



RENORBIO
Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

HÉLIO DE BARROS FERNANDES

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS CONTENDO
 α -TERPINEOL E SEUS EFEITOS SOBRE LESÕES GÁSTRICAS EM ROEDORES**

TERESINA

2016

HÉLIO DE BARROS FERNANDES

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS CONTENDO
 α -TERPINEOL E SEUS EFEITOS SOBRE LESÕES GÁSTRICAS EM ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do RENORBIO-UFPI como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em biotecnologia.

Orientadora: Prof^a dr^a Rita de Cássia
Meneses Oliveira

TERESINA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

F363e Fernandes, Hélio de Barros.

Elaboração e caracterização de nanopartículas contendo α -terpineol e seus efeitos sobre lesões gástricas em roedores / Hélio de Barros Fernandes. – 2016.
128 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2016.
“Profª Drª Rita de Cássia Meneses Oliveira”.

1. α -terpineol. 2. Nanopartículas. 3. Gastroproteção.
4. Antioxidante. 5. Cicatrização gástrica. I. Título.

CDD – 660.6

Elaborado por Sindya Santos Melo CRB 3/1085

HÉLIO DE BARROS FERNANDES

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS CONTENDO
 α -TERPINEOL E SEUS EFEITOS SOBRE LESÕES GÁSTRICAS EM ROEDORES**

EXAMINADA EM 20/09/2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira
(Orientadora)
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Maria das Graças Freire Medeiros
(Membro externo ao programa)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva
(Membro externo ao programa)
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares
(Membro externo ao programa)
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida
(Membro interino do Programa)
Universidade Federal do Piauí

Aos meus pais, Teresinha e Francisco; meu norte, exemplo, refúgio e fortaleza.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por criar o universo, perfeito e repleto mistérios e questionamentos a serem respondidos;

Aos meus irmãos, Humberto, Henrique, Júnior e Heliana pela confiança, apoio e companheirismo incondicional; por todos os anos de convivência, brigas, broncas e momentos felizes, que por fim me(nos) guiaram em mais esta grande conquista;

A Caroline, pelo companheirismo, cumplicidade, zelo, compreensão e amor, tão importantes e que, por muitas vezes, foi a mão sempre estendida no momento de mais peleja;

Aos amigos do CSCJ e Farmakids, presentes nos poucos mais marcantes momentos alegres nesta jornada; sempre na torcida pelo êxito deste trabalho;

A Rita de Cássia Meneses Oliveira, minha Mãe Científica, pelo modelo de ser humano; pela candura, generosidade e humildade infindáveis. Também pelo exemplo de pesquisadora, através dos ensinamentos, das orientações, dos sermões, dos “puxões de orelha” e, principalmente, pela autonomia e confiança depositada em seus alunos, permitindo-nos crescer como pesquisadores;

As minhas eternas companheiras na pesquisa, “as meninas da Gastro”, Francilene, Irisdalva, Ana Flávia e Kamila cujo apoio, assistência e amizade foram essenciais para a concretização deste trabalho;

Ao Professor Vand Venes Rolim Medeiro e seus alunos, Luan Kelves Miranda de Sousa, Francisca Beatriz de Melo Sousa pelo generoso auxílio nos experimentos de marcadores antioxidantes executados na UFPI – *campus* Ministro Reis Veloso;

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, decisivos na execução e conclusão deste projeto: professores Francisco de Assis, Fernando Aécio, Salete, Fernanda Regina, e Aldeídia Pereira;

A equipe técnica do Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais: Benedito, Flavia Francelli, Celiane, Suylane, pela ajuda na execução dos experimentos;

Aos Sr. Carlos de Deus e Kalina, pelo cuidado exemplar aos animais utilizados em nossos experimentos, sem o qual o êxito dos mesmos não seria possível;

Aos professores do Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI *campus* Petrônio Portela, Anderson Nogueira Mendes, Daniel Dias Rufino Arcanjo, Paulo Humberto Moreira Nunes, Aldeídia Pereira de Oliveira e Lis Cardoso Marinho Medeiros, pelo apoio e suporte durante a execução dos experimentos;

Aos professores Anderson Mendes, André Luiz Meneses Carvalho, Hercília Maria Lins Rolim e pela assistência na execução dos experimentos em nanotecnologia, decisivos na obtenção da formulação desejada;

A Shayara Lopes Ciriaco pela inestimável assistência nos experimentos de tecnologia farmacêutica;

Aos professores José Carlos Costa da Silva Pinto, Márcio Nele de Souza e toda a equipe do Laboratório de Engenharia de Polímeros – ENGEPOL – UFRJ, pela orientação e disponibilização das instalações do laboratório para o estudo e elaboração das formulações nanoparticuladas contendo α -terpineol, tornando este trabalho uma realidade.

A todos, o meu muito obrigado!!!

Elaboração e caracterização de nanopartículas contendo α -terpineol e seus efeitos sobre lesões gástricas em roedores

Tese. Programa de Doutorado em Biotecnologia, Fernandes, H.B.
RENORBIO Ponto Focal Piauí/UFPI, 2016

RESUMO

A úlcera péptica é um distúrbio do trato gastrointestinal que resulta do desequilíbrio entre os mecanismos citoprotetores gástricos e fatores lesivos sobre sua mucosa. Apesar dos avanços na terapia vigente de úlceras pépticas, os fármacos utilizados apresentam eficácia limitada e manifestam diversas reações adversas como hipersensibilidade, arritmias, ginecomastia e alterações hepatopépticas. Na busca por moléculas mais efetivas e seguras para o tratamento desta doença, os produtos naturais representam vasta fonte para pesquisa e descobrimento de novos compostos, com destaque ao α -terpineol, um monoterpene encontrado no óleo essencial de espécies como *Melaleuca quinquenervia*, *Pinus taiwanensis* Hayata ou obtido por síntese química. Este composto apresentou atividade antiúlcera em estudos preliminares de lesão aguda em roedores, porém, apresenta propriedades lipofílicas e ainda é um fármaco de reduzida meia-vida na circulação sanguínea. Considerando o grande potencial do efeito antiúlcera do α -terpineol, apesar de sua farmacocinética desfavorável, esse trabalho teve como objetivo investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na proteção gástrica deste fármaco, desenvolver nanopartículas poliméricas de polimetacrilato de metila (PMMA) contendo este monoterpene assim como estudar o seu efeito sobre lesões gástricas em roedores. No estudo de investigação dos mecanismos de ação, o α -terpineol reduziu a inflamação na área ulcerada, aumentou os níveis dos grupos sulfidrílicos não-proteicos ($420,48 \pm 28,89$ vs controle - $290,87 \pm 22,96$ $\mu\text{g/g}$ de tecido), da produção de muco ($62,65 \pm 4,9$ vs controle - $41,8 \pm 1,17$ μg de azul de alcian /g de tecido) e promoveu cicatrização de úlceras gástricas ($28,85 \pm 13,56$ mm^3 vs veículo $204,36 \pm 34,57$ mm^3). As nanopartículas contendo α -terpineol foram preparadas pela técnica de polimerização em miniemulsão. A formulação utilizada para o teste de atividade gastroprotetora (PMMA-Np- α tp 8 %) apresentou uma taxa de encapsulação de $74,07 \pm 3,03$ %, diâmetro médio de $796,8 \pm 88,34$ nm, índice de polidispersão de 0,532 e potencial zeta de $-52,5 \pm 13,1$ mV. A administração de PMMA-Np- α tp 8 % (Dose equivalente a 0,75 mg/kg de α -terpineol) decresceu a área da lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos progressivamente no decorrer das 1, 3 e 6 horas após sua administração ($19,21 \pm 1,78$, $14,41 \pm 1,92$ e $9,59 \pm 1,89$ %, respectivamente) de maneira significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado com veículo e nanopartículas de PMMA sem o monoterpene (PMMA-Np- α tp 0 %) ($30,96 \pm 3,87$ e $31,88 \pm 4,33$ %, respectivamente). Sob a luz destes resultados, o α -terpineol apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e cicatrizantes, importantes para sua atividade gastroprotetora e a técnica de polimerização em miniemulsão foi capaz de incorporá-lo à matriz de PMMA, mantendo suas propriedades gastroprotetoras em doses menores do que sua forma livre.

Palavras-chave: α -terpineol. Nanopartículas. Gastroproteção. Antioxidante. Cicatrização gástrica.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE – Anti-inflamatório não esteróide

ALT – Alanina Aminotransferase

AP-1 – Proteína ativadora-1

AST – Aspartato Aminotransferase

bFGF – Fator básico de crescimento de fibroblastos

CagA – Citotoxina associada ao gene A

CAT – Catalase

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene calcitonina

COX-1 - Ciclo-oxigenase 1

COX-2 - Ciclo-oxigenase 2

DL₅₀ – Dose letal de um fármaco em 50 % de uma população teste

DNA – Ácido desoxirribonucleico

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

E.P.M. – Erro padrão da média

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – Fator de crescimento epidermal

EGF-R – Receptor do fator de crescimento epitelial

EIV – Espectro do infravermelho

EPK – Proteína quinase regulada por vias de sinalização extracelular

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

FTIR – Espectro infravermelho por transformada de Fournier

GLIB – Glibenclamida

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

GSH-Px - glutathione peroxidase

GSSG - - Glutathione oxidada

H. pylori – *Helicobacter pylori*

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₃PO₄ – Ácido fosfórico
HCl – Ácido clorídrico
HCO₃⁻ – Bicarbonato
HO₂[•] – Radical hidroxiperoxil
HOCl – Ácido hipocloroso
HSPs – Proteín do choque térmico (*Heat shock proteins*)
IGF-1 – Fator de crescimento de insulina-1
K₂HPO₄ – Fosfato de potássio dibásico
K₂S₂O₈ – Persulfato de potássio
K_{ATP} – Canais de potássio sensíveis ao ATP
KCl – Cloreto de potássio
KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
L-NAME – N^ω-nitro-L-arginina metil Ester
LTC₄ – Leucotrieno C₄
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA – Malondialdeído
MMA – Metacrilato de metila
MPO – Mieloperoxidase
NAC – N- acetilcisteína
NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NaOH – Hidróxido de sódio
NEM – N-Etil-maleimida
NF-κB – Fator nuclear kappaB
NO – Óxido nítrico
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
O₂^{•-} – Radical superóxido
OH[•] – Radical hidroxil
PDGF – Fator de crescimento de plaquetas
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGI₂ – Prostaglandina I₂
PKLA: Fosfatase alcanina
PMMA – Poli-(metacrilato de metila)

PMMA-Np- α tp – Nanopartículas de poli-(metacrilato de metila) encapsuladas com α -terpineol

SH-NP – Grupos sulfidrilas não protéicos

SOD – Superóxido dismutase

Sp-1 – Fator de transcrição-1

TFF – Fator trefólio de baixo peso molecular

TGA – Análise termogravimétrica

TGF- α – Fator transformador de crescimento alfa

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TXA₂ – Tromboxano A₂

UV-Vis – Ultravioleta visível

VaC – Citotoxina vacuolizante

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Fatores agressores e protetores da mucosa gástrica	22
Figura 2. Resumo da formação das espécies reativas de oxigênio no organismo e ações das enzimas antioxidantes.....	25
Figura 3. Patogênese de lesões gástricas por <i>H. pylori</i>	28
Figura 4. Patogênese de lesões gástricas por AINES	29
Figura 5. Fisiopatologia das lesões gástricas induzidas por etanol	31
Figura 6. Estrutura química do α -terpineol	38
Figura 7. Estrutura química do monômero, MMA e de seu polímero, PMMA	45
Quadro 1. Esquemas terapêuticos para o tratamento de úlceras por <i>helicobacter pylori</i>	32
Quadro 2. Estratégias terapêuticas para o tratamento de úlceras em usuários crônicos de AINES	33
Quadro 3. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de úlceras gástricas..	34
Quadro 4. Atividades biológicas de monoterpênos.....	37
Quadro 5. Estudos farmacológicos do α -terpineol.....	39

CAPÍTULO 2

Figura 1. Participação da via no-sintase no efeito gastroprotetor do α -terpineol contra lesões induzidas por etanol absoluto em camundongos com inibidor da no-sintase, L-NAME.....	80
Figura 2. Participação dos grupos sulfidrílicos endógenos no efeito gastroprotetor do α -terpineol contra lesões induzidas por etanol absoluto camundongos pré-tratados com inibidor dos grupos sulfidrílicos NEM	81
Figura 3. Participação dos K^+_{atp} no efeito gastroprotetor do α -terpineol contra lesões induzidas por etanol absoluto em camundongos pré-tratados com inibidor de K^+_{ATP} , glibenclamida (GLIB).	82
Figura 4. Efeito do α -terpineol sobre a atividade da catalase na mucosa de estômagos lesionados por etanol absoluto, em camundongos	83
Figura 5. Efeito do α -terpineol sobre a atividade da MPO na mucosa de estômagos lesionados por etanol absoluto, em camundongos	83
Figura 6. Efeito do α -terpineol sobre a sobre os níveis de SH-NP na mucosa de estômagos lesionados por etanol absoluto, em camundongos	84
Figura 7. Efeito do α -terpineol sobre a sobre os níveis de MDA na mucosa de estômagos lesionados por etanol absoluto, em camundongos	84

Figura 8. Efeito do α -terpineol sobre teor de muco aderido a mucosa gástrica após ligadura de piloro em ratos.....	85
Figura 9. Efeito do α -terpineol sobre úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos.....	86
Figura 10. Ganho de massa corporal dos animais submetidos a sete dias de tratamento com α -terpineol.....	86

CAPÍTULO 3

Figura 1. Taxa de conversão das reações de polimerização de metacrilato de metila em microemulsão.....	111
Figura 2. Análise térmica de α -terpineol, PMMA-np-atp 0%, PMMA-np-atp 8%, PMMA-np-atp 15 %.....	113
Figura 3. Espectros de IV do α -terpineol, PMMA-np-atp 0%, PMMA-np-atp 8%, PMMA-np-atp 15 % e mistura física entre α -terpineol e PMMA-np-atp 0%.....	115
Figura 4. Varreduras de α -terpineol livre e extraído de PMMA-np-atp 8% e PMMA-np-atp 0%.....	116
Figura 5. Efeito de pmma-np-atp 8% sobre lesões induzidas por etanol absoluto em camundongo após 1, 3 e 6 horas de tratamento.....	116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Efeito do α -terpineol e carbenoxolona sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado em camundongos..... **78**
- Tabela 2.** Efeito do α -terpineol e N-Acetilcisteína sobre lesões gástricas induzidas isquemia e reperfusão em ratos..... **79**
- Tabela 3.** Efeito do tratamento com com α -terpineol (6,25, 12,5 e 25 mg/kg), cimetidina e veículo durante sete dias sobre o peso dos órgãos dos animais em protocolo de úlcera induzida por ácido acético. **87**
- Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos séricos de animais tratados com α -terpineol (6,25, 12,5 e 25 mg/kg), cimetidina e veículo durante sete dias em protocolo de úlcera induzida por ácido acético. **87**

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Formulações com diferentes teores de α -terpineol para preparação de PMMA-np- α TP. **108**
- Tabela 2.** pH das formulações após 24 horas e 12 meses de preparação..... **112**
- Tabela 3.** Tamanho da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação, carga de encapsulado de PMMA-np- α tp 8% **114**

SUMÁRIO

1	Introdução	17
2	Objetivos	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	Capítulo I: Referencial teórico	21
3.1	Úlceras pépticas	21
3.2	Mecanismos protetores da mucosa gástrica	23
3.2.1	Barreira muco-alcalina-hidrofóbica	23
3.2.2	Células epiteliais	24
3.2.2	Microcirculação e inervação sensorial gástrica	27
3.3	Agentes agressores da mucosa gástrica	28
3.3.1	<i>Helicobacter pylori</i>	28
3.3.2	Anti-inflamatórios não-esteróides (AINES)	29
3.3.3	Outros agentes agressores da mucosa gástrica	30
3.4	Estratégia terapêuticas	31
3.5	Produtos naturais	34
3.5.1	Óleos essenciais	35
3.5.2	Monoterpenos	36
3.5.3	α -terpineol	38
3.6	Sistemas carreadores de fármacos	40
3.7	Nanotecnologia e nanopartículas poliméricas	42
3.8	Poli-metacrilato de metila	44
3.9	Preparação de nanopartículas de PMMA	45
3.9.1	Miniemulsão	45
3.9.1	Diluição de Ostwald	46
3.9.1.2	Surfactantes em miniemulsões	46
3.9.1.3	Coestabilizantes	47
3.9.1.4	Sistema de dispersão em minielmsões	48
3.9.1.5	Iniciadores	49
3.9.1.6	Polimerização em miniemulsões	49
3.10	Referências	51

4	Capítulo II: Investigação da atividade gastroprotetora e cicatrizante do α-terpineol em modelos de lesão gástrica aguda e crônica em roedores.....	66
4.1	Introdução	69
4.2	Metodologia	71
4.2.1	Fármacos e reagentes.....	71
4.2.2	Animais.....	71
4.2.3	Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado em camundongos..	72
4.2.4	Atividade antioxidante.....	72
4.2.4.1	Mensuração da concentração de grupos sulfidrilas não protéicos na mucosa gástrica.	72
4.2.4.2	Atividade da Catalase.....	73
4.2.4.3	Atividade da mieloperoxidase.....	73
4.2.4.4	Determinação dos níveis de malondialdeído.....	73
4.2.5	participação da via do óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{atp}) e grupos sulfidrilas na gastroproteção do α -terpineol.....	74
4.2.6	Lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos.....	74
4.2.7	Determinação de muco na parede gástrica	75
4.2.8	Úlcera induzidas por ácido acético em ratos	75
4.2.9	Avaliação da toxicidade do α -terpineol em modelo de lesão por ácido acético.....	76
4.2.10	Análise estatística	77
4.3	Resultados	78
4.3.1	Efeito do α -terpineol sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado em camundongos.....	78
4.3.2	Efeito do α -terpineol sobre lesões gástricas induzidas por isquemia-reperfusão em ratos.....	79
4.3.3	Participação do óxido nítrico, grupos sulfidrilas endógenos e K_{atp} na gastroproteção do α -terpineol.....	79
4.3.4	Atividade da catalase	80
4.3.5	Atividade da mieloperoxidase	80
4.3.6	Concentração de grupos sulfidrilas não protéicos na mucosa gástrica.....	81
4.3.7	Níveis de mda na mucosa gástrica.....	81
4.3.8	Conteúdo de muco na mucosa gástrica.....	82
4.3.9	Efeito do α -terpineol em úlceras induzidas por ácido acético em ratos	85
4.3.10	Avaliação da toxicidade do α -terpineol em modelo de lesão por ácido acético.....	85
4.4	Discussão	88
	Agradecimentos	93
4.5	Referências.....	94

5	Capítulo III: Preparação e caracterização de nanopartículas de PMMA contendo α-terpineol em modelo de lesão aguda induzida por etanol absoluto em roedores	103
5.1	Introdução	106
5.2	Metodologia	107
5.2.1	Animais	107
5.2.2	Preparação de nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol (PMMA-np- α tp)	107
5.2.3	Caracterização de PMMA-np- α tp	108
5.2.3.1	Taxa de conversão por gravimetria	108
5.2.3.2	Distribuição do tamanho de partículas e potencial zeta	109
5.2.3.3	Análise térmica	109
5.2.3.4	Espectro do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	109
5.2.3.5	Taxa de encapsulação	109
5.2.4	Efeito protetor gástrico de PMMA-np- α tp em modelos de lesão aguda induzida por etanol absoluto em camundongos	110
5.2.5	Análise estatística	110
5.3	Resultados	111
5.3.1	Taxa de conversão e pH das formulações	111
5.3.2	Análise térmica	112
5.3.3	Espectro do infravermelho	112
5.3.4	Distribuição do tamanho das partículas, potencial zeta e taxa de encapsulação	114
5.3.5	Efeito protetor gástrico de PMMA-np- α tp em modelos de lesão aguda induzida por etanol absoluto em camundongos	114
5.4	Discussão	117
	Agradecimentos	120
5.5	Referências	121
6	Considerações finais	124
7	Outras atividades desenvolvidas	126

1 Introdução

A úlcera péptica é um distúrbio que se manifesta na forma de feridas na mucosa do trato gastrointestinal superior que, anualmente, acomete 50 milhões de pessoas e apresenta 11 milhões de novos casos diagnosticados no mesmo período em todo o mundo. As úlceras hemorrágicas e perforantes são as complicações mais graves e caso não se adote procedimentos que intervenham nesses quadros, podem levar a complicações como infecção e sepse, evoluindo para o óbito (hemorragias, 5-8 %; perfuração, 10-40%) (CHEN et al., 2016; SURG, 2005).

Embora a etiologia da úlcera péptica ainda não esteja totalmente elucidada, sabe-se que o desequilíbrio entre os fatores agressores (*Helicobacter pylori*, suco gástrico, fumo, álcool, traumas, estresse, anti-inflamatórios, tumores malignos, entre outros) e os fatores citoprotetores da mucosa gástrica (secreção de muco gástrico, regeneração epitelial, fluxo sanguíneo gástrico, prostaglandinas, óxido nítrico, fatores de crescimento, entre outros) é a principal causa conhecida para o surgimento de lesões que evoluem para úlceras pépticas. Tal variedade e complexidade dos elementos envolvidos na etiologia da úlcera péptica tornam a seleção de fármacos para o esquema medicamentoso crucial para o sucesso da terapia (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2016; FRANCO et al., 2015).

A atual abordagem medicamentosa no combate à úlcera péptica baseia-se no controle da secreção gástrica com uso de inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol, esomeprazol, entre outros), antibioticoterapia no tratamento de úlceras pela infecção por *Helicobacter pylori* e, por vezes, o uso de compostos gastroprotetores (compostos de bismuto, misoprostol e sucralfato) (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009). Apesar dos importantes avanços no tratamento dessa disfunção, a presença de úlceras recorrentes e os efeitos adversos medicamentosos (hipersensibilidade, arritmias cardíacas, ginecomastia e alterações hepatopoiéticas) ainda são obstáculos constantes encontrados na terapia vigente. Portanto, tais empecilhos motivam a investigação por fármacos mais efetivos que também atendam aos requisitos de segurança ao longo da terapia (CARRETERO, 2016; KANGWAN et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016).

A atropina e escopolamina (extraídas de *Atropa belladonna* L.); morfina (extraída de *Papaver somniferum* L.) e tubocurarina (encontrada nas folhas de *Strychnos toxifera* Benth.), por exemplo, são fármacos extraídos de espécies vegetais utilizadas

culturalmente por diferentes povos/tribos e que seus estudos resultaram em medicamentos importantes na prática clínica ou serviram de ferramenta para desenvolvimento de novos princípios ativos. A carbenoxolona, um derivado do ácido glicirretínico, é um fármaco eficaz contra úlceras gástricas descoberto como resultado de pesquisas com *Glycyrrhiza glabra* (Alcaçuz), comumente utilizada pelos povos indígenas (AKTAR; MUNIR 1989). Estudos mais recentes de atividade antiúlcera também foram desenvolvidos com outras classes de moléculas derivadas de plantas medicinais, como alcalóides (DE SOUZA ALMEIDA et al., 2011; MILLER et al., 2000), saponinas (LEE et al., 2005), polissacarídeos (GAO et al., 2004), compostos fenólicos (BHATTACHARYA et al., 2007; CAPASSO et al., 2000) e terpenos (KLOPELL et al., 2007; SINGH et al., 2008).

O α -terpineol é um monoterpene encontrado na composição do óleo essencial de espécies como *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.F. Blake (IRELAND et al., 2002), *Pinus taiwanensis* Hayata (YAO et al., 2005), *Eucalyptus* spp (GILLES et al., 2010; RAHIMI-NASRABADI et al., 2013) e *Myrtus communis* L.(BEN HSOUNA et al., 2014) que apresentou atividade gastroprotetora em investigações preliminares (SOUZA et al., 2011). Embora apresente resultados promissores no estudo de úlceras pépticas, o α -terpineol é um fármaco com baixa solubilidade em água e reduzida meia-vida (12,5 minutos) na circulação sanguínea (TOBIN; SWERCZEK; BLAKE, 1976). Os princípios ativos com características necessitam de várias administrações diárias para que obtenha a concentração plasmática estacionária, dificultando a adesão ao tratamento pelo paciente e contribuindo para a ineficácia terapêutica. Uma estratégia viável para contornar tais problemáticas é a elaboração de formulações de liberação controlada (ALAVIJEH et al., 2005).

Os sistemas de liberação controlada se propõem a manter a concentração do fármaco de acordo com a posologia desejada, como por exemplo, os sistemas do tipo nanopartículas, bastante utilizados para elaboração de formulações estáveis, biocompatíveis de liberação prolongada. A nanotecnologia envolve o desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica e um dos seus objetivos é melhorar a biodisponibilidade de um fármaco através do aumento de sua estabilidade nos fluidos biológicos ou ainda o aumento de estabilidade da própria formulação farmacêutica (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; COUVREUR et al., 2002).

Sob esse ponto de vista, obter sistemas particulados contendo α -terpineol com a aplicação de técnicas em nanotecnologia a fim de investigar se a atividade gastroprotetora deste fármaco é mantida e/ou melhorada não só valoriza a biodiversidade e a cadeia produtiva desta molécula assim como amplia o leque de aplicações desta molécula, além do desenvolvimento de um potencial produto para tratamento de doenças do trato gastrintestinal.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na proteção gástrica do α -terpineol livre e de nanopartículas contendo este monoterpeno em modelos de lesões gástricas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Investigar a participação de óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP, grupos sulfidrilicos não-protéicos endógenos e produção de muco e na proteção gástrica do α -terpineol;

2.2.2 Investigar parâmetros antioxidantes na proteção gástrica do α -terpineol através doseamento de grupos sulfidrilicos não-protéicos, malondialdeído e atividade das enzimas catalase e mieloperoxidase;

2.2.3 Avaliar a capacidade cicatrizante do α -terpineol através de lesões gástricas em modelos de indução de úlcera por ácido acético;

2.2.4 Avaliar a toxicidade do α -terpineol durante o tratamento em modelo de indução de úlcera por ácido acético;

2.2.5 Preparar e caracterizar nanopartículas contendo α -terpineol;

2.2.6 Avaliar o efeito protetor gástrico de nanopartículas contendo α -terpineol em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto.

3 Capítulo I: Referencial teórico

3.1 Úlceras pépticas

Os dados e artefatos históricos denotam a aparente perenidade da úlcera péptica, apresentando-a como uma doença que subsiste a eras e que acompanha o homem desde os primórdios de sua civilização. Fez-se menção desta patologia, por exemplo, na escrita cuneiforme de vasos de barro de civilizações mesopotâmicas; no papiro de Ebers da civilização egípcia e nos livros do legado de Hipócrates, Peri Nouson II, do *Corpus Hippocraticum*, fazendo menções aos seus principais sintomas como “fogo no estômago”, “ardor no peito”, “vômito escuro e sanguinolento” e “desconforto abdominal no jejum”. A partir do século XVI as ulcerações gastrointestinais passaram a despertar maior interesse através das observações anatomopatológicas das diferentes regiões do trato gastrointestinal em necropsias e especulações teóricas sobre sua etiopatogenia, com Bailie, em 1793, descrevendo os sintomas da úlcera péptica gástrica. Durante o século XIX teve início os estudos que individualizaram definitivamente a úlcera gástrica como uma doença distinta de outras lesões do trato gastrointestinal e, em 1830, Jean Curveilhier denominou tal injúria como “úlcera simples crônica do estômago” (REZENDE, 2009; TONETO; OLIVEIRA; LOPES, 2011).

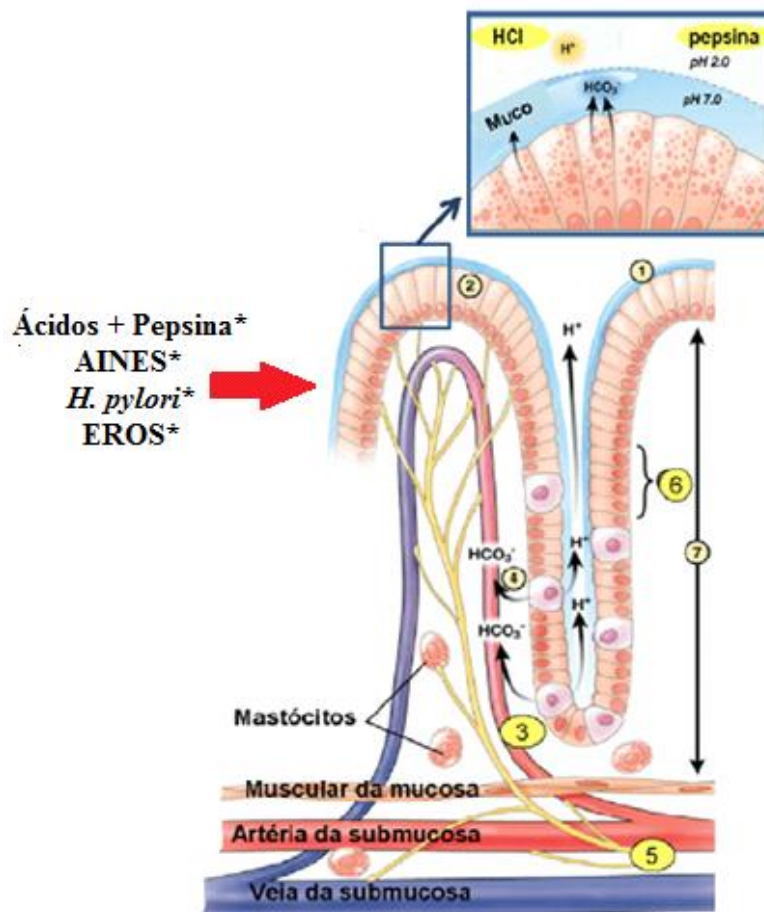
Iniciadas em meados do século XVIII até os dias de hoje, várias hipóteses foram testadas e teorias formuladas com intuito de descobrir que fatores são determinantes e predisõem ao enfraquecimento da mucosa gastrointestinal, origem da lesão inicial e sua evolução para úlcera (REZENDE, 2009). Durante esse período, todos os estudos convergem para um denominador comum: a sobreposição dos fatores agressores sobre os protetores da mucosa gástrica (Figura 1) (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Úlceras pépticas são lesões comumente encontradas no esôfago, estômago e duodeno que podem estender-se por toda a espessura da mucosa e camada muscular desses órgãos na forma de feridas crateriformes, que podem evoluir a complicações, como obstrução da secção lesionada, perfuração e hemorragia (HUANG; LEE, 2014; TARNAWSKI et al., 2001). A hemorragia da mucosa gastrointestinal é a complicação mais freqüente das úlceras pépticas (29 a 38% dos casos), principal causa de internação hospitalar por sangramento do trato gastrointestinal superior (50 a 66% dos casos) com uma taxa mortalidade entre 5-8%. Outra complicação importante é a perfuração da

mucosa (2 a 14% dos casos) que exige intervenção cirúrgica imediata e possui elevada taxa de mortalidade (10-40%) (BARKUN; LEONTIADIS, 2010; HUANG; LEE, 2014).

Somada a gravidade de suas complicações quanto à qualidade de vida do paciente, a úlcera péptica é o distúrbio mais comum do trato digestivo superior, acometendo em média 10 % da população mundial. Outro dado preocupante é a sua incidência anual de 0,1 a 0,19 % (coletados através de dados de diagnóstico médico na comunidade) e 0,03 a 0,17% (por meio de registros hospitalares), com taxa de prevalência anual de 0,2 a 1,5% e 0,1 a 0,19% para os mesmos parâmetros citados, respectivamente (SOSTRES; LANAS, 2011; SUNG; KUIPERS; EL-SERAG, 2009).

Figura 1 – Fatores agressores e protetores da mucosa gástrica.



LEGENDA: *- Fatores agressores da mucosa; 1 – Defesa pré-epitelial; 2 – Defesa epitelial; 3 – Defesa subepitelial; 4 – Maré alcalina; 5 – Nervos sensoriais; 6 – Renovação celular; 7 – Moduladores da barreira gástrica.

FONTE: Adaptado de LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008.

