mucosa gástrica foi determinada por um ensaio colorimétrico tal como descrito por Green et al. (2000). Resumidamente, 100 μ L de homogenato da mucosa gástrica foi misturado com um volume igual de reagente de Griess (sulfanilamida a 1%, 0,1% de dicloridrato de diamina naftil etileno em 5% de H₃PO₄) e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min. A absorbância foi lida a 540 nm num leitor de microplacas (UVM-340, Asys Hitech, Netherlands). Calculou-se a quantidade de nitrito a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram expressos como μ M de nitrito por grama de proteína. A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo ensaio de Bradford (1976).

2.4.4. Atividade da mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Ela tem sido amplamente utilizada como marcadora bioquímica para a infiltração de granulócitos em vários tecidos, incluindo o trato gastrointestinal. A

extensão da acumulação de neutrófilos na mucosa gástrica foi medida por avaliação de atividade de MPO como descrito anteriormente (Bradley et al., 1982). Resumidamente, 50-100 mg de tecido foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) com brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% para cada 50 mg de tecido. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 40000 g durante 7 minutos a 4° C. A atividade de MPO no sedimento ressuspensão foi testada através da medição da alteração da absorvância a 450 nm, utilizando dicloridrato de o-dianisidina e peróxido de hidrogênio a 1%. Os resultados são relatados como unidades (U) de MPO/mg de tecido. Uma unidade de atividade de MPO é definida como a conversão de 1 μ mol de H₂O₂ à água em 1 min a 22°C.

2.4.5. Análise de malondialdeído

O nível de malondialdeído (MDA) em homogenatos a partir de cada grupo foi determinada utilizando o método de Mihara e Uchiyama (1978), que é baseado na reação com ácido tiobarbitúrico. Fragmentos de mucosa gástrica pesando entre 100 e 150 mg, foram homogeneizadas em KCl frio (1,15%) para preparar uma solução de homogenato a 10%. Resumidamente, 250 μ L deste homogenado foi adicionado a 1,5 mL de 1% de H₃PO₄ e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,6% (solução aquosa). Em seguida, a mistura foi agitada e aquecida em banho de água fervente durante 45 min. Em seguida, a mistura da reação foi imediatamente resfriada em banho de água gelada, seguido pela adição de 4 mL de n-butanol. Esta mistura foi agitada durante 1 min, e a camada de butanol foi separado por centrifugação a 1200 g durante 10 min. A absorvância foi determinada a 535 e 520 nm, e calculou-se a diferença de absorvância entre as duas determinações e considerada como o valor de ácido tiobarbitúrico. As concentrações de MDA são expressas como nanomoles por grama de tecido (nmol/g).

2.5. Papel da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Camundongos foram pré-tratados com veículo (salina 0,9%), N ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) ou glibenclamida 30 minutos antes da administração de (-)-Borneol ou Borneol-CD (25 mg/kg, v.o.), L-Arg (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 min depois, os animais foram eutanasiados, os estômagos foram removidos para

exame como descrito anteriormente (item 3.2.10) (GÜRBÜZ et al., 1999; PESKAR et al., 2002).

2.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm SEM. A significância estatística para as diferenças entre grupos foi calculada por análise de variância (ANOVA) e o realizado o pós teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism™ 5.0 (San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

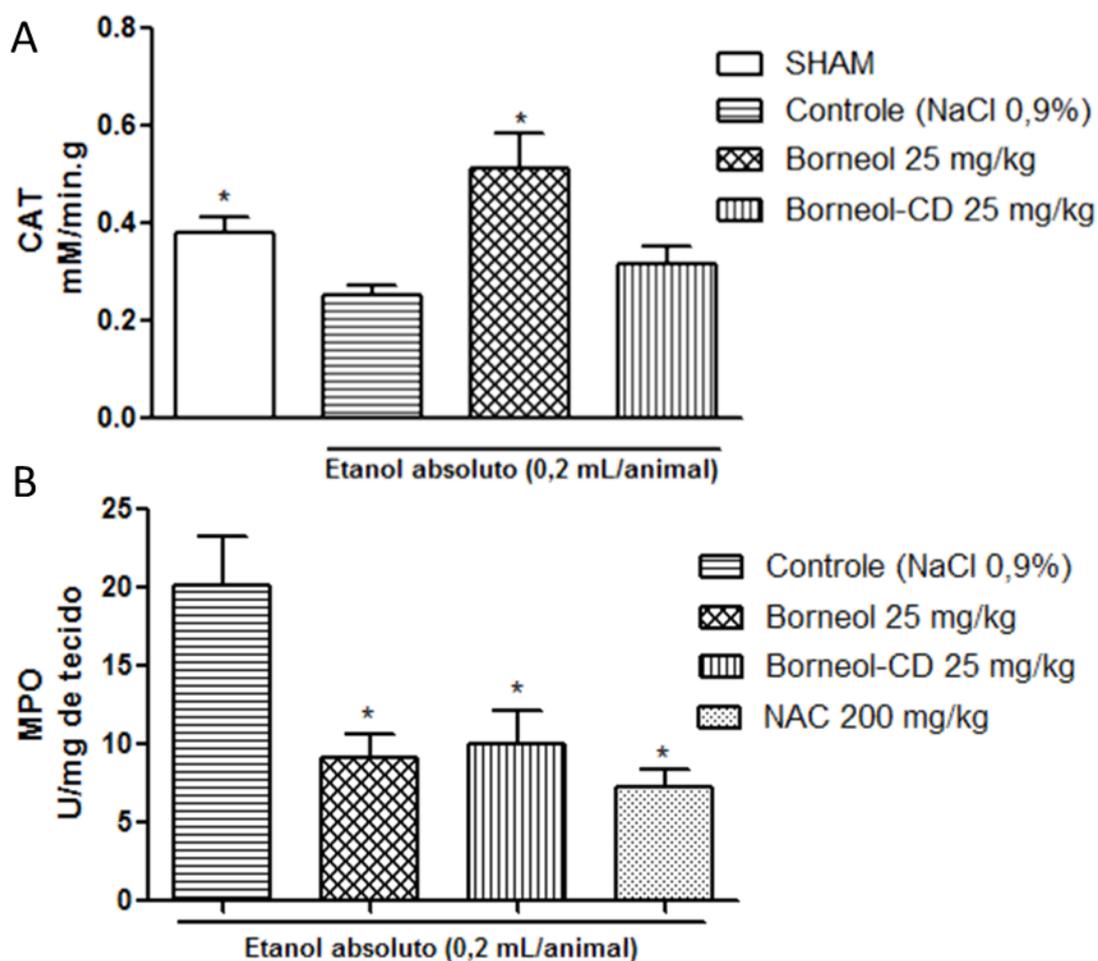
3.1. Determinação da atividade da catalase

