

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS**

KATHARINNE INGRID MORAES DE CARVALHO



**EFEITO DO GERANIOL SOBRE A DOENÇA ULCEROSA
PÉPTICA EXPERIMENTAL**

**BOTUCATU (SP)
FEVEREIRO DE 2012**

KATHARINNE INGRID MORAES DE CARVALHO



EFEITO DO GERANIOL SOBRE A DOENÇA ULCEROSA PÉPTICA EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof. Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima

**BOTUCATU (SP)
FEVEREIRO DE 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Carvalho, Katharinne Ingrid Moraes de.

Efeito do geraniol sobre a doença ulcerosa péptica experimental / Katharinne Ingrid Moraes de Carvalho. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 21001006

1. Úlcera péptica. 2. Sistema gastrointestinal – Doenças. 3. Essências e óleos essenciais.

Palavras-chave: Gastroproteção; Geraniol; Óleo Essencial; Úlcera péptica.

KATHARINNE INGRID MORAES DE CARVALHO



**EFEITO DO GERANIOL SOBRE A DOENÇA ULCEROSA
PÉPTICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia.

Comissão Examinadora:

1º Titular/Presidente: Prof. Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima
(UNESP/Botucatu)

2º Titular: Prof. Dr. Marcos José Salvador (UNICAMP/Campinas)

3º Titular: Prof. Adj. Luiz Claudio Di Stasi (UNESP/Botucatu)

**BOTUCATU (SP)
FEVEREIRO DE 2012**

Auxílio Financeiro:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



Dedico aos meus amados PAIS, **Sebastião Moraes de Carvalho e Maria de Fátima Costa**, por serem os maiores incentivadores nessa minha busca incessante pelo conhecimento. Os melhores exemplos de ética, profissionalismo, fonte inesgotável de apoio, razão da minha vida.

“Se não deu certo, apague e recomece. Esqueça o que ficou, esqueça a dúvida, o que foi quase engano. É sempre hora de mudar, de virar a página e se reinventar. Mesmo que doa, aprender não é um processo à toa.” (FERNANDA MELLO)

“Se queremos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova.” (GANDHI)

Mudar, evoluir, amadurecer, melhorar, progredir!! Esses são os princípios básicos que sempre nortearam minha vida e me fizeram buscar o melhor e me aperfeiçoar. Muitas graças conquistei, muitas coisas ainda preciso correr atrás, o presente é agora, o futuro já não sei, mas ter a certeza de que terei pessoas amigas ao meu lado, torcendo, desejando sucesso, me faz ir além e não temer o que está por vir. Enfim, nesse momento de concretização de mais uma etapa, um sentimento irradia meu coração e me faz querer compartilhá-lo com as pessoas que muito contribuíram para a realização desse projeto, mais do que um projeto de mestrado, um projeto de vida. Só tenho a agradecer nesse momento de tamanha felicidade!!

Primeiramente a **Deus**, por ser o alicerce da minha vida, por me guiar sempre, acalmar meu coração e não deixá-lo nunca perder a fé e a esperança.

Aos meus amados pais, **Sebastião Moraes e Maria de Fátima**, por me concederem o livre-arbítrio. Sempre preocupados em oferecer o melhor, sem medir esforços. Conviver com a saudade foi difícil, saudade do meu querido Piauí, de vocês, mas foi necessário para que eu amadurecesse. Poder contar com vocês, ainda que de longe, foi o que me fez suportar. Afinal, não há boas conquistas sem sacrifício! Amo vocês!!

À minhas irmãs, **Camilla Thaís e Kallyne Raquel**, pelo apoio, longas conversas no telefone. Vocês dão sentido à palavra FAMÍLIA. Sem vocês, eu nada seria!!

À **Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima** e à **Profa. Dra. Lúcia Rocha**, pelos ensinamentos e por disponibilizarem os seus laboratórios para que eu pudesse realizar esse projeto.

Aos companheiros de laboratório, **Raquel, Cat, Paty, Célio, Larissa, Fernando, Juliana, Ellen, Tamires, Geisy e Maycon**. Em especial as amigas **Laísa, Flávia e Vânia!** A Laísa que veio diretamente de Santos para ser o meu melhor porto seguro em Botucatu, reforçando a premissa de que eu me dou muito bem trabalhando com farmacêutico, talvez devesse ter feito farmácia...rs! Uma verdadeira amiga, companheira de experimentos, uma excelente profissional, um exemplo a ser seguido. Sinto-me honrada em poder ter passado dois anos ao seu lado, dividindo os experimentos, compartilhando idéias, esclarecendo dúvidas, dividindo angústias e até mesmo uma tentando levantar a outra quando o cansaço e

a apatia insistiam em bater a nossa porta. Só tenho a agradecer por todos os momentos e dizer que te admiro muito pela tua inteligência, esforço e dedicação. Com toda essa garra você vai longe. Torço muito por você!!! A **Flávia** se tornou meu raio de sol de todas as manhãs!! Por mais frio, nublado, tempo ruim que estivesse, bastava ela aparecer na porta e esbanjar seu sorriso para que o ambiente todo fosse irradiado e contagiado por aquela felicidade. Ela é a personificação da alegria, calor humano, solidariedade e esperança. Sem dúvida ela é uma das pessoas que vale a pena você conhecer, porque te faz acreditar que o mundo pode ser melhor sim, se você for mais justo e semear um pouco mais de bondade no seu coração. E a **Vânia**? Uma amiga excepcional, verdadeira, transparente, sincera!! Companheira de aventuras em terras argentinas, em congressos! Sempre me incentivando a seguir em frente e a não esmorecer perante os obstáculos. Vocês e o Robertão (luminária dos experimentos de isquemia) são a melhor parte de tudo isso... “São tantas já vividas, são momentos que eu não me esqueci, detalhes de uma vida, histórias que eu contei aqui, amigos eu ganhei, saudades eu senti partindo...se chorei ou se sorri o importante é que EMOÇÕES eu VIVI!!!”

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia pela ajuda durante o projeto, principalmente ao **Dr. Hélio Kushima** por ter compartilhado sua vasta sabedoria e experiência. Ao **Seu Júnior e Janete**, pelos cuidados com os animais e com o departamento, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** por todos os auxílios e informações prestadas quando solicitadas.

Aos **alunos do Prof Di Stasi**, especialmente **Ana e Paty**, por compartilharem o laboratório e pela ajuda nos protocolos experimentais.

Ao **Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi** e **Prof. Dr. Marcos José Salvador**, por aceitarem o convite para avaliar meu trabalho. Tenho certeza que ótimas sugestões virão. Sinto-me lisonjeada por ser avaliada por dois profissionais tão competentes.

Aos **Professores da Pós-Graduação, especialmente ao Dr. André Sampaio Pupo**, um verdadeiro exemplo de como se deve exercer docência na pós-graduação. Sempre preocupado com a formação dos alunos e com o senso crítico. Com ele aprendi que não basta aceitar, que o aluno deve sempre pensar, questionar e emitir uma opinião. Não existe certo ou errado, existem opiniões divergentes que quando bem embasadas merecem ser discutidas. Sem dúvidas sou bastante grata

por ter tido a oportunidade de assistir aula com um professor tão competente e inteligente. Conviver com ele só ratificou meu amor pela farmacologia. Tenho profunda admiração, principalmente por me escutar e me orientar quando em determinados momentos me vi cercada de dúvidas.

Ao **PC**, pela paciência, pelo companheirismo, por me escutar, por acreditar em mim, por estar presente em todos os momentos da minha vida, compartilhando angústias e dividindo as alegrias. Você é maravilhoso, merece o que existe de melhor nessa vida!! Se hoje cheguei até aqui é porque contei com seu apoio e incentivo!! Amo você!!

A **todos os amigos**, em especial, **Lorena, Laís, Bruno, Edson, Samira, Denise, Ellida e Flávia!** O tempo só provou que nossa amizade é forte, verdadeira e eterna. Amor incondicional!

Aos **bons e velhos amigos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí**, lugar onde tudo começou. Sou muita grata por tudo que aprendi com vocês.

A minha querida “**mãe-científica**”, **Dra. Rita de Cássia Meneses de Oliveira**, por ter me estendido a primeira oportunidade. Pelos ensinamentos, pela ética, tudo que sou hoje devo à senhora!!

A **Jamile**, pelo companheirismo, ajuda e compreensão. Morar em Botucatu com uma amiga piauiense ajudou a segurar um pouco a saudade de casa. Teu companheirismo foi fundamental. Amo demais!!

Aos amigos que conquistei nessa cidade, **Aline, Mariana, Dani e Rafaela Pomini!** Companheiras de baladas, churrascos, vocês tornaram minha vida mais feliz!!!

A toda **minha família**, especialmente aqui representada por minha prima **Carol!** Meu exemplo de perseverança, empenho! Amo demais!

Todos foram peças chave no meu processo de formação e amadurecimento, tanto pessoal, como profissional. Independente das conquistas, derrotas, sempre tive vocês ao meu lado me incentivando a seguir em frente. Esse apoio incondicional é o que fez tudo valer a pena. Este trabalho é prova de que com vocês posso ser mais e por vocês pretendo ser cada vez melhor. **OBRIGADA!!!!!!!!!!!!**

O projeto de mestrado possibilitou a formação específica em farmacologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo objeto alvo do estudo as úlceras pépticas. Durante a execução do projeto de mestrado, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional do aluno. Tais como:

Trabalhos completos publicados em periódicos científicos internacional

- Antiulcer activity of ethanolic extract of *Encholirium spectabile* Mart. ex Schult & Schult f. (Bromeliaceae) in rodents. **Biological Research, 43: 459-465, 2010.** Katharinne I. Moraes de Carvalho; Hélio B. Fernandes; Flávia D. Frota Machado; Irisdalva S. Oliveira; Francisco A. Oliveira; Paulo Humberto M. Nunes; Julianeli T. Lima; Jackson R. G. Silva Almeida; Rita C. Meneses Oliveira.
- Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology, 137: 700–708, 2011.** Flávia F. B. Passos Freitas; Hélio de Barros Fernandes; Celyane A. Piauilino; Sérgio da Silva Pereira; Katharinne I. Moraes de Carvalho; Mariana H. Chaves; Pedro M. Gomes Soares; Leiz Maria C.V. Miura; José Roberto S. de Almeida Leite; Rita de Cássia M. Oliveira; Francisco de Assis Oliveira.

Trabalhos apresentados na forma de painel em evento científico internacional

- GASTROPROTECTIVE ACTION OF THE MONOTERPENE GERANIOL IN MODEL OF ETHANOL-INDUCED GASTRIC ULCER: INVOLVEMENT OF NO-SYNTASE AND SULPHYDRYL GROUP. CARVALHO, Katharinne Ingrid Moraes de; SILVA, Laísa Pinheiro da; BONAMIN, Flávia; ROCHA, Lúcia Regina Machado; SOUSA, Damião Pergentino de; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. In: VIII

International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP, 2011, Ribeirão Preto – SP. Anais do VIII International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP. São Paulo: 2011. Disponível em www.cifarp.com.br.

Participação em eventos científicos

- IX Workshop da Pós-graduação & X Workshop de Genética, 13-15 de maio de 2010. Botucatu-SP.
- 4º Simpósio de Imunologia: Imunobiologia de Tumores, 20-22 de maio de 2011. Botucatu-SP.
- I Simpósio de Farmacologia da UNESP (SIMFAR), 3-4 de junho de 2011. Botucatu-SP.
- 7º Simpósio do Programa BIOTA-FAPESP, 3-10 de julho de 2011. São Carlos-SP.
- VIII International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 21-24 de agosto de 2011. Ribeirão Preto-SP.