3.2 Mecanismos protetores da mucosa gástrica

3.2.1 Barreira muco-alcalina-hidrofóbica

A barreira pré-epitelial é a primeira linha de defesa da mucosa gástrica e seus constituintes são produzidos por suas células epiteliais colunares sob estímulo de mediadores da proteção gástrica, como o fator de crescimento da epiderme (EGF), fator transformador de crescimento alfa (TGF- α), prostaglandina E₂ e óxido nítrico (NO), que sinergicamente produzem uma camada mucóide, alcalina e hidrofóbica contra diversos mecanismos deletérios da mucosa gástrica (LANAS, 2008; LICHTENBERGER, 1999).

O muco é composto por água (95%), mucinas (principalmente MUC5AC, MUC6 e MUC1) e bicarbonato (HCO₃⁻). As moléculas de mucina que são secretadas na barreira (MUC5AC e MUC6) interagem umas com as outras através de ligações não covalentes entre seus resíduos de cisteína (do tipo SH - -HS), que conferem o caráter denso e viscoso dessa camada, distribuindo-se no extrato mucoso em um arranjo linear laminado que, por sua vez, interage com mucinas ancoradas na membrana das células da mucosa gástrica (MUC1). O bicarbonato, secretado pelas células parietais e colunares gástricas, se distribui ao longo das lâminas do gel mucoso, conserva o pH dentro da neutralidade na interface muco-mucosa gástrica, incrementando as defesas contra compostos ácidos. Sobre a face luminal do gel, também se distribui uma camada de fosfolipídios, conferindo caráter hidrofóbico ao muco-gel, repelindo ácidos e outras toxinas hidrofílicas (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; LICHTENBERGER, 1999; REPETTO; LLESUY, 2002).

Os fatores trifólios de baixo peso molecular (TFFs) são peptídeos que também compõem a barreira pré-epitelial (NEWTON et al., 2000). Possuem uma região em suas moléculas denominada domínio trifólio, composto por seis resíduos de cisteína que formam uma alça que lhes conferem resistência a ação de proteases. Essas moléculas também auxiliam na viscosidade da barreira, aumentam a estabilidade do gel mucoso, atuam orientando o processo de acúmulo e processamento intracelular de mucina, ativação em vias de sinalização no processo de reparo da mucosa através da EPKs (quinases reguladas por vias de sinalização extracelular)/MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos), além de interagir com citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, como moduladores de resposta imune contra produtos bacterianos (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Em síntese, essa camada promove proteção contra choques mecânicos de alimentos, imobiliza micro-organismos, previne a difusão da pepsina e outras substâncias nocivas em direção às células epiteliais da mucosa, cria um gradiente de pH que atua como defesa à secreção ácida do estômago, possui moléculas antioxidantes e integram a comunicação dessa barreira com o epitélio gástrico (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; MOJZIS; HEGEDUSOVA; MIROSSAY, 2000).

3.2.2 Células epiteliais

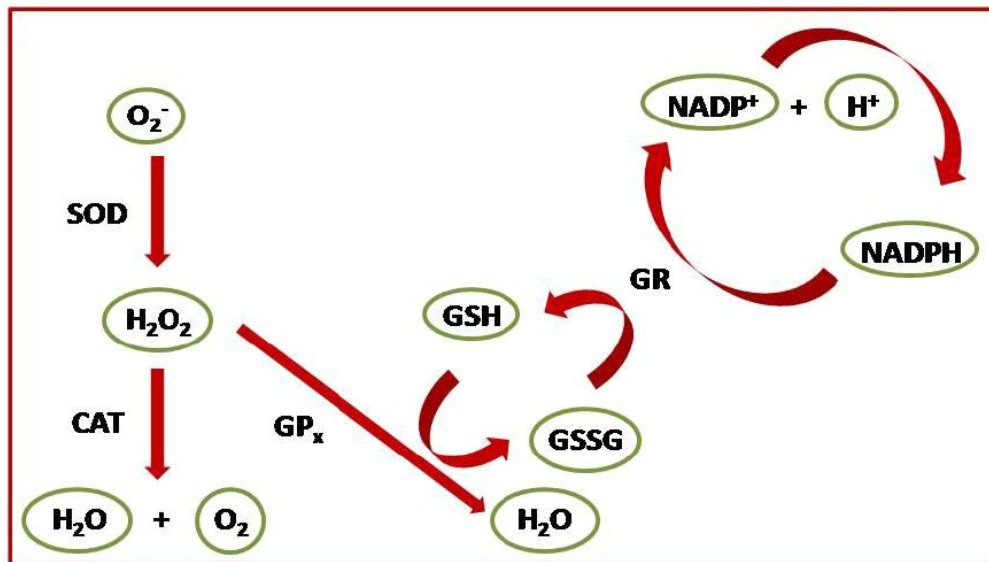
A próxima linha de defesa da mucosa gástrica é composta por suas células epiteliais que são responsáveis pela produção da barreira muco-alcalina, bem como munidas de mecanismos intracelulares que as protegem da hostilidade do ambiente luminal gástrico (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; TARNAWSKI, 2005). O epitélio possui zonas de oclusão e junções comunicantes entre células vizinhas que impedem o fluxo retrógrado de ácido e pepsina por suas membranas basolaterais, possuindo, assim, a função de isolar a camada subepitelial do lúmen gástrico e manter estas células unidas metabolicamente (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; HILLS; BUTLER; LICHTENBERGER, 1983; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Outro mecanismo de defesa intracelular são as proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*-HSPs) que são produzidas em resposta à presença de radicais livres, altas temperaturas e agentes citotóxicos, com função de conferir resistência celular contra o agente agressor ou proporcionar a degradação de proteínas desnaturadas pela ação do mesmo (HILLS; BUTLER; LICHTENBERGER, 1983; MORIMOTO; SANTORO, 1998; OYAKE et al., 2006; TANAKA et al., 2007). A proteína de choque térmico HSP70, por exemplo, é importante na proteção gástrica contra lesões produzidas por agentes irritantes e que o aumento de sua expressão melhora a capacidade antioxidante celular com redução da peroxidação lipídica, além de induzir proliferação celular e angiogênese, acelerando o processo de cicatrização gástrica (ISHIHARA et al., 2011; TSUKIMI; OKABE, 2001).

O epitélio gástrico contém um sistema enzimático antioxidante celular que elimina as espécies reativas de oxigênio (EROs), como os ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxiperoxil (HO_2^{\cdot}) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}), produzidos desregradadamente durante o estresse oxidativo que resulta na formação de produtos de peroxidação lipídica da

membrana de organelas e/ou celular, fortemente relacionados à deterioração celular gástrica (Figura 2) (BIRBEN et al., 2012; NAKAGIRI et al., 2010).

Figura 2. Resumo da formação das espécies reativas de oxigênio no organismo e ações das enzimas antioxidantes.



LEGENDA: **SOD** - superóxido dismutase, **CAT** - catalase, **GPX** - Glutationa peroxidase, **GR** – Glutationa redutase, **GSH** - Glutationa reduzida, **GSSG** - Glutationa oxidada, **NADP+**- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, **NADPH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida. Adaptado de Oliveira, 2011.

FONTE: Adaptada de KWIECIEN, BRZOZOWSKI, KONTUREK, 2002; OLIVEIRA, 2011.

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação de conversão do radical $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NAGANO et al., 2012). Por esse radical ser primariamente produzido por várias fontes durante o estresse oxidativo, a SOD desempenha um papel crucial nos mecanismos eliminadores de EROs (BIRBEN et al., 2012).

O H_2O_2 produzido pela ação da SOD pode ser degradado à água e oxigênio por duas vias enzimáticas: a via da catalase (CAT) ou através da glutatona peroxidase (GSH-Px). A catalase dismuta o peróxido de hidrogênio na presença de NADPH enquanto a GSH-Px o faz pelo consumo a glutatona reduzida (GSH), convertendo-a em sua forma oxidada, o dissulfeto de glutatona (GSSG). O GSSG pode ser novamente reduzido a GSH pela ação da enzima glutatona redutase (GR), para ser reutilizado nas reações de peroxidação via GSH-Px (FLOHE, 1988; KIRKMAN et al., 1999; KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002).

O GSH, molécula hidrossolúvel, presente em todos os compartimentos celulares em grandes concentrações (na ordem de milimolar), é a principal molécula antioxidante não enzimática do epitélio gástrico. Atua como cofator em reações antioxidantes catalizadas pela supracitada GSH-Px; é substrato para a enzima glutatona transferase que cataliza sua ligação a xenobióticos ou metabólitos da peroxidação lipídica, auxiliando na eliminação destes produtos; oxida-se sobre ação direta de EROs, resultando no radical superóxido que pode ser eliminado pela SOD; também protege a célula contra mecanismos de apoptose mediados por toxinas, controla e regula vários fatores de transcrição, como Proteína ativadora-1 (AP-1), fator nuclear kappaB (NF- κ B), e fator de transcrição Sp-1 (BANDYOPADHYAY; CHATTOPADHYAY, 2006; BIRBEN et al., 2012; KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002; WINTERBOURN, 1993; MASELLA et al., 2005).

Em adição à complexa organização intracelular dos mecanismos protetores gástricos, a barreira epitelial apresenta notável capacidade de renovação e reparo tecidual. O processo de regeneração fundamenta-se na substituição de células envelhecidas e/ou lesionadas pela proliferação e migração de células progenitoras, coordenada e controlada pelos fatores de crescimento da mucosa gástrica (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). O processo de proliferação é estimulado principalmente pelos peptídeos ativadores do receptor do fator de crescimento epitelial gástrico (EGF-R), como o fator de crescimento alfa (TGF- α), o fator de crescimento de insulina-1 (IGF-1) e o próprio fator de crescimento epitelial (EGF). Esses hormônios estimulam a mitose celular e a secreção de muco gástrico, reduzem a secreção ácida e estimulam a migração de células para as áreas a serem regeneradas (COFFEY; ROMANO; GOLDENRING, 1995; JONES et al., 1999a; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Conjuntamente aos hormônios de crescimento epitelial gástrico, os fatores estimulantes do endotélio vascular (VEGF), de fibroblastos básicos (bFGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) também auxiliam no processo de renovação celular gástrica por estimular a proliferação e diferenciação de fibroblastos e auxiliar a angiogênese na área lesionada, garantindo aporte adequado de oxigênio e nutrientes às células progenitoras (JONES et al., 1999b; SYAM et al., 2009). Estudos relatam que estes fatores de crescimentos e o EGF-R estão expressos em grandes quantidades em estômagos lesionados pela administração de agentes danosos à mucosa, reforçando a

sua importância nos processos regenerativos gástricos (MAJUMDAR; GOLDENRING, 1998; RELAN et al., 1995; SYAM et al., 2009).

3.2.3 Microcirculação e inervação sensorial gástrica

O fluxo da microcirculação gástrica é essencial para a manutenção da integridade da mucosa gástrica contra agentes deletérios (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Tal importância foi demonstrada em meados de 1970, por exemplo, pela redução do fluxo da microcirculação em animais pré-tratados com indometacina ou vasopressina, que promoveram o aparecimento de lesões na mucosa após administração de taurocolato sódico; ou ainda, fármacos que incrementam o fluxo gástrico, como isoprenalina ou prostaglandina E₂, impediram o surgimento de lesões induzidas por hidróxido de sódio 0,2 N, ácido clorídrico 0,6N, etanol absoluto, cloreto de sódio 25 % e água fervente (ABDEL-SALAM et al., 2001; KONTUREK; ROBERT, 1982; MCGREEVY; MOODY, 1977; WHITTLE, 1977).

O fluxo vascular gástrico pode ser modulado através de mecanismos reflexos executados por terminações nervosas sensitivas gástricas depois de estimuladas por compostos irritantes, como ácido gástrico, toxinas bacterianas e álcalis, mediado pela liberação do peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) e substância-P, próximo aos leitos microvasculares, promovendo a dilatação dos mesmos (HOLZER, 2006). Além dos peptídeos vasoativos, o óxido nítrico produzido constitutivamente pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e as PGE₂ e PGI₂, sintetizadas pela enzima ciclooxigenase (COX), atuam como potentes vasodilatadores, aumentando o fluxo, aporte de oxigênio local, fornecimento nutrientes e retirada de substâncias tóxicas; o NO e PGI₂ também mantêm a integridade vascular contra efeitos deletérios de mediadores pró-isquêmicos como tromboxano A₂ (TXA₂), leucotrieno C₄ (LTC₄) e endotelina, prevenindo agregação plaquetária, adesão leucocitária e isquemia vascular (LANAS, 2008; NEJADKEY et al., 2006; ROZZA et al., 2013; WALLACE; MILLER, 2000).

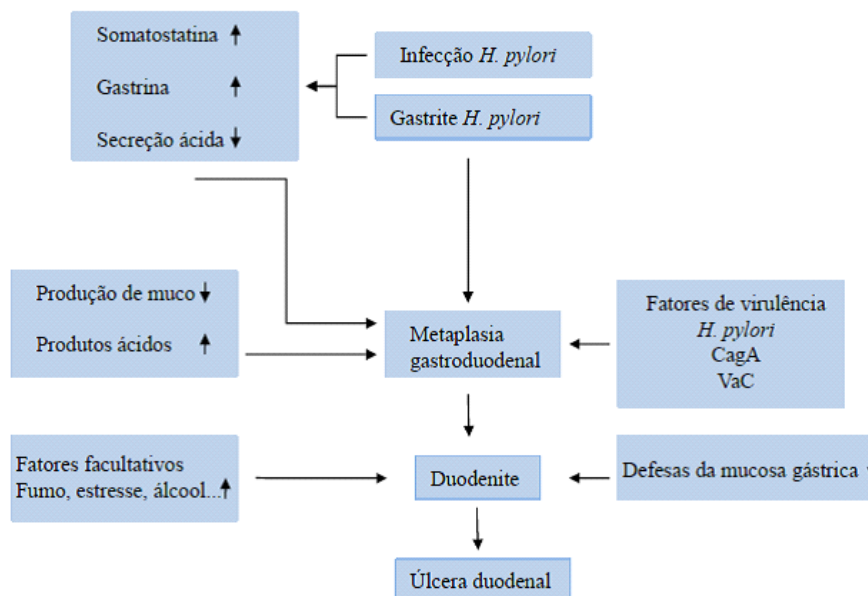
3.3 Agentes agressores da mucosa

3.3.1 *Helicobacter pylori*

A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) tem participação crucial na patogenia da úlcera gástrica, uma vez que 50 a 65% dos pacientes diagnosticados com úlcera gástrica são portadores de cepas desta bactéria. Mais de 50% da população mundial encontra-se infectada por este patógeno e, dentre esses, 5 a 10% irão desenvolver úlcera gástrica durante o período de contágio (GISBERT et al., 2004; MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009; OPPONG; ATHERTON, 2015).

A *H. pylori* é capaz de produzir a enzima uréase, que converte uréia em amônia e bicarbonato, criando um microambiente alcalino que o protege da ação cáustica do suco gástrico e o flagelo contido em sua estrutura permite seu deslocamento para as proximidades da membrana das células do epitélio gástrico, colonizando toda sua extensão (BOLTIN, 2016; HARBISON; DEMPSEY, 2005). Ao se alojar na mucosa, o patógeno libera toxinas, induz a hipersecreção ácida e infiltração de células inflamatórias, enfraquecendo a mucosa gástrica, tornando-a mais susceptível ao aparecimento de lesões (Figura 3) (BLASER; BERG, 2001; HARBISON; DEMPSEY, 2005).

Figura 3. Mecanismo de lesões gástricas induzidas pela infecção de *H. pylori*.



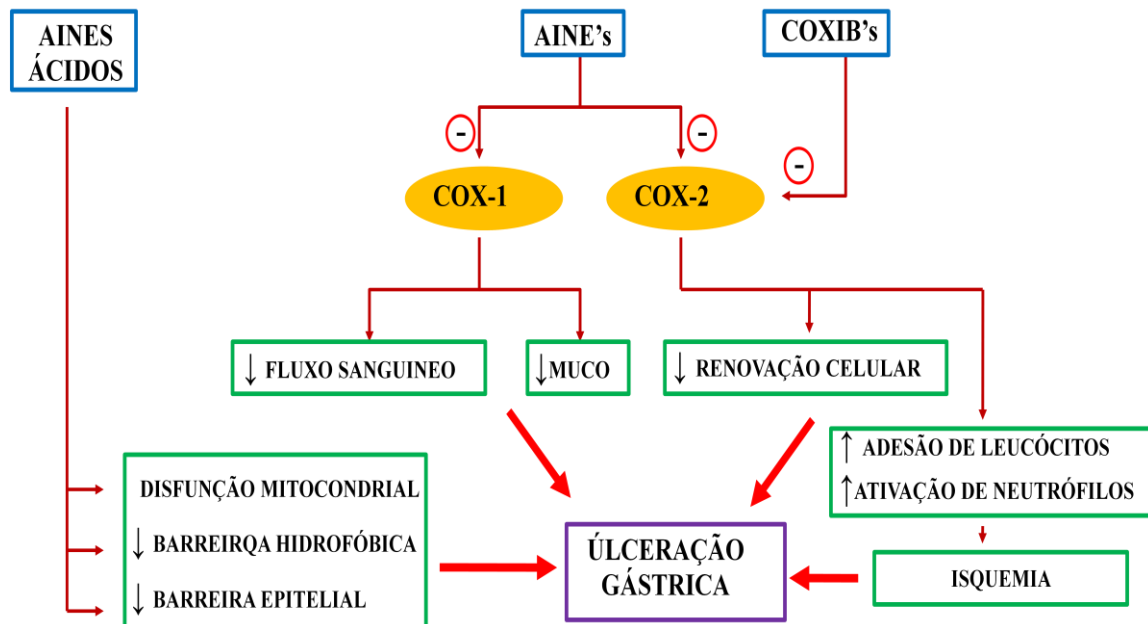
FONTE: Adaptado de MALFERTHEINER et al., 2007.

3.3.2 Anti-inflamatórios não-esteróides (AINES)

O tratamento contínuo utilizando AINES é a segunda maior causa de úlceras gástricas no mundo e o principal fator de risco para suas complicações. A prevalência anual média de úlceras gástricas em usuários crônicos de AINES é de 15 a 30% e mais de 50% dos pacientes que fazem uso prolongado de tais medicamentos relatam o aparecimento de úlceras hemorrágicas como principais complicações (HARBISON; DEMPSEY, 2005; PAHWA; KUMAR; KOHLI, 2010; TIELLEMAN; BUJANDA, 2015).

Esta classe de fármacos reduz a produção de mediadores citoprotetores da mucosa gástrica conhecidos por prostraglandinas (como PGE₂ e PGI₂), pela inibição das enzimas cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), responsáveis por sua síntese, levando a diminuição dos componentes da barreira muco-alcalina, redução do fluxo sanguíneo, infiltração de células inflamatórias, produção de radicais livres e conseqüente dano tecidual (Figura 4) (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009; TIELLEMAN; BUJANDA, 2015).

Figura 4. Patogênese de lesões gástricas por AINES.



FONTE: Adaptado de FORNAI et al., 2008.

Embora a infecção por *H. pylori* e uso crônico de AINES sejam os principais agentes etiológicos da úlcera gástrica (aproximadamente 80% de todos os casos), a relevância de outros fatores determinantes deve ser considerada, uma vez que essa disfunção apresenta uma fisiopatologia complexa e multifatorial (TIELLEMAN; BUJANDA, 2015).

3.3.3 Outros agentes agressores da mucosa gástrica

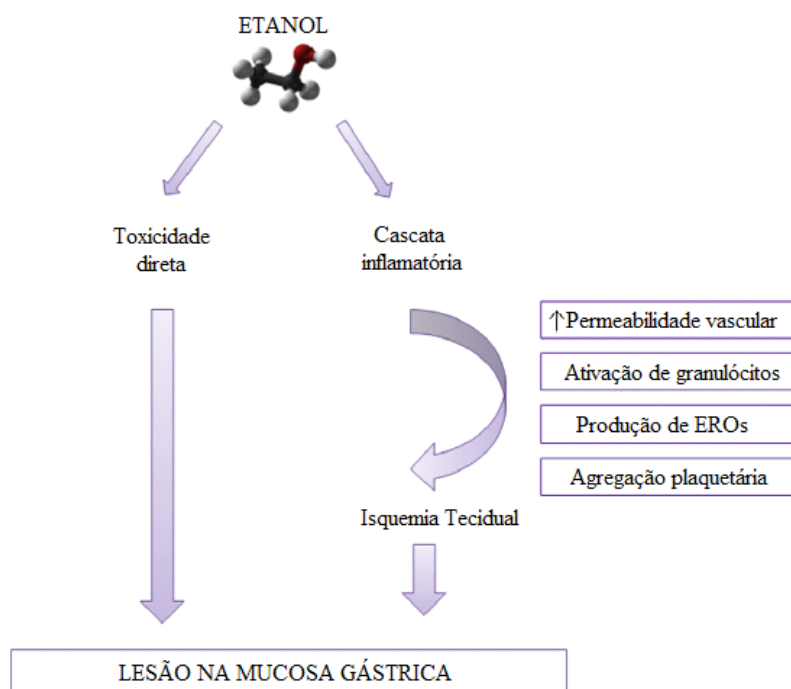
Estudos epidemiológicos mostram que tabagistas são duas vezes mais propensos a desenvolverem úlceras do que não fumantes e ainda eleva o risco de complicações como a úlcera perfurada (ALDOORI et al., 1997; KURATA; NOGAWA, 1997; SVANES et al., 1997). O hábito de fumar aumenta a secreção ácida estomacal e o refluxo gastroduodenal e também reduz a produção de prostaglandinas gastroduodenais e o bicarbonato pancreático-duodenal (AINSWORTH et al., 1993; CRYER; LEE; FELDMAN, 1992; HARBISON; DEMPSEY, 2005).

A síndrome erosiva relacionada ao estresse também é uma condição de injúria da mucosa gástrica, caracterizada pelo comprometimento de sua hemodinâmica e produção excessiva de ácido em decorrência de estresse físico, como queimaduras extensas (úlcera de Curlin), traumatismo crânio-encefálicos que resultam no aumento da pressão intracraniana (úlcera de Cushing), levando a complicações graves como a úlcera perfurada que com frequência evolui para sépsis e falência múltipla de órgãos (HARBISON; DEMPSEY, 2005; KEMP et al., 2015; LEVENSTEIN, 1998). Além do estresse físico, estudos mostram que o estresse psicossomático também leva ao aparecimento de úlceras gástricas. Pesquisadores relatam que o estresse psicológico possa induzir ao aparecimento de úlceras relacionadas a fatores de risco primordiais (*H. pylori* e AINES) e que seu efeito provavelmente é relacionado ao aumento da secreção gástrica que incrementa a ação de fatores agressores em indivíduos mais susceptíveis (PAHWA; KUMAR; KOHLI, 2010; SHIOTANI; GRAHAM, 2002).

O estômago também está sujeito a toxicidade do álcool etílico encontrado nas bebidas. O etanol, de maneira dose dependente, estimula diretamente a secreção ácida e prolonga o esvaziamento gástrico, estendendo o tempo de ação do ácido secretado e pepsina sobre a mucosa, igualmente, bebidas fermentadas, como cervejas e vinhos, estimulam secreção gástrica mediada pela gastrina (TEYSSSEN et al., 1999; WEGENER et al., 1991). Relata-se que as lesões provocadas pelo consumo de álcool são mais

freqüentes em pacientes *H. pylori* negativos enquanto outros estudos tornam inconclusivos os efeitos do álcool na etiologia dessa doença (BOLTIN; NIV, 2014). Embora haja disparidades em estudos do álcool e úlcera gástrica, seus efeitos na fisiologia do trato gastrointestinal não devem ser desconsiderados, visto que o seu consumo, eventual ou crônico, conduz a quadros de desconforto e dor gástrica em pacientes que possuem ou já apresentaram quadros de gastrite e/ou úlcera péptica (Figura 5) (BOLTIN; NIV, 2014).

Figura 5: Fisiopatologia das lesões gástricas induzidas por etanol.



Fonte: Adaptado de BOLTIN; NIV, 2014.

3.4 Estratégias terapêuticas

Os fármacos utilizados na terapia vigente têm como objetivo eliminar o agente etiológico e promover a cicatrização das úlceras juntamente com alívio dos sintomas e prevenção de complicações, sempre evitando a exposição a fatores de risco como uso de AINES, fumo, estresse físico ou psicológico (CARRETERO, 2016; SHIOTANI; GRAHAM, 2002; GISBERT; PAJARES, 2005; MALFERTHEINER et al., 2007).

Em regimes terapêuticos para úlceras gástricas pela infecção por *H. pylori*, utiliza-se de inibidores da bomba de prótons no controle da secreção gástrica, dois

antibióticos, nos quais a classe e a dose baseiam-se no perfil de resistência do bacilo, e um quarto medicamento é empregado caso a terapia tripla não seja resolutive ou a úlcera seja recorrente (Quadro 1) (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009).

Quadro 1. Esquemas terapêuticos para o tratamento de úlceras por *Helicobacter pylori*.

Tratamento	Duração		Esquema terapêutico
Padrão	7-14 dias	a	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor da bomba de prótons (omeprazol 20 mg, lansoprazol 30 mg, pantoprazol 40 mg, rabeprazol 20 mg ou esomeprazol 40 mg • claritromicina 500 mg • amoxicilina 1000 mg, 12/12 h
		b	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor da bomba de prótons • claritromicina 500mg • metronidazol 400 mg ou tinidazol 500mg, 12/12 h
		c	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor da bomba de prótons • tetraciclina 500 mg (6/6h) • amoxicilina 1000mg (12/12h) • sais de bismuto 120 mg(6/6h)
Em caso de insucesso do tratamento padrão	10-14 dias		<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor da bomba de prótons • amoxicilina 1000 mg • levofloxacino 500 mg ou rifabutina 300 mg, 12/12h

LEGENDA: **a** - Em populações com até 20 % de resistência bacteriana a claritromicina e maior que 40% de resistência ao metronidazol; **b**- Em populações com até 20 % de resistência bacteriana a claritromicina e metronidazol; **c** - Em populações com alta resistência bacteriana a claritromicina metronidazol

FONTE: (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009)

Já em úlceras consequentes do uso crônico de AINEs, a descontinuação dessa terapia (quando possível) é a primeira opção juntamente com uso de um fármaco antissecretor. Do contrário, a avaliação do histórico do paciente relativo ao controle de doenças cardiovasculares e à presença de fatores de risco relacionados à úlcera gástrica deve ser realizada, elaborando-se um tratamento baseado em fármacos citoprotetores e anti-inflamatórios COX-2 seletivos (Quadro 2) (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009).

Embora, nos dias de hoje, dispõe-se um vasto conhecimento a respeito da úlcera gástrica, seus agentes etiológicos e estratégias terapêuticas para seu combate e controle, as lesões recorrentes são um dos maiores problemas relacionados ao

tratamento das úlceras pépticas, que correspondem de 10 a 15% de todos os casos (CARRETERO, 2016; NAPOLITANO, 2009).

Quadro 2. Estratégias farmacológicas no tratamento de úlceras gástricas em pacientes medicados com AINE's, considerando a presença de lesões gástricas hemorrágicas e o uso de ácido acetilsalicílico no controle de doenças cardiovasculares (se presentes) nos mesmos.

Presença de Lesões Hemorrágicas	Controle de Doenças Cardiovasculares	
	Com uso de ácido Acetilsalicílico	Sem uso de ácido Acetilsalicílico
Presença de até dois fatores de risco sem histórico de lesões hemorrágicas	<ul style="list-style-type: none"> Naproxeno 500 mg (12/12h) + Inibidor da bomba de prótons Ou Misoprostol 200 μg (6/6h) 	<ul style="list-style-type: none"> AINES (dose prescrita para o tratamento) + Inibidores da bomba de prótons Ou Misoprostol 200 μg (12/12 ou 6/6h) Ou Inibidor COX-2 seletivo
Presença de histórico de lesões gástricas hemorrágicas	<ul style="list-style-type: none"> Evitar uso de AINES 	<ul style="list-style-type: none"> Inibidor COX-2 seletivo + Inibidor da bomba de prótons Ou misoprostol 200 μg (6/6h)

FONTE: MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009.

A ausência de eficácia e descontinuidade do tratamento, seja pela utilização de doses inadequadas, pela a colonização da mucosa por cepas de *H. pylori* resistentes a antibioticoterapia, pela exposição crônica a fatores de risco ou pelos altos custos da terapia antiúlcera, são as principais causas do reaparecimento dessas lesões (CARRETERO, 2016; CORLETO et al., 2014; KANGWAN et al., 2014; NAPOLITANO, 2009). Sob este escopo, a busca por alternativas terapêuticas que contornem esses obstáculos tem sido impulsionada, principalmente através da pesquisa com produtos naturais (RIBEIRO et al., 2016).

3.5 Produtos naturais

Os produtos naturais e seus compostos têm-se mostrado efetivos no tratamento contra úlcera gástrica, por apresentarem ação gastroprotetora e ausência de efeitos danosos, ao contrário de muitos fármacos disponíveis que promovem o alívio dos sintomas, mas por vezes mostram-se com efetividade limitada e com manifestação de efeitos adversos (KANGWAN et al., 2014). As plantas medicinais são um exemplo da importância dos produtos naturais como alternativas terapêuticas, uma vez que sua vasta biodiversidade e o conhecimento popular, passado entre gerações, fornecem informações valiosas quanto ao potencial curativo destes produtos contra enfermidades (LOBO et al., 2014). A potencialidade do uso de plantas medicinais, pela pluralidade de espécies disponíveis, pelas distintas características dos produtos extraídos e variedade das partes da planta utilizadas para o tratamento de úlceras gástricas pode ser demonstrada pelos dados exibidos no quadro 3.

Quadro 3. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de úlceras gástricas.

Espécie	Família	Droga vegetal	Mecanismo de ação estudado	Fonte
<i>Piper betle</i> L.	Piperaceae	Extrato aquoso Folhas	-Antioxidante	(LEI et al., 2003)
<i>Rhizophora mangle</i> L.	Rhizophoraceae	Extrato aquoso Casca do caule	-Gastroprotetor via PGE ₂ -Antissecretor	(MARÍA et al., 2010)
<i>Excoecaria agallocha</i> L.	Euphorbiaceae	Extrato aquoso Casca do caule	-Protetor gástrico contra lesões por AINES -Antissecretor	(THIRUNAVUKKARASU; RAMKUMAR; RAMANATHAN, 2009)
<i>Desmostachia bipinnata</i> L.	Gramineae	Extrato etanólico Folhas	-Protetor gástrico contra lesões por etanol	(AWAAD et al., 2008)

continua

Quadro 3. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de úlceras gástricas.*continuação*

<i>Polyalthia longifolia</i> (Sonn.) Thwaites.	Annonaceae	Extrato etanólico Folhas	-Protetor gástrico contra etanol, AINE e estresse	(MALAIRAJAN et al., 2008)
<i>Solanum nigrum</i> L.	Solanaceae	Extrato Metanólico Frutos	-Antioxidante	(CHAUHAN et al., 2012)
<i>Ocimum sanctum</i> L.	Lamiaceae	Óleos fixos Sementes	-Inibidor da lipoxigenase -Antisecretor por antagonismo a receptores H ₂	(PANDEY; MADHURI, 2010)
<i>Hyptis crenata</i> Pohl ex Benth.	Lamiaceae	Óleos essenciais Folhas	-Antioxidante	(DINIZ et al., 2013)

FONTE: Elaborada pelo autor.

3.5.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais merecem destaque entre os derivados vegetais. Conhecidos por suas fortes fragrâncias e odores característicos, sua prática curativa é conhecida desde a antiguidade, mas seu método de extração a partir plantas aromáticas foi pioneiramente melhorado através da técnica de arraste a vapor pelos povos do oriente médio. Por conhecer suas propriedades antissépticas, bactericidas, fungicidas e curativas em geral, essas civilizações utilizavam esses óleos na conservação de alimentos e também no tratamento de doenças (BAKKALI et al., 2008).