A determinação da atividade enzimática da catalase em estômagos de camundongos indicou uma quantidade de $0,38 \pm 0,03$ mM/min.g de tecido (SHAM) e, após tratamento com etanol, foi significativamente reduzida no grupo controle ($0,25 \pm 0,02$ mM/min.g de tecido). Após pré-tratamento oral com Borneol (25 mg/kg), a atividade da catalase aumentou acentuadamente ($0,51 \pm 0,07$ mM/min.g de tecido), em comparação com o grupo controle. Entretanto, no grupo tratado com Borneol-CD 25 mg/kg ($0,32 \pm 0,04$ mM/min.g de tecido), a atividade da catalase não mostrou nenhuma mudança significativa quando comparado com o grupo controle (Figura 1).

3.2. Medição da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Nos estômagos dos animais pré-tratados com NAC (200 mg/kg), Borneol ou Borneol-CD (25 mg/kg), a atividade de MPO foi diminuída ($7,23 \pm 1,21$; $9,08 \pm 1,54$ e $9,99 \pm 2,17$ U de MPO/mg de tecido) em comparação com o grupo ulcerado ($20,12 \pm 3,18$ U de MPO/mg de tecido) (Figura 1).

Figura 1. Efeito de Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg, sobre a atividade da catalase (A) e MPO (B) no tecido gástrico em ratos.



SHAM: Não foi exposto ao agente estressor. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ comparados ao respectivo grupo controle (ANOVA one way e teste de Tukey's).

3.3. Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH)

Animais tratados com NAC (200 mg/kg) ou Borneol-CD (25 mg/kg), antes da administração de etanol, mostraram um aumento significativo nos níveis de GSH ($412,43 \pm 13,47$ e $387,68 \pm 10,48$ $\mu\text{g/g}$ de proteína, respectivamente) quando comparados com o grupo controle ($302,87 \pm 27,01$ $\mu\text{g/g}$ de proteína). Para o grupo tratado com Borneol 25 mg/kg ($305,63 \pm 6,49$ $\mu\text{g/g}$ de proteína), o conteúdo de GSH não mostrou nenhuma mudança em comparação com o grupo controle. Os animais do grupo SHAM ($425,5 \pm 38,67$ $\mu\text{g/g}$ de proteína) mostraram um conteúdo de GSH maior do que o controle (Figura 2).