Organização de eventos científicos

- Comissão de Apoio do IX Workshop da Pós-Graduação & X Workshop de Genética, 2010.

Disciplinas cursadas

- Abordagem Estatística em Farmacologia I – Fundamentos. Prof^a. Dr^a. Mirtes Costa (1 crédito – Conceito A).
- Abordagem Estatística em Farmacologia II – Aplicabilidade. Prof^a. Dr^a. Mirtes Costa (2 créditos – Conceito A).
- Estresse e Imunidade. Prof. Dr. José Maurício Sforcin (5 créditos – Conceito A).
- Farmacocinética. Prof^a. Dr^a. Márcia Gallacci (3 créditos – Conceito A).
- Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático. Prof^a. Dr^a. Sandra Cordellini (3 créditos – Conceito A).
- Métodos Biofísicos de Avaliação da Motilidade Gastrointestinal. Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda (4 créditos – Conceito A).
- Tópicos de Atualização em Ciências. Prof. Dr. Ciro Moraes Barros (1 crédito – Conceito A).
- Tópicos de Atualização em Ciências. Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi (1 crédito – Conceito A).
- Farmacologia Avançada. Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi (5 créditos – Conceito B).
- Classificação de Receptores Farmacológicos. Prof. Dr. André Sampaio Pupo (3 créditos).

RESUMO

A úlcera péptica é causada por um desequilíbrio entre os fatores protetores e lesivos da mucosa. A expansão global no consumo de álcool e DAINES têm contribuído para um aumento da incidência da doença na população. Um dos maiores problemas relativo à úlcera péptica consiste na recidiva da mesma após a terapêutica, justificando-se a busca por novos tratamentos mais eficazes. Relatos científicos mostram que os óleos essenciais derivados das plantas possuem uma variedade de atividades biológicas, tais como ansiolíticos, antioxidantes, antiinflamatórios e antiulcerogênicos. Baseando-se nessa premissa resolvemos avaliar a atividade gastroprotetora do monoterpene geraniol. Os resultados do estudo mostraram que o geraniol na dose de 7,5 mg/Kg foi efetivo no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com 70% de proteção. Essa ação gastroprotetora mostrou-se dependente da presença de óxido nítrico, dos grupamentos sulfidrilas e do aumento na produção de muco gástrico. No modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina o geraniol não teve ação antiulcerogênica, sugerindo-se que a proteção desse monoterpene esteja associada à metabólitos da via da COX, tais como: as prostaglandinas. No modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com indometacina, os resultados indicaram que a gastroproteção do geraniol está relacionada com as PGs, uma vez que na presença de um inibidor da COX, ele perdeu sua proteção. Os dados apontam ainda para uma atividade antioxidante, comprovada no modelo de isquemia e reperfusão, onde o geraniol conferiu uma proteção à mucosa gástrica de 71%, e no modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina cuja proteção observada foi de 68%. No modelo de ligadura de piloro observou-se a ausência de atividade antissecretória gástrica e verificou-se através do modelo de carvão ativado que esse monoterpene altera a motilidade intestinal. Além disso, constatou-se ausência de toxicidade subaguda em animais tratados durante 14 dias com o geraniol, sugerindo que o mesmo nessa dose é uma substância segura e eficaz. Estes resultados indicam que o geraniol é molécula de origem natural com atividade gastroprotetora.

Palavras-chave: Gastroproteção; Geraniol; Monoterpene; Óleo essencial; Úlcera péptica.

ABSTRACT

A peptic ulcer is caused by an imbalance between the protective and the aggressive factors of the mucosa. The global expansion in the consumption of alcohol and NSAIDs have contributed to an increased incidence of disease in the population. One of the biggest problems relative on peptic ulcer is recurrence of it after the treatment, justifying the search for new more effective treatments. Scientific reports show that essential oils derived from plants have a variety of biological activities, such as anxiolytics, antioxidants, anti-inflammatory and antiulcerogenics. Based on this assumption we decided to evaluate the gastroprotective activity of the monoterpene geraniol. The study results showed that geraniol at a dose of 7.5 mg/Kg was effective in the model of ulcer induced by absolute ethanol with 70% protection. This gastroprotective action was dependent on the presence of nitric oxide, sulfhydryl groups (SHs) and increased production of gastric mucus. In the model of gastric ulcer indomethacin-induced geraniol (7.5 mg / kg) did not had antiulcerogenic action, suggesting that protection this monoterpene is associated with metabolites of the COX pathway, such as prostaglandins. In the model of ethanol-induced ulcer in rats pretreated with indomethacin the results indicated that the geraniol's gastroprotection is related to the prostaglandins, since in the presence of a COX inhibitor, it lost its protection. The results also point to an antioxidant activity, proven in the model of ischemia and reperfusion, where geraniol gave a protection to the gastric mucosa of 71% and the model of duodenal ulcer cysteamine-induced whose protection observed was 68%. In the pylorus ligation model was observed the absence of gastric antisecretory activity and was verified through the model of activated charcoal that this monoterpene alter intestinal motility. In addition, there was no subacute toxicity in animals treated for 14 days with geraniol, suggesting that this substance is safely and effectively. These results indicate that the geraniol is a molecule of natural origin with gastroprotective activity.

Keywords: Gastroprotection; Geraniol; Monoterpene; Essential Oil; Peptic Ulcer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da histamina (1) e os fármacos antagonistas de receptores H ₂ : Cimetidina (2), Ranitidina (3), Famotidina (4) e Nizatidina (5).....	29
Figura 2 – Inibidores da bomba de prótons: Omeprazol (1) e Lansoprazol (2).....	30
Figura 3 – Estrutura química do isopreno.....	33
Figura 4 – Estrutura química do geraniol.....	34
Gráfico 1 – Evolução do peso corporal (g) de ratos tratados durante 14 dias com geraniol (7,5 mg/Kg), (n=6-8). ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.....	47
Gráfico 2 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados representam a média ± e.p.m. ***p< 0.001, (n=6-7). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	48
Gráfico 3 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados representam a média ± e.p.m. ***p< 0.001, (n=5-9). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	48
Gráfico 4 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados representam a média ± e.p.m. ***p< 0.001, (n=5). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	49
Gráfico 5 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina em ratos. Os dados representam a média ± e.p.m. *p< 0.05, (n=5). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	49
Gráfico 6 – Efeito do geraniol (GER) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados com indometacina. Os dados representam a média ± e.p.m. (n=5-6), *p< 0.05, ***p<0.001 quando comparado ao grupo salina+veículo, # # # p <0.001 quando comparado ao grupo indometacina+veículo. Empregou-se ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet. Para comparação entre os grupos com pré-tratamentos distintos utilizou-se ANOVA, seguida do teste de Tukey, cujas letras representadas na barra horizontal expressam: ^b p<0.05 e ^a p <0.01.....	51

Gráfico 7 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$ (n=7). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	52
Gráfico 8 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$ (n=5-6). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	52
Gráfico 9 – Avaliação dos níveis de GSH e MPO na mucosa gástrica de animais submetidos ao modelo de úlcera por etanol. Os dados representam a média \pm e.p.m. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.001$ (n=5). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	53
Gráfico 10 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$ (n=5-6). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	54
Gráfico 11 – Avaliação dos níveis de GSH e MPO no duodeno de animais submetidos ao modelo de úlcera por cisteamina. Os dados representam a média \pm e.p.m. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.001$ (n=5-6). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	55
Gráfico 12 – Participação da NO sintase na gastroproteção do geraniol (GER) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. (n=5-6), *** $p < 0.001$, quando comparado ao grupo salina+veículo, ### $p < 0.001$ quando comparado ao grupo L-NAME+veículo. Empregou-se ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet. Para comparação entre os grupos com pré-tratamentos distintos utilizou-se ANOVA, seguida do teste de Tukey, cujas letras representadas na barra horizontal expressam: ^a $p < 0.001$ e n.s=não significativo.....	56
Gráfico 13 – Participação dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. (n=5-6), *** $p < 0.001$, quando comparado ao grupo salina+veículo, # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo NEM + veículo. Empregou-se ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet. Para comparação entre os grupos com pré-tratamentos distintos utilizou-se ANOVA, seguida do teste de Tukey, cujas letras representadas na barra horizontal expressam: ^b $p < 0.05$ e ^a $p < 0.001$	57

Gráfico 14 – Quantificação de muco aderido à mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol. Os dados representam a média ± e.p.m. ***p< 0.001 (n=5-6). Empregou-se ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	57
Gráfico 15 – Avaliação da motilidade intestinal de camundongos no modelo de carvão ativado. Os dados representam a média ± e.p.m. ***p< 0.001 (n=7-8). Empregou-se ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso relativo dos órgãos dos animais tratados durante 14 dias com geraniol (7,5 mg/Kg), (n=6-8). ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.....	48
Tabela 2 – Análise dos parâmetros séricos dos animais tratados durante 14 dias com geraniol (7,5 mg/Kg), (n=6-8). ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.....	48
Tabela 3 – Avaliação da atividade anti-secretora do geraniol (7,5 mg/Kg) no modelo de ligadura do piloro. Os dados representam a média ± e.p.m. *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001. ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	– difosfato de adenosina
AINEs	– antiinflamatórios não-esteroidais
Al(OH) ₃	– hidróxido de alumínio
AMP	– monofosfato de adenosina
ATP	– trifosfato de adenosina
CaCO ₃	– carbonato de cálcio
CCK	– Colecistocinina
CO ₂	– gás carbônico
COX	– cicloxigenase
DAINEs	– drogas antiinflamatórias não-esteroidais
DL ₅₀	– Dose letal para 50% dos animais que morrem
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DTNB	– ácido ditiobisnitrobenzóico
e.p.m.	– erro padrão da média
eNOS	– óxido nítrico sintase endotelial
EROs	– espécies reativas de oxigênio
g	– grama
G	– gravidade
GSH	– glutathiona
GSSG	– glutathiona oxidada
H ₂ O ₂	– peróxido de hidrogênio
HCO ₃	– bicarbonato
HTAB	– brometo de hexadeciltrimetilamônio

i.p.	– intraperitonal
I/ R	– isquemia e reperfusão
IBP	– inibidores da bomba de prótons
iNOS	– óxido nítrico sintase induzida
ISO	– International Standard Organization
Kg	– kilograma
LTC4	– leucotrienos C4
M	– molar
MDA	– dialdeído malônico
mEq	– miliequivalente
mg	– miligrama
Mg(OH) ₂	– hidróxido de magnésio
MgCl ₂	– Cloreto de Magnésio
min.	– minuto
mL	– mililitro
mm ²	– milímetro quadrado
MPO	– mieloperoxidase
N	– normal
NADPH	– Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaH ₂ CO ₃	– bicarbonato de sódio
NaOH	– Hidróxido de Sódio
NEM	– inibidor da formação dos compostos sulfidrilas endógenas
nm	– nanômetro
nmol	– nanomolar
nNOS	– óxido nítrico sintase neuronal
NO	– óxido nítrico
NOS	– óxido nítrico sintase