Atualmente, os óleos essenciais são largamente utilizados como inseticidas e herbicidas na indústria agrícola e como fragrâncias, fixadores e flavorizantes na indústria farmacêutica e alimentícia (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Composto uma lista que ultrapassa 3000 produtos obtidos a partir de mais de 2000 espécies vegetais, como os óleos de laranja (*Citrus sinensis* L.), eucalipto (*Eucalyptus* sp), citronela (*Cymbopogon nardus* L.), hortelã-pimenta (*Hyptis spicigera* Lam.), limão (*Citrus limon* L.), os óleos essenciais apresentam produção anual de 40 a 60 mil toneladas e lucro de

700 milhões de dólares, ostentando grande destaque no cenário mundial. (DJILANI; DICKO, 2012; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A busca por novas alternativas curativas nas últimas décadas, entretanto, direcionaram o foco dos pesquisadores para a constituição química, propriedades farmacológicas, toxicológicas, e efeitos biológicos dos óleos essenciais. A sua composição química pode variar com números que chegam de 20 a 100 metabólitos secundários diferentes, geralmente com destaque para dois ou três compostos, que os compõem majoritariamente (de 20 a 70% da composição total), como, por exemplo, o óleo essencial extraído dos frutos de *Cedrus deodara* Roxb. ex D. Don que contém α -terpineol (30,2%), linalol (24,7%) e limoneno (17,01%) como seus componentes majoritários; e o carvacrol (30%) e timol (27%) são os compostos predominantes no óleo de *Origanum compactum* Benth. (BAKKALI et al., 2008; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; CARSON; HAMMER, 2011; ZENG et al., 2012).

Vários grupos orgânicos são encontrados na composição dos óleos essenciais, como alcoóis, aldeídos, cetonas de cadeia curta e fenilpropanoides, mas são os monoterpenos e seus derivados oxigenados os constituintes predominantes dos óleos essenciais, chegando a 90% de sua composição (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; CARSON; HAMMER, 2011; PARVARDEH et al., 2016).

3.5.2 Monoterpenos

Os monoterpenos são formados pela associação de duas moléculas de isopreno e sua síntese depende da ação de enzimas específicas denominadas terpenos sintetases e, secundariamente, por enzimas de oxido-redução (BAKKALI et al., 2008; GRAYSON, 2000). Essa variedade enzimática justifica a diversidade estrutural dos monoterpenos encontrados na natureza e a heterogeneidade de seus aromas, sabores e atividades biológicas (DEGENHARDT; KOLLNER; GERSHENZON, 2009; PARVARDEH et al., 2016).

A literatura cita propriedades antiúlcera de monoterpenos encontrados em óleos essenciais, como citados no quadro 4. O mentol, por exemplo, apresentou mecanismos protetores gástricos por aumentar a produção de muco gástrico, PGE₂ e a participação de grupos sulfidrilas, além de apresentar atividade antissecretora (ROZZA et al., 2013); carvacrol promoveu o aumento da produção de muco, participação de prostaglandinas, óxido nítrico, atividade antioxidante e anti-inflamatória, além

estimular a cicatrização de lesões gástricas em modelos crônicos (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012); diferente dos exemplos anteriores, o efeito protetor da epóxi-carvona não foi relacionado à atividade antissecretora e nem a participação de óxido nítrico ou prostaglandinas (OLIVEIRA et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2011). Dados como esses mostram o potencial de monoterpenos para o tratamento de úlceras gástricas.

Quadro 4. Atividades biológicas de monoterpenos.

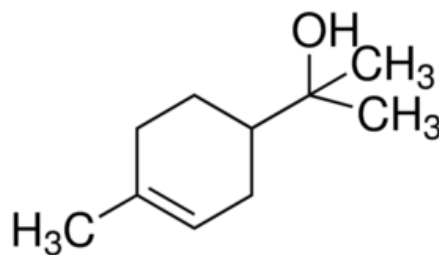
Monoterpeno	Atividade	Fonte
Linalol, α -terpineol	Antimicrobiana	(PARK et al., 2012)
Carvacrol, timol, geraniol e eugenol	Antimicrobiana	(GALLUCCI et al., 2010)
Carvacrol	Vasorelaxante	(AYDIN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2010)
Timol	Vasorelaxante	(PEIXOTO-NEVES et al., 2010)
Mentol	Analgésica	(GALEOTTI et al., 2002)
Linalol, mentol	Miorelaxante	(LIBROWSKI, 2005)
Geraniol	Antitumoral	(CARNESECCHI et al., 2001)
Limoneno	Antitumoral	(MALTZMAN et al., 1989)
γ -terpineno	Antioxidante	(GRASSMAN, 2005)
Cineol	Anti-inflamatória	(JUERGENS, 2014)
<i>p</i> -cymene	Anti-inflamatória, antinociceptiva	(QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013)
Mentol	Gastroprotetora	(ROZZA et al., 2013)
Carvacrol	Gastroprotetora	(OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012)
Limoneno	Gastroprotetora	(ROZZA et al., 2011)
Epoxicravona	Gastroprotetora	(SIQUEIRA et al., 2012)

FONTE: Elaborada pelo autor.

3.5.3 α -terpineol

O α -terpineol ou [2-(4-Methyl-1-cyclohex-3-enyl)propan-2-ol](Figura 6) é um monoterpreno, líquido a temperatura ambiente, incolor, pouco viscoso, de odor suave, adocicado e floral, constituinte do óleo essencial de espécies como *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.F. Blake (IRELAND et al., 2002), *Pinus taiwanensis* Hayata (YAO et al., 2005), *Eucalyptus* spp (GILLES et al., 2010; RAHIMI-NASRABADI et al., 2013), *Myrtus communis* L.(BEN HSOUNA et al., 2014), *Laurus nobilis* L.(ABU-DAHAB; KASABRI; AFIFI, 2014).

Figura 6. Estrutura química do α -terpineol.



FONTE: Adaptado de BHATIA; LETIZIA; API, 2008.

Comercialmente é encontrado em produtos industrializados como sabonetes e outros cosméticos, constituinte de formulações antifúngicas e antissépticas na indústria farmacêutica e ingrediente de produtos de limpeza na indústria química. Sua demanda varia entre 1 a 10 toneladas/ano (BAPTISTELLA, 2009; BHATIA; LETIZIA; API, 2008).

Em função da grande demanda, o α -terpineol utilizado no mercado é obtido principalmente pela via sintética, como a hidratação de pinenos; a ação de ácidos cloroacéticos sobre o limoneno ou ácidos clorossulfônicos/p-toluenossulfônicos em nerol também são descritas como vias sintéticas, sendo que a via do limoneno é interessante pela disponibilidade, facilidade de obtenção em alta pureza química e óptica desse terpeno (BAPTISTELLA, 2009; LINARES-PALOMINO et al., 2006).

O alfa-terpineol também é utilizado na pesquisa médica, no estudo de suas propriedades farmacológicas, sendo relatada uma variedade de atividades biológicas como anticonvulsivante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, entre outras

(Quadro 5). Destaca-se, dentro desse rol de atividades terapêuticas, a atividade antiúlcera do α -terpineol em modelos de lesão por etanol absoluto, atuando provavelmente através de mecanismos gastroprotetores (SOUZA et al., 2011).

Quadro 5 – Estudos farmacológicos do α -terpineol.

Atividade	Protocolo	Dose	Via de administração	Fonte
Anticonvulsivante	Eletrochoque	400 mg/kg	oral	(DE SOUSA; QUINTANS; DE ALMEIDA, 2007)
	Convulsão induzida por pentilenotetrazol	200 mg/kg		
Antinociceptiva	Hiperálgia induzida por carragenina Hiperálgia induzida por fator de necrose tumoral- α	100 mg/kg	intraperitoneal	(DE OLIVEIRA et al., 2012)
Antiadição	Dependência à morfina	20 mg/kg	intraperitoneal	(PARVARDEH et al., 2016)
	Tolerância à morfina	40 mg/kg		
Anti-inflamatória	Pleurite induzida por carragenina	100 mg/kg	Intraperitoneal	(DE OLIVEIRA et al., 2012)
	Produção de nitrito induzida por Lipopolissacarídeo	1, 10 e 100 μ g/ml	in vitro	
Hipotensora	Hipertensão induzida por L-NAME	100 mg/kg/dia/7 dias	Oral	(SABINO et al., 2013)
Vasorrelaxante	Anéis de artéria mesentérica pré-contraídas com fenilefrina e KCl	10^{-9} a 10^{-2} M	In vitro	(SABINO et al., 2013)
Antimicrobiana	Concentração inibitória mínima Concentração bactericida mínima	0,1-0,8 mg/ml	In vitro	(PARK et al., 2012)
Relaxante muscular gástrico	Retardo de esvaziamento gástrico pós-prandial	50 mg/kg	Oral	(DA SILVA et al., 2016)

Continua

Quadro 5 – Estudos farmacológicos do α -terpineol.

(Continuação)

Atividade	Protocolo	Dose	Via de administração	Fonte
Antifúngica	Concentração inibitória mínima	0,64-1,25 mg/ml	In vitro	(PINTO et al., 2014)
	Concentração fungicida mínima	0,64-2,5 mg/ml		

FONTE: Elaborada pelo autor.

Estudos de toxicidade aguda foram realizados em roedores com o objetivo de obter a dose letal para 50% dos animais tratados com uma dose única de α -terpineol (DL_{50}) pela via intraperitoneal, intramuscular e via oral. Após 72 horas de observação, a DL_{50} pela via intraperitoneal em ratos foi de 847 mg/kg; após 48 horas de observação pela via intramuscular, a DL_5 foi de 2000 mg/kg e, por via oral, durante 7 dias, de 2900 mg/kg, ambas em camundongos (BHATIA; LETIZIA; API, 2008; YAMAHARA et al., 1985).

Embora com grande potencial terapêutico, o α -terpineol apresenta algumas limitações farmacocinéticas, como sua natureza lipofílica ($\text{Log}K_{o/w} = 3,3$), que interfere em sua solubilidade em meio aquoso e, conseqüentemente, em sua absorção/biodisponibilidade oral; além disso possui meia-vida na circulação sanguínea muito curta (12,5 minutos) (BHATIA; LETIZIA; API, 2008; ODEH; AL-JABER; KHATER, 2014; TOBIN; SWERCZEK; BLAKE, 1976). Sob esse ponto de vista, pode-se lançar mão de estratégias para contornar essas restrições técnicas a fim de melhorar suas características farmacocinéticas, otimizar seu potencial farmacológico.

3.6 Carreadores de fármacos

Os sistemas carreadores são formulações que permitem a introdução de um agente terapêutico em um sistema biológico e melhoram sua eficácia e segurança, através do controle do tempo, taxa e local de liberação desses fármacos no organismo. O processo é constituído pela administração da formulação, liberação dos componentes

terapeuticamente ativos pelo produto e o subsequente transporte dos mesmos através das membranas biológicas até o sítio de ação.

Até o ano de 1950, a maioria dos fármacos era apresentada em formulações líquidas, na forma de comprimidos ou cápsulas que liberavam o princípio ativo ao contato com água sem qualquer controle sobre sua cinética de liberação. Em 1952, Smith Klein Beecham introduziu a primeira formulação de liberação prolongada (sulfato de dextroanfetamina – Dextrine®) capaz de controlar a cinética de liberação do fármaco e alcançar uma eficácia de 12 horas (LEE; LI, 2010). O desenvolvimento desta nova tecnologia, denominada “Spansule”, deu pontapé inicial para o surgimento da primeira geração de sistema carreador de fármacos, baseadas na liberação controlada através do gerenciamento das propriedades físico-químicas desses sistemas, compostas por formas farmacêuticas orais, administradas até duas vezes ao dia, e transdérmicas, com administrações semanais (YUN; LEE; PARK, 2015).

A segunda geração é chamada de sistema de liberação “inteligente”, que compreende a produtos lançados de 1980 até os anos 2010, nos quais o foco foi desenvolver formulações orais com cinética de liberação de ordem zero, com a finalidade de manter as concentrações de fármacos constantes na circulação, mas essa cinética era obtida apenas em estudos *in vitro*, uma vez que *in vivo* as formulações orais tinham diferentes taxas de absorção devido às diferentes propriedades absorptivas ao longo do trato gastrointestinal. Sabendo-se que o efeito terapêutico de um fármaco é mantido se sua concentração plasmática permanecer entre a mínima efetiva e a máxima segura, partiu-se então dessa premissa para a pesquisa por formulações dessa geração, o que permitiu um aumento na flexibilidade no desenvolvimento das mesmas, como sistema de liberação de hormônios como leuprorelina (Lupron® Depot), goserelina (Zoladex® Depot), somatotropina (Nutropin® Depot), utilizando polímeros biodegradáveis como reservatórios dessas moléculas, com mecanismos de liberação a longo-prazo (meses); e nanopartículas, direcionando o desenvolvimento de medicamentos na terapia preventiva, gênica ou antitumoral (paclitaxel-Abraxane®). (EMAMI, 2006; OKADA, 2009; YUN; LEE; PARK, 2015).

A terceira geração, chamada de sistemas de transporte modulador, ainda está a se firmar, e tem como proposta melhorar o armazenamento e cinética de liberação de produtos já existentes, criar sistemas de liberação de longa duração (até um ano), auto-reguláveis (por estímulos, por exemplo), capazes de diminuir a toxicidade de fármacos, restringindo seus efeitos para seus sítios de ação. Por exemplo, nanopartículas

responsivas a glutathione para transporte de fármacos intracelular e terapia gênica já estão em desenvolvimento (CHENG et al., 2011; JI; FENG, 2015); testes em humanos com formulações de nano e micropartículas para liberação de fármacos em áreas inflamadas de intestino já foram realizados (SCHMIDT et al., 2013); lipossomas contendo doxorubicina com polietilenoglicol (Doxil®), já aprovada pela Food and Drugs Administration (FDA), diminuiu a cardiotoxicidade desse fármaco (BARENHOLZ, 2012), mostrando-se, portanto, que os resultados dos estudos dessa geração encontram-se em diversas fases de desenvolvimento, anunciando as perspectivas positivas desse sistema de liberação de fármacos.

3.7 Nanotecnologia e nanopartículas poliméricas

A nanotecnologia é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos dessas preparações têm sido realizados ativamente no mundo com propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SURI; FENNIRI; SINGH, 2007; YUN; LEE; PARK, 2015). Esta tecnologia surgiu na década de 1960 com o desenvolvimento da microencapsulação, técnica na qual polímeros e outras substâncias são transformados em partículas de tamanho micrométrico com posterior encapsulação (LASIC, 1998; ODEH; AL-JABER; KHATER, 2014).

De uma forma geral, estes sistemas apresentam elevada área superficial, sendo considerados vetores para a administração de substâncias lipofílicas, possibilitando uma liberação homogênea e, muitas vezes, controlada de fármacos, mantendo assim a resposta terapêutica no sítio de ação por tempo prolongado. A vetorização em órgãos, tecidos ou células específicas também apresenta como vantagem a diminuição de efeitos adversos apresentados sistemicamente pelo fármaco não vetorizado. Outro aspecto importante é a diminuição das doses e do número de aplicações, de modo que os pacientes apresentam maior adesão ao tratamento. Além disso, em alguns casos, esse processo melhora da biodisponibilidade de um fármaco através do aumento de sua estabilidade nos fluidos biológicos ou ainda o aumento de estabilidade da própria formulação farmacêutica (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; COUVREUR et al., 2002; PARK, 2014a, 2014b).

As nanopartículas poliméricas, sistema de carreadores com diâmetro de partículas menores que 1 μm , podem ser classificadas genericamente como nanoesferas e nanocápsulas, dependendo de sua composição. A presença de óleo na composição das nanocápsulas leva a formação de uma estrutura vesicular, com uma capa polimérica envolvendo o núcleo oleoso, onde se localiza a maior parte do fármaco. Nas nanoesferas, a ausência da matriz oleosa leva a organização de uma estrutura matricial, nas quais os compostos ativos podem estar adsorvidos na superfície, aprisionados ou dispersos na matriz. Nanocápsulas e nanoesferas são excelentes carreadores de fármacos, pois moléculas frágeis podem ser protegidas contra calor, luz e degradações enzimáticas fisiológicas (BAZYLIŃSKA et al., 2014; SOPPIMATH et al., 2001; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

O polímero escolhido para a preparação de nanopartículas deve obedecer a critérios de degradabilidade e compatibilidade no organismo. O primeiro está relacionado à quebra de ligações covalentes, por hidrólise ou clivagem enzimática, e também pelo desgaste da matriz polimérica através de processos físicos, como abrasão, difusão e dissolução, ambos intimamente relacionados à taxa de liberação dos fármacos incorporados. Nos polímeros biodegradáveis, suas matrizes são naturalmente eliminadas do organismo, enquanto que os não-biodegradáveis precisam ser retirados do corpo após a liberação do ativo, a não ser em aplicações orais em que o polímero passe através do trato gastrointestinal e seja eliminado pelas fezes (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

A compatibilidade dos polímeros desses sistemas com as moléculas endógenas é de extrema importância. Polímeros menos biocompatíveis podem interagir com proteínas de tecidos conjuntivos, da membrana plasmática de células teciduais ou do plasma através de ligações covalentes, forças intermoleculares ou por adsorção, que podem desencadear a ativação de mecanismos da resposta imune, com ativação do sistema complemento, ligação de anticorpos e fagocitose pelas células do sistema retículo-endotelial, comprometendo a efetividade e dificultando a eliminação do sistema de liberação, ocasionando reações de hipersensibilidade e/ou anafilaxia (GAMUCCI et al., 2014).

Quanto a sua origem, os polímeros podem ser naturais ou sintéticos. Uma grande variedade de polímeros naturais pode ser utilizada para a preparação de sistemas poliméricos de transporte, dos quais se destacam as proteínas, como albumina humana ou bovina e os polissacarídeos, como alginatos e quitosana. Os polímeros naturais

podem ser utilizados para preparar micropartículas poliméricas, bem como transportadores coloidais. As vantagens desta classe de polímeros incluem a bioadesão a mucosas como ocular, nasal, urinária, gastrointestinal e vaginal; são biocompatíveis, biodegradáveis que, por conseguinte, proporcionam maior biodisponibilidade dos princípios ativos administrados, mas sofrem grande variação em relação aos lotes produzidos, devido aos diferentes processos de fabricação/obtenção e purificação. Os polímeros sintéticos Os polímeros sintéticos mais utilizados para a preparação de sistemas de transporte de princípios ativos são poli-ácido láctico, poli-ácido glicólico, poli-ácido láctico-co-ácido glicólico, poli-metacrilato de metila, poli-ácido metacrílico, poli-caprolactona, o poliestireno, os poli-acrilatos e seus derivados e ainda os poliésteres alifáticos. Os polímeros sintéticos apresentam um custo mais elevado e maior potencial antigênico, podendo manifestar toxicidade quando degradados ou hidrolisados, mas mantêm-se a reprodutibilidade em cada lote sendo, por isso, mais seguro para veiculação de princípios ativos (GAMUCCI et al., 2014; RAMTOOLA et al., 2011).

3.8 Poli-(metacrilato de metila)

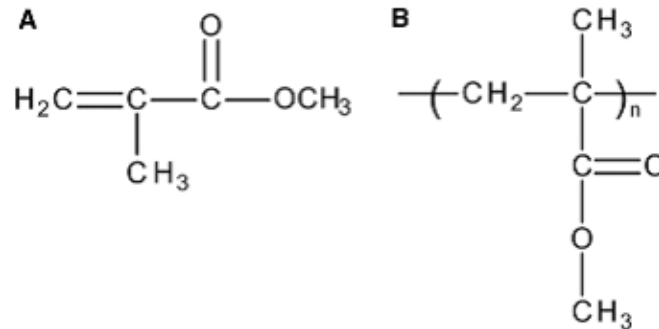
O uso do poli-metacrilato de metila (PMMA) como polímero para preparação de partículas é um marco na história da microencapsulação e suas primeiras aplicações forma no desenvolvimento de nanopartículas para veiculação de vacinas (BETTENCOURT; ALMEIDA, 2015; KREUTER; SPEISER, 1976). O PMMA é um homopolímero sintético não-biodegradável de metacrilato de metila (MMA), seu monômero (Figura 7). É um material, rígido mas quebradiço com características hidrofóbicas. Entretanto, seu contato com soluções aquosas o torna levemente hidrofílico (JOHNSON; KREUTER; ZOGRAFI, 1986).

Atualmente, é aceito como um polímero atóxico que apresenta bons relatórios de segurança em aplicações biomédicas sem apresentar efeitos adversos severos, como oncogenicidade, observado por estudos de prática ortopédica, em pacientes com implantes que contém PMMA (SCHADE; ROUKIS, 2010).

Este polímero geralmente é empregado como sistema carreador de antibióticos como aminoglicosídeos, gentamicina ou tobramicina (BETTENCOURT; ALMEIDA, 2012) e o lipopeptídico daptomicina (MCLAREN; MCLAREN; SMELTZER, 2006; WEISS et al., 2009). A encapsulação de AINES utilizando nanopartículas de PMMA como indometacina, tolmetina e ácido mefenâmico (CORRY; MORAN, 1998),

antineoplásicos como metotrexato (WANG et al., 1996), doxirrubicina e pamidronato (HEALEY et al., 2003) e drogas antifúngicas como anfotericina B (SEALY et al., 2009) também é descrita na literatura. Apesar de suas características de biodecomposição, o PMMA ainda é uma importante ferramenta na engenharia biomédica por sua biocompatibilidade e conferir estabilidade da formulação.

Figura 7. Estrutura química do (A) do monômero, MMA, e (B) de seu polímero, PMMA.



FONTE: Adaptado de BETTENCOURT; ALMEIDA, 2015.

3.9 Preparação de nanopartículas de PMMA

3.9.1 Miniemulsão

O termo miniemulsão é empregado genericamente para descrever dispersões submicrométricas (na faixa de tamanho de 30-500 nm), geralmente do tipo óleo em água, que apresentam grande estabilidade por extensos períodos, sendo preparado a partir de um sistema contendo óleo, água, surfactante e coestabilizador (ZHANG et al., 2008). A fase oleosa dispersa é composta do fármaco no qual está solubilizado no coestabilizante (um hidrófobo) que por sua vez é dissolvido no monômero (metacrilato de metila). A fase aquosa dispersante é composta por água, tampão (bicarbonato de sódio) e um surfactante, geralmente aniônico. Após a mistura das duas fases por agitação contínua, é necessário aplicar um mecanismo de alta tensão cisalhante para alcançar um estado estacionário obtido pelo equilíbrio das taxas de rompimento e de coalescência na dispersão e adição de um agente iniciante da polimerização (LANDFESTER, 2006).

3.9.1.1 Degradação de Ostwald

Termodinamicamente, a miniemulsão é instável devido à energia requerida para manter a grande área específica das gotas, entretanto, conseguir e manter as gotas estáveis é preponderante na preparação e polimerização em miniemulsão. Normalmente, gotas nanométricas não são suficientemente estáveis para existir durante períodos de tempo superiores a 24h, devido à degradação de Ostwald (degradação difusional ou Ostwald ripening) (FONTENOT et al., 1993a).

Em uma emulsão óleo em água, a transferência de massa das gotas menores para as maiores ocorre naturalmente e influencia a distribuição do tamanho de partículas. Quando as gotas pequenas não são estabilizadas contra a degradação difusional, elas vão desaparecendo e o tamanho médio das gotículas aumenta com o tempo. O processo de degradação é promovido pela diferença de potencial químico existente entre os componentes presentes nas gotas menores e nas gotas maiores. Por causa da natureza hidrofóbica dos componentes emulsionados, o aumento de potencial químico nas partículas pequenas por causa da alta área específica pode ser muito significativo, o que promove transferência de massa espontânea das partículas menores para as maiores através da fase aquosa. Esse efeito pode ser minimizado com a inserção de aditivos que reduzam a energia de interface (tensoativos), o potencial químico da fase dispersa ou que aumentem às resistências à transferência de massa entre o meio aquoso e as partículas (coestabilizantes) (ASUA, 2002).

3.9.1.2 Surfactante em miniemulsões

A principal função do tensoativo é estabilizar as gotas do monômero e reduzir a tensão interfacial entre a fase orgânica e aquosa através de um rearranjo na superfície, impedindo a coalescência entre as gotas. O processo de coalescência acontece quando duas gotículas estão próximas o suficiente para que ocorra o contato entre as gotas, levando à formação de uma única gota maior. A coalescência pode ser impedida pela adição de surfactantes iônicos, que estabilizam a emulsão por meio da repulsão eletrostática, ou pela adição de surfactantes não-iônicos, que promovem a proteção por impedimento estérico, sendo também possível que ocorram os dois efeitos simultaneamente (ASUA, 2002; ASUA et al., 1990).

A aplicabilidade dos surfactantes em miniemulsões depende das seguintes características: (i) ter caráter anfifílico; (ii) solubilidade preferencial na fase aquosa, nos casos da emulsão do tipo O/W; (iii) adsorver fortemente na superfície das gotas, não se deslocando facilmente quando as gotas colidirem; (iv) conceder um potencial eletrocinético à gota; (v) apresentar baixo custo, não toxicidade e segurança de manipulação (ASUA, 2002)

A concentração de surfactante influencia o tamanho de gota, pois uma maior concentração de surfactante é capaz de estabilizar uma maior área interfacial e gotas de tamanhos menores. Para uma mesma fração orgânica, as gotas de tamanho menor necessitam de uma cobertura interfacial mais densa de surfactante. Esse efeito se deve a uma maior densidade numérica de partículas, uma menor distância entre as superfícies e uma maior mobilidade relativa das gotas menores. O lauril sulfato de sódio é um tensoativo aniônico dos mais utilizados em formulações de miniemulsão. A quantidade de emulsificante empregada nas polimerizações em miniemulsão varia tipicamente entre 1 e 5% da massa dos monômeros (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002).

3.9.1.3 Coestabilizador em miniemulsões

Os coestabilizantes, como hexadecano e o álcool cetílico, são moléculas com função de estabilizar as gotas da fase dispersa contra a degradação difusional. Esses compostos exercem uma pressão osmótica dentro das gotículas, neutralizando a pressão de Laplace, não permitindo a sua difusão das gotas vizinhas através da fase aquosa, portanto, quanto mais hidrofóbico for o coestabilizante, maior será sua eficiência em reduzir a degradação de Ostwald dos sistemas de miniemulsão (LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILÄNDER, 2010).

Os coestabilizadores, por serem insolúveis em água, não podem difundir na fase aquosa, assim, ao remover monômero de uma gotícula, ocorre um aumento na concentração do co-estabilizante, retardando ou impedindo a degradação de *Ostwald* e mantendo sua estabilidade durante a polimerização. A quantidade usual de co-estabilizador varia em na faixa de 2-4% em relação à massa do monômero nas reações de polimerização (ASUA, 2002).

3.9.1.4 Sistemas de dispersões de miniemulsões

O processo de emulsificação inicia-se com uma pré mistura das duas fases: uma aquosa, que contém o surfactante, e uma orgânica, que contém o co-estabilizante dissolvido no monômero. A ordem com que os componentes são misturados não interfere na taxa de polimerização, desde que se tenha uma eficiente homogeneização. (ASUA, 2002; MILLER et al., 1994). O processo de emulsificação consiste basicamente de duas etapas. Primeiramente, ocorre a deformação e a ruptura das gotas, aumentando a área específica da miniemulsão. Depois, a estabilização da nova interface deve ser promovida pelo surfactante; caso contrário, a gota voltará a coalescer. Os equipamentos normalmente empregados para dispersão das miniemulsões são o ultra-turrax (rotor-stator), o ultra-som e homogeneizador de alta pressão (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; BROSEL; SCHUBERT, 1999). O ultra-turrax é um equipamento de cisalhamento que induz forte deformação por meio da rotação em alta velocidade de um rotor em relação a um estator físico. O tamanho das gotículas formadas depende da intensidade de cisalhamento gerada, que depende da geometria do equipamento e da velocidade de rotação. O ultra-turrax e equipamentos afins não são tão eficientes, uma vez que não permitem obter uma distribuição de tamanho de gotícula homogênea, sendo que as partículas apresentam uma ampla faixa de tamanhos (ASUA, 2002; LÓPEZ et al., 2008)

O ultra-som, também chamado sonicador, gera ondas de ultra-som que causam oscilações das moléculas de fluido nas proximidades do local de propagação das ondas. O sistema é mantido agitado, garantindo que todo o fluido que passe na região de sonificação sofra a transferência de energia para que ocorra a quebra de todas as gotas de monômero, dessa forma, o tempo e a amplitude de sonicação influenciam significativamente o tamanho de gotas (ASUA, 2002). Tal efeito é explicado pela limitação da pequena região afetada pelas ondas de ultrassom, sendo necessário mais tempo para que todo o fluido passe pela região onde ocorre a quebra das gotas e o aumento da amplitude de onda aplicada promove maior quebra das gotas devido à maior quantidade de energia fornecida por unidade de volume. A técnica de sonicação é adequada ao ambiente laboratorial, para estudos de viabilidade cinética do processo de polimerização (EL-JABY et al., 2009)

O homogeneizador de alta pressão envolve a pressurização de dispersões por uma bomba com deslocamento positivo e o posterior fluxo através de uma abertura

estreita a altas velocidades. O processo gera elevados gradientes de velocidade e de tensão de cisalhamento, que promovem a dispersão fina da mistura. Quanto maior o número de ciclos, menor o tamanho das gotículas. Dessa forma, os tamanhos das partículas podem ser controlados ajustando a pressão e o número de ciclos no equipamento. O homogeneizador de alta pressão é o equipamento mais eficaz para emulsificação, enquanto o ultra-turrax é o menos eficiente (QUAN et al., 2011).

3.9.1.5 Iniciadores

Os iniciadores são moléculas que uma vez inseridas no sistema de miniemulsão induzem a formação de radicais, dando início a reação de polimerização. Os iniciadores utilizados no processo de polimerização em miniemulsão podem ser solúveis na fase aquosa (persulfato de sódio ou potássio) ou orgânica (2-2'-Azo-bis-isobutironitrila – AIBN; peróxido de laurila e peróxido de benzoíla). A reação de polimerização em que o iniciador é dissolvido na fase aquosa, os radicais formados entram nas gotas de monômero na miniemulsão, no caso do iniciador ser solúvel na fase orgânica, ele é dissolvido antes da preparação da miniemulsão e a reação é iniciada dentro das gotas submicrométricas (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; BECHTHOLD; LANDFESTER, 2000).

3.9.1.6 Polimerização em miniemulsões

A miniemulsão tem como característica permitir a obtenção de uma mistura estável, formada por gotículas contendo o monômero, suspensas em um meio heterogêneo, comportando-se como o *locus* primário da polimerização (ou um “nano reator”), ou seja, cada gota de monômero se transforma em uma partícula polimérica (GUO; ZETTERLUND, 2011).

As partículas poliméricas são formadas com a captura de radicais pelas micelas inchadas em monômero ou pela precipitação das cadeias em crescimento na fase aquosa. Esse mecanismo dá origem às fases do processo de polimerização que são: de nucleação, crescimento do polímero e redução da concentração de monômero. A nucleação é a primeira fase de polimerização, em que as partículas de polímero são formadas pela entrada de radicais livres na micela ou pela precipitação dos oligômeros

formados na fase aquosa. Com isso, há o esgotamento das micelas contendo os monômeros e, finalmente, quando as gotas de monômero se exaurem, a reação continua até o consumo completo do monômero existente nas partículas poliméricas (LENZI; LIMA; PINTO, 2004).

3.10 Referências

ABDEL-SALAM, O. M. E.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, n. 1–6, p. 105–127, 2001.

ABU-DAHAB, R.; KASABRI, V.; AFIFI, F. U. Evaluation of the volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) on breast cancer cell line models. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 2, p. 136–147, 2014.

AINSWORTH, M. A.; HOGAN, D.L.; KOSS, M.A.; ISENBERG, J.I. Cigarette smoking inhibits acid-stimulated duodenal mucosal bicarbonate secretion. **Annals of internal medicine**, v. 119, n. 9, p. 882–886, 1993.

AKHTAR, M. S.; MUNIR, M. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.27. n.1, p. 163-176

ALAVIJEH, M. S.; CHISHTY, M.; QAISER, M.Z.; PALMER, A.M. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, the Blood-Brain Barrier, and Central Nervous System Drug Discovery. **NeuroRx**, v. 2, n. 4, p. 554–571, 2005.

ALDOORI, W. H.; GIOVANNUCCI, E.L.; STAMPFER, M.J.; RIMM, E.B.; WING, A.L.; WILLETT, W.C. A prospective study of alcohol, smoking, caffeine, and the risk of duodenal ulcer in men. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 8, n. 4, p. 420–424, 1997.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 288, n. 1, p. C1–19, 2005.