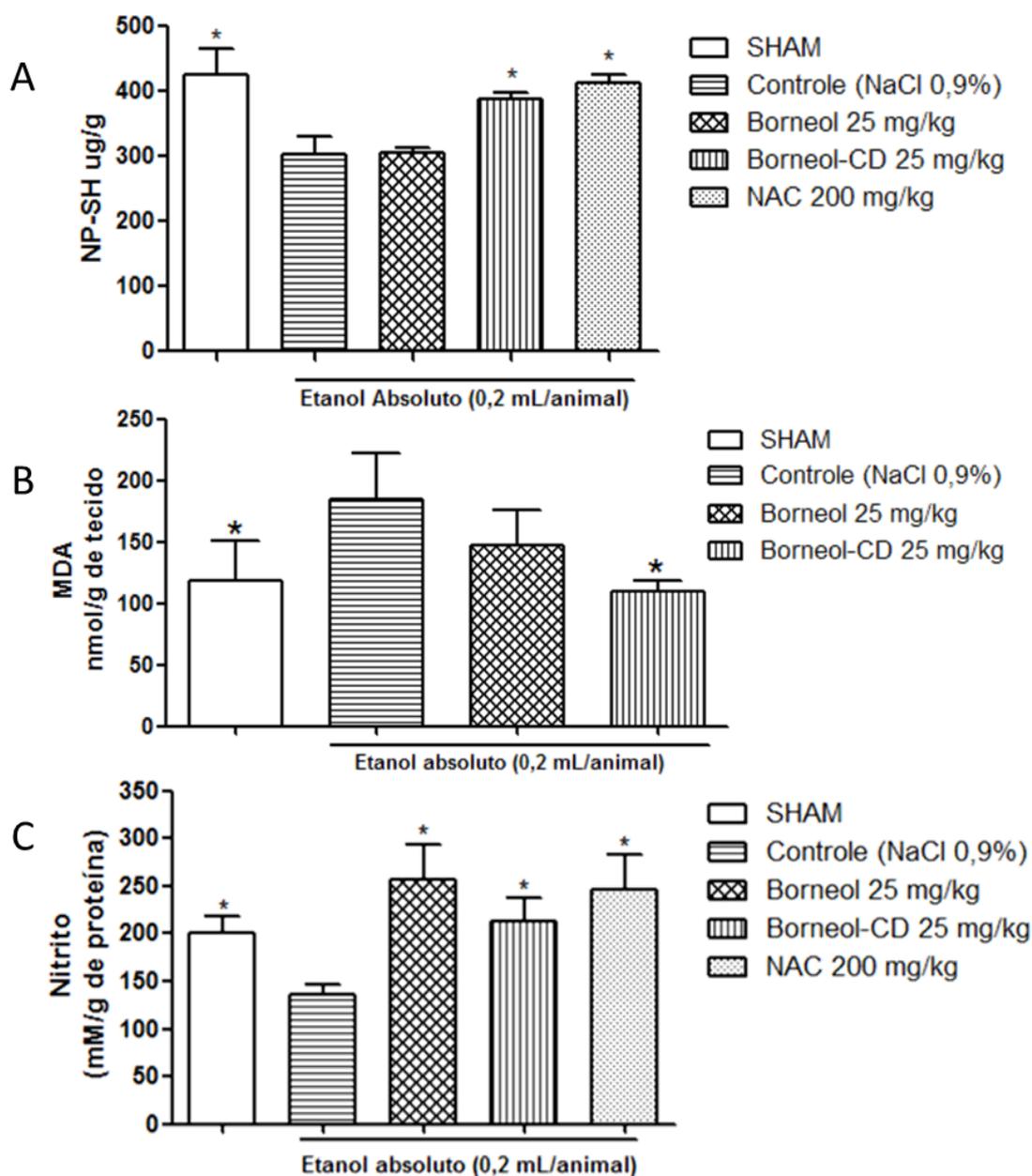
3.4. Medição da peroxidação lipídica

Os níveis de MDA gástrico, que é um índice de peroxidação lipídica, se apresentaram com valores de $124,41 \pm 11,51$ nmol/g no grupo SHAM e observou-se um aumento significativo após a administração oral de etanol absoluto no grupo veículo ($165,69 \pm 31,44$ nmol/g). O tratamento com Borneol-CD (25 mg/kg), antes da administração de etanol, foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica de modo significativo ($109,88 \pm 5,16$ nmol/g, respectivamente), quando comparados ao grupo controle. Entretanto, o grupo tratado com Borneol 25 mg/kg ($137,76 \pm 25,22$ nmol/g) não mostrou redução significativa nos níveis de MDA (Figura 2).

3.5. Conteúdo de nitrito na mucosa gástrica

Em comparação com o grupo SHAM ($200,89 \pm 16,56$ μ g/g de tecido), os níveis de nitritos totais da mucosa foram marcadamente reduzidos no grupo controle, tratado com etanol ($135,97 \pm 10,13$ μ g/g de tecido). O tratamento oral com NAC 200 mg/kg, Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg ou aumentou significativamente os níveis de nitrito na mucosa gástrica ($246,91 \pm 35,18$; $256,06 \pm 36,98$ e $213,75 \pm 24,46$ μ g/g de tecido, respectivamente), comparados com o grupo controle (Figura 2).

Figura 2. Efeito de Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg, sobre (A) os grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH), (B) - o conteúdo de malondialdeído (MDA) e (C) de nitrito no tecido gástrico em ratos.



SHAM: Não foi exposto ao agente estressor. Os dados são representados como média \pm E.P.M.

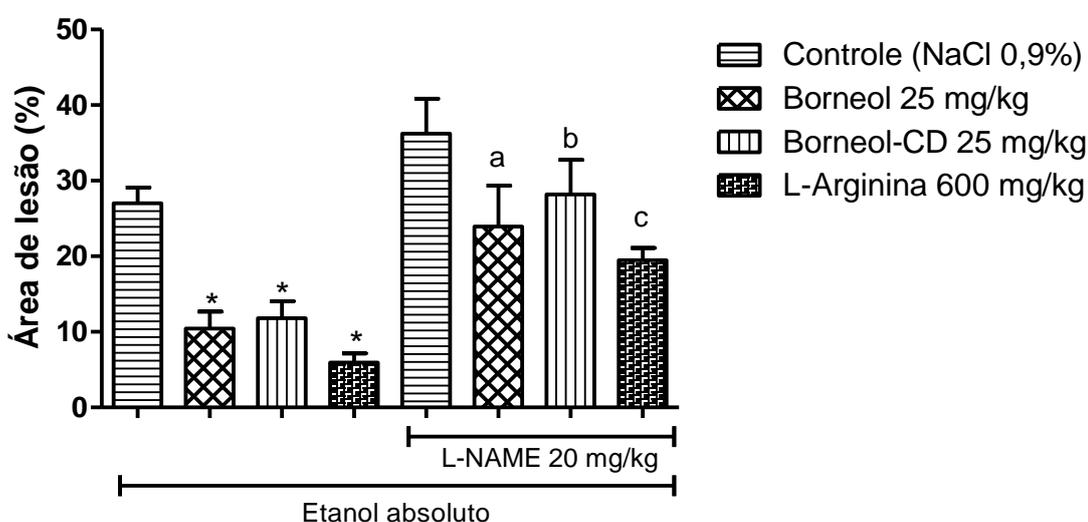
* $p < 0.05$ comparados ao respectivo grupo controle (ANOVA one way e teste de Tukey's).