O ₂	– oxigênio
O ₂ ⁻	– ânion superóxido
p/ v	– partes por volume
PG	– prostaglandinas
rpm	– rotações por minuto
s.c.	– subcutânea
TCA	– tricloroacético
TGI	– trato gastrintestinal
U	– unidade
v.o.	– via oral
XD	– xantina desidrogenase
XO	– xantina oxidase
µg	– micrograma
µL	– microlitro
°C	– graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	Considerações Gerais.....	25
1.2	Farmacoterapêutica da Úlcera Péptica.....	28
1.3	Óleos Essenciais.....	32
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Geral.....	36
2.2	Específicos.....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	Geraniol.....	37
3.2	Animais.....	37
3.3	Avaliação das Lesões Ulcerosas.....	38
3.4	Atividade Farmacológica Geral.....	38
3.4.1	Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol.....	38
3.4.2	Indução de Lesão Gástrica por Indometacina.....	39
3.4.3	Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Animais Pré-Tratados com Indometacina.....	39
3.4.4	Úlceras Gástricas Induzidas por Isquemia e Reperfusão.....	40
3.4.5	Úlceras Duodenais Induzidas por Cisteamina.....	40
3.5	Avaliação do Mecanismo de Ação.....	41
3.5.1	Determinação do Papel do Óxido Nítrico (NO) na Citoproteção Gástrica.....	41
3.5.2	Determinação do Papel dos Grupamentos Sulfidrílicos na Citoproteção Gástrica.....	41
3.5.3	Determinação de Muco Aderido à Parede Gástrica.....	42

3.5.4	Avaliação dos Parâmetros do Suco Gástrico pelo Modelo de Ligadura do Píloro.....	42
3.6	Determinação da Motilidade Intestinal.....	43
3.7	Determinações dos Parâmetros Bioquímicos dos Constituintes Oxidantes e Antioxidantes.....	43
3.8	Determinações Hormonais de Colecistocinina (CCK) e Somatostatina Sérica.....	45
3.9	Estudo de Toxicidade Subaguda.....	45
3.10	Análise Estatística.....	46
4	RESULTADOS.....	47
4.1	Toxicidade subaguda.....	47
4.2	Avaliação da Atividade Antiulcerogênica do Geraniol em Modelos Agudos de Úlcera Péptica em Ratos.....	48
4.2.1	Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto.....	48
4.2.2	Úlcera Gástrica Induzida por Indometacina (AINE).....	50
4.2.3	Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Ratos Pré-Tratados com Indometacina (AINE).....	51
4.2.4	Lesão gástrica induzida por isquemia e reperfusão.....	51
4.2.5	Úlcera duodenal induzida por cisteamina.....	52
4.3	Avaliação dos Mecanismos de Ação Envolvidos na Atividade Antiulcerogênica do Geraniol.....	53
4.3.1	Efeito do Geraniol nos Níveis de Glutathione Total e de Mieloperoxidase na Mucosa Gástrica de Animais Submetidos ao Modelo de Úlcera Induzida por Etanol.....	53
4.3.2	Efeito do Geraniol nos Níveis de Glutathione Total e de Mieloperoxidase na Mucosa Gástrica de Animais Submetidos ao Modelo de Úlcera Induzida por Isquemia e Reperfusão.....	54
4.3.3	Efeito do Geraniol nos Níveis de Glutathione Total e de Mieloperoxidase no Duodeno de Animais Submetidos ao Modelo de Úlcera Induzida por Cisteamina.....	54
4.3.4	Avaliação da Participação da NOS na Gastroproteção.....	55
4.3.5	Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidrilas na Gastroproteção.....	56

4.3.6	Quantificação do Muco Aderido à Parede Gástrica no Modelo de Etanol.....	57
4.3.7	Avaliação da Atividade Anti-secretora no Modelo de Ligadura do Píloro.....	58
4.3.8	Efeito do Geraniol nos Níveis Séricos de Colecistocinina e Somatostatina no Modelo de Ligadura de Píloro.....	58
4.3.10	Avaliação da Motilidade Intestinal no Modelo de Carvão Ativado.....	59
5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

As úlceras do trato gastrintestinal são lesões profundas na mucosa, onde tanto os componentes dos tecidos epitelial e conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (MILANI e CALABRÒ, 2001). Apresentam-se de três formas: úlcera péptica (lesão situada tanto no estômago como no duodeno), úlcera duodenal (apenas no duodeno) e úlcera gástrica (somente no estômago) (PEURA e CZINN, 2004).

A lesão da mucosa gástrica pode ocorrer por causas adquiridas ou inatas. As causas mais comuns desta lesão ocorrem por: hipóxia e isquemia (resultante da diminuição do fluxo sanguíneo, decréscimo da hemoglobina ou em decorrência da falha do sistema antioxidante endógeno); agentes químicos (eicosanóides, endotelinas, monoaminas, fármacos sintéticos e substâncias químicas ingeridas voluntariamente como o etanol); agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos, parasitas) que desencadeiam reações imunológicas que geralmente são acionadas para a defesa do organismo, mas que produzem radicais livres tóxicos contribuindo assim para a injúria tecidual, fatores físicos (estresse, temperaturas extremas, força mecânica) e por alterações genéticas (SZABO, 1991).

As úlceras pépticas resultam de diferentes mecanismos patogênicos e, independente de sua etiologia, são provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, óxido nítrico e prostaglandinas) e lesivos [pepsina, ácido clorídrico (HCl), espécies reativas de oxigênio, dentre outros]. Além disso, essa doença também pode ser desencadeada e/ou agravada por fatores exógenos predisponentes relacionados a condições de vida tais como: estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs), ingestão de determinados alimentos e pela presença do agente infeccioso *Helicobacter pylori* (MAITY *et al.*, 2003; WALLACE e GRANGER, 1996). Estes agentes são implicados ainda na patogênese das lesões gástricas, por promoverem aumento na secreção do ácido gástrico e pepsina, diminuição do fluxo

sanguíneo gástrico, por suprimirem a produção endógena de prostaglandinas, inibirem a proliferação celular e o crescimento da mucosa, além de alterar a motilidade gástrica (BRUNTON, 1996; WALLACE, 2001).

A infecção por *Helicobacter pylori* e o uso de DAINES são as causas predominantes de úlcera péptica nos Estados Unidos, respondendo por 48% e 24% dos casos, respectivamente (KURATA e NOGAWA, 1997). O isolamento desse agente infeccioso e sua identificação como uma das causas mais importantes de ulceração levou à exploração do papel da inflamação e sua cascata de citocinas associados ao mecanismo de secreção de ácido gástrico; uma vez que desencadeia um estado de inflamação crônica (YUAN *et al.*, 2006).

A bactéria *H. pylori* diminui a eficácia do sistema de defesa da mucosa, através da redução da espessura da camada de gel do muco, diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa e interação com o epitélio gástrico. Pode aumentar a secreção de ácido gástrico através da produção de vários antígenos, fatores de virulência, mediadores solúveis e através do aumento na quantidade de células parietais em decorrência do estado inflamatório (TUMMALA *et al.*, 2004).

As úlceras induzidas por DAINES não seletivos são causadas por irritação tópica das células epiteliais gástricas e redução da síntese de prostaglandinas (MALFERTHEINER *et al.*, 2009). Por conta das suas propriedades farmacológicas, muitos DAINES ácidos causam alterações na camada de gel hidrofóbica da mucosa desencadeando assim a irritação tópica que contribui para a injúria. Entretanto, a inibição da ciclooxigenase (COX) é o principal fator que auxilia na formação das úlceras, uma vez que a COX é a enzima limitante na conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas (BERARDI e WELAGE, 2008).

As prostaglandinas têm efeito citoprotetor na mucosa por inibir a secreção ácida, aumentar a quantidade de muco e por ser um vasodilatador que sustenta o aporte nutritivo necessário para o bom funcionamento celular (WALLACE, 2001). Portanto, como os DAINES causam inibição da COX dentre os efeitos adversos destes fármacos estão as úlceras do trato gastrointestinal (RAMAKRISHNAN e SALINAS, 2007).

As principais complicações das úlceras associadas à presença da *H. pylori* e induzidas por DAINES incluem hemorragia, perfuração gástrica ou duodenal e estenose no local da úlcera (NAPOLITANO, 2009). Os AINES são responsáveis

por aumentar em quatro vezes o risco de complicações da úlcera entre os usuários em comparação com pacientes que não fazem uso dessa medicação (MALFERTHEINER, 2009). Considera-se ainda que a presença do *H. pylori* tem sido considerada carcinogênico (SUZUKI *et al.*, 2009). Esses dois fatores de risco independentes tem efeitos sinérgicos na formação da doença ulcerosa péptica (YUAN *et al.*, 2006).

As úlceras gástricas e duodenais são enfermidades que acometem um número considerável de pessoas no mundo inteiro e alguns autores a consideram como a nova “praga” do século XXI (O’MALLEY, 2003). Por mais de um século as úlceras foram consideradas a maior causa de morbidade e mortalidade (CHAN e LEUNG, 2002). Apesar da acentuada redução da mortalidade e melhora nos índices de atendimento médico durante as últimas décadas, a úlcera péptica é ainda uma doença comum.

A prevalência mundial de úlceras pépticas é variável, sendo que as úlceras duodenais predominam nas populações ocidentais enquanto que as úlceras gástricas são mais freqüentes na Ásia, especialmente no Japão. Em relação ao sexo, os dados epidemiológicos demonstraram que os homens são mais susceptíveis a ambos os tipos de úlcera do que às mulheres (SONNENBERG e EVERHART, 1996).

Nos EUA uma grande parcela da população é afetada, seis milhões de casos de úlcera péptica foram estimados, sendo que a cada ano 500.000 novos casos são registrados (FEINSTEIN *et al.*, 2010). No Brasil, apesar de ser uma doença extremamente freqüente, não se conhece de modo preciso sua real incidência. Estima-se que a incidência de úlcera péptica varia de 1 a 20%, sobre a população (D’ACAMPORA *et al.*, 2008).

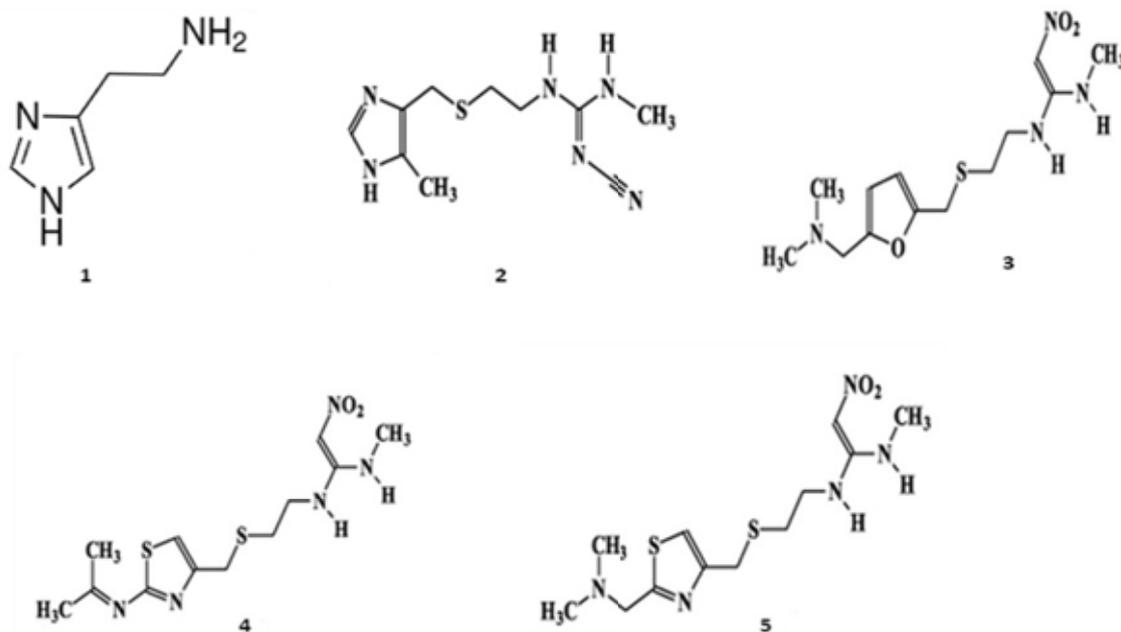
A expansão global no consumo de álcool e DAINes (agentes farmacológicos mais utilizados clinicamente) têm contribuído para o crescimento da etiopatologia da úlcera gástrica (WALLACE, 2001). Tal fato faz com que haja uma maior incidência da doença na população e que a mesma ganhe mais importância na clínica médica.