AMIRSHAHROKHI, K.; KHALILI, A.-R. Gastroprotective effect of 2-mercaptoethane sulfonate against acute gastric mucosal damage induced by ethanol. **International immunopharmacology**, v. 34, p. 183–188, 2016.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 4, p. 689–757, 2002.

ASUA, J. M.; RODRIGUEZ, V.S.; C. A. SILEBI, C.A.; EL-AASSER, M.S. Miniemulsion copolymerization of styrene-methyl methacrylate: Effect of transport phenomena. **Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia**, v. 35-36, n. 1, p. 59–85, 1990.

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 7, p. 1283–1346, 2002.

AWAAD, A. S. MOHAMED, N.H.; MAITLAND, D.J.; SOLIMAN, G.A. Anti-ulcerogenic Activity of Extract and Some Isolated Flavonoids from *Desmostachia bipinnata* (L .) Stapf. **Record of natural products**, v. 3, p. 76–82, 2008.

- AYDIN, Y.; KUTLAY, O.; ARI, S.; DUMAN, S.; UZUNER, K.; AYDIN, S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. **Planta medica**, v. 73, n. 13, p. 1365–1371, 2007.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BAPTISTELLA, L. H. B. Preparação do (+)- α -terpineol a partir do (+)-limoneno.pdf. **Química nova**, v. 32, n. 4, p. 1069–1071, 2009.
- BARENHOLZ, Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012.
- BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **The American journal of medicine**, v. 123, n. 4, p. 358–66.e2, 2010.
- BAZYLIŃSKA, U. LEWIŃSKA, A.; LAMCH, L.; WILK, K.A. Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, p. 42–49, 2014.
- BECHTHOLD, N.; LANDFESTER, K. Kinetics of Miniemulsion Polymerization As Revealed by Calorimetry. **Macromolecules**, v. 33, n. 13, p. 4682–4689, 2000.
- BEN HSOUNA, A.; HAMDI, N.; MILADI, R.; ABDELKAFI, S. Myrtus communis essential oil: chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens. **Chemistry & biodiversity**, v. 11, n. 4, p. 571–580, 2014.
- BETTENCOURT, A.; ALMEIDA, A. J. Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 4, p. 353–367, 2012.
- BETTENCOURT, A.; ALMEIDA, A. J. Poly(Methyl Methacrylate) (PMMA): Drug Delivery Applications. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**, p. 6511–6525, 2015.
- BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on alpha-terpineol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11 SUPPL., p. 280–285, 2008.
- BHATTACHARYA, S.; BANERJEE, D.; BAURI, A.K.; CHATTOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.K. Healing property of the Piper betel phenol, allylpyrocatechol against indomethacin-induced stomach ulceration and mechanism of action. **World journal of gastroenterology**, v. 13, n. 27, p. 3705–3713, 2007.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2012.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

BLASER, M. J.; BERG, D. E. Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 7, p. 767–773, 2001.

BOLTIN, D. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Probiotics in Helicobacter pylori -induced peptic ulcer disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 99–109, 2016.

BOLTIN, D.; NIV, Y. Pharmacological and alimentary alteration of the gastric barrier. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 6, p. 981–994, 2014.

BROSEL, S.; SCHUBERT, H. Investigations on the role of surfactants in mechanical emulsification using a high-pressure homogenizer with an orifice valve. **Chemical Engineering and Processing**, v. 38, n. 4-6, p. 533–540, 1999.

CAPASSO, R.; PINTO, L.; VUOTTO, M.L.; DI CARLO, G. Preventive effect of eugenol on PAF and ethanol-induced gastric mucosal damage. **Fitoterapia**, v. 71 Suppl 1, p. S131–7, 2000.

CARNESECCHI, S.; SCHNEIDER, Y.; CERALINE, J.; DURANTON, B.; GOSSE, F.; SEILER, N.; RAUL F. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 298, n. 1, p. 197–200, 2001.

CARRETERO, C. Úlcera péptica Keywords : **Revista de la educación superior**, v. 12, n. 3, p. 111–117, 2016.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In: **Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 203–238.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.

CHAUHAN, R.; RUBY, K.; SHORI, A .; DWIVEDI, J. Solanum nigrum with dynamic therapeutic role: a review. **International journal of pharmaceutical sciences review and research**, v. 15, n. 1, p. 65–71, 2012.

CHEN, S.; ZHAO, X.; SUN, P.; QIAN, J.; SHI, Y.; WANG, R. Preventive effect of Gardenia jasminoides on HCl/ethanol induced gastric injury in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, , v. 133, p. 1–8, 2016.

CHENG, R.; FENG, F.; MENG, F.; DENG, C.; FEIJEN, J.; ZHONG, Z. Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and

gene delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 152, n. 1, p. 2–12, 2011.

COFFEY, R. J.; ROMANO, M.; GOLDENRING, J. Roles for transforming growth factor-alpha in the stomach. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 21 Suppl 1, p. S36–9, 1995.

CORLETO, V. D.; FESTA, S.; DI GIULIO, E.; ANNIBALE, B. Proton pump inhibitor therapy and potential long-term harm. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 21, n. 1, p. 3–8, 2014.

CORRY, D.; MORAN, J. Assessment of acrylic bone cement as a local delivery vehicle for the application of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 19, n. 14, p. 1295–1301, 1998.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 19, n. 2, p. 99–134, 2002.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 7, p. 1417–1450, 2006.

CRYER, B.; LEE, E.; FELDMAN, M. Factors influencing gastroduodenal mucosal prostaglandin concentrations: roles of smoking and aging. **Annals of internal medicine**, v. 116, n. 8, p. 636–640, 1992.

DA SILVA, M. T. B.; MARQUES, R.B.; BATISTA-LIMA, F.J.; SOARES, M.A.; DOS SANTOS, A.A.; MAGALHÃES, P.J.; OLIVEIRA, F.A.; ALMEIDA, F.R.A. alpha-Terpineol Induces Gastric Retention of Liquids by Inhibiting Vagal Parasympathetic Pathways in Rats. **Planta medica**, v. 82, p. 1329 – 1334, 2016.

DE OLIVEIRA, M. G. B., MARQUES, R.B.; SANTANA, M.F.; SANTOS, A.B.; BRITO, F.A.; BARRETO, E.O.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R.; BADAUÊ-PASSOS, D. JR.; ANTONIOLLI, A.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J alpha-terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 111, n. 2, p. 120–125, 2012.

DE SOUSA, D. P.; QUINTANS, L.; DE ALMEIDA, R. N. Evolution of the Anticonvulsant Activity of α -Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 1, p. 69–70, 2007.

DE SOUZA ALMEIDA, E. S.; FILHO, V.C.; NIERO, R.; CLASEN, B.K.; BALOGUN, S.O.; MARTINS, D.T.O. Pharmacological mechanisms underlying the anti-ulcer activity of methanol extract and canthin-6-one of *Simaba ferruginea* A. St-Hil. in animal models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 630–636, 2011.

DEGENHARDT, J.; KOLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1621–1637, 2009.

DINIZ, L. R. L.; VIEIRA, C.F.; SANTOS, E.C.; LIMA, G.C.; ARAGÃO, K.K.; VASCONCELOS, R.P.; ARAÚJO, P.C.; VASCONCELOS, Y.A.; OLIVEIRA, A.C. OLIVEIRA, H.D.; PORTELLA, V.G.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.

Gastroprotective effects of the essential oil of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. on gastric ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 694–700, 2013.

DJILANI, A.; DICKO, A. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. **Nutrition, Well-Being and Health**, p. 156–178, 2012.

EL-JABY, U.; FARZI, G.; BOURGEAT-LAMI, E.; CUNNINGHAM, M.; MCKENNA, T.F.L. Emulsification for Latex Production Using Static Mixers. **Macromolecular Symposia**, v. 281, n. 1, p. 77–84, 2009.

EMAMI, J. In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 9, n. 2, p. 169–189, 2006.

FLOHE, L. Glutathione peroxidase. **Basic life sciences**, v. 49, p. 663–668, 1988.

FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; BLANDIZZI, C. Pathophysiology of Gastric Ulcer Development and Healing: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Options, Peptic Ulcer Disease, Dr. Jianyuan Chai (Ed.), 2011.

FRANCO, E. S.; MÉLO, M. E. B.; JATOBÁ, B. J. A.; SANTANA, A. L. B. D.; SILVA, A. A. R.; SILVA, T. G.; NASCIMENTO, M. S.; MAIA, M. B. S. Study of the Gastroprotective Effect of Extracts and Semipurified Fractions of *Chresta martii* DC. and Identification of Its Principal Compounds. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2015.

GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience letters**, v. 322, n. 3, p. 145–148, 2002.

GALLUCCI, N.; OLIVA, M.; CAREZZANO, E.; ZYGADLO, J.; DEMO, M. Terpenes antimicrobial activity against slime producing and non-producing staphylococci. **Molecular Medicinal Chemistry**, v. 21, n. April, p. 132–136, 2010.

GAMUCCI, O.; BERTERO, A.; GAGLIARDI, M.C.; BARDI, G. Biomedical Nanoparticles: Overview of Their Surface Immune-Compatibility. **Coatings**, v. 4, n. 1, p. 139–159, 2014.

GAO, Y.; TANG, W.; GAO, H.; CHAN, E.; LAN, J.; ZHOU, S. Ganoderma lucidum polysaccharide fractions accelerate healing of acetic acid-induced ulcers in rats. **Journal of medicinal food**, v. 7, n. 4, p. 417–421, 2004.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 731–737, 2010.

GISBERT, J. P.; LEGIDO, J.; GARCÍA-SANZ, I.; PAJARES, J.M. Helicobacter pylori and perforated peptic ulcer prevalence of the infection and role of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 36, n. 2, p. 116–120, 2004.

GRASSMAN, J. Terpenoids as Plant Antioxidants. In: HORMONES, G. L. B. T.-V. & (Ed.). **Plant Hormones**. [s.l.] Academic Press, 2005. v. Volume 72p. 505–535.

GRAYSON, D. H. Monoterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 4, p. 385–419, 2000.

GUO, Y.; ZETTERLUND, P. B. Particle formation mechanism in radical polymerization in miniemulsion based on in situ surfactant formation without high energy homogenization. **Polymer**, v. 52, n. 19, p. 4199–4207, 2011.

HARBISON, S. P.; DEMPSEY, D. T. Peptic ulcer disease. **Current problems in surgery**, v. 42, n. 6, p. 346–454, 2005.

HEALEY, J. H.; SHANNON, F.; BOLAND, P.; DIRESTA, G.R. PMMA to stabilize bone and deliver antineoplastic and antiresorptive agents. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 415 Suppl, p. S263–75, 2003.

HILLS, B. A.; BUTLER, B. D.; LICHTENBERGER, L. M. Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach. **The American journal of physiology**, v. 244, n. 5, p. G561–8, 1983.

HOLZER, P. Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: blood flow regulation and tissue protection. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 125, n. 0, p. 70–75, 2006.

HUANG, T.-C.; LEE, C.-L. Diagnosis, treatment, and outcome in patients with bleeding peptic ulcers and Helicobacter pylori infections. **BioMed research international**, v. 2014, p. 658108, 2014.

IRELAND, B. F.; HIBBERT, D.B.; GOLDSACK, R.J.; DORAN, J.C.; BROPHY, J.J. Chemical variation in the leaf essential oil of Melaleuca quinquenervia (Cav.) S.T. Blake. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 5, p. 457–470, 2002.

ISHIHARA, T.; SUEMASU, S.; ASANO, T.; TANAKA, K.; MIZUSHIMA, T. Stimulation of gastric ulcer healing by heat shock protein 70. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 7, p. 728–736, 2011.

JI, W.; FENG, C.-L. Glutathione-responsive C2-symmetric benzene-based co-assembly hydrogels. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 213, p. e19–20, 2015.

JOHNSON, B. A.; KREUTER, J.; ZOGRAFI, G. Effects of surfactants and polymers on advancing and receding contact angles. **Colloids and Surfaces**, v. 17, n. 4, p. 325–342, 1986.

- JONES, M. K.; TOMIKAWA, M.; MOHAJER, B.; TARNAWSKI, A.S. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 4, p. D303–9, 1999a.
- JONES, M. K.; ITANI, R.M.; WANG, H.; TOMIKAWA, .M; SARFEH, I.J.; SZABO, S.; TARNAWSKI, A.S. Activation of VEGF and Ras genes in gastric mucosa during angiogenic response to ethanol injury. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 6 Pt 1, p. G1345–55, 1999b.
- JUERGENS, U. R. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. **Drug research**, v. 64, n. 12, p. 638–646, 2014.
- KANGWAN, N.; PARK, J.M.; KIM, E.H.; HAHM, K.B. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 5, n. 1, p. 40–47, 2014.
- KEMP, W. J.; BASHIR, A.; DABABNEH, H.; COHEN-GADOL, A.A. Cushing's ulcer: Further reflections. **Asian Journal of Neurosurgery**, v. 10, n. 2, p. 87–94, 2015.
- KIRKMAN, H. N., ROLFO, M.; FERRARIS, A.M.; GAETANI, G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 20, p. 13908–13914, 1999.
- KLOPELL, F. C.; LEMOS, M.; SOUSA, J.P.; COMUNELLO, E.; MAISTRO, E.L.; BASTOS, J.K. DE ANDRADE, S.F. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 62, n. 7-8, p. 537–542, 2007.
- KONTUREK, S. J.; ROBERT, A. Cytoprotection of canine gastric mucosa by prostacyclin: possible mediation by increased mucosal blood flow. **Digestion**, v. 25, n. 3, p. 155–163, 1982.
- KREUTER, J.; SPEISER, P. P. In Vitro Studies of Poly(methyl Methacrylate) Adjuvants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 11, p. 1624–1627, nov. 1976.
- KURATA, J. H.; NOGAWA, A. N. Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Helicobacter pylori*, and smoking. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 2–17, 1997.
- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 53, n. 1, p. 39–50, 2002.
- LAINÉ, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41–60, jul. 2008.
- LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, n. Suppl 2, p. S4–S4, 17 2008.

LANDFESTER, K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. **Annual Review of Materials Research**, v. 36, n. 1, p. 231–279, 2006.

LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MAILÄNDER, V. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 493–515, 2010.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 307–321, 1998.

LEE, E. B., KIM, O.J.; KANG, S.S.; JEONG, C. Araloside A, an antiulcer constituent from the root bark of *Aralia elata*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 3, p. 523–526, 2005.

LEE, P. I.; LI, J.-X. Evolution of Oral Controlled Release Dosage Forms. In: **Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 21–31.

LEI, D.; CHAN, C.P.; WANG, Y.J.; WANG, T.M.; LIN, B.R.; HUANG, C.H.; LEE, J.J.; CHEN, H.M.; JENG, J.H.; CHANG, M.C. Antioxidative and antiplatelet effects of aqueous inflorescence Piper betle extract. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 7, p. 2083–2088, 2003.

LENZI, M. K.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Modelagem da polimerização simultânea de estireno em suspensão e emulsão. **Polímeros**, v. 14, p. 112–121, 2004.

LEVENSTEIN, S. Stress and peptic ulcer: life beyond Helicobacter. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 316, n. 7130, p. 538–541, 1998.

LIBROWSKI, T. Analgesic and anti-inflammatory activity of stereoisomers of carane derivatives in rodent test. **Pharmacological reports : PR**, v. 57, n. 6, p. 802–810, 2005.

LICHTENBERGER, L. M. Gastroduodenal mucosal defense. **Current opinion in gastroenterology**, v. 15, n. 6, p. 463–472, 1999.

LINARES-PALOMINO, P. J.; SALIDO, S.; ALTAREJOS, J.; NOGUERAS, M.; SÁNCHEZ, A. Reactivity of the Monoterpenoid Nerol with p-Toluenesulfonic and Chlorosulfonic Acids: Selective Syntheses of alpha-Terpineol and alpha-Cyclogeraniol. An Activity for the Undergraduate Organic Lab. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 7, p. 1052, 2006.

LOBO, P. L. D.; FONTELES, C.S.; MARQUES, L.A.; JAMACARU, F.V.; FONSECA, S.G.; DE CARVALHO, C.B.; DE MORAES, M.E. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: a randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 21, n. 8-9, p. 1043–1047, 2014.

LÓPEZ, A.; CHEMTOB, A.; MILTON, J. L.; MANEA, M.; PAULIS, M.; BARANDIARAN, M. J.; THEISINGER, S.; LANDFESTER, K.; HERGETH, W. D.; UDAGAMA, R.; MCKENNA, T.; SIMAL, F.; ASUA, J. M. Miniemulsification of Monomer-Resin Hybrid Systems. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 16, p. 6289–6297, 2008.

MAJUMDAR, A. P.; GOLDENRING, J. R. Localization and significance of pp55, a gastric mucosal membrane protein with tyrosine kinase activity. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 5 Pt 1, p. G863–70, 1998.

MALAIRAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI, K.J. Evaluation of anti-ulcer activity of *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thwaites in experimental animals. **Indian journal of pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 126–128, 2008.

MALFERTHEINER, P., MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C.; BAZZOLI, F.; EL-OMAR, E.; GRAHAM, D.; HUNT, R.; ROKKAS, T.; VAKIL, N.; KUIPERS, E.J. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. **Gut**, v. 56, n. 6, p. 772–781, 2007.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Lancet (London, England)**, v. 374, n. 9699, p. 1449–1461, 2009.

MALTZMAN, T. H.; HURT, L.M.; ELSON, C.E.; TANNER, M.A.; GOULD, M.N. The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 4, p. 781–783, 1989.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586, 2005.

MCGREEVY, J. M.; MOODY, F. G. Protection of gastric mucosa against aspirin-induced erosions by enhanced blood flow. **Surgical forum**, v. 28, p. 357–359, 1977.

MCLAREN, A. C.; MCLAREN, S. G.; SMELTZER, M. Xylitol and glycine fillers increase permeability of PMMA to enhance elution of daptomycin. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 451, p. 25–28, 2006.

MILLER, C. M.; BLYTHE, P. J.; SUDOL, E. D.; SILEBI, C. A.; EL-AASSER, M. S. Effect of the presence of polymer in miniemulsion droplets on the kinetics of polymerization. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2365–2376, 1994.

MILLER, M. J.; MACNAUGHTON, W.K.; ZHANG, X.J.; THOMPSON, J.H.; CHARBONNET, R.M.; BOBROWSKI, P.; LAO, J.; TRENTACOSTI, A.M.; SANDOVAL, M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine *sangre de grado*. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, n. 1, p. G192–200, 2000.

- MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 49, n. 4, p. 441–446, 2000.
- MORIMOTO, R. I.; SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. **Nature biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 833–838, 1998.
- NAGANO, Y.; MATSUI, H.; SHIMOKAWA, O.; HIRAYAMA, A.; TAMURA, M.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; RAI, K.; INDO, H.P.; MAJIMA, H.J.; HYODO, I. Rebamipide attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induced lipid peroxidation by the manganese superoxide dismutase (MnSOD) overexpression in gastrointestinal epithelial cells. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 63, n. 2, p. 137–142, 2012.
- NAKAGIRI, A.; SUNAMOTO, M.; TAKEUCHI, K.; MURAKAMI, M. Evidence for the involvement of NADPH oxidase in ischemia/reperfusion-induced gastric damage via angiotensin II. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 61, n. 2, p. 171–179, 2010.
- NAPOLITANO, L. Refrac tor y Peptic Ulcer Disease. **Gastroenterology Clinics of NA**, v. 38, n. 2, p. 267–288, 2009.
- NEJADKEY, F.; NAHAVANDI, A.; DEHPOUR, A.R.; MANI, A.R. Role of nitric oxide in the gastro-protective effect of lithium. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP**, v. 13, n. 2, p. 85–89, 2006.
- NEWTON, J. L.; ALLEN, A.; WESTLEY, B.R.; MAY, F.E. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. **Gut**, v. 46, n. 3, p. 312–320, 2000.
- ODEH, F.; AL-JABER, H.; KHATER, D. Nanoflora — How Nanotechnology Enhanced the Use of Active Phytochemicals. **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**, 2014.
- OKADA, H. Depot Injectable Microcapsules of Leuprorelin Acetate (Lupron Depot). In: **Biodrug Delivery Systems**. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. [s.l.] CRC Press, 2009. p. 370–383.
- OLIVEIRA, F.; ANDRADE, L.N.; DE SOUSA, E.B.; DE SOUSA, D.P. Anti-Ulcer Activity of Essential Oil Constituents. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5717–5747, 2014.
- OLIVEIRA, I. S.; DA SILVA, F.V.; VIANA, A.F.; DOS SANTOS, M.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; MARTINS, M.D.O.C.; NUNES, P.H.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R. C. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 9, p. 899–908, 2012.
- OPPONG, P.; ATHERTON, J. Helicobacter pylori infection and peptic ulcers. **Medicine**, v. 43, n. 4, p. 215–222, 2015.

OYAKE, J.; OTAKA, M.; MATSUHASHI, T.; JIN, M.; ODASHIMA, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; HORIKAWA, Y.; OHBA, R.; HATAKEYAMA, N.; ITOH, H.; WATANABE, S. Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. **Life sciences**, v. 79, n. 3, p. 300–305, 2006.

PAHWA, R.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Clinical Manifestations , Causes and Management Strategies of Peptic Ulcer Disease. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 2, p. 99–106, 2010.

PANDEY, G.; MADHURI, S. Review Article PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF OCIMUM SANCTUM (TULSI): A REVIEW. **International journal of pharmaceutical sciences review and research**, v. 5, n. 1, p. 61–66, 2010.

PARK, K. Lessons learned from thermosensitive liposomes for improved chemotherapy. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 174, p. 219, jan. 2014a.

PARK, K. Translation from mouse to human: time to think in new boxes. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 189, p. 187, 2014b.

PARK, S.N.; LIM, Y.K.; FREIRE, M.O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J.K. Antimicrobial effect of linalool and alpha-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 369–372, 2012.

PARVARDEH, S.; MOGHIMI, M.; ESLAMI, P.; MASOUDI, A. alpha-Terpineol attenuates morphine-induced physical dependence and tolerance in mice: role of nitric oxide. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 19, n. 2, p. 201–208, 2016.

PERERA, L.M.S.; ESCOBAR, A.; SOUCCAR, C.; REMIGIO, M.A.; MANCEBO, B. Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug : Chemical composition of active extract. **Journal of pharmacognosy and phytotherapy**, v. 2, n. June, p. 56–63, 2010.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K.S.; GOMES, M.D.; LIMA, F.C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.; CECCATTO, V.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LEAL-CARDOSO, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341–350, 2010.

PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; OLIVEIRA, P.; COELHO, J.; CAVALEIRO, C. SALGUEIRO, L. Activity of *Thymus caespitius* essential oil and α -terpineol against yeasts and filamentous fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 107–112, 2014.

QUAN, P.; XIA, D.; PIAO, H.; PIAO, H.; SHI, K.; JIA, Y.; CUI, F. Nitrendipine Nanocrystals: Its Preparation, Characterization, and In Vitro–In Vivo Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1136–1143, 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; MOREIRA, J.C. F.; PASQUALI, M.A.B.; RABIE, S.M.S.; PIRES, A.S.; SCHRÖDER, R.; RABELO, T.K.; SANTOS, J.P.A.; LIMA, P.S.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARAÚJO, A.A.S.; QUINTANS, J.S.S.; GELAIN, D.P. Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. **ISRN Toxicology**, v. 2013, p. 459-530, 2013.

RAHIMI-NASRABADI, M.; POURMORTAZAVI, S.M.; NAZARIAN, S.; AHMADI, F.; BATOOLI, H. Chemical Composition, Antioxidant, and Antibacterial Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Eucalyptus largiflorens* F. Muell. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 2, p. 369–381, 2013.

RAMTOOLA, Z.; LYONS, P.; KEOHANE, .K; KERRIGAN, S.W.; KIRBY, B.P.; KELLY, J.G. Investigation of the interaction of biodegradable micro- and nanoparticulate drug delivery systems with platelets. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 26–32, 2011.

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

RELAN, N. K.; FLIGIEL, S.E.; DUTTA, S.; TUREAUD, J.; CHAUHAN, D.P.; MAJUMDAR, A.P. Induction of EGF-receptor tyrosine kinase during early reparative phase of gastric mucosa and effects of aging. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 73, n. 5, p. 717–726, 1995.

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, n. 5, p. 523–534, 2002.

REZENDE, J. M. DE. 21 - Úlcera Péptica E a Ilusão Do Conhecimento. 2009.

RIBEIRO, A. R. S.; DINIZ, P.B.; PINHEIRO, M.S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.; 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.

ROZZA, A. L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M.O.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; PELLIZZON, C.H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (*Rutaceae*) essential oil and its majority compounds limonene and beta-pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin. **Chemico-biological interactions**, v. 189, n. 1-2, p. 82–89, 2011.

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, n. 2, p. 272–278, 2013.

SABINO, C. K. B.; FERREIRA-FILHO, E.S.; BEZERRA MENDES, M.B.; SILVA-FILHO, J.C.; PONTE, M.P.T.R.; MOURA, L.H.P.; OLIVEIRA, E.C.A.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; SANTOS, M.R.V.; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, A.P.

Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 333–339, 2013.

SCHADE, V. L.; ROUKIS, T. S. The role of polymethylmethacrylate antibiotic-loaded cement in addition to debridement for the treatment of soft tissue and osseous infections of the foot and ankle. **The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons**, v. 49, n. 1, p. 55–62, 2010.

SCHMIDT, C. et al. Nano- and microscaled particles for drug targeting to inflamed intestinal mucosa: a first in vivo study in human patients. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 165, n. 2, p. 139–145, 2013.

SEALY, P. I. et al. Delivery of antifungal agents using bioactive and nonbioactive bone cements. **The Annals of pharmacotherapy**, v. 43, n. 10, p. 1606–1615, 2009.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SHIOTANI, A.; GRAHAM, D. Y. Pathogenesis and therapy of gastric and duodenal ulcer disease. **The Medical clinics of North America**, v. 86, n. 6, p. 1447–66, viii, 2002.

SILVA, F. V, GUIMARÃES, A.G.; SILVA, E.R.; SOUSA-NETO, B.P.; MACHADO, F.D.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARCANJO, D.D.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R.C. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 11, p. 984–991, 2012.

SINGH, S.; KHAJURIA, A.; TANEJA, S.C.; KHAJURIA, R.K.; SINGH, J.; JOHRI, R.K.; QAZI, G.N. The gastric ulcer protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*, in rats. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 15, n. 6-7, p. 408–415, 2008.

SIQUEIRA, B. P. J.; MENEZES, C.T.; SILVA, J.P.; SOUSA, D.P.; BATISTA, J.S. Antiulcer effect of epoxy-carvone. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 144–149, 2011.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1–2, p. 1–20, 29 2001.

SOSTRES, C.; LANAS, A. Epidemiology and Demographics of Upper Gastrointestinal Bleeding: Prevalence, Incidence, and Mortality. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 21, n. 4, p. 567–581, 2011.

SOUZA, R.; CARDOSO, M.; MENEZES, C.; SILVA, J.; DE SOUSA, D.; BATISTA, J. Gastroprotective activity of alpha-terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. **Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 277–281, 2011.

SUNG, J. J. Y.; KUIPERS, E. J.; EL-SERAG, H. B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 29, n. 9, p. 938–946, 2009.

SURG, C. P. Peptic Ulcer Disease. v. 11, n. June, p. 346–454, 2005.

SURI, S. S.; FENNIRI, H.; SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **J Occup Med Toxicol.**, v. 2, p. 16, 2007.

SVANES, C.; SOREIDE, J.; SKARSTEIN, A.; FEVANG, B.; BAKKE, P.; VOLLSET, S.; SVANES, K.; SOREIDE, O. Smoking and ulcer perforation. **Gut**, v. 41, n. 2, p. 177–180, 1997.

SYAM, A. F.; SADIKIN, M.; WANANDI, S.I.; RANI, A.A. Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer. **Acta medica Indonesiana**, v. 41, n. 2, p. 95–98, 2009.

TANAKA, K.I. TSUTSUMI, S.; ARAI, Y.; HOSHINO, T.; SUZUKI, K.; TAKAKI, E.; ITO, T.; TAKEUCHI, K.; NAKAI, A.; MIZUSHIMA, T. Genetic evidence for a protective role of heat shock factor 1 against irritant-induced gastric lesions. **Molecular pharmacology**, v. 71, n. 4, p. 985–993, 2007.

TARNAWSKI, A.; SZABO, I.L.; HUSAIN, S.S.; SOREGHAN, B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. **Journal of physiology, Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 337–344, 2001.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive diseases and sciences**, v. 50 Suppl 1, p. S24–33, 2005.

TEYSSEN, S.; GONZÁLEZ-CALERO, G.; SCHIMICZEK, M.; SINGER, M.V. Maleic acid and succinic acid in fermented alcoholic beverages are the stimulants of gastric acid secretion. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 5, p. 707–713, 1999.

THIRUNAVUKKARASU, P.; RAMKUMAR, L.; RAMANATHAN, T. Anti-ulcer Activity of Excoecaria agallocha bark on NSAID-induced Gastric Ulcer in Albino Rats. **Global journal of pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 123–126, 2009.

TIELLEMAN, T.; BUJANDA, D. Epidemiology and Risk Factors for Upper Gastrointestinal Bleeding. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of NA**, v. 25, n. 3, p. 415–428, 2015.

TOBIN, T.; SWERCZEK, T. W.; BLAKE, J. W. Pine oil toxicity in the horse: drug detection, residues and pathological changes. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 291–301, 1976.

TONETO, M. G.; OLIVEIRA, F. J. M.; LOPES, M. H. I. Evolução histórica da úlcera péptica: Da etiologia ao tratamento. **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 23–30, 2011.

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, n. 1, p. 1–9, 2001.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 5, p. 1025–1058, 2009.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512–520, 2000.

WANG, H. M.; CRANK, S.; OLIVER, G.; GALASKO, C.S. The effect of methotrexate-loaded bone cement on local destruction by the VX2 tumour. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 78, n. 1, p. 14–17, 1996.

WEGENER, M.; SCHAFFSTEIN, J.; DILGER, U.; COENEN, C.; WEDMANN, B.; SCHMIDT, G. Gastrointestinal transit of solid-liquid meal in chronic alcoholics. **Digestive diseases and sciences**, v. 36, n. 7, p. 917–923, 1991.

WEISS, B. D.; WEISS, E.C.; HAGGARD, W.O.; EVANS, R.P.; MCLAREN, S.G.; SMELTZER, M.S. Optimized elution of daptomycin from polymethylmethacrylate beads. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 264–266, 2009.

WHITTLE, B. J. Mechanisms underlying gastric mucosal damage induced by indomethacin and bile-salts, and the actions of prostaglandins. **British journal of pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 455–460, 1977.

YAMAHARA, J.; KIMURA, H.; KOBAYASHI, M.; OKAMOTO, T.; SAWADA, T.; FUJIMURA, H.; CHISAKA, T. Cholagogic action and characteristics of (+/-)-alpha-terpineol-beta-D-O-glucopyranoside, a new monoterpenoid glucoside. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 4, p. 1669–1675, 1985.

YAO, S.-S.; GUO, W.F.; LU, Y.; JIANG, Y.X. Flavor characteristics of lapsang souchong and smoked lapsang souchong, a special Chinese black tea with pine smoking process. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8688–8693, 2005.

YUN, Y. H.; LEE, B. K.; PARK, K. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 2–7, 2015.

ZHANG, Y.; ZHU, S.; YIN, L.; QIAN, F.; TANG, C.; YIN, C. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 6, p. 1654–1661, 2008.