3.6. Participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS)

No grupo controle, o etanol absoluto produziu lesões gástricas ($27,02 \pm 2,06$) que foram reduzidas significativamente nos grupos de animais tratados com o Borneol (25 mg/kg), o Borneol-CD (25 mg/kg) ou a L-arginina (L-ARG, 600 mg/kg), para $10,43 \pm 2,25$;

$11,83 \pm 2,25$ e $5,94 \pm 1,22$, respectivamente. O pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg) foi capaz de reverter a gastroproteção promovida pelo Borneol, o Borneol-CD e pela L-ARG para $23,92 \pm 5,42$; $28,17 \pm 4,59$ e $19,49 \pm 1,60$ quando comparados com os grupos que não receberam o L-NAME (Figura 3).

Figura 3. Efeito de Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg ou da L-arginina (600 mg/kg) após pré-tratamento com L-NAME, 20 mg/kg, no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

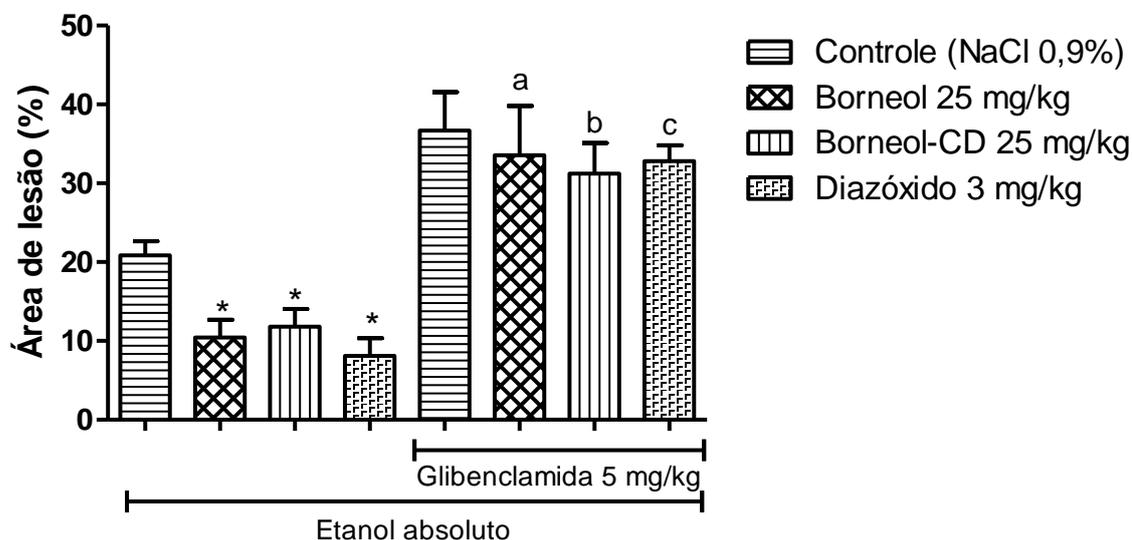


Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$, comparados ao grupo Controle não tratado com L-NAME, ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo Borneol não tratado com L-NAME, ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo Borneol-CD não tratado com L-NAME e ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo L-arginina não tratado com L-NAME (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey).

3.7. Participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})

No grupo controle, o etanol absoluto produziu lesões gástricas ($20,87 \pm 1,78$) que foram reduzidas significativamente nos grupos de animais tratados com o Borneol (25 mg/kg), o Borneol-CD (25 mg/kg) ou a diazóxido (3 mg/kg), para $10,43 \pm 2,25$; $11,83 \pm 2,25$ e $8,10 \pm 2,23$, respectivamente. O pré-tratamento com Glibenclamida (10 mg/kg) foi capaz de reverter a gastroproteção promovida pelo Borneol, o Borneol-CD e pela diazóxido para $33,58 \pm 6,21$; $31,22 \pm 3,89$ e $32,82 \pm 2,00$ quando comparados com os grupos que não receberam o Glibenclamida (Figura 4).

Figura 4. Efeito de Borneol ou Borneol-CD 25 mg/kg ou do Diazóxido (3 mg/kg) após pré-tratamento com Glibenclamida 5 mg/kg, no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$, comparados ao grupo Controle não tratado com Glibenclamida, ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo Borneol não tratado com Glibenclamida, ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo Borneol-CD não tratado com Glibenclamida e ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo Diazóxido não tratado com Glibenclamida (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey).