1.2 Farmacoterapêutica da Úlcera Péptica

A inibição da secreção ácida gástrica é a chave terapêutica para o tratamento das úlceras pépticas. O controle efetivo da acidez gástrica alivia os sintomas, promove a cura e reduz as recorrências ulcerosas. A terapia pode também ser direcionada ao fortalecimento das defesas da mucosa gástrica e duodenal através da indicação de agentes citoprotetores tais como: prostaglandinas (PG), somatostatina, óxido nítrico (NO) e compostos sulfidrílicos. Essas terapias combinadas têm por objetivo promover o equilíbrio através da redução dos fatores agressores e aumento dos fatores de proteção da mucosa (AIHARA *et al.*, 2003).

Durante mais de um século, as úlceras pépticas foram controladas com cirurgia, culminando em altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento farmacológico consistia em neutralizar a acidez gástrica estomacal com a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio (NaH_2CO_3), carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido de alumínio [$\text{Al}(\text{OH})_3$] e hidróxido de magnésio [$\text{Mg}(\text{OH})_2$] ou associações. Todavia, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de se associar com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas de dissolução e absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. Alguns podem também quelar outras drogas presentes no trato gastrintestinal (TGI), formando complexos insolúveis que passam pelo TGI sem serem absorvidos. Assim, a supressão farmacológica efetiva e mais segura da secreção ácida gástrica teve início com a introdução dos antagonistas de receptores H_2 de histamina nos anos 70 (YUAN *et al.*, 2006).

Os antagonistas de receptores H_2 , tais como ranitidina, cimetidina, famotidina e nizatidina (Figura 1), inibem a produção de ácido por competição reversível com a histamina pela ligação aos receptores H_2 na membrana basolateral das células parietais. Esses fármacos são semelhantes à histamina com substituição da fração etilamina por uma cadeia lateral grande, no caso a cimetidina, enquanto que a ranitidina, famotidina, e a nizatidina possuem modificação na estrutura básica do fármaco que é um anel imidazólico (SILVA, 2002). Diferem em relação a sua farmacocinética e sua capacidade de causar interações medicamentosas. A cimetidina inibe a atividade do citocromo P450 através da diminuição do



metabolismo de muitas substâncias que são substratos para oxidases hepáticas de função mista, enquanto a afinidade da ranitidina para o sistema P450 é de aproximadamente um sexto e a famotidina e nizatidina não têm interação com esse sistema (REYNOLDS, 1990; MARCOLIN *et al.*, 2004).

Figura 1 – Estrutura química da histamina (1) e os fármacos antagonistas de receptores H₂: Cimetidina (2), Ranitidina (3), Famotidina (4) e Nizatidina (5).

Em decorrência de sua meia-vida plasmática curta, os antagonistas dos receptores H₂ podem ser administrados em quantidades relativamente maiores, uma a duas vezes ao dia para favorecer uma terapêutica efetiva. O tratamento de oito semanas se mostra efetivo para 50 a 75% dos pacientes, sendo que pode se estender até 16 semanas com uma taxa maior de cicatrização. As recidivas diminuem quando os fármacos são administrados à noite, pois são eficientes em inibir a secreção basal tornando-se eficazes em inibir a secreção ácida noturna que tem um papel importante na cicatrização das úlceras (GILMAN *et al.*, 2007).

Esses fármacos são geralmente bem tolerados e inicialmente acreditava-se que tinham uma baixa incidência de efeitos colaterais, sendo os mais comuns: tonturas, diarreia e dor de cabeça (LEWIS, 1991; SABESIN, 1993). Entretanto, o uso disseminado desses medicamentos na clínica médica tem possibilitado uma melhor caracterização e informações dos efeitos colaterais decorrentes do uso dessa classe, que até então permaneciam desconhecidos (MARCOLIN *et al.*; 2004).

Além dos efeitos adversos já descritos, náusea, sonolência, mialgia e prurido são outros efeitos associados ao uso desses fármacos. O uso à longo prazo da cimetidina em altas doses causa uma diminuição da ligação da testosterona ao receptor androgênico e inibição da CYP que hidrolisa o estradiol, acarretando o desenvolvimento de ginecomastia, redução da contagem de espermatozóide, impotência sexual nos homens e galactorréia nas mulheres. Frente a esses efeitos o fármaco de escolha é a ranitidina (GILMAN *et al.*, 2007; UE *et al.*, 2007).

Na década de 80 foram lançados os inibidores da bomba de prótons (H^+/K^+ ATPase): omeprazol e lansoprazol (Figura 2), atualmente os fármacos mais eficazes na supressão da secreção de ácido gástrico (YUAN *et al.*, 2006).

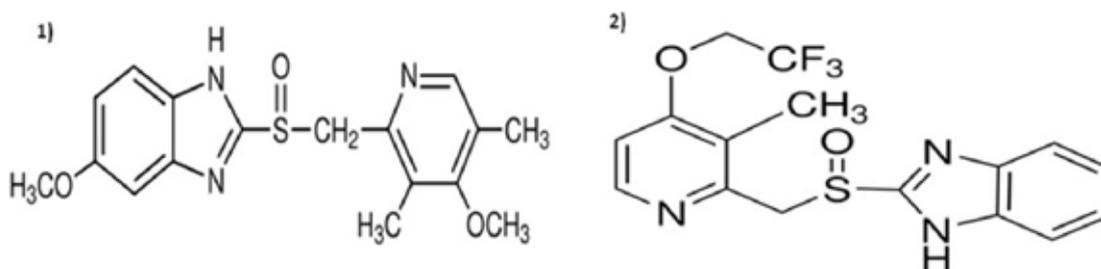


Figura 2 – Inibidores da bomba de prótons: Omeprazol (1) e Lansoprazol (2).

Os inibidores da bomba de prótons (IBP) são pró-fármacos que necessitam de ativação em ambiente ácido. Após absorção, difundem-se pelas células parietais do estômago e acumulam-se nos canalículos secretores de ácido das células parietais, onde são ativados pela formação de uma sulfenamida tetracíclica catalisada por prótons. Esta forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidrila de cisteínas presentes no domínio extracelular da H^+/K^+ ATPase, resultando em uma inativação irreversível da bomba. A secreção do ácido só se reinicia após a síntese e inserção de novas moléculas de H^+/K^+ ATPase na membrana luminal (GILMAN, 2007).

Uma conseqüência da redução da acidez gástrica mediada pelos IBP é o aumento da produção de gastrina, que favorece um quadro de hipergastrinemia que pode predispor a mucosa a uma hipersecreção rebote de ácido gástrico após a suspensão da terapia e também pode favorecer o crescimento de tumores gastrintestinais. Outros efeitos colaterais associados são: cefaléia, diarréia, dor

abdominal, náusea, deficiência de vitamina B12, elevação de transaminases, angina e hipotensão (GILMAN *et al.*, 2007).

Um dos maiores problemas relativo à farmacoterapia da úlcera péptica consiste na recidiva da doença após o tratamento. Embora a taxa de cicatrização com os inibidores da secreção gástrica seja de 80-100% após uma terapia de quatro semanas, a recorrência da úlcera está entre 40-80% dentro de um ano após o tratamento. Acredita-se que uma das razões da recorrência da lesão deve-se ao fato que as úlceras cicatrizadas são precariamente vascularizadas e têm de duas a três vezes menos densidade de vasos sangüíneos novos ao redor do que o tecido normal (SZABO e VINCZE, 2000). Entretanto, estas duas classes de fármacos, principalmente quando utilizados de forma crônica promovem vários efeitos colaterais, entre eles a hipergastrinemia que pode estar associada ao desenvolvimento do câncer gástrico. Outro problema relacionado com a terapêutica atual diz respeito aos efeitos colaterais dos antagonistas de receptores H₂ e inibidores da bomba de prótons agravados pelo tempo de uso, tornando-se necessários mais estudos que busquem novos tratamentos capazes de promover a remissão dessa doença sem graves efeitos adversos.

As plantas podem fornecer compostos capazes tanto de reduzir fatores agressivos como aumentar a resistência da mucosa gástrica simultaneamente (sinergismo), possibilitando o tratamento das ulcerações gástricas com maior eficácia (BORRELI e IZZO, 2000). Relatos científicos mostram a existência de uma grande variedade de plantas medicinais com atividade gastroprotetora, indicando que as plantas medicinais constituem uma importante fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas para o tratamento da úlcera péptica (SCHMEDA-HIRSCHMANN e YESILADA, 2005). Além disso, os produtos naturais também podem contribuir para a terapêutica dos distúrbios gástricos, através de tratamentos mais acessíveis, atendendo uma grande parcela da população brasileira (70-80%) que não tem poder aquisitivo suficiente para participar do mercado consumidor (FERREIRA *et al.*, 2008).

1.3 Óleos Essenciais

A utilização de produtos naturais como medicamento foi uma prática bastante comum na Antiguidade, período em que já se destacava a importância da utilização de plantas na forma de óleos, tais como os óleos de oliva, gergelim, rícino, dentre outros. No Egito Antigo, segundo textos do papiro de Ebers (um dos tratados médicos mais antigos, datado de 1550 a.C.), óleos como os de alho, girassol e açafraão já eram recomendados para uso terapêutico. Na Antiga Índia, textos conhecidos como Ayurvedas (ciência da vida) datados de 3000 a.C., descreviam a utilização de diversos óleos viscosos para o tratamento de uma série de doenças. Atualmente, no Brasil e no exterior, a terapia alternativa com o uso de óleos essenciais continua sendo bastante utilizada e estes óleos são investigados por suas ações terapêuticas até hoje (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

De acordo com definição estabelecida pela ISO (International Standard Organization), óleos essenciais são os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. A nomenclatura é muito variada para a denominação dos óleos essenciais, que também são chamados de essências ou óleos etéreos. Essas denominações são em decorrência das propriedades físico-químicas, o fato de serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente acarreta a designação óleo, enquanto que sua principal característica, a volatilidade e baixo peso molecular os designa como essencial, diferindo dos óleos fixos, já o nome essência deve-se ao aroma agradável e intenso que possuem. A denominação óleos etéreos, refere-se ao fato de serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter (SIMÕES e SPITZER, 2007).

Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, cuja presença dos terpenos se faz predominante principalmente os de baixo peso molecular, como no caso os monoterpenos (SIMÕES e SPITZER, 2007).

Os terpenos são substâncias químicas encontradas como constituintes de uma variedade de extratos vegetais e representam uma das maiores e mais diversas classes de metabólitos secundários, com aproximadamente 55.000 substâncias

isoladas. São formados pela ciclização enzimática através da conversão de moléculas simples, lineares de hidrocarbonetos fosfatados em esqueletos carbocíclicos quirais. As reações de oxidação e rearranjos posteriores são responsáveis pela grande e variada quantidade de estruturas químicas. Por conta dessa enorme diversidade estrutural, ocupam um lugar especial na medicina, por possuírem uma ampla gama de ações farmacológicas, que vão desde atividade contra o câncer, contra a malária à capacidade de interferência em canais iônicos (MAIMONE e BARAN, 2007).