4 Capítulo II: Investigação da atividade gastroprotetora e cicatrizante do α -terpineol em modelos de lesão gástrica aguda e crônica em roedores

Este capítulo abordará os resultados a serem apresentados neste Exame de Tese na forma de artigo submetido ao periódico internacional European Journal of Pharmaceutical Sciences em Maio de 2016 (Fator de impacto 3.881; Qualis A2 em Biotecnologia)

Investigação da atividade gastroprotetora e cicatrizante do α -terpineol em modelos de lesão gástrica aguda e crônica em roedores

Helio B. Fernandes¹, Rosemarie Brandim Marques², Irisdalva S. Oliveira¹, Francilene V. da Silva¹, Ana Flavia S. C. Viana^{3,4}, Kamila, L. de Lira⁴, Jand Venes Rolim Medeiros⁵, Luan Kelves Miranda de Souza⁶, Francisca Beatriz de Melo Sousa⁶ Rita de Cássia M. Oliveira^{1,4,5*}

¹*Programa de pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Ponto focal – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI;*

²*Faculdade de medicina, Universidade Estadual do Piauí, Teresina-PI;*

³*Programa de pós-graduação em farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE;*

⁴*Núcleo de pesquisa em plantas medicinais, Centro de ciências da saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI;*

⁵*Programa de pós-graduação em farmacologia, Centro de Ciências da saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI;*

⁶*Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba-PI.*

*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 teve como objetivo estudar os mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção do α -terpineol, um monoterpene encontrado em plantas medicinais como *Ravensara aromática* Sonn., *Croton sonderianus* Muell Arg., *Eucalyptus globulus* Labill. O estudo foi realizado através de modelos de lesões agudas por etanol absoluto, etanol acidificado, isquemia-reperfusão, ligadura de piloro e modelo crônico de úlcera por ácido acético com avaliação de parâmetros de toxicidade subcrônica neste protocolo. A análise estatística foi realizada através de ANOVA “one way” e os dados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$. Lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto, etanol acidificado, em camundongos, e isquemia-reperfusão em ratos foram reduzidas pela administração de α -terpineol. Em modelos de lesão por etanol absoluto, o seu efeito protetor gástrico foi inibido pela administração de N ω -nitro-L-arginine methyl Ester (L-NAME) e N-etilmaleimida (NEM), inibidores da NO-sintase e grupos sulfidrilicos endógenos, respectivamente, mas não pela administração de glibenclamida, um bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). O α -terpineol exibiu atividades antioxidante, por elevar o teor de grupos sulfidrilas não protéicos, aumentar a atividade da catalase e diminuir os níveis de malondialdeído (MDA), e anti-inflamatória por diminuir a atividade da mieloperoxidase (MPO) em mucosa gástrica lesada por etanol absoluto em camundongos; aumentou, ainda, a produção de muco gástrico em ratos submetidos a ligadura de piloro e reduziu as lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratos sem aparecimento de indícios de toxicidade subcrônica. Esses dados sugerem que o efeito antiúlcera do α -terpineol envolve mecanismos gastroprotetores como atividade antioxidante, anti-inflamatória, produção de muco gástrico e cicatrizante.

Palavras-chave: α -terpineol. Gastroproteção. Etanol. ácido acético. Antioxidante. GSH. Óxido nítrico. Cicatrização gástrica.

Abstract

This Article had as objective to study the mechanisms of action involved in gastroprotection of α -terpineol, a monoterpene present in medicinal plants as *Ravensara aromatic Sonn.*, *Croton sonderianus Muell Arg.*, *Eucalyptus globulus Labill.* The study was performed by means of models of acute lesions by absolute ethanol, ethanol acidified, ischemia-reperfusion, ligation of the pylorus and chronic ulcer model by acetic acid with assessment of parameters of toxicity subchronic in this Protocol. The Statistical analysis was performed using ANOVA "one way" and the data were considered significant at $p < 0.05$. acute gastric lesions induced by absolute ethanol, acidified ethanol in mice, and ischemia-reperfusion in rats were reduced by the administration of α -terpineol. In models of absolute ethanol injury, their gastric protective effect was inhibited by administration of N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and N-ethylmaleimide (NEM), NO synthase inhibitors and endogenous sulfhydryl group, respectively, but not by the administration of glibenclamide a blocker sensitive potassium channel ATP (KATP). Furthermore, the production of gastric mucus in rats with pylorus ligation and reduced gastric lesions induced by acetic acid in mice without appearance of subchronic toxicity evidence. These data suggest that the antiulcer effect of α -terpineol involves gastroprotectores mechanisms such as antioxidant, anti-inflammatory, wound healing and production of gastric mucus.

Keywords: α -terpineol. Gastroprotection. Ethanol. Acetic acid. Antioxidant. GSH. Nitric oxide. Gastric healing.

4.1 Introdução

Úlcera gástrica é uma doença crônica definida como uma lesão degenerativa e necrótica, caracterizada por repetidos episódios de cicatrização e reincidência com complicações inesperadas como sangramento, estenose e perfuração (HUANG; LEE, 2014). É também a disordem mais comum do trato digestivo superior, apresentando uma prevalência de 10 % da população mundial e uma incidência anual na faixa de 0,1 a 0,19% (SOSTRES; LANAS, 2011; SUNG; KUIPERS; EL-SERAG, 2009).

Lesões gástricas desenvolvem-se via processos complexos e multifatoriais, resultado do desequilíbrio entre os mecanismos de defesa da mucosa gástrica (prostaglandinas, óxido nítrico, moléculas e enzimas antioxidantes, secreção de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo gástrico normal, entre outros) e os agentes agressores (secreção ácida gástrica, pepsina, leucotrienos, agentes oxidantes, infecção por *Helicobacter pylori*, etanol, anti-inflamatórios não esteróides, entre outros) (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009; PAHWA; KUMAR; KOHLI, 2010)

Habitualmente são utilizados para o tratamento de úlceras gástricas antagonistas do receptor H_2 e inibidores da bomba de prótons. Entretanto, apesar da eficácia destas terapias, seus efeitos colaterais/adversos (como hipersensibilidade, arritmias, ginecomastia e alterações hematopoéticas) frequentemente são inevitáveis e limitam sua utilidade clínica, somado ao fato do aparecimento de úlceras recorrentes em alguns pacientes sob estes tratamentos (XIAO et al., 2013). Sob este escopo, a busca por alternativas terapêuticas tem sido impulsionada, principalmente pela pesquisa em produtos naturais (RIBEIRO et al., 2016).

Os óleos essenciais são uma mistura de compostos naturais, voláteis, produzidos como metabólitos secundários de plantas aromáticas. Mais de 90% dos óleos essenciais de plantas medicinais são compostos por monoterpenos, compostos voláteis dos mais variados aromas, sabores e estruturas químicas, que vêm sendo extensamente estudados pela riqueza de seu potencial terapêutico (BAKKALI et al., 2008; PATRICK-IWUANYANWU et al., 2012).

O α -terpineol, um monoterpeno encontrado na composição do óleo essencial de espécies como *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (IRELAND et al., 2002), *Myrtus communis* L. (BEN HSOUNA, et al, 2014) e *Laurus nobilis* L. (ABU-DAHAB; KASABRI; AFIFI, 2014). Estudos relatam várias atividades farmacológicas como anticonvulsivante (DE SOUSA; QUINTANS; DE ALMEIDA, 2007), antinociceptiva

(DE OLIVEIRA et al., 2012; GUIMARAES; QUINTANS; QUINTANS, 2013; QUINTANS-JUNIOR et al., 2011; PARVARDEH et al., 2016), anti-inflamatória (HELD; SCHIEBERLE; SOMOZA, 2007), vasorrelaxante (MAGALHAES et al., 2008), hipotensora (SABINO et al., 2013), antimicrobiana (PARK et al., 2012), antifúngica (PINTO et al., 2014), antiproliferativa (BICAS et al., 2011; HASSAN et al., 2010) e relaxante muscular gástrica (DA SILVA et al., 2016).

Em estudos de atividade antiúlcera, Souza e colaboradores (2011) reportam atividade protetora gástrica do α -terpineol em modelos de lesão por etanol absoluto, e tal efeito, provavelmente, não envolve a participação de prostaglandinas ou mecanismos antissecretores gástricos.

Considerando quão diversos são os mecanismos de proteção gástrica e quão complexo é o seu controle e regulação, o estudo da potencial atividade gastroprotetora do α -terpineol deve ser continuado. Sob esta perspectiva, este trabalho teve como objetivo estudar os possíveis mecanismos de ação do α -terpineol em sua atividade gastroprotetora em modelos agudos e crônicos de lesão gástrica em roedores.

4.2 Metodologia

4.2.1 Fármacos e reagentes

Carbenoxolona, α -terpineol, N-acetilcisteína (NAC), N ω -nitro-L-arginina metil Ester (L-NAME), N-Etil-maleimida (NEM), Cimetidina, Glibenclamida, diazóxido, L-arginina, 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), dicloridrato de o-dianisidina, brometo de hexadecil trimetil amônio, n-butanol, ácido tiobarbitúrico, acetato de sódio e tween 80 foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); etanol, ácido clorídrico (HCl), ácido tricloroacético, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de potássio (KCl), Ácido fosfórico (H₃PO₄), sacarose, cloreto de magnésio, éter dietílico, ácido acético foram comprados de ISOFAR (Duque de Caxias, RJ, BRA); azul de alcian, pela VETEC (Duque de Caxias, RJ, BRA); cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, de Syntec (Hortolandia, SP, BRA), tiopental de sódio (CRISTÁLIA, BRA); e reagentes para alanina trasaminase, aspartame transaminase, creatinina, fosfatase alcalina, glicose e creatinina foram adquiridos da Labtest (Lagoa Santa, MG, BRA). Glibenclamida e diazóxido foram diluídos em solução de NaOH 0,01 N e α -terpineol foi diluído em solução de tween 80 a 3% (solução veículo). O volume das soluções administradas aos animais foi de 10 mL/kg.

4.2.2 Animais

Camundongos Swiss (25-30 g) machos e fêmeas 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*. Previamente a cada experimento, foram mantidos em jejum por 18 h e em seguida, aclimatados ao ambiente de teste por 2 h. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos (n=6-7). No modelo de lesões gástricas induzidas por ácido acético ou isquemia-reperfusão, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de cetamina com cloridrato de xilazina (50 e 5 mg/kg, i.m., respectivamente). Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados pela administração de tiopental de sódio (100 mg/kg, i.p.). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil (CEEA, número 008/12).

4.2.3 Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado em camundongos

Solução veículo ou α -terpineol (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg – controle positivo no estudo de atividade gastroprotetora) ou N-acetilcisteína (200 mg/kg – controle positivo na avaliação da atividade antioxidante) foram administrados oralmente (n=6/grupo) e após 60 minutos, lesões gástricas foram induzidas pela administração oral de 0,2 mL/animal de etanol absoluto (ROBERT et al., 1979) ou etanol acidificado (60%/HCl 0,3M) (MIZUI; SHIMONO; DOTEUCHI, 1987). Os camundongos foram eutanasiados 30 minutos após a administração de etanol ou 60 minutos após a administração de etanol acidificado, e os estômagos foram removidos e abertos ao longo da curvatura maior. O contorno das lesões no corpo do estômago foi traçado em película transparente através de um marcador de ponta de feltro (IWATA et al., 1997). As áreas totais das lesões foram medidas usando um programa de planimetria computadorizada (ImageJ-NIH[®]) e expressos em termos de porcentagem de área de lesão (BHARGAVA; GUPTA; TANGRI, 1973). 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) (ROBERT et al., 1979). Após a mensuração da área de lesão, foram preparados homogenados com os estômagos de camundongos submetidos ao protocolo de lesão gástrica por etanol absoluto para o estudo da atividade antioxidante.

4.2.4 Avaliação dos mecanismos antioxidantes

4.2.4.1 Mensuração da concentração de grupos sulfidrilas não protéicos na mucosa gástrica

A concentração de grupos sulfidrilas não protéicos (SH-NP) nos tecidos gástricos foi estimada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Resumidamente, 50-100 mg de tecido gástrico foi homogeneizado em 1 mL de EDTA 0,02 M para cada 100 mg de tecido. Aliquotas (400 μ L) do homogenato foram misturados com 320 μ L de água destilada e 80 μ L de ácido tricloroacético 50% (m/v), para precipitar as proteínas. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm 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 em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em microgramas de GSH por grama de tecido (μg de GSH/g de tecido).

4.2.4.2 Atividade da Catalase

Os estômagos foram pesados e homogeneizados numa solução tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 7,4) e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Uma solução de peróxido de hidrogênio (0,059 M) foi preparada com a solução tampão e utilizada como substrato para o ensaio. Em 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 catalase foi medida pelo decaimento do peróxido de hidrogênio no comprimento de onda de 240 nm por espectrofotometria durante 6 minutos, através da leitura da variação de absorbância entre o primeiro e o sexto minuto. Os resultados foram expressos em millimolar por minuto por 100 mg de tecido ($\text{mM}/\text{min}/100 \text{ g}$ e tecido) (BEERS; SIZER, 1952).

4.2.4.3 Atividade da mieloperoxidase

A extensão do acúmulo de neutrófilos na mucosa gástrica foi medida por avaliação de atividade de mieloperoxidase (MPO) (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 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 hexadecil trimetil amônio 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 ressuspenso foi testada através da medição da alteração da absorbância a 450 nm, utilizando dicloridrato de o-dianisidina e peróxido de hidrogênio a 1%. Os resultados foram relatados como unidades (U) de MPO/mg de tecido. Uma unidade de atividade de MPO é definida como a conversão de 1 μmol de H_2O_2 à água em 1 min a 22 ° C.

4.2.4.4 Determinação dos níveis de malondialdeído

O nível de malondialdeído (MDA) em homogenatos a partir de cada grupo foi determinado por sua reação com ácido tiobarbitúrico. Tecido da mucosa gástrica

pesando entre 100 e 150 mg, foram homogeneizadas em solução fria de KCl (1,15%). Então, 250 μ L deste homogenado foi adicionado a 1,5 mL de de ácido fosfórico H_3PO_4 a 1% e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,6%, e então submetida a agitação e aquecimento em banho de água fervente durante 45 min. Em seguida, a mistura foi imediatamente resfriada em banho de água gelada, seguido pela adição de 4 mL de n-butanol, sob agitação durante 1 minuto. A camada de butanol foi separada por centrifugação a 1200 g durante 10 minutos. A absorbância foi determinada a 535 e 520 nm, e calculou-se a diferença de absorbância 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) (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

4.2.5 Participação da via do óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e grupos sulfidrilícos na gastroproteção do α -terpineol

Utilizou-se de camundongos no estudo das vias do óxido nítrico e K_{ATP} e ratos para a via dos grupos sulfidrilícos. Primeiramente, um grupo de animais (n=6/grupo) foi tratado com solução veículo ou α -terpineol (12,5 mg/kg) ou N-acetilcisteína (200 mg/kg) por via oral; L-arginina (600 mg/kg) ou diazóxido (3mg/kg) por via intraperitoneal. Um segundo grupo foi previamente tratado por via intraperitoneal com NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 20 mg/kg) (DE OLINDA et al., 2008), um inibidor da NO-sintase ou glibenclamida (GLIB, 5mg/kg) (DE OLINDA et al., 2008), um inibidor dos canais K^+_{ATP} , ou N-etilmaleimida (NEM – 10 mg/kg) (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999), um bloqueador de grupamentos sulfidrilícos. Decorridos 30 minutos desse tratamento, administrou-se, solução veículo ou α -terpineol (12,5 mg/kg) ou N-acetilcisteína (200 mg/kg), por via oral, ou L-arginina (600 mg/kg) ou diazóxido (3mg/kg), por via intraperitoneal. Após 60 minutos, para o veículo, α -terpineol e N-acetilcisteína, e 30 minutos para L-Arginina e diazóxido, foi induzido lesão por etanol absoluto a todos os grupos. Decorridos 30 min após a indução, os animais foram eutanasiados e realizadas as leituras das lesões como descrito previamente.

4.2.6 Lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos

Os ratos (n=6/grupo) foram tratados oralmente com veículo ou α -terpineol (3,125, 6,25; 12,5 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 uma hora (UEDA; OKADA, 1989). Após período de reperfusão, os animais foram eutanasiados, seus estômagos removidos e as lesões gástricas foram analisadas. A área das lesões gástricas foi medida utilizando o ImageJ-NIH[®] e expressos em termos de porcentagem de área de lesão (BHARGAVA; GUPTA; TANGRI, 1973)

4.2.7 Determinação de muco na parede gástrica

Ratos (n=6/grupo) foram anestesiados com cetamina e xilazina e, em seguida, o abdômen foi incisado e ligou-se o piloro. Veículo ou α -terpineol (12,5 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg) foram administrados por via intraduodenal após ligação do piloro (SHAY, 1945). Segmentos glandulares de estômagos submetidos à ligadura do piloro foram removidos e pesados. Cada segmento foi imediatamente transferido para solução corante de Alcian Blue 0,25% (em sacarose 0,16 M, tamponado com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,8). O corante livre foi removido por lavagem com solução de sacarose 0,25 M. O corante ligado ao muco gástrico foi extraído com cloreto de magnésio 0,5%. Uma amostra de 4 mL do extrato mucoso azul foi então vigorosamente agitada com um volume igual de éter dietílico. A emulsão resultante foi centrifugada e a absorbância foi registrada a 598 nm. A quantidade de Azul de Alcian extraída por grama de tecido glandular foi calculada (μ g de alcian blue/g de tecido) (CORNE; MORRISSEY; WOODS, 1974)

4.2.8 Úlcera induzida por ácido acético em ratos

Ratos (n=6/grupo) foram submetidos a processo cirúrgico para indução da úlcera gástrica, utilizando como agente indutor o ácido acético (80%). Após a anestesia, a indução da úlcera foi realizada por meio de um tubo de vidro de 8 mm de diâmetro e 2 cm de altura, em contato com a serosa do estômago para delimitar a área que seria lesada. Foram adicionados 70 μ L de ácido acético 80%, o qual permaneceu em contato com a serosa do estômago por 1 minuto. Logo após, o ácido acético foi removido com a ajuda de uma pipeta automática e o local lavado com solução salina. O estômago foi acomodado na cavidade abdominal e suturado (OKABE; PFEIFFER, 1972). No primeiro dia após a indução da úlcera, iniciou-se o tratamento por via oral com veículo

ou cimetidina (100 mg/kg) ou α -terpineol (6,25, 12,5 e 25 mg/kg) durante 7 dias. Após o tratamento crônico, os animais foram eutanasiados, o estômago retirado, aberto pela curvatura maior, lavado com água destilada e esticado para fazer a mensuração do volume da ulceração, com auxílio de um paquímetro. A mensuração do volume lesado (mm^3) foi realizada através da medida do comprimento x altura x área interna da úlcera (POTRICH et al., 2010)

4.2.9 Avaliação da toxicidade do α -terpineol em modelo de lesão por ácido acético

Foi avaliada possível toxicidade subcrônica da exposição diária dos ratos (n=6/grupo) a dose de 6,25, 12,5 e 25 mg/kg do α -terpineol durante sete dias de tratamento, no modelo de úlceras por ácido acético. O peso dos animais tratados durante sete dias foi aferido diariamente. A análise dos parâmetros bioquímicos e do peso absoluto dos órgãos dos animais também são importantes indicadores para avaliação da toxicidade de uma substância (DA SILVA et al., 2013; EL HILALY; ISRAILI; LYOUSSI, 2004; POTRICH et al., 2010). Assim, no dia seguinte ao sétimo dia de tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por administração intramuscular e 4 mL de sangue foram coletados através da veia cava inferior em tubo a vácuo com gel separador e centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos para obtenção de soro e análise dos parâmetros bioquímicos: ALT (Alanina Aminotransferase), AST (Aspartato Aminotransferase), fosfatase alcalina, uréia, creatinina, glicose. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Express Plus da Bayer, com reagentes Labtest. Após a coleta do sangue os animais foram eutanasiados e os órgãos (coração, pulmão, baço, fígado e rins) foram retirados para verificação do peso absoluto.

4.2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.). A significância estatística das diferenças entre grupos foi calculada por análise de variância (ANOVA) e pelo pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism™5.0 (San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Efeito do α -terpineol sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado em camundongos

O α -terpineol reduziu a área das lesões induzidas por etanol absoluto nas doses de 6,25 ($23,4 \pm 2,61\%$ *), 12,5 ($13,7 \pm 1,2\%$ *) e 25 mg/kg ($14,2 \pm 2,71\%$ *) em comparação ao grupo veículo ($34,6 \pm 1,3\%$) (Tabela 1). Nas lesões por etanol acidificado, apenas as doses de 12,5 e 25 mg/kg ($14,9 \pm 1,6\%$ e $13,6 \pm 1,95\%$, respectivamente) do α -terpineol reduziram significativamente (* $p < 0,05$) a área da mucosa lesada em comparação ao grupo veículo ($25,6 \pm 1,61\%$) (Tabela 1). Em ambos os protocolos não houve diferença significativa na redução das lesões entre as doses de 12,5 e 25 mg/kg. O controle positivo carbenoxolona também reduziu significativamente (* $p < 0,05$) as lesões nos protocolos estudados ($9,7 \pm 0,2\%$ * para etanol e $10,2 \pm 1,2\%$ * para etanol acidificado). A dose 12,5 mg/kg foi a menor e mais efetiva neste protocolo, sendo, portanto, utilizada para a realização dos protocolos de mecanismo.

Tabela 1. Efeito do α -terpineol e carbenoxolona sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado em camundongos. 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).

Protocolo de lesão gástrica	Tratamento	Dose (mg/kg)	Área de Lesão (%)
Etanol	Veículo	-	$34,60 \pm 1,3$
	α -terpineol	6,25	$24,30 \pm 2,6^*$
		12,5	$13,70 \pm 1,2^*$
		25	$14,20 \pm 1,7^*$
	Carbenoxolona	100	$9,70 \pm 0,2^*$
Etanol/HCl	Veículo	-	$25,60 \pm 1,6$
	α -terpineol	6,25	$21,90 \pm 1,3$
		12,5	$14,90 \pm 1,6^*$
		25	$13,60 \pm 2,0^*$
	Carbenoxolona	100	$10,20 \pm 1,2^*$

FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

4.3.2 Efeito do α -terpineol sobre lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos

Comparado com o grupo veículo ($24,46 \pm 1,23\%*$), o tratamento com α -terpineol reduziu significativamente ($*p < 0,05$) a área percentual de lesão gástrica induzida pela isquemia e reperfusão vascular gástrica nas doses de 6,25 e 12,5 mg/kg ($17,65 \pm 1,18\%*$ e $12,58 \pm 0,58\%*$, respectivamente), assim como controle positivo N-Acetilcisteína ($8,58 \pm 2,01\%*$) (Tabela 2). A melhor dose (12,5 mg/kg) foi utilizada nos protocolos de atividade antioxidante.

Tabela 2. Efeito do α -terpineol e N-acetilcisteína sobre lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos. 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).

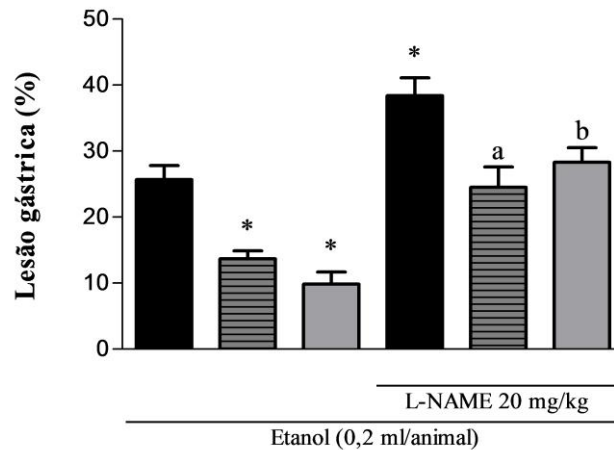
Tratamento	Dose (mg/kg)	Área de lesão (%)
Veículo	-	$24,46 \pm 1,2$
α -terpineol	3,125	$23,62 \pm 0,8$
	6,25	$17,65 \pm 1,2*$
	12,5	$12,58 \pm 0,6*$
NAC	200	$8,56 \pm 2,0*$

FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

4.3.3 Participação do óxido nítrico, grupos sulfidrilas endógenos e canais K_{atp} na gastroproteção do α -terpineol.

A proteção da mucosa gástrica pelo tratamento com o α -terpineol foi significativamente revertida ($^ap < 0,05$) nos animais pré-tratados com o inibidor da NO-sintase L-NAME ($13,7 \pm 1,2\%^a$ vs $24,58 \pm 3,1\%*$, respectivamente) (Figura 1), assim como no grupo pré-tratado com o bloqueador de grupos sulfidrilas endógenos NEM ($13,8 \pm 4,1\%^a$ vs $44,2 \pm 2,4\%$) (Figura 2). Entretanto não houve diferenças significativas na gastroproteção do α -terpineol após o tratamento com o bloqueador dos canais K^+_{ATP} glibenclamida ($14,1 \pm 2,36\%$ vs $17,8 \pm 3,78\%$, respectivamente) (Figura 3).

Figura 1. Participação da via NO-Sintase no efeito gastroprotetor do α -terpineol contra lesões induzidas por etanol absoluto em camundongos pré-tratados com inibidor da NO-sintase, L-NAME. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. grupo veículo; ^a $p < 0,05$ vs grupo α -terpineol; ^b $p < 0,05$ vs grupo L-arginina; (ANOVA one way e teste de Tukey).



Legendas:

- Veículo ▨ α -terpineol 12,5 mg/kg ■ L-arginina 600 mg/kg
- Veículo + L-NAME ▨ α -terpineol 12,5 mg/kg+ L-NAME
- L-Arginina 600mg/kg + L-NAME

FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

4.3.4 Atividade da catalase

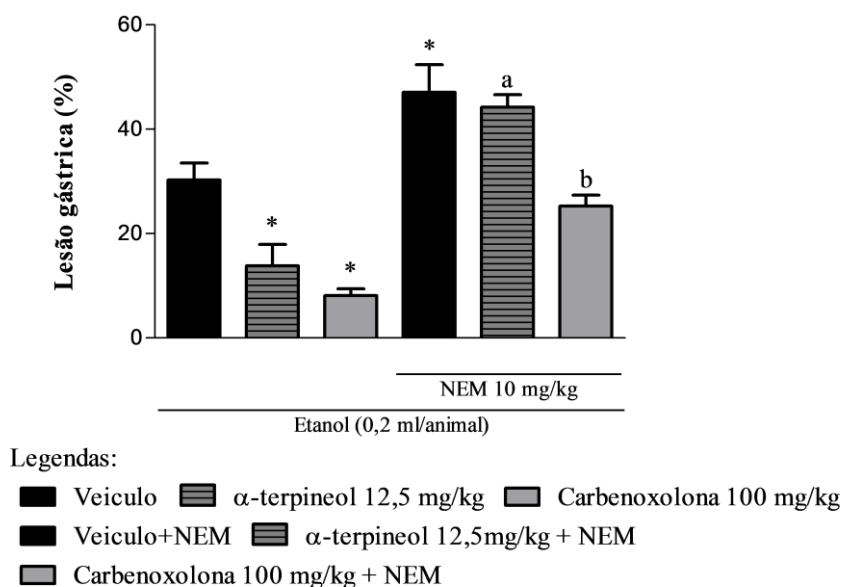
Foi observado uma alta atividade da catalase na mucosa gástrica com a administração do α -terpineol ($0,59 \pm 0,05$ mM/mim.g de tecido*) em comparação ao grupo tratado com veículo ($0,21 \pm 0,04$ mM/mim.g de tecido) (* $p < 0,05$). Esta atividade foi maior (* $p < 0,05$) do que nos grupos não tratado e sem indução de lesão gástrica (SHAM – $0,38 \pm 0,04$ mM/mim.g de tecido*) e controle positivo NAC ($0,43 \pm 0,06$ mM/mim.g de tecido*) (Figura 4).

4.3.5 Atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase apresentou-se reduzida de maneira significativa (* $p < 0,05$) tanto em estômagos de animais tratados com α -terpineol ($3,69 \pm 0,61$ U/g de

tecido*) como os do grupo SHAM ($2,7 \pm 0,76$ U/g de tecido*) em comparação com grupo veículo ($6,36 \pm 1,24$ U/g de tecido)(figura 5).

Figura 2. Participação dos grupos sulfidrílicos endógenos no efeito gastroprotetor do α -terpineol contra lesões induzidas por etanol absoluto em ratos pré-tratados com inibidor dos grupos sulfidrílicos, NEM. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. grupo veículo; ^a $p < 0,05$ vs grupo α -terpineol; ^b $p < 0,05$ vs grupo L-arginina (ANOVA one way e teste de Tukey).



FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

4.3.6 Concentração de grupos sulfidrílicos não protéicos na mucosa gástrica

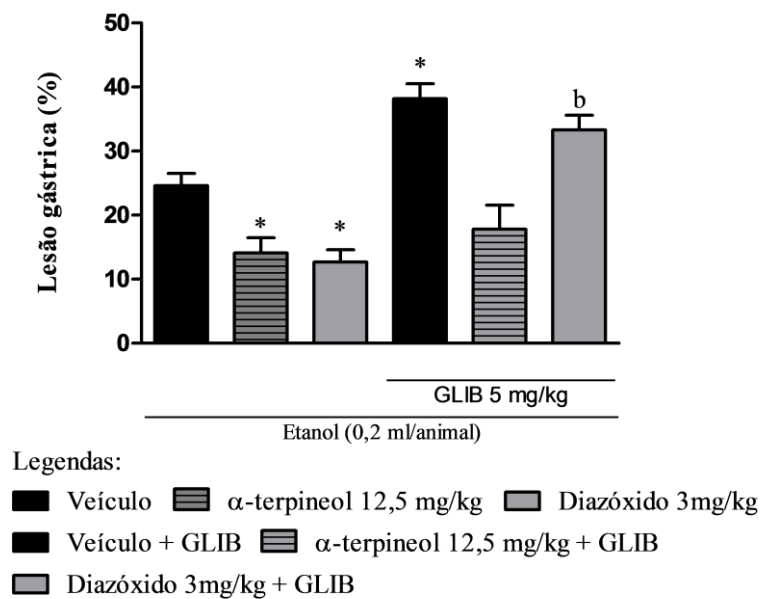
Os níveis de SH-NP da mucosa gástrica de animais tratados com α -terpineol ou controle positivo NAC ($420,48 \pm 28,89^*$ e $418,51 \pm 14,7^*$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) foram significativamente (* $p < 0,05$) maiores do que aqueles tratados com veículo ($290,87 \pm 22,96$ $\mu\text{g/g}$ de tecido) e sem diferença significativa em comparação ao grupo SHAM ($425,56 \pm 38,67^*$ $\mu\text{g/g}$ de tecido)(figura 6).

4.3.7 Níveis de MDA na mucosa gástrica

O tratamento com α -terpineol reduziu níveis de MDA da mucosa gástrica ($81,15 \pm 7,51^*$ nmol/g de tecido) significativamente (* $p < 0,05$) em comparação ao grupo

veículo ($114,4 \pm 5,58$ nmol/g de tecido), assim como o grupo SHAM ($85,62 \pm 3,38^*$ nmol/g de tecido)(figura 7).

Figura 3. Participação dos K^+_{ATP} no efeito gastroprotetor do α -terpineol contra lesões induzidas por etanol absoluto em camundongos pré-tratados com inibidor de K^+_{ATP} , GLIB. Os dados são representados como média \pm E.P.M. $^*p < 0,05$ vs. grupo veículo; $^a p < 0,05$ vs grupo α -terpineol; $^b p < 0,05$ vs grupo L-arginina (ANOVA one way e teste de Tukey).