4. DISCUSSÃO

A integridade da mucosa gástrica é mantida através da associação de fatores que controlam a secreção de ácido e muco, o fluxo sanguíneo e fatores antioxidantes (KWIECIEN et al., 2014). A atividade antioxidante *in vitro* de óleos essenciais ou extratos de plantas contendo Borneol é bem documentada por Vardar-Unlü et al. (2003), Radonic and Milosh (2003), Sökmen et al. (2004), Harish et al. (2005) e Kelen; Tepe (2008).

Independentemente do tipo de espécie reativa de oxigênio (ERO), o primeiro estágio da lesão celular mediada por estas, é peroxidação dos componentes da membrana celular, em particular lípidos de membrana em um processo chamado de peroxidação lipídica (MATSUDA et al., 2013). Os peróxidos de lípidos são metabolizados por β -oxidação a malondialdeído (MDA) e a 4-hidroxinonenal (4-HNE). O nível de lipoperoxidação promovida pelo etanol foi medida indiretamente através da quantificação de MDA. Verificou-se que o pré-tratamento com Borneol complexado à CD (Borneol-CD) foi capaz de reduzir este parâmetro, provavelmente devido à eliminação de compostos tóxicos,

principalmente pela enzima superóxido dismutase (SOD), pois esta desempenha um papel crucial na neutralização de EROs (BILICI et al., 2002; TAMURA et al., 2013).

Outro fator associado com a presença de úlceras gástricas é o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), utilizada como uma marcadora de infiltração de neutrófilos no tecido inflamado (BONAMIN et al. 2014). O tratamento com Borneol-CD também age reduzindo a atividade da MPO, mostrando seu papel na redução da agregação de neutrófilos. O monoterpeneo Eucalyptol também promoveu gastroproteção mediada pela redução na quantidade de MDA e da atividade da enzima MPO (CALDAS et al., 2015).

As células têm diferentes sistemas para controlar a quantidade de EROs, como por exemplo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Elas protegem a mucosa gástrica contra os efeitos tóxicos do oxigênio derivado de radicais livres (OKTEM et al., 2005). A enzima SOD catalisa a transformação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , que é menos nocivo. Este é então degradado pela enzima CAT, o transforma em água e oxigênio ou pela GSH-Px (BHATTACHARJEE et al., 2002). A redução do H_2O_2 em água pela GSH-Px é acompanhada da conversão de glutathiona da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG) (KWIECIEN et al., 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho foram consistentes com outro estudo descrito na literatura para os estômagos lesionados com etanol. Uma diminuição da quantidade de GSH e da atividade da catalase e um aumento na peroxidação lipídica foi observada para o grupo exposto à ação deletéria desse álcool (LI et al., 2016). Foi demonstrado que o Borneol conseguiu aumentar a atividade da catalase. No entanto, o Borneol-CD não altera a atividade da enzima catalase, mas aumenta a quantidade dos níveis de nitrito na mucosa. Além disso, seu mecanismo envolve o aumento nos níveis de GSH, mostrando uma atividade antioxidante por sequestro de radicais livres.

O Borneol e o Borneol-CD induziram a um aumento na quantidade de nitrito na mucosa gástrica. O nitrito é um precursor da síntese de óxido nítrico (NO) que age aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, promovendo vasodilatação. Este fator é importante não apenas por manter a integridade da mucosa gástrica, mas também por promover a remoção de EROs e prevenir a ativação de mediadores inflamatórios (CHAN; LEUNG, 2002; MEDEIROS et al., 2008). Estes resultados sugerem o possível envolvimento da síntese de óxido nítrico no mecanismo gastroprotetor de Borneol. Além disso, o pré-tratamento com L-NAME, um inibidor não específico da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), aboliu parcialmente a gastroproteção apresentada por Borneol e por Borneol-

CD, corroborando com dados anteriores que mostraram monoterpenos alterando a atividade da NOS (OLIVEIRA et al., 2012; CARVALHO et al., 2014) e aumentando os indícios da participação do óxido nítrico no efeito gastropotetor dessa substância.

A regulação do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica também envolve a participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), uma classe de ligantes protéicos envolvidos também na secreção de ácido gástrico e na contratilidade do estômago (RIBEIRO et al., 2016). Na presença da glibenclamida, um bloqueador desses canais, o efeito de Borneol e de Borneol-CD foi revertido, sugerindo a importância desses canais em seu efeito gastroprotetor. Mecanismos gastroprotetores semelhantes foram observados para o monoterpeno carvacrol, com a participação de fatores antioxidantes, da enzima NOS e dos K_{ATP} (OLIVEIRA et al., 2012).

Em resumo, o presente estudo demonstrou que a atividade gastroprotetora do Borneol contra lesões agudas da mucosa gástrica induzidas por etanol absoluto parece ser mediada pela redução da peroxidação lipídica, redução da agregação de neutrófilos, participação do óxido nítrico e dos canais K_{ATP} , aumento dos grupos NP-SH e a atividade da catalase. Embora a dose testada de BOR-CD contenha apenas 12% de (-)-borneol, a ativação dos mecanismos protetores gástricos ocorreu de maneira semelhante ao BOR na mesma dose preparada. Este fato pode significar um aumento na biodisponibilidade da substância. Mais estudos são necessários para avaliar fatores adicionais envolvidos em tais ações e para elucidar as diferenças no mecanismo de ação entre as duas formas do Borneol investigadas.