Possuem ampla distribuição na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores. São também chamados de isoprenóides, pois sua estrutura pode ser dividida em unidades de isoprenos, como mostra a figura 3 (RUZICKA, 1953). Durante a formação dos terpenos, as unidades de isopreno se ligam, e o número de unidades incorporadas em determinado terpenóide serve de base para a classificação desses compostos. Os monoterpenos são compostos por duas unidades de isopreno ($C_{10}H_{16}$), os sesquiterpenos por três unidades ($C_{15}H_{24}$), os diterpenos por quatro ($C_{20}H_{32}$), os triterpenos compostos por seis ($C_{30}H_{48}$) e os tetraterpenos, ou carotenos, são formados por oito unidades de isopreno ($C_{40}H_{64}$) (ROBBERS *et al.*, 1997).

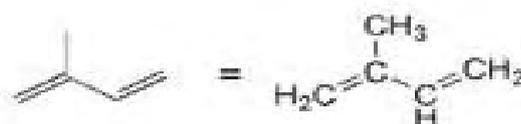


Figura 3 – Estrutura química do isopreno.

Os monoterpenos são compostos que correspondem cerca de 90% dos óleos essenciais de plantas e são divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol); monocíclicos (alfa-terpineol e terpinoleno) e bicíclicos (alfa-pineno, tujona, cânfora, fenchona). Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos ou cetonas (mentona, carvona), lactonas (nepetalactona) e troponas (gama-tujaplicina) (SIMÕES e SPITZER, 2007).

Atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenóides naturais e alguns são comumente usados como aditivos alimentares e componentes de

fragrância, e muitos são encontrados em cosméticos, sabonetes, produtos de limpeza, desinfetantes, conservantes e medicamentos (ABU-LAFI *et al.*, 2007; SELL e PYBUSS, 1999). Os monoterpenos em geral exercem atividade antitumoral e são considerados uma nova classe de agentes químicos preventivos para o câncer (CARNESECCHI, 2001).

O geraniol é um monoterpeno acíclico (Figura 4), encontrado comumente como um dos componentes principais dos óleos essenciais de plantas tais como: citronela, limão, laranja, amora, palmarosa e gerânio. Em sua forma pura apresenta-se como um líquido incolor, oleoso e com um aroma de rosa. Tem bastante utilidade na indústria como um ingrediente de perfumaria utilizado em produtos cosméticos decorativos, perfumes finos, xampus, sabonetes e outros artigos de higiene pessoal, bem como em produtos não-cosméticos, tais como os de limpeza doméstica e detergentes (LAPCZYNSKI *et al.*, 2008).

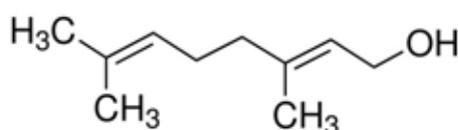


Figura 4 – Estrutura química do geraniol.

Origina-se da molécula geranyl difosfato (GPP) através de sintases que executam reações de ionização (BOHLMANN *et al.*, 1998). Em geral, a biossíntese do geraniol é através da via do mevalonato, mas em algumas plantas é sintetizado por uma via independente do mevalonato (CHEN e VILJOEN, 2010).

Dados na literatura têm caracterizado várias atividades farmacológicas para o geraniol, dentre elas podemos destacar ação repelente e inseticida (TRAINA *et al.*, 2005, JEON *et al.*, 2009; KHALLAAYOUNE *et al.*, 2009), ação antihelmíntica (KUMARAN *et al.*, 2003; HIERRO *et al.*, 2004), antimicrobiana (FRIEDMAN *et al.*, 2002; INOUYE *et al.*, 2001; SI *et al.*, 2006), antioxidante (CHOI *et al.*, 2000; TIWARI e KAKKAR, 2009) e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, contra leucemia, hepatoma e células de melanoma (SHOFF *et al.*, 1991; CARNESECCHI *et al.*, 2001), entretanto não existem relatos de sua ação no TGI como antiulcerogênico.

Estudos preliminares em nosso laboratório (Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais) demonstraram uma ação gastroprotetora do

geraniol administrado por via oral (50, 100 e 200 mg/Kg) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos. A partir desse resultado preliminar demos continuidade aos estudos farmacológicos com esse monoterpene em outros modelos agudos de úlcera gástrica e duodenal, elucidando assim os mecanismos de ação para essa atividade e visando contribuir para o estudo farmacológico controlado deste composto como potencial droga antiulcerogênica péptica de origem natural.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Encontrar novas substâncias farmacologicamente ativas com potencial terapêutico para o combate e/ou prevenção das úlceras gástricas e duodenais e oferecer novas opções terapêuticas que possuam uma melhor eficácia e promovam a ausência ou atenuação dos efeitos adversos.

2.2 Específicos

1) Avaliar a atividade gastroprotetora do monoterpeno geraniol em modelos experimentais agudos de úlcera gástrica e duodenal induzida por diferentes agentes em ratos;

2) Estudar os mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do geraniol através da avaliação da participação de: enzima NO-sintase, dos grupamentos sulfidrilas, muco aderido, prostaglandinas, glutathione, mieloperoxidase, somatostatina e colecistocinina;

3) Avaliar a atividade antissecretora do geraniol no modelo de ligadura de piloro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Geraniol

O geraniol foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich, U.S.A. Para a execução dos protocolos experimentais, realizou-se previamente uma curva dose-resposta no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, no intuito de caracterizar a melhor dose-efetiva deste composto com atividade gastroprotetora. As doses do geraniol foram: 6,25 mg/Kg , 7,5 mg/Kg, 12,5 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg. Optou-se pela dose de 7,5 mg/Kg do geraniol para todos os experimentos. Em relação à preparação do óleo, o mesmo foi solubilizado cinco minutos antes de ser administrado e preparado em um béquer envolto por papel alumínio e fechado com papel parafilm a fim de evitar a influência de fatores externos e em decorrência da volatilidade do óleo essencial.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos albinos machos Wistar (200 a 250 g), para os experimentos de lesões gástricas e determinação dos mecanismos de ação antiulcerogênica; e camundongos albinos machos Swiss (30 a 50 g) para avaliação da motilidade intestinal, provenientes do Biotério Central da UNESP - Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP, Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] destrusada e água *ad libitum*. A morte dos animais foi realizada em câmara de CO₂. Todos os experimentos foram aprovados de acordo com as normas do Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu (18/05).

3.3 Avaliação das Lesões Ulcerosas

Nos testes de atividade antiulcerogênica o geraniol e as drogas-padrão (cimetidina, lansoprazol ou carbenoxolona, usadas como controles positivos e indicadas em cada modelo de lesão péptica) foram administradas por via oral, em dose-volume de 10 mL/Kg. Foi utilizado ainda um grupo (controle negativo) que recebeu um volume equivalente de uma solução de Tween 80 a 8% (veículo) no qual o monoterpeno e as drogas-padrão foram dissolvidos. Ratos ou camundongos, mantidos em gaiola especial sem maravalha, foram submetidos a jejum de no mínimo 6 horas dependendo do modelo experimental. Os modelos utilizados de indução de lesões gastroduodenais representaram as principais causas de úlcera no homem, ou seja, álcool, DAINÉ, cisteamina, além da ligadura do piloro para análise dos efeitos produzidos pelo acúmulo de secreção gástrica. Para a quantificação das lesões gástricas, os estômagos foram colocados em placa de vidro e escaneados para realização da análise por planimetria (área total e área relativa, mm²), através do programa Avsoft Bioview.

3.4 Atividade Farmacológica Geral

3.4.1 Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol

Os diferentes grupos de ratos (n=5) foram tratados, após 12 horas de jejum, com o geraniol em doses variáveis (v.o.), com carbenoxolona (100 mg/Kg, v.o.) ou veículo (Tween 80[®] a 8%, v.o.), uma hora antes da indução da lesão gástrica pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto. Decorrido uma hora da indução, os animais foram mortos e os estômagos retirados para contagem das lesões, conforme descrito anteriormente (MORIMOTO *et al.*, 1991). Tiras do estômago foram retiradas e pesadas para posteriores procedimentos bioquímicos (glutathiona total - GSH e MPO). Para este modelo, utilizou-se também um grupo

denominado SHAM, que foi submetido ao mesmo estresse dos demais grupos, sem a utilização dos agentes indutores de lesão.

3.4.2 Indução de Lesão Gástrica por Indometacina

Os ratos foram aleatoriamente separados em grupos (n=5), privados de comida por 12 horas, com água *ad libitum*. Decorrido 30 minutos da administração oral do veículo (Tween 80[®] a 8% - controle negativo), cimetidina (100 mg/Kg - controle positivo), geraniol (7,5 mg/Kg), o agente lesivo indometacina 50 mg/Kg (solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5%, de acordo com Allen e Hamilton (2000) foi administrado oralmente para todos os grupos. Após 6 horas da administração do agente lesivo (indometacina), todos os animais foram mortos e os estômagos retirados para leitura das lesões gástricas (GUIDOBONO, 1997).

3.4.3 Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Animais Pré-Tratados com Indometacina

Ratos Wistar, em jejum de 12 horas, foram divididos em grupos (n=5-6) de acordo com os tratamentos (Salina + Veículo, Salina + Carbenoxolona, Salina + Geraniol, Indometacina + Veículo, Indometacina + Carbenoxolona e Indometacina + Geraniol). Os controles receberam injeção subcutânea de solução salina e os outros animais de Indometacina (30 mg/Kg solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5%, de acordo Allen e Hamilton (2000), pH 7,4). Após 30 min, os grupos receberam por via oral os tratamentos veículo (10 mL/Kg), carbenoxolona (100 mg/Kg) e geraniol (7,5 mg/Kg). Depois de 1 hora, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol absoluto. Uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos e os estômagos removidos para determinação da área de lesão conforme já descrito (MATSUDA e YOSHIKAWA, 1999).

3.4.4 Úlceras Gástricas Induzidas por Isquemia e Reperfusão

Os ratos foram divididos em diferentes grupos (n=7) tratados com veículo, lansoprazol (30 mg/Kg) e geraniol (7,5 mg/Kg). Decorrido 30 min. dos tratamentos, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (ambas por via intramuscular) e permaneceram sedados durante todo o procedimento. Foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm, do lado esquerdo do abdômen onde a aorta e a veia cava foram primeiramente identificadas para facilitar a localização da artéria celíaca. Após a identificação, a artéria celíaca foi isolada, submetida a um processo de limpeza e eliminação de aderências e eventual tecido adiposo. Um *clamp* microvascular foi colocado nessa artéria e permaneceu clampado durante 30 min. Após este período de isquemia, o *clamp* foi removido (para permitir a reperfusão) permanecendo assim os 60 min. subsequentes. No final desse período, os animais foram mortos e uma porção do tecido gástrico de cada rato foi removida para exame das lesões como descrito anteriormente e o tecido foi armazenado para caracterização enzimática (UEDA *et al.*, 1989).

3.4.5 Úlceras Duodenais Induzidas por Cisteamina

As úlceras duodenais foram induzidas em ratos pela administração de cloridrato de cisteamina (300 mg/Kg, v.o.) duas vezes em intervalos de 4 horas cada. Os animais, após jejum de 2 horas, foram divididos em grupos (n=5-6) e pré-tratados com o veículo, lansoprazol (30 mg/Kg) e o geraniol (7,5 mg/Kg) trinta minutos antes da primeira administração de cisteamina. Decorrido 24 horas do início do jejum, os animais foram mortos, o duodeno foi retirado cuidadosamente e cortado longitudinalmente. A área da úlcera duodenal foi determinada por planimetria conforme método descrito anteriormente. Tiras do duodeno foram retiradas, pesadas e armazenadas para posteriores procedimentos bioquímicos (glutathiona total - GSH e MPO). Para este modelo, utilizou-se também um grupo denominado SHAM, que foi submetido ao mesmo estresse dos demais grupos, sem a utilização de agentes indutores de lesão duodenal (SZABO, 1978).