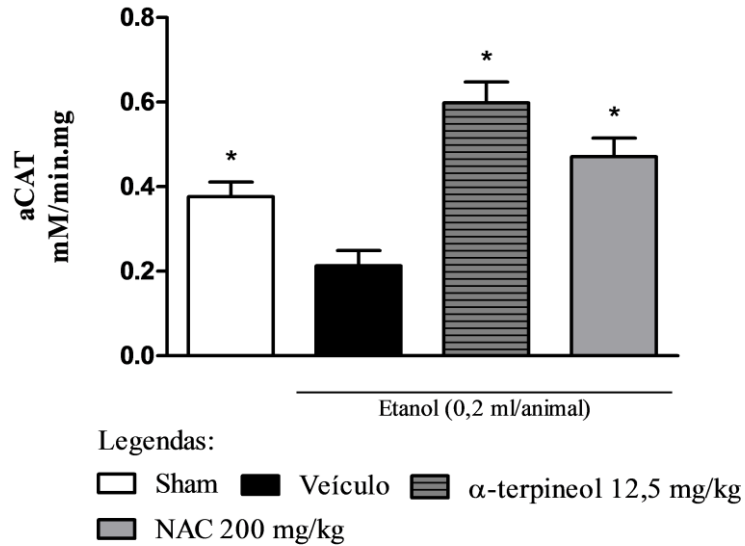


FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

4.3.8 Conteúdo de muco na mucosa gástrica

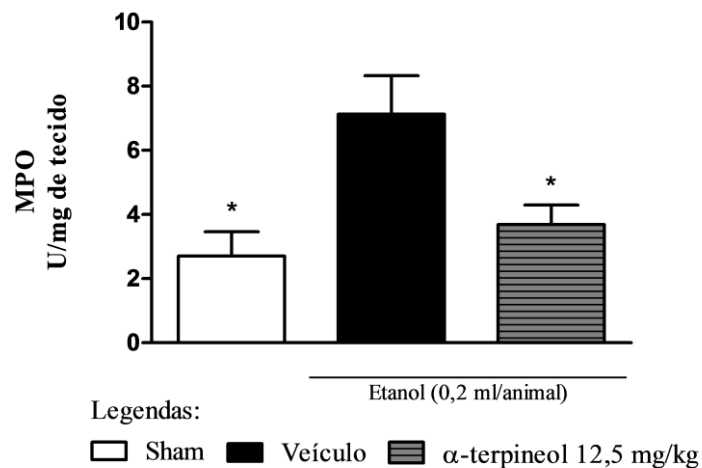
O conteúdo de muco gástrico aumentou significativamente ($^*p < 0,05$) com a administração do α -terpineol ($62,65 \pm 4,9^*$ μ g de azul de alcian/g de tecido), comparando-o com o grupo veículo ($41,8 \pm 1,17$ μ g de azul de alcian /g de tecido). O grupo controle positivo carbenoxolona, também aumentou significativamente o conteúdo de muco em comparação ao grupo veículo ($57,28 \pm 3,13^*$ μ g de azul de alcian/g de tecido) (Figura 8).

Figura 4. Efeito do α -terpineol sobre a atividade da catalase na mucosa de estômagos lesionados por etanol absoluto, em camundongos. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. grupo veículo (ANOVA one way e teste de Tukey).



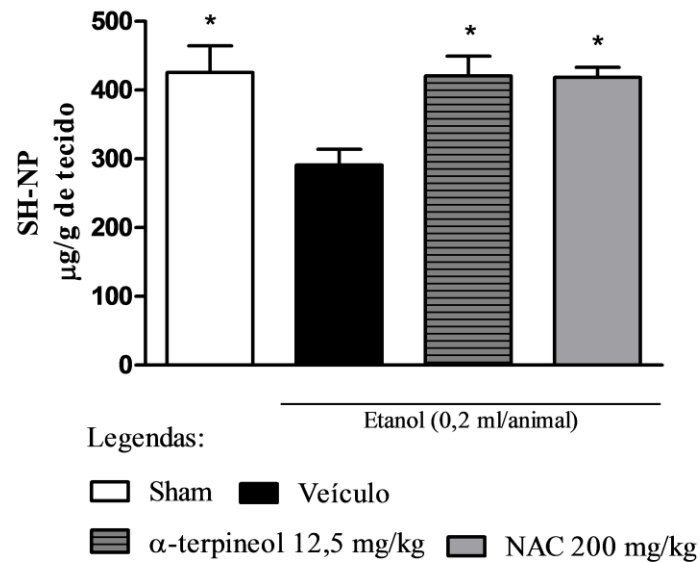
FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

Figura 5. Efeito do α -terpineol sobre a atividade da MPO na mucosa de estômagos lesionados por etanol absoluto, em camundongos. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. grupo veículo (ANOVA one way e teste de Tukey).



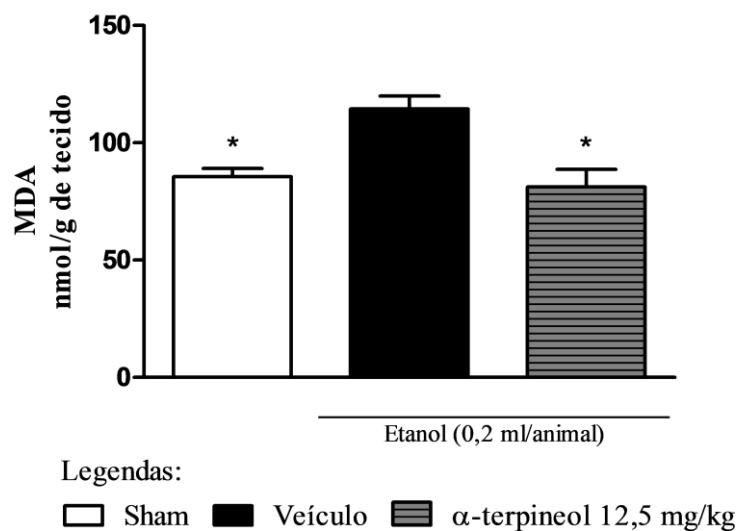
FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

Figura 6. Efeito do α -terpineol sobre os níveis de SH-NP na mucosa de estômagos lesionados por etanol absoluto, em camundongos. 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).



FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

Figura 7. Efeito do α -terpineol sobre a sobre os níveis de MDA na mucosa de estômagos lesionados por etanol absoluto, em camundongos. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. grupo veículo (ANOVA one way e teste de Tukey).

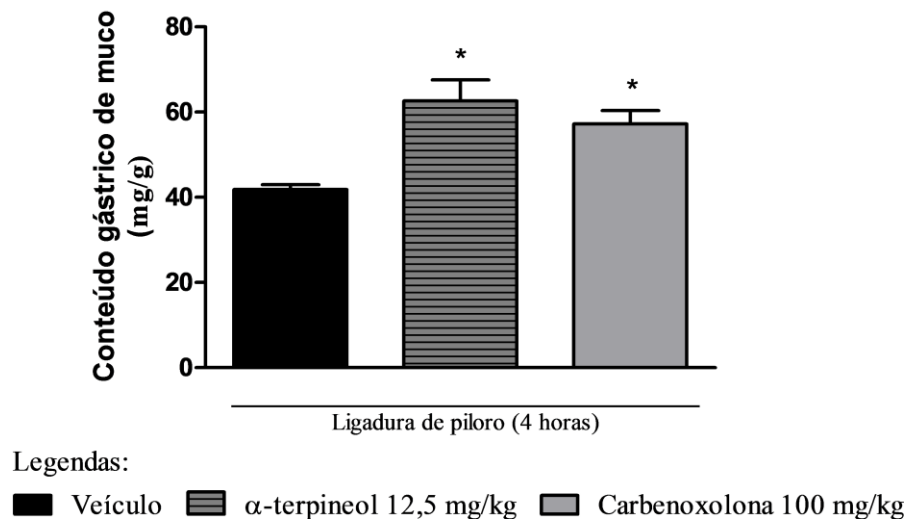


FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

4.3.9 Efeito do α -terpineol em úlceras induzidas por ácido acético em ratos

Após sete dias de tratamento, o α -terpineol, nas doses 6,25 ($81,36 \pm 25,55 \text{ mm}^3$), 12,5 ($28,85 \pm 13,56 \text{ mm}^3$) e 25 mg/kg ($18,45 \pm 5,5 \text{ mm}^3$), reduziu significativamente ($p < 0,05$) o volume da úlcera gástrica induzida por ácido acético em comparação ao grupo veículo ($204,36 \pm 34,57 \text{ mm}^3$), porém sem significância entre si ou grupo cimetidina ($52,42 \pm 12,21 \text{ mm}^3$) (Figura 9).

Figura 8. Efeito do α -terpineol sobre teor de muco aderido a mucosa gástrica após ligadura de piloro em ratos. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. grupo veículo (ANOVA one way e teste de Tukey).

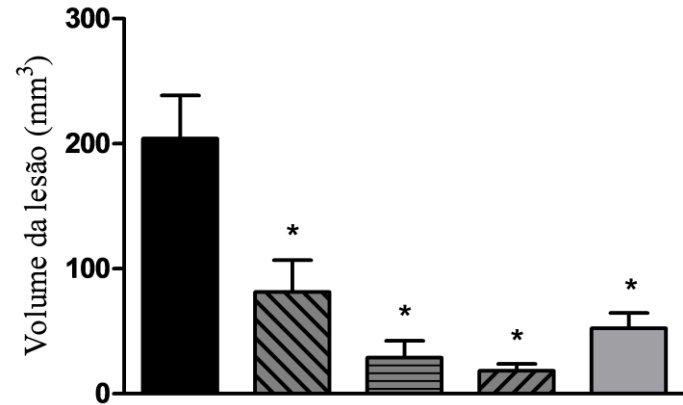


FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

4.3.10 Toxicidade do α -terpineol em úlceras induzidas por ácido acético em ratos

O tratamento com α -terpineol (6,25, 12,5 e 25 mg/kg) em animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por ácido acético não provocou alterações estatisticamente significativas no ganho de peso corpóreo desses animais quando comparados com o grupo controle (Figura 10). Também não foram encontradas diferenças significativas no peso absoluto dos órgãos (Tabela 3) e nos parâmetros bioquímicos séricos avaliados, em relação aos seus respectivos grupos controles (Tabela 4).

Figura 9. Efeito do α -terpineol sobre úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. grupo veículo (ANOVA one way e teste de Tukey).

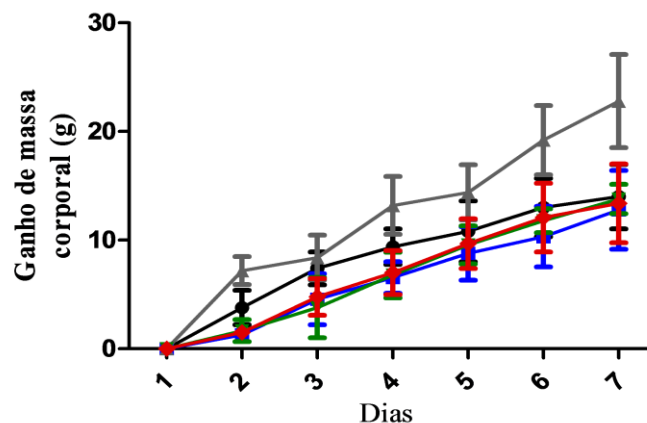


Legendas:

- Veículo
- ▨ α -terpineol 6,25 mg/kg
- ▤ α -terpineol 12,5 mg/kg
- ▧ α -terpineol 25 mg/kg
- cimetidina 100 mg/kg

FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

Figura 10. Ganho de massa corporal dos animais submetidos a sete dias de tratamento com α -terpineol (6,25, 12,5 e 25 mg/kg), cimetidina e veículo em protocolo de úlcera induzida por ácido acético. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. grupo veículo (ANOVA one way e teste de Tukey).



Legendas:

- Controle
- α -terpineol 6,25 mg/kg
- ▲ α -terpineol 12,5 mg/kg
- ◆ α -terpineol 25 mg/kg
- ▲ Cimetidina 100 mg/kg

FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

Tabela 3. Efeito do tratamento com α -terpineol (6,25, 12,5 e 25 mg/kg), cimetidina e veículo durante sete dias sobre o peso dos órgãos dos animais em protocolo de úlcera induzida por ácido acético. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. grupo veículo (ANOVA one way e teste de Tukey).

Grupo	Dose (mg/kg)	Peso dos órgãos (g)				
		Baço	Coração	Fígado	Pulmões	Rins
Veículo	-	0,6 \pm 0,13	0,9 \pm 0,12	9,5 \pm 0,10	1,4 \pm 0,11	1,7 \pm 0,10
α -terpineol	6,25	0,8 \pm 0,12	0,9 \pm 0,11	9,8 \pm 0,10	1,3 \pm 0,12	1,8 \pm 0,10
	12,5	1,0 \pm 0,15	0,8 \pm 0,12	9,8 \pm 0,10	1,3 \pm 0,11	1,7 \pm 0,10
	25	1,1 \pm 0,12	0,9 \pm 0,13	9,0 \pm 0,12	1,4 \pm 0,11	1,8 \pm 0,11
Cimetidina	100	0,9 \pm 0,10	0,8 \pm 0,11	9,5 \pm 0,11	1,2 \pm 0,10	1,8 \pm 0,12

FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos de animais tratados com α -terpineol (6,25, 12,5 e 25 mg/kg), cimetidina e veículo durante sete dias em protocolo de úlcera induzida por ácido acético. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. grupo veículo (ANOVA one way e teste de Tukey). AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase; PKLA: Fosfatase alcalina.

Grupo	Dose (mg/kg)	Parâmetro Bioquímico					
		AST (U/L)	ALT (U/L)	Glicemia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	PKAl (mg/dL)
Veículo	-	187,6 \pm 10,9	54,50 \pm 5,1	153,3 \pm 20,1	0,47 \pm 0,0	36,13 \pm 2,5	143,6 \pm 15,5
α -terpineol	6,25	156,7 \pm 7,5	38,67 \pm 1,3	120,0 \pm 21,1	0,45 \pm 0,0	39,67 \pm 5,0	71,25 \pm 14,5
	12,5	184,3 \pm 19,7	64,00 \pm 4,9	114,5 \pm 19,5	0,52 \pm 0,0	39,75 \pm 4,6	130,5 \pm 16,8
	25,0	176,3 \pm 12,4	51,00 \pm 1,8	108,5 \pm 13,5	0,44 \pm 0,0	31,87 \pm 3,9	123,5 \pm 21,6
Cimetidina	100	201,6 \pm 19,9	58,40 \pm 7,1	115,0 \pm 23,6	0,50 \pm 0,0	48,00 \pm 2,0	177,6 \pm 34,1

FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016

4.4 Discussão

Primeiramente, investigou-se a capacidade do α -terpineol em proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol absoluto. Os resultados quanto a atividade protetora gástrica neste protocolo foram promissores. Este agente exerce efeitos complexos e multifatoriais na mucosa gástrica associados a distúrbios no equilíbrio entre fatores protetores e agentes lesivos. Alterações vasculares, lesão a células endoteliais da mucosa gástrica, hiperemia, edema, hemorragia gástrica, migração de células inflamatórias, destruição da camada mucoprotetora, exposição da mucosa ao suco gástrico e a radicais livres produzidos são alguns dos efeitos provocados pelo etanol. Por essas características, o etanol é uma ótima ferramenta em estudos iniciais de atividade antiúlcera (LI et al., 2015; MOTA et al., 2011; SUZUKI et al., 2012). Dados da literatura mostram que os monoterpenos geraniol (DE CARVALHO et al., 2014), α -pineno (PINHEIRO et al., 2015), carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012), limoneno (MORAES et al., 2009), mentol (ROZZA et al., 2013), constituintes de óleos essenciais de espécies vegetais, assim como o α -terpineol, exibiram atividade protetora gástrica neste modelo experimental, relatando-os como fontes potenciais para o tratamento de distúrbios gastrintestinais. Em estudos anteriores, o α -terpineol também evitou lesões induzidas por etanol, reforçando os resultados encontrados neste estudo. Entretanto tal efeito não foi atribuído a presença de atividade antissecretória (SOUZA et al., 2011). Portanto, iniciou-se o estudo para investigar o potencial gastroprotetor do α -terpineol.

O protocolo de lesões gástricas por etanol acidificado é uma excelente ferramenta para a investigação desta propriedade, uma vez que o etanol expõe a mucosa ao do ácido clorídrico, agindo sinergicamente, causando lesões necróticas provindas da redução drástica dos mecanismos citoprotetores da mucosa gástrica (CHEN et al., 2016; KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002; NATALE et al., 2004). Portanto, a redução das lesões neste modelo pelo tratamento com α -terpineol evidencia a presença de mecanismos citoprotetores deste, na mucosa gástrica.

A ação antioxidante é um mecanismo de proteção gástrica dos mais importantes, o que levou a investigação para o protocolo de lesões induzidas por isquemia-reperfusão. Neste modelo há a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e infiltração de neutrófilos. Durante a isquemia, há o enfraquecimento da barreira da mucosa, o que permite a difusão de ácido do suco gástrico, lesando-a

(GEMICI et al., 2010). A redução do fluxo sanguíneo e aporte deficiente de oxigênio desencadeiam disfunção bioquímica celular, com produção excessiva de hipoxantina, conversão da enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase e produção de metabólitos citotóxicos, que levam a morte celular (DE GROOT, 2005; OLIVEIRA et al., 2012). Com a reperfusão, o sistema xantina oxidase na presença de oxigênio produz quantidades aumentadas de EROs, como ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxiperoxil (HO_2^{\cdot}) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}), promovendo peroxidação lipídica, infiltração de neutrófilos e dano tecidual (NAKAGIRI et al., 2010; WADA et al., 1996). O efeito protetor do α -terpineol neste modelo evidencia uma possível participação sobre mecanismos antioxidantes envolvidos na proteção gástrica.

A peroxidação lipídica promove alterações na membrana celular, como perda de sua integridade, aumento da permeabilidade e acelera o processo de formação de úlceras gástricas. O MDA, um dos produtos da peroxidação lipídica, é utilizado como um marcador de dano tecidual por EROs e sua produção está aumentada, por exemplo, em lesões gástricas induzidas por etanol (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2016). O α -terpineol foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de MDA na mucosa gástrica após administração de etanol absoluto, reforçando a hipótese de seu efeito antioxidante.

Outro efeito importante do α -terpineol na sua atividade como antioxidante na proteção gástrica foi manter elevada a atividade da catalase, em modelos de lesão por etanol absoluto. A catalase é uma enzima que participa dos mecanismos antioxidantes da mucosa gástrica, convertendo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, impedindo-o de reagir com o radical superóxido e originar o radical hidroxil (OH^{\cdot}), de grande importância na formação de lesões gástricas (KASAZAKI et al., 2003; YASUKAWA et al., 2004; ZHANG et al., 2014).

Os compostos sulfidrilicos endógenos, como a glutatona reduzida (GSH) são outra classe de substâncias que participam no mecanismo antioxidante gástrico, importantes na defesa intracelular e na barreira de muco contra compostos tóxicos. Suas propriedades antioxidantes provêm do grupo SH- de sua estrutura química. Os mesmos agem como um sequestrador de radicais livres, inibidor da peroxidação lipídica, regulador de mecanismos de sinalização e reparo do DNA, além de ajudar na manutenção da barreira de muco, através de pontes dissulfeto, prevenindo que o muco se torne solúvel e de fácil extração por agentes ulcerogênicos como o etanol (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2016; CALZADA; ARISTA; PEREZ, 2010). A reversão da proteção gástrica do α -terpineol com o pré-tratamento dos animais com de

N-etil-maleimida (NEM), um bloqueador de grupos sulfidrilicos endógenos e o aumento dos níveis de GSH em homogenados de estômago após administração de etanol mostram que os grupos sulfidrilas estão envolvidos na sua atividade gastroprotetora.

Kasazaki e colaboradores (2003) reportam que o radical $O_2^{\cdot-}$ produzido durante o estresse oxidativo, facilita a migração de neutrófilos na mucosa gástrica. Os neutrófilos amplificam a cadeia produtora de radicais livres, pois uma vez infiltrados liberam enzimas produtoras de agentes oxidantes que lesionam o tecido. A enzima mieloperoxidase (MPO), encontrada nos grânulos de neutrófilos, é um marcador bioquímico para infiltração destas células em tecidos lesados. Sua atividade catalítica oxida o íon cloreto com peróxido de hidrogênio formando o ácido hipocloroso (HOCl, um radical livre citotóxico) (AMIRSHAHROKHI; BOHLOOLI; CHINIFROUSH, 2011; AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2016; AMIRSHAHROKHI, 2013; ELLIOTT; WALLACE, 1998). A inibição da migração de neutrófilos para a mucosa gástrica pode estar envolvida nos possíveis mecanismos protetores do α -terpineol, tendo visto que sua administração diminuiu a atividade da MPO.

O óxido nítrico (NO), um mediador endógeno produzido via óxido nítrico sintase (NOS), desempenha importante papel na integridade da mucosa gástrica, pois age no aumento do fluxo sanguíneo gástrico, na regulação da secreção gástrica, inibição da agregação de neutrófilos e adesão de leucócitos ao endotélio vascular, atuando diretamente sobre estes mecanismos ou regulando o efeito de outras substâncias (AMIRSHAHROKHI; BOHLOOLI; CHINIFROUSH, 2011; AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2016; AMIRSHAHROKHI, 2013; ELLIOTT; WALLACE, 1998; LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008; ROZZA et al., 2013; WALLACE; MILLER, 2000; WALLACE et al., 1997; ZANARDO et al., 2006). O pré-tratamento dos animais com N ω -nitro-L-arginine methyl Ester (L-NAME), um inibidor da NOS reverteu a proteção do α -terpineol na mucosa gástrica, evidenciando uma possível participação da via NO-NOS nesta atividade.

Um dos mecanismos que óxido nítrico participa na proteção da mucosa gástrica é a via NO/GMPc/K_{ATP}. O NO ativa a enzima guanilato ciclase (GC), que aumenta as concentrações do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Subsequentemente, o GMPc ativa os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). Estes, por sua vez, aumentam a microcirculação gástrica e inibem a ativação de neutrófilos e produção de radicais livres (CAMPOS et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008; ROZZA et al., 2013). Com base nestas informações avaliou-se a participação destes canais na

proteção gástrica promovida pelo α -terpineol. O tratamento com glibenclamida, um bloqueador dos K_{ATP} , não interferiu em sua gastroproteção, sendo pouco provável que estes canais participem deste efeito.

O tratamento com α -terpineol aumentou o conteúdo de muco gástrico coletado em comparação ao grupo veículo. Vários estudos demonstram a importância da secreção de muco como mecanismo de defesa gástrica (DA SILVA et al., 2015; HIRUMA-LIMA et al., 2002; RIBEIRO et al., 2016; TAKAYAMA et al., 2011). A barreira mucosa é considerada a primeira linha de defesa, pois sua camada aderente, contínua e alcalina diminui danos provocados por alimentos ingeridos, evita a autodigestão da mucosa pelo suco gástrico e impede a ação de radicais livres contra as células epiteliais por suas glicoproteínas e compostos sulfidrilicos com propriedades antioxidantes (ALRASHDI et al., 2012; LALOO et al., 2013; MOJZIS; HEGEDUSOVA; MIROSSAY, 2000; ROZZA et al., 2013). Esta barreira protetora depende da síntese e liberação de prostaglandinas e NO na mucosa gástrica (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Embora estudos anteriores relatem que as prostaglandinas não estão envolvidas na gastroproteção do α -terpineol, a via NO-NOS pode ser uma provável rota para este mecanismo protetor.

Além de estudar a atividade protetora gástrica do α -terpineol em modelos agudos, sua atividade cicatrizante frente ao modelo crônico de úlcera gástrica por ácido acético também foi avaliada. A lesão induzida por ácido acético promove alteração na adesão de muco, na microcirculação, na peroxidação lipídica, nos níveis de prostaglandinas e óxido nítrico da mucosa gástrica (KARAKOYUN et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2001). As lesões gástricas neste modelo apresentam grandes similaridades à encontrada nas úlceras gástricas em humanos, tanto nas características patológicas como nos mecanismos de cicatrização, pela dificuldade de tratamento e o longo período para a cura (OKABE; AMAGASE, 2005). Em linhas gerais, a cicatrização de úlceras é um processo multifatorial que envolve migração e proliferação celular, angiogênese, re-epitelização e deposição de matriz extracelular (TARNAWSKI, 2005). O tratamento dos animais durante sete dias com α -terpineol reduziu significativamente as lesões induzidas por ácido acético, evidenciando também o efeito cicatrizante na sua gastroproteção.

Os efeitos do tratamento do α -terpineol sobre o ganho de peso corpóreo, peso absoluto dos órgãos e parâmetros bioquímicos séricos (ALT, AST, glicose, fosfatase

alcalina, uréia e creatinina), também foi avaliado, pois alterações nesses critérios podem indicar toxicidade subcrônica do produto testado (EL HILALY; ISRAILI; LYOUSSI, 2004; PATIL; SURANA, 2010; TOFOVIC; JACKSON, 1999).

Marcadores enzimáticos séricos são parâmetros bioquímicos associados com índices de saúde e de significância diagnóstica na rotina da prática clínica. Alanina transaminase (ALT) e aspartame transaminase (AST) são principalmente utilizadas na avaliação de lesões hepáticas ou cardíacas por drogas ou outros xenobióticos, uma vez que, quando injuriados estes órgãos liberam grandes quantidades destas enzimas no plasma, ressaltando que ALT é mais específica para o fígado e, portanto, melhor parâmetro para avaliar lesão hepática (MYTHILYPRIYA; SHANTHI; SACHDANANDAM, 2007; OZER et al., 2008; RAMAIAH, 2011; WASAN et al., 2001). Outro marcador hepático é a fosfatase alcalina (FAL) que está relacionada à funcionalidade dos hepatócitos: quanto maior sua concentração sérica maior a atividade metabólica destas células (MANJUNATHA et al., 2005). A concentração sérica de creatinina e uréia indicam a presença de alterações na função de filtração renal, excreção de metabolitos e injúria neste órgão (PATRICK-IWUANYANWU et al., 2012). Após os sete dias de tratamento com α -terpineol em úlceras induzidas por ácido acético em ratos, não houve alterações significativas em nenhum dos indicadores estudados, portanto não exibindo toxicidade subcrônica nas doses utilizadas.

Em conclusão, os resultados sugerem que o α -terpineol, um monoterpene encontrado em uma grande variedade de espécies vegetais usadas na medicina popular, tais como *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake, *Ravensara aromática* sonn., *Croton sonderianus* Muell.Arg, *Eucalyptus globulus* Labill., apresenta propriedades antiúlcera através de mecanismos citoprotetores e cicatrizantes sobre a mucosa gástrica, com aumento das defesas antioxidantes, produção de muco e diminuição da inflamação no local da lesão, através da participação de mediadores importantes como óxido nítrico, sem apresentar indicativos de toxicidade subcrônica. Entretanto deve-se lembrar da complexidade destes mecanismos e que mais estudos devem ser desenvolvidos para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na atividade evidenciada.

Agradecimentos

Somos gratos a UFPI (Universidade Federal do Piauí, Brasil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) pelo apoio financeiro. Além disso, não há conflito de interesse relacionado com este estudo.

4.5 Referencias

ABU-DAHAB, R.; KASABRI, V.; AFIFI, F. U. Evaluation of the volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) on breast cancer cell line models. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 2, p. 136–147, 2014.

ALRASHDI, A. S. et al. Mechanisms of Gastroprotective Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Jasminum sambac* against HCl/Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

AMIRSHAHROKHI, K. Anti-inflammatory effect of thalidomide in paraquat-induced pulmonary injury in mice. **International immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 210–215, 2013.

AMIRSHAHROKHI, K.; BOHLOOLI, S.; CHINIFROUSH, M. M. The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 253, n. 3, p. 197–202, 2011.

AMIRSHAHROKHI, K.; KHALILI, A.-R. Gastroprotective effect of 2-mercaptoethane sulfonate against acute gastric mucosal damage induced by ethanol. **International immunopharmacology**, v. 34, p. 183–188, 2016.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BEERS, R. F. J.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133–140, 1952.

BHARGAVA, K. P.; GUPTA, M. B.; TANGRI, K. K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. **European journal of pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 191–195, 1973.

BICAS, J. L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.; DE CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 7, p. 1610–1615, 2011.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618–622, 1982.

BRIGHT-ASARE, P.; HABTE, T.; YIRGOU, B.; BENJAMIN, J. Prostaglandins, H₂-receptor antagonists and peptic ulcer disease. **Drugs**, v. 35 Suppl 3, p. 1–9, 1988.

CALZADA, F.; ARISTA, R.; PEREZ, H. Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal-gum acacia-induced hyperperistalsis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 49–51, 2010.

CAMPOS, D. A.; DE LIMA, A.F.; RIBEIRO, S.R.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 391–397, 2008.

CHEN, S.; ZHAO, X.; SUN, P.; QIAN, J.; SHI, Y.; WANG, R. Preventive effect of *Gardenia jasminoides* on HCl/ethanol induced gastric injury in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, 2016.

CORNE, S. J.; MORRISSEY, S. M.; WOODS, R. J. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **The Journal of physiology**, v. 242, n. 2, p. 116P–117P, 1974.

DA SILVA, L. M.; ALLEMAND, A.; MENDES, D.A.; DOS SANTOS, A.C.; ANDRÉ, E.; DE SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T.R.; DARTORA, N.; MARQUES, M.C.; BAGGIO, C.H.; WERNER, M.F. Ethanol extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 51, p. 179–187, 2013.

DA SILVA, L. M.; BOEING, T.; SOMENSI, L.B.; CURY, B.J.; STEIMBACH, V.M.; SILVERIA, A.C.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; SANTIN, J.R.; DE ANDRADE, S.F. Evidence of gastric ulcer healing activity of *Maytenus robusta* Reissek: In vitro and in vivo studies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 175, p. 75–85, 2015.

DA SILVA, M. T. B.; DA SILVA, M. T. B.; MARQUES, R.B.; BATISTA-LIMA, F.J.; SOARES, M.A.; DOS SANTOS, A.A.; MAGALHÃES, P.J.; OLIVEIRA, F.A.; ALMEIDA, F.R. α -Terpineol Induces Gastric Retention of Liquids by Inhibiting Vagal Parasympathetic Pathways in Rats. **Planta medica**, 2016.

DE CARVALHO, K. I. M.; BONAMIN, F.; DOS SANTOS, R.C.; PÉRICO, L.L.; BESERRA, F.P.; DE SOUSA, D.P.; FILHO, J.M.; DA ROCHA, L.R.; HIRUMA-LIMA, C.A. Geraniol-a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n. 4, p. 355–365, 2014.

DE GROOT, H. [Injury to visceral organs by ischemia and reperfusion. Processes in pathogenetic networks]. **Zentralblatt fur Chirurgie**, v. 130, n. 3, p. 202–212, 2005.

DE OLINDA, T. M.; LEMOS, T.L.; MACHADO, L.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Quebrachitol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide and K⁺ ATP channels. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 327–333, 2008.

DE OLIVEIRA, M. G. B., MARQUES, R.B.; SANTANA, M.F.; SANTOS, A.B.; BRITO, F.A.; BARRETO, E.O.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R.; BADAUÊ-PASSOS, D. JR.; ANTONIOLLI, A.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. α -terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 111, n. 2, p. 120–125, 2012.

DE SOUSA, D. P.; QUINTANS, L.; DE ALMEIDA, R. N. Evolution of the Anticonvulsant Activity of α -Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 1, p. 69–70, 2007.

EL HILALY, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 43–50, 2004.

ELLIOTT, S. N.; WALLACE, J. L. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. **Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie**, v. 12, n. 8, p. 559–568, 1998.

GEMICI, B.; TAN, R.; ONGÜT, G.; IZGÜT-UYSAL, V.N. Expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric ischemia-reperfusion: role of angiotensin II. **The Journal of surgical research**, v. 161, n. 1, p. 126–133, 2010.

GUIMARAES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS, L. J. J. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. **Phytotherapy research : PTR**, v. 27, n. 1, p. 1–15, 2013.

HASSAN, S. B.; GALI-MUHTASIB, H.; GÖRANSSON, H.; LARSSON, R. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling. **Anticancer research**, v. 30, n. 6, p. 1911–1919, 2010.

HELD, S.; SCHIEBERLE, P.; SOMOZA, V. Characterization of alpha-terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8040–8046, 2007.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J.S.; BIGHETTI, E.J.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; NUNES, D.S.; BRITO, A.R. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. **Phytotherapy : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 523–529, 2002.

HUANG, T.-C.; LEE, C.-L. Diagnosis, treatment, and outcome in patients with bleeding peptic ulcers and *Helicobacter pylori* infections. **Biomedical research international**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

IRELAND, B. F.; HIBBERT, D.B.; GOLDSACK, R.J.; DORAN, J.C.; BROPHY, J.J. Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 5, p. 457–470, 2002.

IWATA, F.; KOO, A.; ITOH, M.; LAM, K.; LEUNG, J.W.; LEUNG, F.W. Functional evidence linking potassium channels and afferent nerve-mediated mucosal protection in rat stomach. **Life sciences**, v. 61, n. 17, p. 1713–1720, 1997.

KANGWAN, N.; PARK, J.M.; KIM, E.H.; HAHM, K.B. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 5, n. 1, p. 40–47, 2014.