Agradecimentos

Somos gratos à RENORBIO-UFPI (Rede Nordeste de Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí, Brasil), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), à UFSE (Universidade Federal de Sergipe) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) pelo apoio financeiro. Não há conflitos de interesses relacionados com este estudo.

Referências

ALMEIDA, J. R. G. S. ; SOUZA, G. R. ; Silva, J.C. ; SARAIVA, S. R. G. L. ; OLIVEIRA JUNIOR, R. G. ; QUINTANS, J.S.S. ; BARRETO, R. S. S. ; BONJARDIM, L. R. ; Cavalcanti, S.C.H. ; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. . Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1-5, 2013.

BARRETO, R.S.S., QUINTANS, J.S.S., BARRETO, A.S., ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C., GALVÃO, J.G., GONSALVES, J.K.M.C., NUNES, R.S., CAMARGO, E.A., LUCCA-JÚNIOR, W., SOARES, R.C., FEITOSA, V., L.C., QUINTANS-JÚNIOR, L.J.,

Improvement of wound tissue repair by chitosan films containing (-)-Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, in rats. **International Wound Journal**, 2014. doi: 10.1111/iwj.12385

BEERS, R. F. Jr.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 95, p. 133–140, 1952.

BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on Borneol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 (Suppl 1), p. s77–s80, 2008.

BHATTACHARJEE, M.; BHATTACHARJEE, S.; GUPTA, A.; BANERJEE, R. K. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in H. pylori-mediated and nonmediated gastric ulcer. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, p.731–743, 2002..

BILICI, D.; SULEYMAN, H.; BANOĞLU, Z. N.; KIZILTUNC, A.; AVCI, B.; CIFTÇIOĞLU, A.; BILICI, S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, p. 856–861, 2002.

BONAMIN, F.; MORAESA, T. M.; SANTOS, R.C.; KUSHIMA, H.; FARIA, F. M.; SILVA, M. A.; JUNIOR, I. V.; NOGUEIRA, L.; BAUAB, T. M.; SOUZA BRITO, A. R. M.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. 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.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645–666, 2007.

BUCCIARELLI, A.; MINETTI, A.; MILCZAKOWSKY, C.; SKLIAR, M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 1025–1030, 2010.

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

CANDAN, F., UNLU, M., TEPE, B., DAFERERA, D., POLISSIOU, M., SOKMEN, A. et al., Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215–20, 2003.

CARVALHO, K. I. M.; BONAMIN, F.; SANTOS, R. C.; PÉRICO, L. L.; BESERRA, F. P.; SOUSA, D. P.; FILHO, J. M. B.; ROCHA, L. R. M.; 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, n. 4, p. 355–365, 2014.

- CHAN, F. K.; LEUNG, W. K. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 360, p. 933–941, 2002.
- CHATURVEDI, A.; KUMAR, M. M.; BHAWANI, G.; CHATURVEDI, H.; KUMAR, M.; GOEL, R. K. Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seeds on gastric ulceration and secretion in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 51, p. 131–140, 2007.
- DE SOUSA, D. P. **Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects**, 1st ed.; Nova Science Publishers: New York, NY, USA, pp. 1–236, 2012.
- GREEN, L. C.; TANNENBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in Parkinson's disease using the model of the 6-hydroxydopamine and MPTP, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 262–273, 2000.
- GÜRBÜZ, V.; ALICAN, I.; BERRAK, Y.; YEGEN, C.; BOZKURT, A.; OKTAR, B.; HAKLAR, G.; YÜKSEL, M.; KURTEL, H. Role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric mucosal dysfunction in the rat. **Experimental Physiology**, v. 84, n. 2, p. 319–332, 1999.
- HARISH, R.; DIVAKAR, S.; SRIVASTAVA, A.; SHIVANANDAPPA, T. Isolation of antioxidant compounds from the methanolic extract of the roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight and Arn.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7709–7714, 2005.
- HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMENOVÁ, D.; MARSÁLKOVÁ, L.; SRAMKOVÁ, M.; WSÓLOVÁ, L. Effects of Borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1318–23, 2009.
- JI, C. X.; FAN, D. S.; LI, W.; GUO, L.; LIANG, Z. L.; XU, R. M.; ZHANG, J. J. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of the antidepressants duloxetine, amitriptyline, fluoxetine and mirtazapine in different models of experimental gastric ulcer in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, p. 46–51, 2012.
- JUHA, Š., CIKOŠ, Š., CZIKKOVÁ, S., VESELÁ, J., ILKOVÁ, G., DOMORACKA, K., et al., Effects of Borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. **Folia Biologica**, v. 54, p. 1–7, 2008.
- KELEN, M.; TEPE, B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4096–4104, 2008.
- KNOBLOCH, K.; PAUI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119–28, 1989.
- KORDALI, S., KOTAN, R., MAVI, A., CAKIR, A., ALA, A., YILDRIM, A., Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculoides* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculoides*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 53, p. 9452–8, 2005.

KWIECIEN, S.; JASNOS, K.; MAGIEROWSKI, M.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; BRZOZOWSKI, B.; MACH, T.; WOJCIK, D.; BRZOZOWSKI, T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress-induced gastric injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 613-622, 2014.