Avaliação do Mecanismo de Ação

Determinação do Papel do Óxido Nítrico (NO) na Citoproteção Gástrica

Os ratos submetidos a jejum por 12 horas foram divididos em grupos (n=5-6) de acordo com os respectivos tratamentos (Salina + Veículo, Salina + Carbenoxolona, Salina + Geraniol, L-NAME + Veículo, L-NAME + Carbenoxolona e L-NAME + Geraniol). Os grupos controles receberam injeção intraperitoneal de solução salina e os demais receberam tratamento com L-NAME 70 mg/Kg (inibidor da NO-sintase), pela mesma via (MATSUDA e YOSHIKAWA, 1999; MORIMOTO *et al.*, 1991). Após 30 min, todos os grupos receberam por via oral os respectivos tratamentos (veículo, carbenoxolona 100 mg/Kg e geraniol 7,5 mg/Kg). Após uma hora, os animais foram submetidos à administração oral com etanol (1mL/ animal) e decorrido 1 hora do tratamento com o agente lesivo, os animais foram mortos, seus estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura, colocados em placas de vidro e escaneados para quantificação das lesões como descrito anteriormente.

Determinação do Papel dos Grupamentos Sulfidrílicos na Citoproteção Gástrica

Após 12 horas de jejum, os ratos foram divididos em grupos (n=5-6) de acordo com os respectivos tratamentos (Salina+Veículo, Salina+Carbenoxolona, Salina + Geraniol, NEM + Veículo, NEM + Carbenoxolona e NEM + Geraniol). Os grupos controles receberam uma injeção intraperitoneal de solução salina e os demais grupos experimentais, uma injeção de N-etilmaleimida 10 mg/ Kg (NEM), um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos (MATSUDA e YOSHIKAWA, 1999; MORIMOTO *et al.*,1991). Após 30 min, todos os grupos de animais receberam os respectivos tratamentos orais com o veículo, geraniol (7,5 mg/Kg) ou carbenoxolona (100 mg/Kg). Após uma hora, os animais foram submetidos à administração oral de

1 mL de etanol por animal e decorrido 1 hora da administração do agente lesivo etanol, os animais foram mortos, seus estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura, colocados em placas de vidro e escaneados para posterior avaliação macroscópica das lesões conforme descrito anteriormente.

3.4.6 **Determinação de Muco Aderido à Parede Gástrica**

Para determinar o efeito dos tratamentos na produção de muco gástrico utilizou-se o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto (BESERRA *et al.*, 2011; MORIMOTO *et al.*, 1991). Após a morte dos animais, os estômagos foram retirados e a porção glandular do estômago separada e imersa em 10 mL de solução de Alcian Blue (0,1% em solução de sacarose 0,16 M e acetato de sódio 0,05 M) por duas horas. Após duas lavagens consecutivas com 7 mL de 0,25 M de sacarose (a primeira após 15 min e a segunda após 45 min), 7 mL de 0,5 M MgCl₂ foi adicionado em cada tubo falcon para a extração do muco. O segmento glandular permaneceu nesta solução por 2 horas, com agitação intermitente. Após 2 horas, a porção glandular foi pesada e descartada. Retirou-se 4 mL da solução resultante e adicionou-se 4 ml de éter etílico até a formação de uma emulsão e as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3500 g. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 580 nm. A leitura foi feita após realização de uma curva padrão com várias concentrações de Alcian blue. Os resultados foram expressos em µg de Alcian blue/mL/g de tecido (RAFATULLAH *et al.*, 1990).

3.4.7 **Avaliação dos Parâmetros do Suco Gástrico pelo Modelo de Ligadura do Píloro**

Os parâmetros do suco gástrico foram avaliados pelo efeito dos diferentes tratamentos administrados oral ou intraduodenalmente, no intuito de avaliar o efeito local ou sistêmico do geraniol. Após 12 horas de jejum os ratos foram anestesiados, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura

de piloro. A administração das drogas foi realizada logo após a amarradura, por via intraduodenal e uma hora antes da amarradura no caso da via oral. As incisões foram suturadas e quatro horas após a cirurgia os ratos foram mortos e a incisão reaberta. Logo em seguida, foi realizada uma ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) e o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01N em bureta digital (modelo EM, Alemanha). A concentração total de ácido foi expressa em mEq/mL/4 horas e o pH foi determinado em pHmêtro modelo PA 200 (SHAY *et al.*, 1945).

Determinação da Motilidade Intestinal

Camundongos Swiss (n=7-8), em jejum de 6 horas, foram divididos em grupos (n=7-8) que receberam seus respectivos tratamentos orais: veículo (controle negativo), morfina 2,5 mg/Kg (i.p., controle positivo) e geraniol (7,5 mg/Kg). Após trinta minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% (v.o.) em volume de 10 mL/Kg. Meia hora após a administração do carvão, todos os animais foram mortos e todo o intestino delgado foi removido juntamente com o estômago, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado, para a obtenção da relação entre a distância percorrida e comprimento total do intestino. Os dados obtidos dessa relação foram transformados em arco seno para posterior análise estatística (STICKNEY e NORTHUP, 1959).

3.5 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos dos Constituintes Oxidantes e Antioxidantes

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogenato de mucosa gástrica e também duodenal (separadamente), sendo que a homogeneização foi realizada a frio durante aproximadamente 45 segundos com a

ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflon e um recipiente de vidro de 10 mL de capacidade.

Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) – a determinação da atividade da mieloperoxidase em fragmentos da mucosa gástrica e/ou duodenal de rato foi realizada pelo método de KRAWISZ *et al.* (1984). Fragmentos da mucosa (100-300 mg), após descongelamento, foram colocados sobre uma placa de Petri com gelo e picados com tesouras e com 1 mL de tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), durante 15 segundos. Em seguida o material picado foi transferido para um tubo de vidro, cujo restante do tampão foi adicionado, de modo a se obter uma proporção 1:20 (p/v), e homogeneizado durante 45 segundos a frio, usando o homogeneizador Heidoph. O homogenato resultante foi dividido em 2 alíquotas de 1,0 mL, armazenadas em eppendorfs. Uma das alíquotas foi sonicada por 10 segundos e submetida a um triplo processo de congelamento-descongelamento. Após o último descongelamento, a alíquota foi centrifugada a 7000 g por 5 minutos a 4°C. Em uma placa de 96 canais, foi adicionado 100 µL do sobrenadante de cada amostra em pocinhos distintos, 150 µL do tampão de reação (cloridrato de orto-dianisidina). Em seguida, determinou-se o incremento de absorbância a 450 nm usando um espectrofotômetro. A atividade da enzima mieloperoxidase foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de mieloperoxidase (U) se considera como aquela que degrada 1 nmol/ min de peróxido de hidrogênio a 25°C. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

Determinação do conteúdo de glutathiona total – a determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985), que se baseia na oxidação total do glutathiona (GSH) reduzido presente em uma amostra a sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. O GSSG gerado é reduzido por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. O GSH formado se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo, no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu conseqüente incremento de absorbância a 412 nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG). Para efetuar a determinação do conteúdo de glutathiona total, foram utilizados os fragmentos da mucosa gástrica congelado com ácido tricloroacético (TCA). As amostras, após

descongelamento, foram picadas com tesouras durante 15 segundos aproximadamente, sobre uma placa de Petri com gelo e, posteriormente homogeneizadas com uma solução de TCA 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v), usando um homogeneizador Heidoph. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 2000 G por 5 minutos a 4°C. Do sobrenadante utilizou-se 20 µL que foi colocado em uma placa de 96 canais, onde se adicionou 140 µL de NADPH, 15 µL de PBS e 20 µL DTNB. A placa foi colocada no leitor do espectrofotômetro, permanecendo incubada por 5 minutos em uma temperatura de 30 °C. Após este período adicionou-se 15 µL de glutationa redutase e registrou-se o incremento de absorbância a 412 nm no espectrofotômetro. A concentração de glutationa foi calculada a partir da curva obtida por interpolação em uma curva padrão realizada com glutationa e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

3.6 Determinações Hormonais de Colecistocinina (CCK) e Somatostatina Sérica

A administração do veículo, cimetidina (100 mg/Kg) e geraniol (7,5 mg/Kg) foi realizada 1 hora antes da amarradura do piloro em ratos machos Wistar (n=5), segundo método descrito por Shay (1945). Após 4 horas da ligadura do piloro, os animais foram mortos e o sangue foi coletado para a quantificação sérica de somatostatina e colecistocinina. Imediatamente após coletar o sangue, foi acondicionado em tubos de ensaio mantidos em recipiente de isopor e gelo (3 °C), por cerca de 4 horas. Após esse período, os tubos foram submetidos à centrifugação (3000 rpm, a 4 °C), por 10 min. Após a centrifugação, o soro obtido foi estocado em eppendorfs, à temperatura de -20 °C até o momento das dosagens de colecistocinina e somatostatina. A colecistocinina e a somatostina foram dosadas pelo método imunoenzimático, com auxílio de kit da empresa Phoenix Pharmaceuticals, Inc. |

3.7 Estudo de Toxicidade Subaguda

Ratos normais (que não passaram por nenhum processo de indução de úlcera gástrica) foram divididos em grupos (n=5-9) de acordo com seus respectivos tratamentos (Veículo, Geraniol 7,5 mg/ Kg e SHAM). Todos os grupos receberam tratamento durante o período de 14 dias (exceto o grupo SHAM) e diariamente foram realizadas observações em relação à evolução do peso corporal (SOUZA-BRITO, 1995). Ao final do experimento, foram realizadas análises macroscópicas, pesagem de cada órgão vital (coração, fígado, rins, pulmão e baço) e o soro dos animais tratados foi coletado para exames bioquímicos (γ -GT, uréia, creatinina, AST-aspartato-amino-transferase, ALT-alanina amino-transferase e glicose).

3.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste a posteriori adequado (Dunnet ou Tukey) para cada parâmetro obtido com nível de significância mínima de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Toxicidade subaguda

Os animais foram tratados por via oral durante 14 dias com o veículo e geraniol (7,5 mg/Kg). Um terceiro grupo que não recebeu nenhum tratamento denominado Sham, apenas passou pelo estresse da administração e pesagem diária foi incluído neste experimento. O monitoramento diário do peso dos animais não indicou variação significativa em relação ao grupo Sham (Gráfico 1). Outro parâmetro analisado foi o peso relativo dos órgãos, obtidos da razão entre o peso do órgão e peso total do animal que foi transformada em arcoseno para análise estatística. Após realização da análise estatística dos dados, verificou-se que não há diferença significativa entre os grupos (Tabela 1). A análise de alguns parâmetros séricos (Tabela 2) também não apresentou diferença significativa, demonstrando que a administração do geraniol (7,5 mg/Kg) durante 14 dias não apresenta efeitos tóxicos evidentes.