KARAKOYUN, B.; YÜKSEL, M.; ERCAN, F.; ERZİK, C.; YEĞEN, B.C. Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. **Inflammation**, v. 32, n. 1, p. 37–46, 2009.

KASAZAKI, K.; YASUKAWA, K.; SANO, H.; UTSUMI, H. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH₄OH-induced gastric lesions of rats using a 300 MHz in vivo ESR technique. **Free radical research**, v. 37, n. 7, p. 757–766, 2003.

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, n. 1, p. 23–30, 2001.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 53, n. 1, p. 39–50, 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41–60, 2008.

LALOO, D.; PRASAD, S.K.; KRISHNAMURTHY, S.; HEMALATHA, S. Gastroprotective activity of ethanolic root extract of *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook. **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 2, p. 505–514, 2013.

LI, W.; YAO, H.; NIU, X.; WANG, Y.; ZHANG, H.; LI, H.; UM, Q. Protective effect of δ -amyrone against ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Immunobiology**, v. 220, n. 6, p. 798–806, 2015.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 2, p. 156–167, 2008.

MAGALHAES, P. J. C.; LAHLOU, S.; JUCÁ, D.M.; COELHO-DE-SOUZA, L.N.; DA FROTA, P.T.; DA COSTA, A.M.; LEAL-CARDOSO, J.H. Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 169–177, 2008.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Lancet (London, England)**, v. 374, n. 9699, p. 1449–1461, 2009.

MANJUNATHA, B. K.; VIDYA, S.M.; DHIMAN, P.; PALLAVI, R.; MANKANI, K.L. Hepatoprotective activity of *Leucas hirta* against CCl₄ induced hepatic damage in rats. **Indian journal of experimental biology**, v. 43, n. 8, p. 722–727, 2005.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life sciences**, v. 65, n. 2, p. PL27–32, 1999.

MEDEIROS, J. V. R.; GADELHA, G.G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. A.; SOARES, P.M.; SANTOS, A. A.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H. 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, n. 4, p. 721–727, 2008.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 271–278, 1978.

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. **Japanese journal of pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 43-50, 1987.

MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 49, n. 4, p. 441–446, 2000.

MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F.C.; SANTOS, R.C.; ROCHA, L.R.; MARQUES, M.O.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chemico-biological interactions**, v. 180, n. 3, p. 499–505, 2009.

MOTA, C. S.; FREITAS, R.B.; ATHAYDE, M.L.; BOLIGON, A.A.; AUGUSTI, P.R.; SOMACAL, S.; ROCHA, M.P.; BAUERMAN, L.F. Effect of *Vernonia cognata* on oxidative damage induced by ethanol in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 7, p. 675–684, 2011.

MYTHILYPRIYA, R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Oral Acute and Subacute Toxicity Studies with Kalpaamruthaa, a Modified Indigenous Preparation, on Rats. **Journal of Health Science**, v. 53, n. 4, p. 351–358, 2007.

NAKAGIRI, A.; SUNAMOTO, M.; TAKEUCHI, K.; MURAKAMI, M. Evidence for the involvement of NADPH oxidase in ischemia/reperfusion-induced gastric damage via angiotensin II. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 61, n. 2, p. 171–179, 2010.

NATALE, G.; LAZZERI, G.; LUBRANO, V.; COLUCCI, R.; VASSALLE, C.; FORNAI, M.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 195, n. 1, p. 62–72, 2004.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models--the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1321–1341, 2005.

- OKABE, S.; PFEIFFER, C. J. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. **The American journal of digestive diseases**, v. 17, n. 7, p. 619–629, 1972.
- OLIVEIRA, I. S.; DA SILVA, F.V.; VIANA, A.F.; DOS SANTOS, M.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; MARTINS, M.D.O.C.; NUNES, P.H.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R. C. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 9, p. 899–908, 2012.
- OZER, J. RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194–205, 2008.
- PAHWA, R.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Clinical Manifestations, Causes and Management Strategies of Peptic Ulcer Disease. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 2, p. 99–106, 2010.
- PARK, S.-N.; LIM, Y.K.; FREIRE, M.O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J.K. Antimicrobial effect of linalool and alpha-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 369–372, 2012.
- PARVARDEH, S.; MOGHIMI, M.; ESLAMI, P.; MASOUDI, A. alpha-Terpineol attenuates morphine-induced physical dependence and tolerance in mice: role of nitric oxide. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 19, n. 2, p. 201–208, 2016.
- PATIL, P. H.; SURANA, S. J. Toxicological evaluations of Eranthemum roseum R. Br Linn root extracts. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 1, p. 1006–1012, 2010.
- PATRICK-IWUANYANWU, K. C.; AMADI, U.; CHARLES, I.A.; AYALOGU, E.O. Evaluation of acute and sub-chronic oral toxicity study Of Baker Cleansers Bitters - a polyherbal drug on experimental rats. **EXCLI Journal**, v. 11, p. 632–640, 2012.
- PINHEIRO, M.A.; MAGALHÃES, R.M.; TORRES, D.M.; CAVALCANTE, R.C.; MOTA, F.S.; COELHO, E.M.O.; MOREIRA, H.P.; LIMA, G.C.; ARAÚJO, P.C.; CARDOSO, J.H.; DE SOUZA, A.N.; DINIZ, L.R. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from Hyptis species. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. 41, p. 123–130, 2015.
- PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; OLIVEIRA, P.; COELHO, J.; CAVALEIRO, C. SALGUEIRO, L. Activity of Thymus caespititius essential oil and α -terpineol against yeasts and filamentous fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 107–112, 2014.
- POTRICH, F. B.; ALLEMAND, A.; DA SILVA, L.M.; DOS SANTOS, A.C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MENDES, D.A.; ANDRE, E.; WERNER, M.F.; MARQUES, M.C. 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-JUNIOR, L. J. OLIVEIRA, M.G.; SANTANA, M.F.; SANTANA, M.T.; GUIMARÃES, A.G.; SIQUEIRA, J.S.; DE SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.

alpha-Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 6, p. 583–586, 2011.

RAMAIAH, S. K. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. **Clinics in laboratory medicine**, v. 31, n. 1, p. 161–172, 2011.

RIBEIRO, A. R. S.; DINIZ, P.B.; PINHEIRO, M.S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.; 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.

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, n. 3, p. 433–443, 1979.

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, n. 2, p. 272–278, 2013.

SABINO, C. K. B.; FERREIRA-FILHO, E.S.; BEZERRA MENDES, M.B.; SILVA-FILHO, J.C.; PONTE, M.P.T.R.; MOURA, L.H.P.; OLIVEIRA, E.C.A.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; SANTOS, M.R.V.; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, A.P. Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 333–339, 2013.

SCHUNACK, W. Pharmacology of H₂-receptor antagonists: an overview. **The Journal of international medical research**, v. 17 Suppl 1, p. 9A–16A, 1989.

SHAY, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43–61, 1945.

SILVA, F. V, GUIMARÃES, A.G.; SILVA, E.R.; SOUSA-NETO, B.P.; MACHADO, F.D.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARCANJO, D.D.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R.C. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 11, p. 984–991, 2012.

SOSTRES, C.; LANAS, A. Epidemiology and Demographics of Upper Gastrointestinal Bleeding: Prevalence, Incidence, and Mortality. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 21, n. 4, p. 567–581, 2011.

SOUZA, R.; CARDOSO, M.; MENEZES, C.; SILVA, J.; DE SOUSA, D.; BATISTA, J. Gastroprotective activity of alpha-terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. **Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 277–281, 2011.

SUNG, J. J. Y.; KUIPERS, E. J.; EL-SERAG, H. B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 29, n. 9, p. 938–946, 2009.

SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TSUGAWA, H.; MOGAMI, S.; HIBI, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 50, n. 1, p. 35–39, 2012.

TAKAYAMA, C.; DE-FARIA, F.M.; DE ALMEIDA, A.C.; VALIM-ARAÚJO, D.A.; REHEN, C.S.; DUNDER, R.J.; SOCCA, E.A.; MANZO, L.P.; ROZZA, A.L.; SALVADOR, M.J.; PELLIZZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A.R. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n. 1, p. 147–155, 2011.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive diseases and sciences**, v. 50 Suppl 1, p. S24–33, 2005.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 360–366, 1999.

UEDA, S.; OKADA, Y. Acid secretagogues induce Ca^{2+} mobilization coupled to K^{+} conductance activation in rat parietal cells in tissue culture. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1012, n. 3, p. 254–260, 1989.

WADA, K. KAMISAKI, Y.; KITANO, M.; KISHIMOTO, Y.; NAKAMOTO, K.; ITOH, T. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. **Life sciences**, v. 59, n. 19, p. PL295–301, 1996.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W.; WILSON, T.L.; DEL SOLDATO, P.; CIRINO, G. Reduction of shock-induced gastric damage by a nitric oxide-releasing aspirin derivative: role of neutrophils. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 6 Pt 1, p. G1246–51, 1997.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512–520, 2000.

WASAN, K. M.; NAJAFI, S.; WONG, J.; KWONG, M.; PRITCHARD, P.H. Assessing plasma lipid levels, body weight, and hepatic and renal toxicity following chronic oral administration of a water soluble phytostanol compound, FM-VP4, to gerbils. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 4, n. 3, p. 228–234, 2001.

XIAO, Y. L.; NIE, Y.Q.; HOU, X.H.; XIE, P.Y.; FANG, J.Y.; YUAN, Y.Z.; ZHOU, L.Y.; ZHAO, N.Q.; CHEN, M.H. The efficacy, safety and cost-effectiveness of hydrotalcite versus esomeprazole in on-demand therapy of NERD: A multicenter, randomized, open-label study in China. **Journal of digestive diseases**, v. 14, n. 9, p. 463–468, 2013.

YASUKAWA, K. KASAZAKI, K.; HYODO, F.; UTSUMI, H. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in rats with water immersion restraint-induced

gastric lesions using in vivo electron spin resonance spectroscopy. **Free radical research**, v. 38, n. 2, p. 147–155, 2004.

ZANARDO, R. C. O.; BRANCALEONE, V.; DISTRUTTI, E.; FIORUCCI, S.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 12, p. 2118–2120, 2006.

ZHANG, J.Y.; WU, Q.F.; WAN, Y.; SONG, S.D.; XU, J.; XU, X.S.; CHANG, H.L.; TAI, M.H.; DONG, Y.F.; LIU, C. Protective role of hydrogen-rich water on aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 6, p. 1614–1622, 2014.

5 Capítulo III: Preparação e caracterização de nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol e seu efeito sobre modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em roedores.

Este capítulo abordará os resultados submetidos ao periódico internacional Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (Fator de impacto 2.376; Qualis B1 em Biotecnologia)

Preparação e caracterização de nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol e seu efeito sobre modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em roedores.

Helio de Barros Fernandes¹, Shayara Lopez Ciriaco³, André Luis Menezes Carvalho³, Hercília Maria Lins Rolim³, Anderson Nogueira Mendes², Marcio Nele de Souza⁴, José Carlos Costa da Silva Pinto⁴, Rita de Cássia M. Oliveira^{1,2,4*}

¹*Programa de pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Ponto focal – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI;*

²*Departamento de Biofísica e Fisiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI;*

³*Laboratório de Nanosistemas Farmacêuticos de Liberação Modificada, Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Centro de ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI;*

⁴*Instituto Alberto Luiz Coimbra de pós-graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ;*

⁵*Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI;*

⁶*Programa de pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.*

*Corresponding author: Rita de Cássia Meneses Oliveira, Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina, Brazil. Fone: +55 86 3215-5872, E-mail: menesesoliveira@gmail.com

Resumo

O α -terpineol, um monoterpeno constituinte do óleo essencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.F. Blake, *Cedrus deodara* Roxb. ex D.Don, apresentou atividade protetora gástrica em modelos de lesão aguda em roedores, mas é um composto lipofílico e apresenta curta meia-vida na circulação sanguínea. As nanopartículas poliméricas de polimetacrilato de metila (PMMA) são uma importante ferramenta na engenharia biomédica, por sua biocompatibilidade e propriedade estabilizante do princípio ativo e/ou da formulação. Este trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol (PMMA-Np-atp) e verificar seu efeito como protetor gástrico em modelos de lesão aguda em roedores. Nanopartículas contendo α -terpineol foram preparadas pela técnica de polimerização em miniemulsão. A formulação utilizada para o teste de atividade gastroprotetora (PMMA-Np-atp 8 %) apresentou um diâmetro médio de $796,8 \pm 88,34$ nm, índice de polidispersão de 0,532, potencial zeta de $-52,5 \pm 13,1$ mV e taxa de encapsulação de $74,07 \pm 3,03$. A redução da área da lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos tratados com PMMA-Np-atp 8 % (Dose equivalente a 0,75 mg/kg de O α -terpineol livre) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com α -terpineol (12,5 mg/kg). Essa formulação, ainda, reduziu progressivamente as lesões gástricas durante 1, 3 e 6 horas após sua administração ($19,21 \pm 1,78$, $14,41 \pm 1,92$ e $9,59 \pm 1,89$ %, respectivamente), mas sem diferença significativa em relação ao grupo tratado com α -terpineol 12,5 mg/kg após 6 horas de sua administração ($14,46 \pm 1,69$) e significativamente ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado com veículo e nanopartículas de PMMA sem o monoterpeno (PMMA-Np-atp 0 %) ($30,96 \pm 3,87$ e $31,88 \pm 4,33$ %, respectivamente). A técnica de polimerização em miniemulsão foi capaz de incorporar o α -terpineol à matriz de PMMA, mantendo suas propriedades gastroprotetoras com uma menor dose administrada.

Palavras-chave: Efeito gastroprotetor. Nanopartículas de PMMA. α -terpineol. Etanol.

Abstract

α -terpineol, a constituent monoterpene essential oil from *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.F. Blake and *Cedrus deodara* Roxb. ex D.Don, presented gastric protective activity against models of acute injury in rodents. However, it is a lipophilic compound and presents short half-life in the blood flow. The PMMA polymeric nanoparticles are an important tool in the biomedical engineering due to the biocompatibility and stability property of the active principle and/or formulation. The present work aims at preparing and characterizing Poly-(methyl metacrylate) (PMMA) nanoparticles containing α -terpineol (PMMA-Np- α tp) and then verifying their gastric protective effect in models of acute injury in rodents. Nanoparticles containing α -terpineol were prepared by means of the technique of polymerization in microemulsion. The formulation used for the gastroprotective activity assay (PMMA-Np- α tp 8 %) presented an average diameter of 796.8 ± 88.34 nm, polydispersity index of 0.532, zeta potential of -52.5 ± 13.1 mV and encapsulation rate of 74.07 ± 3.03 . The reduction of the gastric injury induced by absolute ethanol in mice treated with PMMA-Np- α tp 8 % (dose equivalent to 0.75 mg/kg of free α -terpineol) did not present significant difference in relation to the group treated with α -terpineol (12.5 mg/kg). This formulation also progressively reduced gastric lesions 1, 3 and 6 hours after its oral administration (19.21 ± 1.78 , 14.41 ± 1.92 and $9.59 \pm 1.89\%$, respectively), but with no significance difference in relation to the group treated with α -terpineol 12.5 mg / kg after 6 hours of its administration (14.46 ± 1.69) and significantly ($p < 0.05$) when compared to the group treated with vehicle and PMMA nanoparticles without the monoterpene (PMMA-Np- α tp 0 %) (30.96 ± 3.87 and $31.88 \pm 4.33\%$, respectively). The technique of polymerization in microemulsion, therefore, was able to incorporate α -terpineol to the PMMA matrix, keeping its gastroprotective properties with a lesser dose administered.

Keywords: Gastroprotective effect. PMMA nanoparticles. α -terpineol. Ethanol.

5.1 Introdução

Úlceras gástricas são lesões provocadas pela sobreposição dos fatores agressores sobre os protetores da mucosa gástrica (HUANG; LEE, 2014). O α -terpineol, um monoterpeneo constituinte do óleo essencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.F. Blake, *Cedrus deodara* Roxb. ex D.Don apresentou atividade protetora gástrica em modelo de lesão aguda em roedores (IRELAND et al., 2002; SOUZA et al., 2011; ZENG et al., 2012). Entretanto, o potencial terapêutico do α -terpineol apresenta algumas limitações farmacocinéticas como sua característica lipofílica e curta meia-vida na circulação sanguínea (12,5 minutos) (BHATIA; LETIZIA; API, 2008; TOBIN; SWERCZEK; BLAKE, 1976). Sob esse ponto de vista, pode-se lançar mão de estratégias para contornar essas restrições técnicas a fim de melhorar o potencial farmacológico e diminuir os desperdícios de matéria prima, como o sistema de transporte de fármacos nanoparticulados.

A nanotecnologia envolve o desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica /micrométrica com objetivo de melhorar a biodisponibilidade de um fármaco através do aumento de sua estabilidade nos fluidos biológicos ou ainda o aumento de estabilidade da própria formulação farmacêutica. (YUN; LEE; PARK, 2015). O poli-metacrilato de metila (PMMA) é um homopolímero sintético não-biodegradável atóxico com características hidrofóbicas, mas seu contato com soluções aquosas o torna levemente hidrofílico (JOHNSON; KREUTER; ZOGRAFI, 1986). O uso do poli-metacrilato de metila (PMMA) como biopolímero para preparação de nanopartículas é um marco na história da microencapsulação e suas primeiras aplicações foram no desenvolvimento de nanopartículas para veiculação de vacinas. Mais tarde foram relatadas a veiculação de antibióticos, anti-inflamatórios e antineoplásicos (BETTENCOURT; ALMEIDA, 2012, 2015; CORRY; MORAN, 1998; HEALEY et al., 2003; WEISS et al., 2009). As nanopartículas poliméricas de PMMA são uma importante ferramenta na engenharia biomédica, por sua biocompatibilidade e propriedade estabilizante da formulação. Por não haver relatos na literatura sobre preparação de nanopartículas contendo α -terpineol em PMMA com finalidade terapêutica para tratamento de lesões gástricas, esse trabalho tem como objetivo preparar e caracterizar nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol (PMMA-Np-atp) e verificar seu efeito protetor gástrico em modelos de lesão aguda em roedores.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Animais

Camundongos Swiss (25-30 g) machos e fêmeas e ratos Wistar (180-220 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*. Previamente a cada experimento, foram mantidos em jejum por 18 h e em seguida, aclimados ao ambiente de teste por 2 h. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos (n=6-7) diferentes. No modelo de lesões gástricas induzidas por ácido acético ou isquemia e reperfusão, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (50 e 5 mg/kg, i.m., respectivamente). Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados por tiopental de sódio (100 mg/kg, i.p.). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil (CEEA, número 008/12).

5.2.2 Preparação de nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol (PMMA-Np- α tp)

As PMMA-Np- α tp foram preparadas por polimerização em miniemulsão. O α -terpineol (proporção 0, 8, 15 e 30 % massa/massa da fase oleosa) foi adicionado ao coestabilizador hexadecano e solubilizado sob agitação magnética. Essa solução foi misturada ao monômero metacrilato de metila e mantida sob agitação magnética por 10 minutos. A fase aquosa foi preparada com adição e solubilização do bicarbonato de sódio (tampão) e lauril sulfato de sódio (tensoativo) à água sob agitação magnética por 10 minutos. Então, a fase oleosa foi adicionada a fase aquosa sob agitação magnética e, após 15 minutos, foi submetida à homogeneização por ultrassonicador (T25 Basic, Ika Labortechnik) na potência de 20 %/ 5 minutos para a obtenção da miniemulsão (tabela 1). A miniemulsão foi adicionada ao reator de vidro, sob agitação de 500 rpm a 80°C . Após alcançada a temperatura desejada para o processo, a polimerização foi induzida pela adição de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) com tempo de reação de 120 minutos. Com o fim da reação, o pH foi medido 24 horas após a preparação em pH-metro (Metrohm, modelo 780) e a secagem da formulação foi realizada em estufa ventilada (50°C / 12 horas) com pesagem da massa seca obtida.

5.2.3 Caracterização das PMMA-Np-atp

5.2.3.1 Taxa de polimerização do MMA em PMMA por gravimetria

A conversão por gravimetria é determinada como a razão entre a massa de polímero presente no reator e a massa de monômero alimentada. A massa de polímero é calculada a partir do resíduo seco obtido pela evaporação de uma amostra da solução retirada do reator durante a reação de polimerização em uma estufa com ventilação. Para calcular a massa de polímero, é necessário subtrair a massa de hidroquinona sólida (um inibidor da reação de polimerização) adicionada para parar a reação e a fração de sólidos não poliméricos presente no resíduo seco. Durante as reações, alíquotas em torno de 5 mL foram retiradas de dentro do reator com a ajuda de uma seringa. As amostras foram coletadas nos tempos 2, 6, 10, 20, 30, 45, 60 e 120 minutos. Recipientes (barquetas) feitos de papel de alumínio eram pesados e, em seguida, adicionaram-se 3 gotas de uma solução de hidroquinona a 1,0%, pesando novamente a amostra recolhida do reator. As amostras eram levadas a estufa por um período de 12 a 26 horas a 70°C. Após esse período o resíduo seco obtido era novamente pesado e a taxa de conversão (%/minuto) foi calculada pela equação:

$$Eq_1 \frac{\text{massa do polímero seco}}{\text{massa da amostra retirada do reator} \times \text{massa orgânica da formulação} / \text{massa total da formulação}} \times 100$$

Tabela 1. Formulações com diferentes teores de α -terpineol para preparação de PMMA-Np-atp.

Componentes		Massa
α -terpineol	0 %	-
	8 %	1,26 gramas
	15 %	2,4 gramas
	30 %	3,6 gramas
Hexadecano		0,36 grama
Metacrilato de metila		15,52 gramas
Lauril sulfato de sódio		0,8 grama
Bicarbonato de sódio		0,1 grama
Água		64,0 gramas

FONTE: Laboratório de Engenharia de Polímeros, ENGEPOL/COPPE-UFRJ, 2015.

5.2.3.2 Distribuição do tamanho de partículas e potencial zeta

A medida de tamanho de partícula e potencial zeta neste trabalho foi realizada utilizando equipamento ZETASIZER NANO ZS (modelo ZEN 3600, Malvern Instruments). O diâmetro médio das partículas foi medido pela Dispersão Dinâmica de Luz por intermédio da taxa de difusão das partículas através do fluido. O potencial zeta das formulações foi determinado por anemometria laser Doppler utilizando o equipamento. As amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido.

5.2.3.3 Análise térmica

A análise termogravimétrica foi realizada em equipamento TGA Mettler Toledo (modelo SDTA 851). As amostras foram submetidas a uma faixa de temperatura de 25 a 700°C com vazão de aquecimento de 10°C/min. Nesta análise foi utilizado Nitrogênio como gás de arraste na vazão de 50 mL/min.

5.2.3.4 Espectro do infravermelho por transformada de Fournier (FTIR)

As interações químicas entre o α -terpineol e o polímero foram realizadas por meio do espectômetro de infravermelho Shimadzu (IR Prestige-21) com varredura entre 400 e 4000 cm^{-1} .

5.2.3.5 Taxa de encapsulação

A eficiência de encapsulação e a carga encapsulada do α -terpineol foi medida de acordo com Keawchaoon e Yoksan, 2011. Uma massa correspondente a 10 mg da formulação foi introduzida em um béquer e o α -terpineol foi extraído da mesma com 40 ml de etanol absoluto, dado que o etanol é um solvente no qual o monoterpeno é muito solúvel, assim como penetra facilmente pela matriz de PMMA. Decorridos 60 minutos de agitação magnética, o material foi centrifugado a 20000 g/ 30 minutos, e o sobrenadante contendo α -terpineol solubilizado foi retirado e feita varredura (800 a 190 nm) em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Shimadzu 2700). A concentração do α -terpineol foi determinada pela absorvância obtida na varredura, lançando o valor em

uma equação da absorvância obtida em função da concentração do monoterpene em uma curva de calibração previamente elaborada. Para calcular a taxa de encapsulação e a carga encapsulada do α -terpineol contida na amostra, foram utilizadas as equações 1 e 2 descritas abaixo:

$$\text{Eq}_2 \text{ Taxa de encapsulação} = \frac{\text{massa de } \alpha\text{-terpineol extraída}}{\text{massa total de } \alpha\text{-terpineol adicionada na preparação}} \times 100$$

$$\text{Eq}_3 \text{ Carga encapsulada} = \frac{\text{massa de } \alpha\text{-terpineol encapsulada}}{\text{massa total da preparação}} \times 100$$

5.2.4 Efeito protetor gástrico de PMMA-Np- α tp em modelos de lesão aguda induzida por etanol absoluto em camundongos

Foram utilizados cinco grupos (n=6) de animais, tratados com veículo (solução de tween 80 a 3%), α -terpineol (12,5mg/kg), carbenoxolona (100 mg/kg), nanopartículas compostas apenas com PMMA (PMMA-Np- α tp 0%) e outra contendo α -terpineol (PMMA-Np- α tp 8%) - ambas 12,5mg de formulação/kg de peso. Após 60 minutos (para todos os grupos) ou 180 e 360 minutos (para animais tratados com PMMA-Np- α tp 8 %), lesões gástricas foram induzidas pela administração oral de 0,2 mL/animal de etanol absoluto (ROBERT et al., 1979). Os animais foram eutanasiados 30 minutos após a administração de etanol e os estômagos foram removidos e abertos ao longo da curvatura maior. As áreas totais das lesões foram medidas usando um programa de planimetria computadorizada (ImageJ-NIH[®]) e expressos em termos de porcentagem de área de lesão (BHARGAVA; GUPTA; TANGRI, 1973). A área da lesão foi calculada como se segue:

$$\text{Eq}_4 \text{ Área da lesão}(\%) = \frac{\text{Área de lesão (mm}^2\text{)}}{\text{Área total (mm}^2\text{)}} \times 100$$

5.2.5 Análise estatística

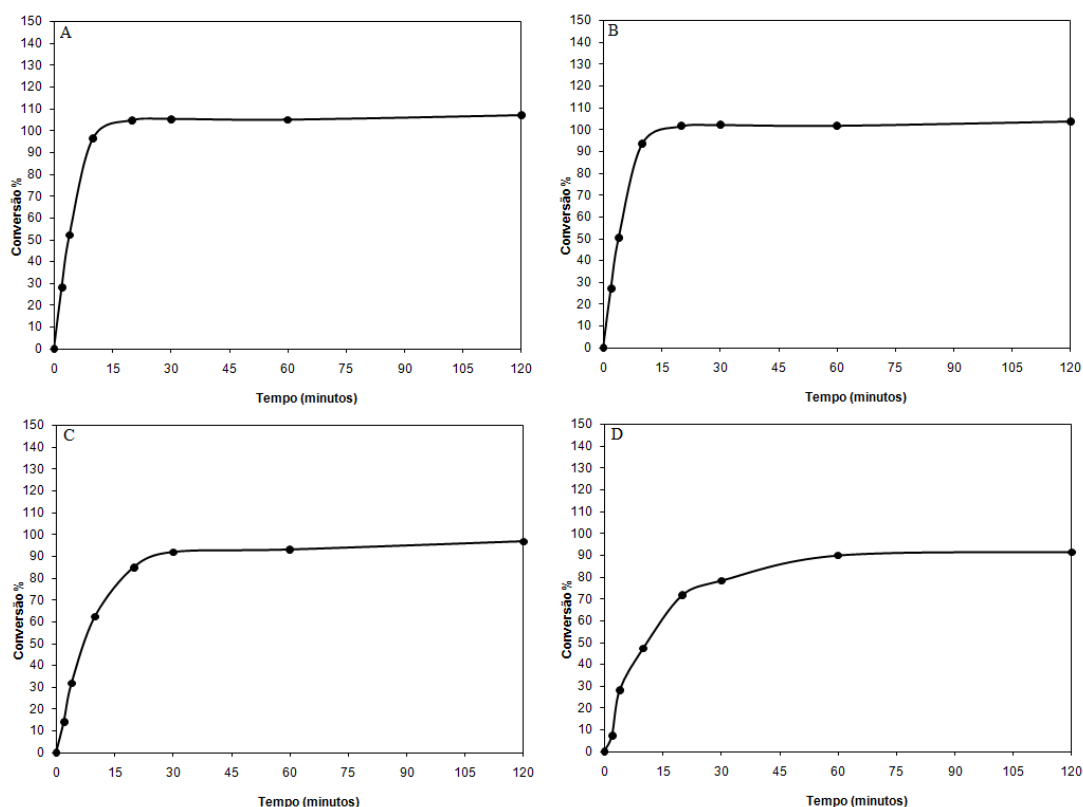
Os resultados são expressos como média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.). A significância estatística das diferenças entre grupos foi calculada por análise de variância (ANOVA) e pelo pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad PrismTM5.0 (San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.3 Resultados

5.3.1 Taxa de conversão e pH das formulações

A taxa de conversão nos parâmetros utilizados na reação de polimerização foi de 100 % nas formulações PMMA-Np-atp 0 % e 8 %. As formulações de PMMA-Np-atp 15% e 30% apresentaram taxa de conversão de 96,82 e 91,52 %, respectivamente, dentro do tempo de reação estipulado (Figura 1). Baseados nestes dados, a formulação escolhida para os estudos de caracterização e atividade contra úlceras induzidas por etanol absoluto foi PMMA-Np-atp 8 % e o tempo de reação foi diminuído para 35 minutos uma vez que a partir do minuto 20, tem-se taxa de conversão de 100%. Embora todas as formulações tenham apresentado diminuição do pH ao longo de 12 meses, os maiores decaimentos foram observados em PMMA-Np-atp 15% e 30 % (Tabela 2).

Figura 1. Taxa de conversão (%/min) das reações de polimerização de metacrilato de metila em miniemulsão.



LEGENDAS: A - PMMA-Np-atp 0%; B - PMMA-Np-atp 8%; C - PMMA-Np-atp 15%; D - PMMA-Np-atp 30%.

FONTE: Laboratório de Engenharia de Polímeros, ENGEPOL/COPPE-UFRJ, 2015.

Tabela 2. pH das formulações após 24 horas e 12 meses de preparação em suspensão.

Formulação	pH/tempo	
	24hs	12 meses
PMMA-Np- α tp 0%	8,26	8,56
PMMA-Np- α tp 8%	8,12	7,94
PMMA-Np- α tp 15%	8,33	7,03
PMMA-Np- α tp 30%	8,27	6,95

FORNTE: Laboratório de Engenharia de Polímeros, ENGEPOL/COPPE-UFRJ, Rio de Janeiro – RJ; Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal, NPPM-UFPI, Teresina – PI, 2016.