KWIECIEN, S.; PAWLIK, M. W.; BRZOZOWSKI, T.; PAWLIK, W. W.; KONTUREK, S. J. Reactive oxygen metabolite action in experimental, stress model of gastric mucosa damage. **Gastroenterologia Polska**, v. 17, p. 234-243, 2010.

LI, W.; WANG, X.; ZHANG, H.; HE, Z.; ZHI, W.; LIU, F.; WANG, Y.; NIU, X. Anti-ulcerogenic effect of cavidine against ethanol-induced acute gastric ulcer in mice and possible underlying mechanism. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 450-459, 2016.

LI, Y.H.; SUN, X.P.; ZHANG, Y.Q.; WANG, N.S. The antithrombotic effect of Borneol related to its anticoagulant property. **The American journal of Chinese medicine**, v. 36, p. 719-727, 2008.

MATSUDA, T.; TAO, H.; GOTO, M.; YAMADA, H.; SUZUKI, M.; WU, Y.; XIAO, N.; HE, Q.; GUO, W.; CAI, Z.; KURABE, N.; ISHINO, K.; MATSUSHIMA, Y.; SHINMURA, K.; KONNO, H.; MAEKAWA, M.; WANG, Y.; SUGIMURA, H. Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa. **Carcinogenesis**, v. 34, p. 121-127, 2013.

MEDEIROS, J. V.; GADELHA, G. G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. A.; SOARES, P. M. G.; SANTOS, A. A.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 721-727, 2008.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, p. 271-278, 1978.

OKTEM, F.; OZGUNER, F.; MOLLAOGLU, H.; KOYU, A.; UZ, E.; Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 350-355, 2005.

OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F. V.; FERNANDES, H. B.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, R. C. M. Redução da peroxidação lipídica e da atividade da enzima mieloperoxidase no efeito gastroprotetor do Borneol livre ou complexado em β -ciclodextrina. **Revista Brasileira de Biodiversidade e Biotecnologia. III Simpósio Latino Americano de Biotecnologia do Nordeste / Encontro Luso Brasileiro de Biotecnologia**. Data: 11 a 13 de Dezembro de 2015. <http://gpicursos.com/slab2015/Sistema/trabalho-pdf.php?id=493>

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.

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.

RADONIC, A.; MILOSH, M. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. *Free Radical Research*, v. 37, p. 673–679, 2003.

RAJA, B., KUMAR, M.S., KUMAR, S. Antihypertensive and antioxidant potential of Borneol-A NATURAL TERPENE in L-NAME induced hypertensive rats. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive**, v. 1, p. 271–9, 2010.

RASHEED, N.; AHMAD, A.; SINGH, N.; SINGH, P.; MISHRA, V.; BANU, N.; LOHANI, M.; SHARMA, S.; PALIT, G., Differential response of A 68930 and sulphiride in stress-induced gastric ulcers in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, p. 121–128, 2010.

RIBEIRO, A. R. S.; DINIZ, P. B. F.; PINHEIRO, M. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K⁺ channels, and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 121–128, 2016.

SANTIN, J. R.; LEMOS, M.; KLEIN, J. L. C.; NIERO, R.; DE ANDRADE, S. F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 334–339, 2010.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of Total Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 1192-1205, 1968.

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., OLIVEIRA, 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.

SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; CANDAN, F.; UNLÜ, M.; AKPULAT, H. A. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 451–456, 2004.

TABANCA, N.; KIRIMER, N.; DEMIRCI, B.; DEMIRCI, F.; BASER, K. H. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of Borneol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 49, p. 4300–3, 2001.

TAMURA, M.; MATSUI, Y. N.; NAGANO, T.; et al. Salt is an oxidative stressor for gastric epithelial cells. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 64, p. 89-94, 2013.

VARDAR-UNLÜ G.; CANDAN, F.; SÖKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, M.; DÖNMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 63–67, 2003.

WENQIANG, G.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, Y.; YANFENG, H. Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Levl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 20, p. 992–8, 2006.

XIONG, Z. Y.; XIAO, F. M.; XU, X.; WU, Y. F.; JIANG, X. M. Studies on pharmacological activity of borneol. *China Journal of Chinese Materia Medica*, v. 38, n. 6, p. 786-90, 2013.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos até o momento, foi possível concluir que:

- O Borneol possui atividade farmacológica na proteção da mucosa gástrica sobre lesões agudas provocadas por etanol e por isquemia-reperusão
- Possui um papel na aceleração do processo de cura de lesões promovidas por ácido acético.
- Essas atividades parecem envolver mecanismos antioxidantes, melhoria do fluxo sanguíneo, redução da peroxidação lipídica e do processo inflamatório.
- A complexação com β -ciclodextrina melhora a solubilidade do Borneol e ativa mecanismos protetores que não são ativados pelo Borneol livre, tornando essa forma mais interessante para uso na indústria farmacêutica.

A partir dos resultados obtidos até o momento, têm-se como perspectivas a continuação da investigação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora e cicatrizante do Borneol não complexado e do complexado em ciclodextrina:

- Realizar cálculos de docagem molecular para analisar a interação do borneol com fatores protetores gástricos.
- Avaliar o efeito do Borneol não complexado e do complexado em ciclodextrina no reparo e cicatrização de úlceras gástricas em modelos de migração e proliferação celular.
- Desenvolver uma formulação tópica do (-)-Borneol para estudo de atividade cicatrizante.
- Avaliar o efeito da formulação tópica no reparo e cicatrização de feridas cirúrgicas.

6. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de realização do curso de Doutorado em Biotecnologia (2012- atual), outras atividades acadêmico-científicas foram realizadas em parcerias com o grupo de pesquisa, originando quatro publicações em periódicos indexados, um patentes submetida e apresentações de trabalhos em eventos na área, como listados a seguir:

Artigos aceitos para publicação

SILVA, FRANCILENE V.; FERNANDES, H.B.; **OLIVEIRA, IRISDALVA S.**; VIANA, A.F.S.C.; COSTA, D. S.; LOPES M. T. P.; LIRA, K. L.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SOUSA, A. A., OLIVEIRA, R.C.M. Beta-Cyclodextrin enhanced gastroprotective effect of (-)-linalool, a monoterpene present in Rosewood essential oil, in gastric lesion models. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, No. NSAP-D-16-00124R2, Aceito em 01/09/2016.

Artigos publicados em periódicos

SILVA, FRANCILENE V.; **OLIVEIRA, IRISDALVA S.**; FIGUEIREDO, KAYO A. ; JÚNIOR, FRANCISCO B. MELO ; COSTA, DANIELLY A. ; CHAVES, MARIANA H. ; AMARAL, MAURÍCIO P.M. ; ALMEIDA, FERNANDA R.C. ; OLIVEIRA, FRANCISCO A. ; OLIVEIRA, RITA C.M. . Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Sterculia striata* A. St.-Hil. & Naudin (Malvaceae) in Rodents. *Journal of Medicinal Food* ^{JCR}, v. 00, p. 140129125441004-7, 2014.

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

SOUSA, J. A. ; **OLIVEIRA, I. S.** ; SILVA, F. V. ; COSTA, D. A. ; CHAVES, M. H. ; OLIVEIRA, F. A. ; NUNES, P. H. M. ; OLIVEIRA, R. C. M. . Gastroprotective Activity of *Sterculia striata* A. St. Hil. & Naudin (Malvaceae) in Rodents. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences* ^{JCR}, v. 67, p. 163-171, 2012.

OLIVEIRA, IRISDALVA S.; SILVA, FRANCILENE V. ; VIANA, ANA FLÁVIA S. C. ; SANTOS, MÁRCIO R. V. ; QUINTANS-JÚNIOR, LUCINDO J. ; MARTINS, MARIA DO CARMO C. ; NUNES, PAULO H. M. ; OLIVEIRA, FRANCISCO DE A. ; OLIVEIRA, RITA DE C. M. . Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* ^{JCR}, v. 385, p. 899-908, 2012.

Trabalhos apresentados em eventos

LOPES, K. L. ; MACHADO, F.D.F. ; **OLIVEIRA, I. S.** ; OLIVEIRA, F.A. ; ALMEIDA, J.R.G.S ; OLIVEIRA, R.C.M. . Atividade gastroprotetora e antioxidante da fração acetato de etila de *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez. em ratos. In: II Encontro Estratégico em

Ciências Farmacêuticas II Seminário Ibero Americano de P&D de medicamentos, 2015, Teresina. II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas II Seminário Ibero Americano de P&D de medicamentos, 2015.

LOPES, K. L. ; MACHADO, F.D.F. ; **OLIVEIRA, I. S.** ; SILVA-FREITAS, F. V. ; LIMA, G. S. ; OLIVEIRA, F.A. ; ALMEIDA, J.R.G.S ; Oliveira, R. C. M. . Possible participation of prostaglandins in gastroprotection of ethyl acetate fraction of *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez. in rats and mice. In: Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014, Fortaleza. Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014.

VIANA, A.F.S.C. ; CARVALHO, E. F. ; LIMA, G. S. ; **OLIVEIRA, I. S.** ; SILVA, F. V. ; REIS FILHO, A. C. ; SOUSA, D. P. ; OLIVEIRA, R. C. M. . Gastroprotective effect of (-)-Myrtenol against gastric ulcer induced by ibuprofen and cold restraint-stress, in rodents. In: 45° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2013, Ribeirão Preto-SP. 45° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2013.

Machado, F. D. F. ; **OLIVEIRA, I. S.** ; VIANA, A. F. S. C. ; PIAUILINO, C. A. ; LIMA, J. T. ; ALMEIDA, J. R. G. S. ; OLIVEIRA, F.A. ; OLIVEIRA, R. C. M. . Gastroprotective action and antioxidant properties of fractions ethanol extract of *Neoglaziovia variegata* Mez.. In: 44th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2012, Foz do Iguaçu. 44th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2012.

Patentes submetidas

ALMEIDA, F. R. C. ; Universidade Federal do Piauí ; MARQUES, R.B. ; Machado, F. D. F. ; **OLIVEIRA, I. S.** ; SILVA, F. V. ; OLIVEIRA, F. A. ; QUINTANS JUNIOR, L. J. . a-Terpineol, constituinte principal do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* March., para tratamento de lesões e úlceras gástricas. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020120183005, data de depósito: 18/07/2012, título: "a-Terpineol, constituinte principal do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* March., para tratamento de lesões e úlceras gástricas" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.