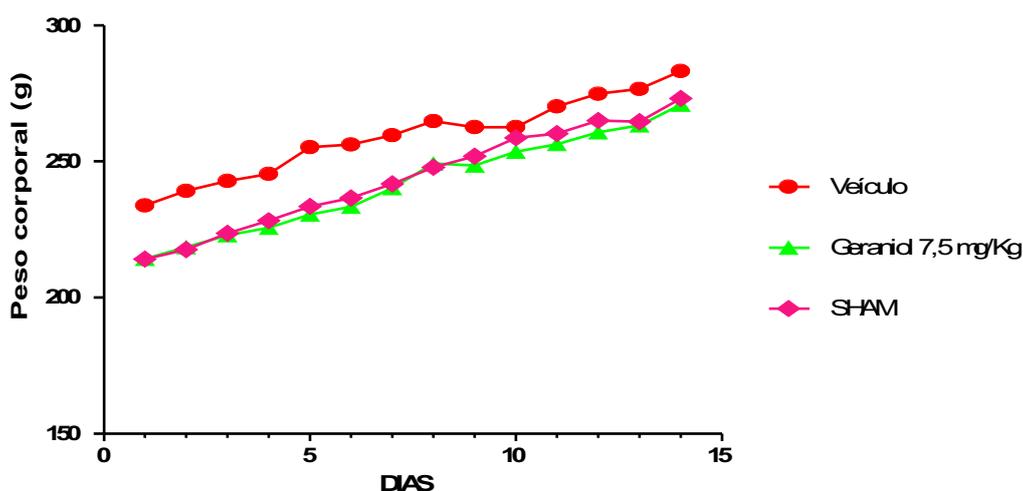


Gráfico 1: Evolução do peso corporal (g) de ratos tratados durante 14 dias com geraniol (7,5 mg/Kg), (n=6-8). ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

Tabela 1 – Peso relativo dos órgãos dos animais tratados durante 14 dias com geraniol (7,5 mg/Kg), (n=6-8). ANOVA, seguida pelo teste de Tukey

TRATAMENTO (V.O)	FÍGADO	CORAÇÃO	PULMÃO	BAÇO	RINS	MORTE
VEÍCULO	10,35±0,17	3,78±0,05	4,55±0,16	3,50±0,12	5,05±0,04	-
GERANIOL 7,5 mg/Kg	10,39±0,10	3,75±0,04	4,67±0,11	3,53±0,10	4,94±0,03	-
SHAM	10,21±0,06	3,85±0,08	4,65±0,17	3,54±0,12	5,01±0,02	-

Tabela 2: Análise dos parâmetros séricos dos animais tratados durante 14 dias com geraniol (7,5 mg/Kg), (n=6 ou 8). ANOVA, seguida pelo teste de Tukey

TRATAMENTO (V.O.)	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GT (U/L)	CREATININA (mg/dL)	URÉIA (mg/dL)	GLICOSE (U/L)
VEÍCULO	157,00±16,36	52,33±2,65	2,53±0,83	0,33±0,01	34,00±2,11	109,70±4,48
GERANIOL 7,5 mg/Kg	136,30±10,47	45,00±2,03	2,34±0,57	0,34±0,02	37,88±2,82	105,90±5,02
SHAM	156,80±14,04	44,88±2,52	1,86±0,34	0,37±0,02	32,88±2,51	99,50±6,62

4.2 Avaliação da Atividade Antiulcerogênica do Geraniol em Modelos Agudos de Úlcera Péptica em Ratos

4.2.1 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto

Em estudos preliminares o geraniol demonstrou atividade gastroprotetora nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg. Administradas pela via oral, ofereceu proteção de 89%, 99% e 99% respectivamente, quando comparadas ao veículo (Gráfico 2). A curva dose resposta para caracterizar a menor dose efetiva (Gráfico 3), constatou que as doses de 6,25, 12,5, 25 e 50 mg/Kg são eficazes em inibir as lesões

causadas pelo etanol em 76%, 74%, 65% e 83% respectivamente, sem diferença estatística entre elas.

Realizamos um terceiro experimento com o geraniol na dose de 7,5 mg/Kg, cuja proteção observada foi de 70% (Gráfico 4). Optamos por dar continuidade a avaliação da atividade gastroprotetora do geraniol em outros modelos de úlcera na dose de 7,5 mg/Kg, uma vez que outro monoterpene (β -mirceno) testado em nosso laboratório apresentou resultados promissores nessa mesma dose e que o geraniol em doses menores, no caso 3,125 mg/Kg, não causa inibição significativa das lesões ulcerosas (dado não mostrado).

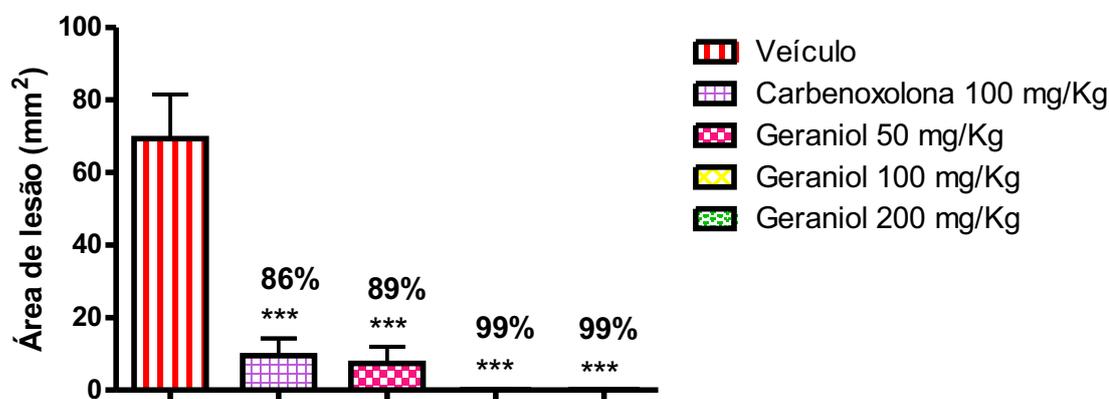


Gráfico 2 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** p < 0.001, (n=6-7). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

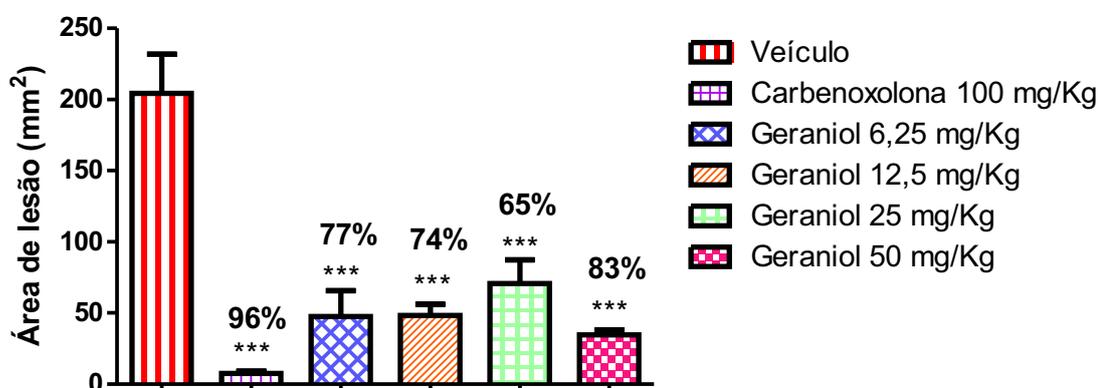


Gráfico 3 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** p < 0.001, (n=5-9). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

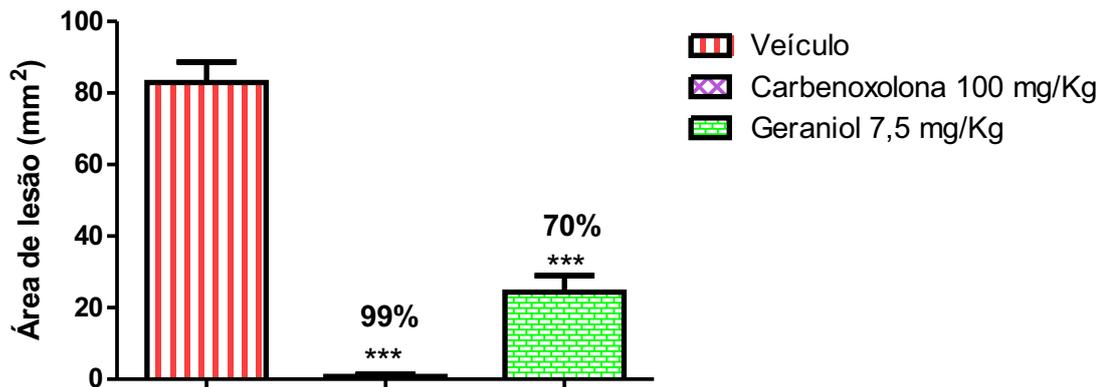


Gráfico 4 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$, (n=5). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

4.2.2 Úlcera Gástrica Induzida por Indometacina (AINE)

O geraniol não demonstrou atividade gastroprotetora na dose de 7,5 mg/Kg nesse modelo (Gráfico 5). A diminuição da área lesionada do grupo teste não foi significativa ($32,22 \pm 8,48 \text{ mm}^2$) quando comparada ao veículo ($23,04 \pm 4,21 \text{ mm}^2$).

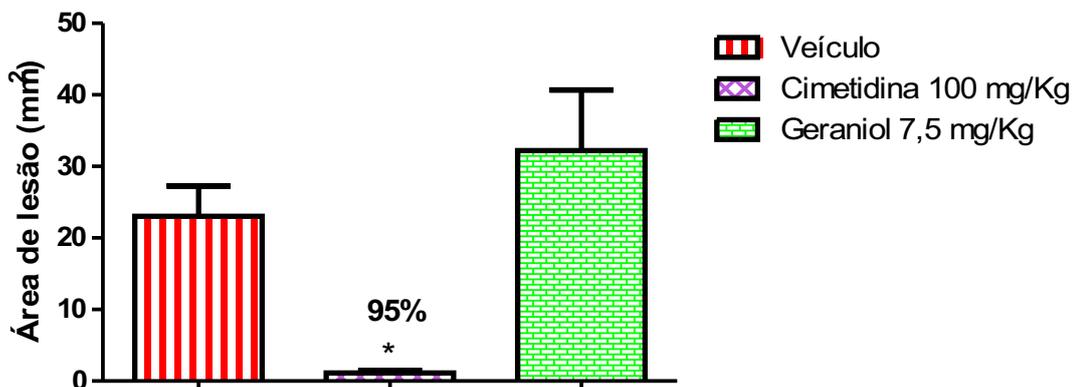


Gráfico 5 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. * $p < 0.05$, (n=5). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

4.2.3 Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Ratos Pré-Tratados com Indometacina (AINE)

Conforme os dados expressos no gráfico 6 pode-se observar que o pré-tratamento com indometacina (30 mg/Kg, s.c.) potencializou as lesões do veículo (85,05 ± 19,52 mm² para 199,80 ± 32,60 mm²) e inibiu a proteção da mucosa oferecida pelo geraniol, elevando de forma significativa a área das lesões (45,17 ± 8,29 mm² para 148,60 ± 36,44 mm²).

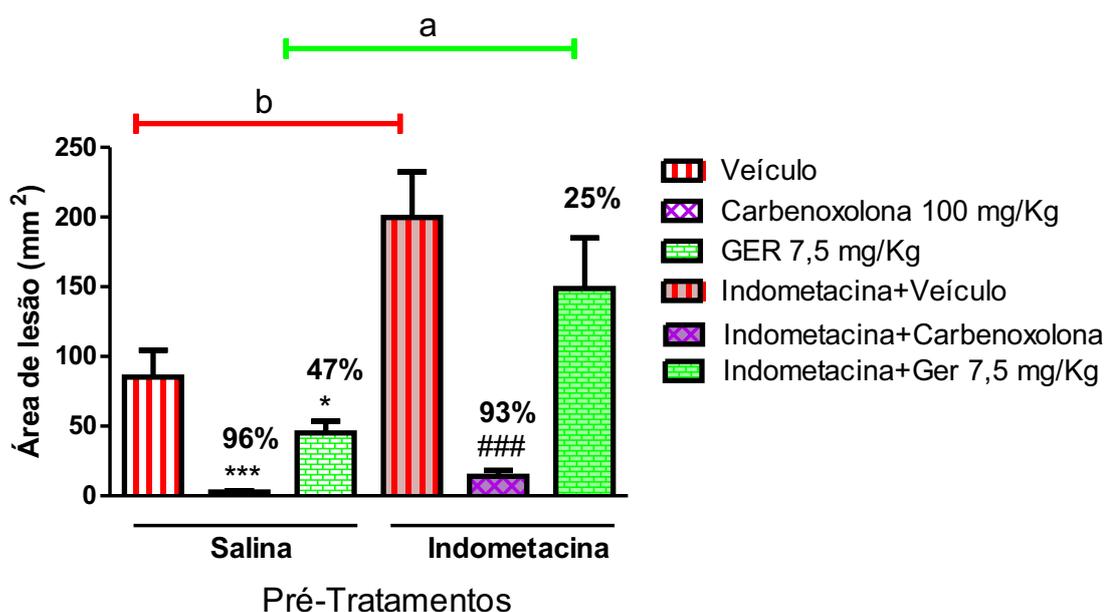


Gráfico 6 – Efeito do geraniol (GER) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados com indometacina. Os dados representam a média ± e.p.m. (n=5-6), *p< 0.05, ***p<0.001 quando comparado ao grupo salina+veículo, ###p <0.001 quando comparado ao grupo indometacina+veículo. ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet. Para comparação entre os grupos com pré-tratamentos distintos utilizou-se ANOVA, seguida do teste de Tukey, cujas letras representadas na barra horizontal expressam: ^ap<0.05 e ^bp <0.01.