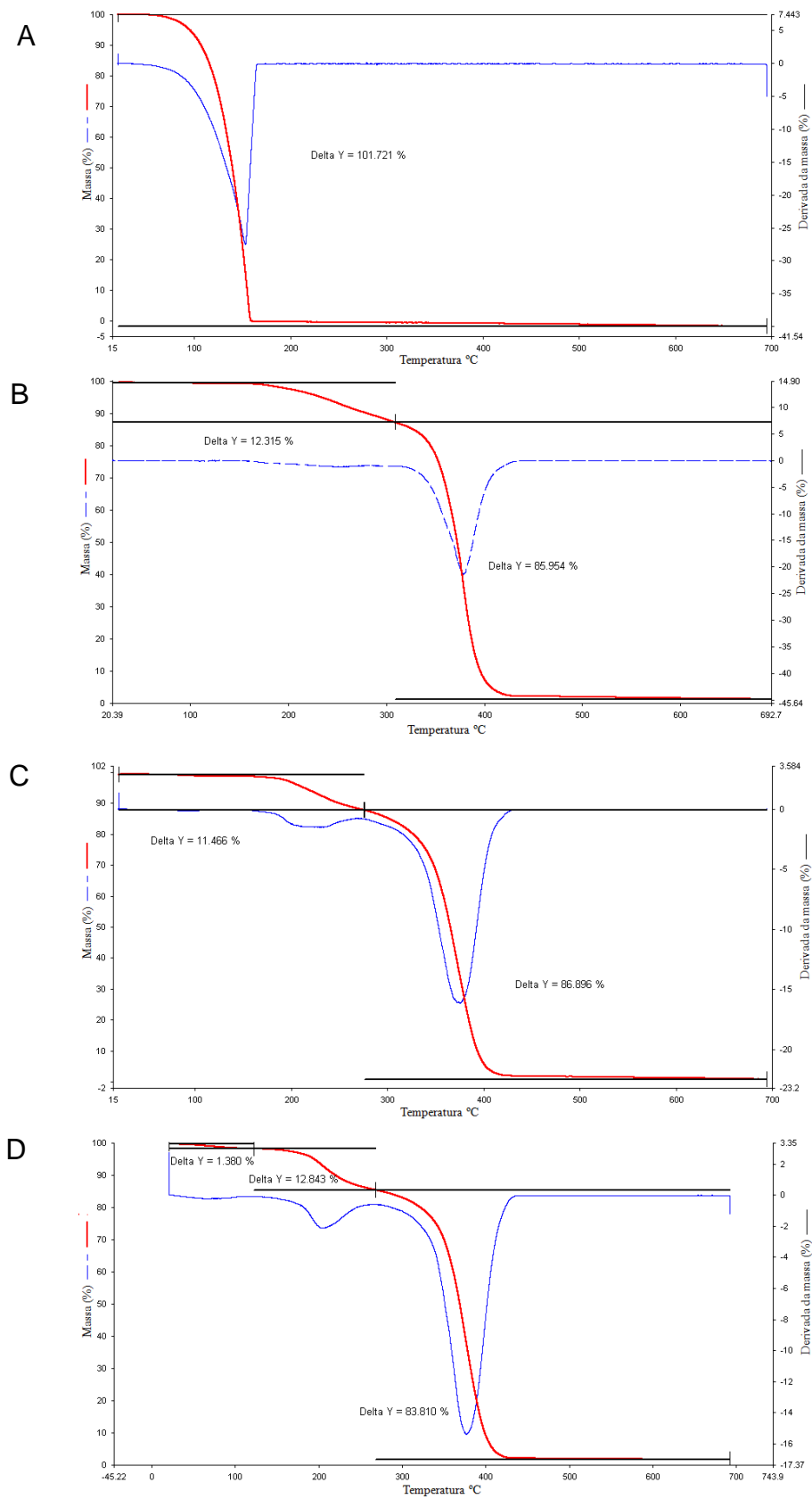
5.3.2 Análise térmica

A figura 2 ilustra a análise térmica do α -terpineol puro, PMMA-Np- α tp 0, 8 e 15 %. A perda de massa do monoterpeno puro se inicia em 57°C e sua temperatura de decomposição (pico da curva diferencial) encontra-se em 153 °C. Para a PMMA-Np- α tp 0 %, observou-se uma de decaimento de massa em duas fases: a primeira, a partir de 157 °C, e a segunda, 273 °C até a decomposição total do polímero, em 430 °C. Em PMMA-Np- α tp 8 e 15 %, a diminuição da massa é seguida em três etapas: a primeira iniciada em 52 a 110 °C, a segunda entre 138 a 264 °C e a terceira, 276 a 463 °C. Nota-se também diminuição da área referente ao decaimento do polímero entre PMMA-Np- α tp 8 e 15 % (86,9 % vs. 83,8 %, respectivamente).

5.3.3 Espectro infravermelho

No espectro de infravermelho (EIV) do α -terpineol puro (figura 3A), foi observado picos em 3450 cm^{-1} e 2970 a 2900 cm^{-1} ; tais valores diminuem de intensidade após o processo de polimerização do PMMA junto ao monoterpeno em PMMA-Np- α tp 8 % e 15 % (figuras 3C e 3D, respectivamente), predominando bandas em 1700 cm^{-1} e em 1190 a 1240 cm^{-1} , encontradas em PMMA-Np- α tp 0 % (figura 3B). Entretanto, pôde-se perceber uma distensão das bandas retraídas na mistura física do α -terpineol com PMMA (figura 3E).

Figura 2. Análise térmica de α -terpineol, PMMA-Np-atp 0% e PMMA-Np-atp 8%.



LEGENDAS: A - α -terpineol; B - PMMA-Np-atp 0%; C - PMMA-Np-atp 8%; D - PMMA-Np-atp 15 %.

FONTE: Laboratório de Engenharia de Polímeros, ENGEPOL/COPPE-UFRJ, 2015.

5.3.4 Distribuição do tamanho das partículas, potencial zeta e taxa de encapsulação

As PMMA-Np- α tp 8% apresentaram diâmetro médio das partículas de $796,8 \pm 88,34$ nm, com índice de polidispersão de 0,532 e potencial zeta de $-52,5 \pm 13,1$ mV (Tabela 3). A fim de confirmar que o α -terpineol estava incorporado à matriz, fez-se uma varredura por espectrometria na faixa UV-Visível absorvida pelo monoterpeneo (200-230 nm) no material extraído com etanol absoluto a partir da formulação PMMA-Np- α tp 8%, com posterior centrifugação. O pico foi em 202 nm, sem absorbância nesta região em PMMA-Np- α tp 0% extraído com o mesmo solvente, confirmando a presença do alfa-terpineol em PMMA-Np- α tp 8%, sem interferências dos componentes da formulação neste comprimento de onda (figura 4). Pelas absorbâncias obtidas das varreduras das formulações PMMA-Np- α tp 8%, obteve-se uma eficiência e carga de encapsulação de $74,07 \pm 3,03$ % e 5,92 %, que, em termos numéricos, significam que em 100 mg de formulação seca tem-se, em média, 5,92 mg de α -terpineol (BAKKALI et al., 2008).

Tabela 3. Tamanho da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação, carga de encapsulado de PMMA-Np- α tp 8%.

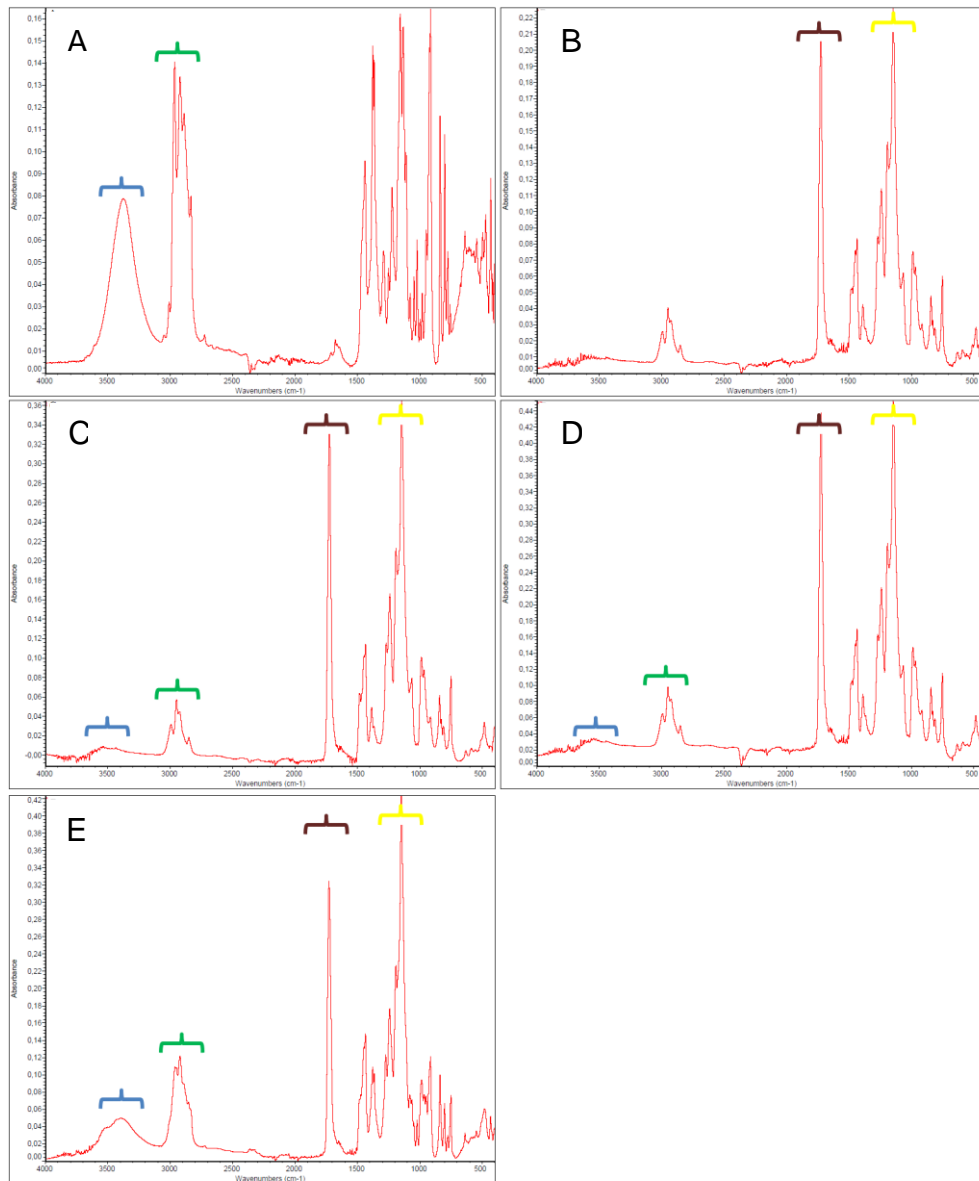
Diâmetro médio da partícula (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)	Carga de encapsulado (%)
796,8 \pm 88,34	0,532	-52,5 \pm 13,1	74,07 \pm 3,03	5,93 \pm 3,03

FONTE: Laboratório de Engenharia de Polímeros, ENGEPOL/COPPE-UFRJ, Rio de Janeiro - RJ; Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, LIMAV-UFPI, Teresina - PI 2016.

5.3.5 Efeito protetor gástrico de PMMA-Np- α tp em modelos de lesão aguda induzida por etanol absoluto em camundongos

A administração do PMMA-Np- α tp 8 % (que corresponde a uma dose de 0,75 mg/kg de α -terpineol) em camundongos, reduziu as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto progressivamente após 6 horas do tratamento a $19,21 \pm 1,78$, $14,41 \pm 1,92$ e $9,59 \pm 1,89$ %, para os tempos de 1, 3 e 6 horas, respectivamente, de forma significativa tanto com o controle negativo (veículo, $30,96 \pm 3,87$ %) como PMMA-Np- α tp 0 % ($31,88 \pm 4,33$ %) (Figura 5).

Figura 3. Espectros de IV do α -terpineol, PMMA-Np-atp 0%, PMMA-Np-atp 8%, PMMA-Np-atp 15 % e mistura física entre α -terpineol e PMMA-Np-atp 0%.

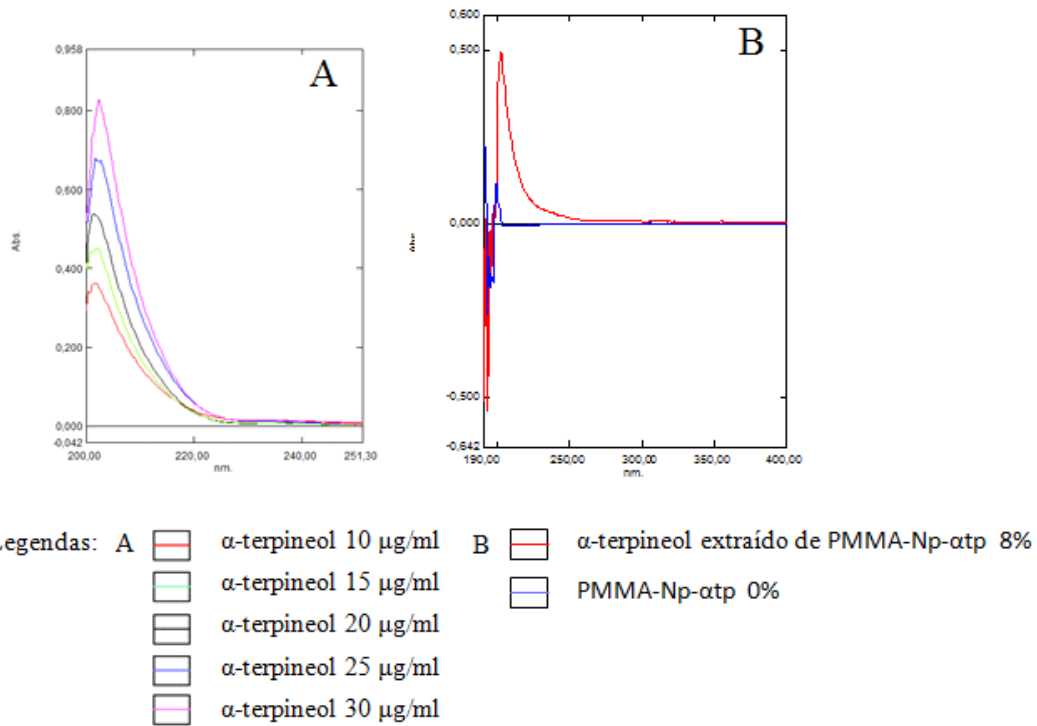


LEGENDA: A - α -terpineol; B - PMMA-Np-atp 0 %; C - PMMA-Np-atp 8 %; D - PMMA-Np-atp 8 %; E - mistura física α -terpineol:PMMA-Np-atp 0 %.

■ 1190 – 1240 cm^{-1} ■ 1700 cm^{-1} ■ 2970 – 2900 cm^{-1} ■ 3450 cm^{-1}

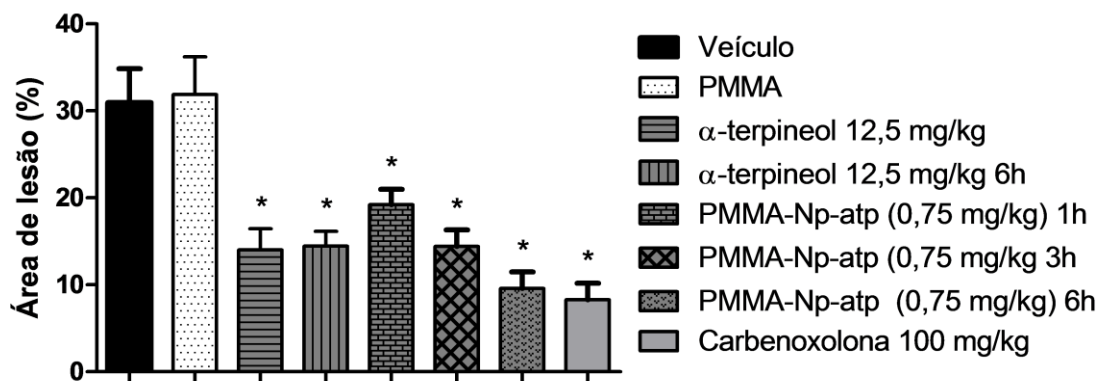
FONTE: Laboratório de Engenharia de Polímeros, ENGEPOP/COPPE-UFRJ, 2015.

Figura 4. Varreduras de α -terpineol livre ou extraído de PMMA-Np-atp 8% e PMMA-Np-atp 0% com etanol.



FONTE: Laboratório de Engenharia de Polímeros, ENGEPOL/COPPE-UFRJ, 2015.

Figura 5. Efeito de PMMA-Np-atp 8% sobre lesões induzidas por etanol absoluto em camundongo após 1, 3 e 6 horas de tratamento. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. grupo veículo; # $p < 0.05$ vs. grupo PMMA-Np-atp 0%.



FONTE: Laboratório de Farmacologia Gastrointestinal – NPPM/UFPI, 2016.

5.4 Discussão

O aumento da porcentagem de princípio ativo na composição da formulação levou a uma diminuição das taxas de conversão de PMMA-Np- α t 15 e 30%. Quando as gotas de monômero se exaurem, a reação continua até o consumo completo do monômero existente nas partículas poliméricas. Nesta etapa há o crescimento da cadeia, levando ao aumento da viscosidade do sistema, que pode ocasionar uma redução da constante cinética de término de reação e resultando no aumento da taxa de polimerização, provocando o chamado “efeito gel”. O efeito gel dificulta o encontro de radicais eventualmente presentes nas partículas, retardando seu encontro para a promoção da etapa de finalização da reação. O óleo exerce uma forte influência sobre a cinética de reação, seja por causa de um possível efeito inibidor ou por um efeito de diluição do monômero (TEO; ASHOKKUMAR; GRIESER, 2011). Devido às características oleosas, o α -terpineol possivelmente exerce efeito inibidor da reação de polimerização nas condições utilizadas.

A diminuição do pH observada em emulsões de nanopartículas de PMMA pode ser atribuída à dissociação dos grupos carboxílicos do polímero ou, ainda, pela formação de ácido carboxílico em meio aquoso por hidrólise de monômeros não reagentes (LÓPEZ et al., 2008). Uma vez que as taxas de conversão de PMMA-Np- α t 15 e 30% foram menores que 100%, há monômeros não polimerizados livres na formulação final, disponibilizando mais grupos carboxílicos por sua hidrólise, reduzindo mais acentuadamente o pH do que em PMMA-Np- α t 0 e 8 %.

Houve mudanças no perfil termogravimétrico de α -terpineol após sua encapsulação em matriz de PMMA. Um estudo de degradação térmica do PMMA puro por termogravimetria mostrou que o polímero se degrada em três etapas, nas temperaturas de 180, 250 e 350 °C (DONG; NI, 2004). O mecanismo de decaimento envolve clivagem de cadeias laterais de terminações vinila ($-\text{H}_2\text{C} - \text{CCH}_3\text{CO}-$) na primeira fase, ruptura das cadeias principais poliméricas ($-\text{CH}_2\text{HC} - \text{CCH}_2\text{CH}-$) na segunda e clivagem aleatória das cadeias poliméricas na terceira. Nos resultados obtidos neste trabalho, entretanto, o polímero sem o fármaco se degradou em 157 e 273 °C, pois a clivagem das cadeias poliméricas vinílicas da primeira fase pode se prolongar até a segunda etapa e mascarar a curva final de degradação (VIRATYAPORN; LEHMAN, 2011).

Em PMMA-Np-atp 8 e 15 %, a redução de massa entre 52 e 110 °C possivelmente compreende a perda de massa de α -terpineol das formulações, visto que neste intervalo há diminuição da quantidade do monoterpeneo, e não de PMMA, como apresentado em suas respectivas curvas termogravimétricas na figura 2. No segundo intervalo de decaimento dessas formulações (138 – 264 °C), pode-se inferir, também, que há decréscimo gravimétrico pela perda de fármaco, pois quando se aumenta a quantidade de princípio ativo adicionado no preparo das nanopartículas (de 8 para 15 % de fármaco), observa-se aumento da perda de massa com elevação térmica nos intervalos de temperatura citados. A queda de massa referente ao α -terpineol pode estar relacionada a dois fatores: no primeiro intervalo, pode estar relacionada à liberação do fármaco adsorvido na superfície da matriz de PMMA e, no segundo intervalo, à degradação térmica do princípio ativo, que ocorre na faixa de 157 °C (WORANUCH; YOKSAN, 2013).

A técnica FTIR identifica a composição química de um material através da presença de seus grupamentos funcionais dentro de faixas espectrais do infravermelho. Na análise do espectro FTIR do α -terpineol (figura 3A), a banda em 3450 cm^{-1} representa seu grupamento alcoólico (-OH), 1350 a 1440 cm^{-1} indicam as vibrações da ligação C – H do anel ciclohexeno, e entre 2970 e 2900 cm^{-1} , as vibrações de estiramentos de C – H dos grupamentos metil e metileno; e para o PMMA, suas características nesta análise residem principalmente nos estiramentos do seu grupamento éster (C = O em 1700 cm^{-1} , e C – O – C, em 1230 a 1240 cm^{-1}) (SINGHO et al., 2012; WIJAYATI, NANIK., DWI PRANOWO, 2011). A presença de picos crescentes característicos do espectro do α -terpineol nas preparações PMMA-Np-atp 8 e 15 % é indício de sua incorporação na matriz de PMMA e a discrepância entre os picos do monoterpeneo e do polímero nos espectros é reflexo das diferenças quantitativas dos mesmos na formulação, visto que FTIR também é um método quantitativo indireto (WORANUCH; YOKSAN, 2013).

O índice de polidispersão (PDI) é um parâmetro que indica a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas. Valores de PDI acima de 0,5 são descritos na literatura como indicativo de uma ampla distribuição de tamanhos e valores abaixo disso representam conjunto de partículas de tamanho mais uniforme (LIU; WU, 2010). O alto valor de PDI de PMMA-Np-atp 8% (0,523, tabela 2) pode ser explicado pelo limitado tempo de sonicação (5 minutos) ou ainda pela baixa potencia utilizada pelo ultrassom (20 %), pois, uma reduzida área de sonicação exige mais tempo para que

todo o fluido passe pela região onde ocorre a quebra das gotas e uma maior amplitude de onda aplicada promove aumento da quebra das gotas, pela maior quantidade de energia fornecida ao sistema. (EL-JABY et al., 2009). O potencial zeta negativo ($-52,5 \pm 13,1$, tabela 3) justifica-se pelo uso do surfactante aniônico, lauril sulfato de sódio, que, com seus átomos de oxigênio tem importantes propriedades eletronegativas, conferindo carga negativa na superfície das nanopartículas (BRUXEL et al., 2012). A taxa de encapsulação de $74,07 \pm 3,03$ % pode ser justificada pela quantidade de hidrófobo (hexadecano) na formulação, que possivelmente não foi capaz de impedir a difusão do princípio ativo para a fase aquosa durante a preparação da emulsão ou pela sua degradação com aquecimento.

O etanol absoluto é um agente indutor de lesões agudas capaz de reduzir as barreiras protetoras gástricas, expondo a mucosa à ação de sua secreção ácida, representando uma ótima ferramenta em estudos iniciais de atividade antiúlcera (SUZUKI et al., 2012). O tratamento com α -terpineol (12,5 mg/kg) assim como sua formulação PMMA-Np- α tp 8 % (correspondendo a dose de 0,75 mg/kg de α -terpineol) reduziram a área de lesão da mucosa gástrica de camundongo induzida por etanol absoluto, no entanto, apenas o produto nanoparticulado diminuiu gradativamente a área de lesão gástrica induzida no decorrer de 6 horas após o tratamento. O fenômeno de interação-difusão- liberação do princípio ativo das nanopartículas com os líquidos no interior da mucosa gástrica podem explicar a diferença no efeito protetor gástrico. Partículas com tamanho médio acima de 400 nm (tamanho médio das partículas da PMMA-Np- α tp 8 % - $796,8 \pm 88,34$) levam até 60 minutos para sua estabilização e início do processo de difusão através do muco gástrico até alcançarem os enterócitos. Ainda, a liberação gradual e contínua do fármaco leva a suas concentrações crescentes otimizando seu efeito no trato gastrointestinal (DURRER et al., 1994; HUSSAIN; JAITLEY; FLORENCE, 2001).

A preparação da formulação de nanopartículas por miniemulsão, portanto, mostrou-se uma metodologia viável para incorporar α -terpineol a matriz polimérica de PMMA e manter seu efeito protetor gástrico ao longo tempo de maneira similar ao composto livre, porém, em dose menor.

Agradecimentos

Somos gratos a UFPI (Universidade Federal do Piauí, Brasil), Universidade Federal do Rio de Janeiro (Coppe-UFRJ), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) pelo apoio financeiro. Além disso, não há conflito de interesse relacionado com este estudo.

5.5 Referencias

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BETTENCOURT, A.; ALMEIDA, A. J. Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 4, p. 353–367, 2012.

BETTENCOURT, A.; ALMEIDA, A. J. Poly(Methyl Methacrylate) (PMMA): Drug Delivery Applications. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**, p. 6511–6525, 2015.

BHARGAVA, K. P.; GUPTA, M. B.; TANGRI, K. K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. **European journal of pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 191–195, 1973.

BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on alpha-terpineol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11 SUPPL., p. 280–285, 2008.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CORRY, D.; MORAN, J. Assessment of acrylic bone cement as a local delivery vehicle for the application of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 19, n. 14, p. 1295–1301, 1998.

DONG, C.; NI, X. The Photopolymerization and Characterization of Methyl Methacrylate Initiated by Nanosized Titanium Dioxide. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 41, n. 5, p. 547–563, 2004.

DURRER, C. IRACHE, J.M.; PUISIEUX, F.; DUCHÊNE, D.; PONCHEL, G. Mucoadhesion of latexes. I. Analytical methods and kinetic studies. **Pharmaceutical research**, v. 11, n. 5, p. 674–679, 1994.

EL-JABY, U.; FARZI, G.; BOURGEAT-LAMI, E.; CUNNINGHAM, M.; MCKENNA, T.F.L. Emulsification for Latex Production Using Static Mixers. **Macromolecular Symposia**, v. 281, n. 1, p. 77–84, 2009.

HEALEY, J. H.; SHANNON, F.; BOLAND, P.; DIRESTA, G. R. PMMA to stabilize bone and deliver antineoplastic and antiresorptive agents. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 415 Suppl, p. S263–75, 2003.

HUANG, T.-C.; LEE, C.-L. Diagnosis, treatment, and outcome in patients with bleeding peptic ulcers and Helicobacter pylori infections. **BioMed research international**, v. 2014, p. 658108, 2014.

- HUSSAIN, N.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 50, n. 1-2, p. 107–142, 2001.
- IRELAND, B. F.; IRELAND, B. F.; HIBBERT, D.B.; GOLDSACK, R.J.; DORAN, J.C.; BROPHY, J.J. Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 5, p. 457–470, 2002.
- JOHNSON, B. A.; KREUTER, J.; ZOGRAFI, G. Effects of surfactants and polymers on advancing and receding contact angles. **Colloids and Surfaces**, v. 17, n. 4, p. 325–342, 1986.
- KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163–171, 2011.
- LIU, C. H.; WU, C. T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, n. 2-3, p. 149–156, 2010.
- LÓPEZ, A.; CHEMTOB, A.; MILTON, J.L; MANEA, M.; PAULIS, M.; BARANDIARAN, M.J.; THEISINGER, S.; LANDFESTER, K.; HERGETH, W.D.; UDAGAMA, R.; MCKENNA, T.; SIMAL, F.; ASUA, J.M. Miniemulsification of Monomer-Resin Hybrid Systems. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 16, p. 6289–6297, 1 2008.
- 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, n. 3, p. 433–443, 1979.
- SINGHO, N. D.; LAH, N. A. C.; JOHAN, M. R.; AHMAD, R. FTIR studies on silver-poly(methylmethacrylate) nanocomposites via in-situ polymerization technique. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 6, p. 5596–5603, 2012.
- SOUZA, R.; CARDOSO, M.; MENEZES, C.; SILVA, J.; DE SOUSA, D.; BATISTA, J. Gastroprotective activity of alpha-terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. **Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 277–281, 2011.
- SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TSUGAWA, H.; MOGAMI, S.; HIBI, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 50, n. 1, p. 35–39, 2012.
- TEO, B. M.; ASHOKKUMAR, M.; GRIESER, F. Sonochemical polymerization of miniemulsions in organic liquids/water mixtures. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 13, n. 9, p. 4095–4102, 2011.

TOBIN, T.; SWERCZEK, T. W.; BLAKE, J. W. Pine oil toxicity in the horse: drug detection, residues and pathological changes. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 291–301, 1976.

VIRATYAPORN, W.; LEHMAN, R. L. Effect of nanoparticles on the thermal stability of PMMA nanocomposites prepared by in situ bulk polymerization. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 103, n. 1, p. 267–273, 2011.

WEISS, B. D.; WEISS, E. C.; HAGGARD, W. O.; EVANS, R. P.; MCLAREN, S. G.; SMELTZER, M.S. Optimized elution of daptomycin from polymethylmethacrylate beads. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 264–266, 2009.

WIJAYATI, NANIK., DWI PRANOWO, H. Synthesis of Terpeneol From α -Pinene Catalyzed By Tca / Y-Zeolite. v. 11, n. 3, p. 234–237, 2011.

WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 578–585, 2013.

YUN, Y. H.; LEE, B. K.; PARK, K. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 2–7, 2015.

ZENG, W.-C.; ZHANG, Z.; GAO, H.; JIA, L. R.; HE, Q. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oil from pine needle (*Cedrus deodara*). **Journal of food science**, v. 77, n. 7, p. C824–9, 2012.

6 Considerações finais

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o α -terpineol:

- Apresentou atividade protetora gástrica contra lesões agudas em camundongo e rato;
- Mostrou atividade cicatrizante na redução de úlceras induzidas em modelo crônico em rato;
- Não apresentou sinais de toxicidade durante 7 dias de tratamento por via oral em ratos;
- Exibiu atividade gastroprotetora provavelmente por ação antioxidante, anti-inflamatória, produtora de muco e cicatrizante.
- Foi incorporado a nanopartículas de PMMA pela técnica de miniemulsão;
- Presente nas nanopartículas de PMMA apresentou atividade gastroprotetora em modelo de lesão aguda por etanol absoluto em doses menores do que o monoterpeno não encapsulado.

A partir dos resultados apresentados nesta tese, a preparação de nanopartículas contendo α -terpineol e seus efeitos sobre lesões gástricas em roedores tem as seguintes perspectivas:

- Continuar os estudos *in vivo* com a formulação preparada com ensaios crônicos e de toxicidade
- Realizar estudo de cinética de liberação da formulação preparada para os estudos *in vivo*;
- Realizar análise de microscopia eletrônica de transmitância para complementar o estudo do tamanho e distribuição de partículas;
- Realizar análise de ressonância magnética nuclear para complementar o estudo de interações químicas entre α -terpineol e o polímero;
- Otimizar o processo de preparação de nanopartículas contendo α -terpineol em miniemulsão, a fim de melhorar as características da formulação, aumentar a taxa de incorporação e uniformizar o tamanho das partículas;

- Preparar nanopartículas contendo α -terpineol a partir de outros polímeros e realizar o estudo comparativo com formulações já produzidas;

7 Outras atividades desenvolvidas

7.1 Artigos publicados em periódicos

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.

7.2 Trabalhos apresentados em eventos

SILVA, F.V. ; OLIVEIRA, I.S ; **FERNANDES, H.B.** ; ARAUJO, A. A. S. ; QUINTANS-JUNIOR, L. J. ; OLIVEIRA, RITA C.M. . 'Efeito gastroprotetor e cicatrizante do (-)-Linalol livre e incorporado em β -ciclodextrina em modelos animais. In: III Simpósio latino-americano de biotecnologia do nordeste- III SLAB Encontro Luso Brasileiro de Biotecnologia, 2015, Parnaíba-PI. III Simpósio latino-americano de biotecnologia do nordeste- III SLAB Encontro Luso Brasileiro de Biotecnologia, 2015.

OLIVEIRA, I.S ; SILVA, F.V. ; **FERNANDES, H.B.** ; ARAÚJO, ADRIANO ANTUNES DE SOUZA ; QUINTANS-JUNIOR, L. J. ; OLIVEIRA, RITA C.M. . Redução da peroxidação lipídica e da atividade da enzima mieloperoxidase no efeito gastroprotetor do Borneol livre ou complexado em β -ciclodextrina. In: III Simpósio Latino Americano de Biotecnologia do Nordeste - III SLAB Encontro Luso Brasileiro de Biotecnologia, 2015, Parnaíba-PI.

FERNANDES, H.B ; LIRA, K. L. ; SILVA, F.V. ; Carvalho, E. F. ; Leite, J. R. S. A. ; OLIVEIRA, R. C. M. . Atividade gastroprotetora da polpa de beterraba em camundongos. In: III Simpósio Latino Americano de Biotecnologia do Nordeste - III SLAB Encontro Luso Brasileiro de Biotecnologia, 2015, Parnaíba-PI.

VIANA, A. F. S. C. ; **FERNANDES, H.B** ; SILVA, F.V. ; OLIVEIRA, I.S ; LIRA, K. L. ; CHAVES, M. H. ; OLIVEIRA, RITA C.M. . Atividade gastroprotetora do chá de *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire em modelo de úlcera induzida por etanol.. In: I Simpósio Nordestino de Recursos Naturais e Potencialidades

Terapêuticas, 2015, teresina. I Simpósio Nordestino de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, 2015.

FERNANDES, H.B ; VIANA, A.F.S.C ; SILVA, F.V. ; LIMA, G. S. ; COSTA, C. ; Chaves, M.H. ; Oliveira, F. A. ; OLIVEIRA, R. C. M.. Efeito antioxidante e gastroprotetor da fração hidroalcoólica do extrato etanólico de *Cenostigma macrophyllum* Teles Freire.. In: Fesbe, 2013, Caxambu-MG. Fesbe, 2013.