4.2.4 Lesão gástrica induzida por isquemia e reperfusão

O geraniol demonstrou atividade gastroprotetora nesse modelo experimental (Gráfico 7). A administração por via oral diminuiu de maneira significativa a área lesionada (30,60 ± 5,28 mm²) quando comparada ao veículo (106,70 ± 17,73 mm²).

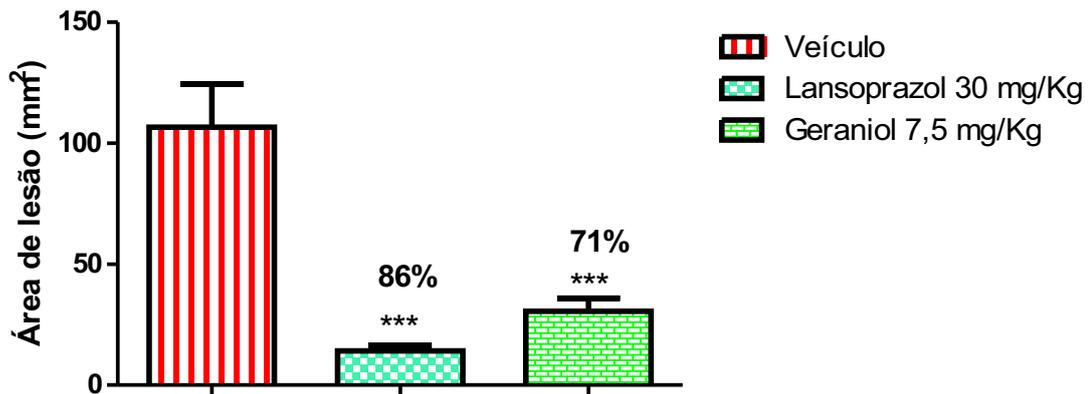


Gráfico 7 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$ (n=7). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

4.2.5 Úlcera duodenal induzida por cisteamina

O geraniol foi eficaz em diminuir de maneira significativa a área de lesão ulcerosa no duodeno ($30,46 \pm 10,85 \text{ mm}^2$) quando comparada ao veículo ($96,68 \pm 12,70 \text{ mm}^2$), como mostra o gráfico 8.

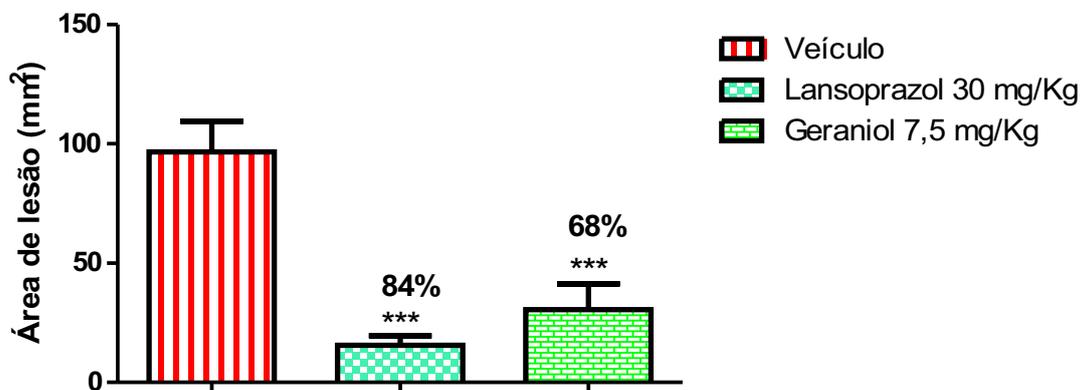


Gráfico 8 – Efeito do geraniol no modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$ (n=5-6). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

4.3 Avaliação dos Mecanismos de Ação Envolvidos na Atividade Antiulcerogênica do Geraniol

4.3.1 Efeito do Geraniol nos Níveis de Glutathiona Total e de Mieloperoxidase na Mucosa Gástrica de Animais Submetidos ao Modelo de Úlcera Induzida por Etanol

Através da quantificação de GSH total da mucosa gástrica foi possível observar que o geraniol (7,5 mg/ Kg) impediu a depleção dos níveis de GSH pela ação do etanol ($1708 \pm 79,21$) quando comparado com o veículo ($1319 \pm 60,05$). Em relação à quantificação de MPO, o tratamento com geraniol manteve baixo os níveis dessa enzima ($266,50 \pm 31,31$) quando comparado com o veículo ($441,20 \pm 58,61$), como mostra o gráfico 9.

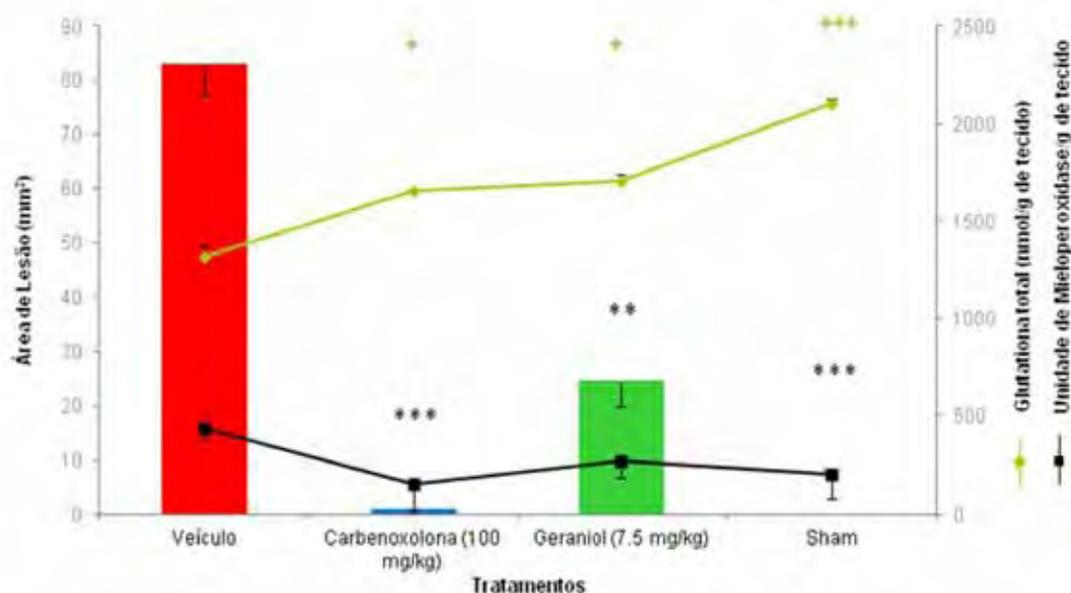


Gráfico 9 – Avaliação dos níveis de GSH e MPO na mucosa gástrica de animais submetidos ao modelo de úlcera por etanol. Os dados representam a média \pm e.p.m. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ ($n=5$). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

4.3.2 Efeito do Geraniol nos Níveis de Glutathiona Total e de Mieloperoxidase na Mucosa Gástrica de Animais Submetidos ao Modelo de Úlcera Induzida por Isquemia e Reperfusão

Através da quantificação de GSH total da mucosa gástrica foi possível observar que o geraniol impediu a depleção dos níveis de GSH ($1023,00 \pm 29,52$) quando comparado com o veículo ($846,60 \pm 36,69$). Em relação à quantificação de MPO, o tratamento com geraniol manteve baixo os níveis dessa enzima ($360,50 \pm 42,52$) quando comparado com o veículo ($809,50 \pm 90,88$), como mostra o gráfico 10.

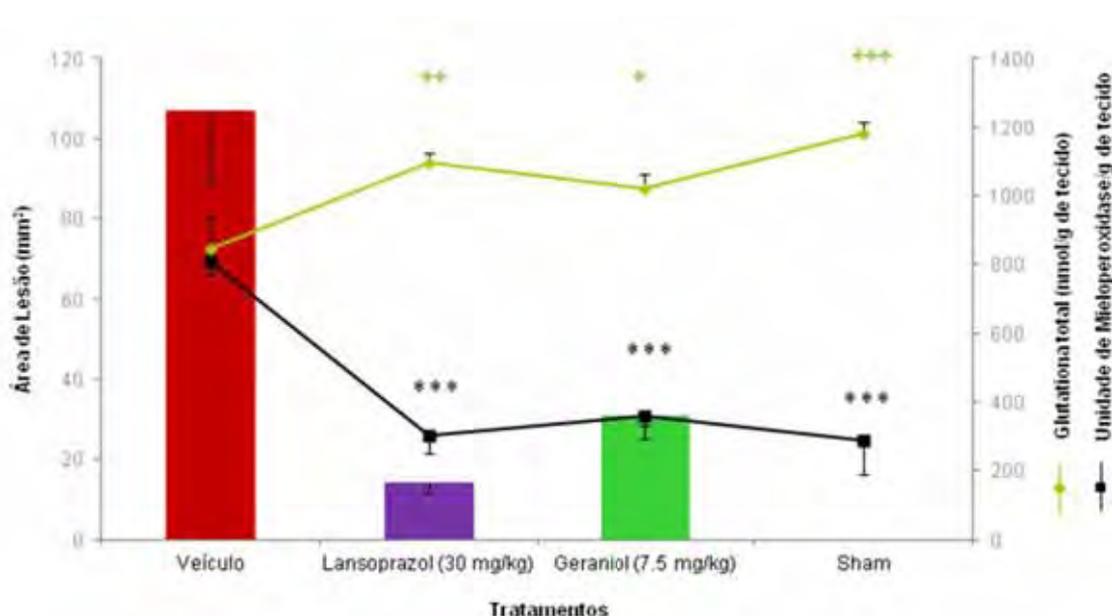


Gráfico 10 – Avaliação dos níveis de GSH e MPO na mucosa gástrica de animais submetidos ao modelo de úlcera por isquemia e reperfusão. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ ($n = 5-7$). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

4.3.3 Efeito do Geraniol nos Níveis de Glutathiona Total e de Mieloperoxidase no Duodeno de Animais Submetidos ao Modelo de Úlcera Induzida por Cisteamina

Através da quantificação de GSH total do duodeno observou-se que o geraniol impediu a depleção dos níveis de GSH pela ação da cisteamina ($567,3 \pm 48,89$) quando comparado com o veículo ($401,2 \pm 38,06$). Em relação à quantificação de MPO, o tratamento manteve baixo os níveis dessa enzima ($762,30$

$\pm 115,10$) quando comparado com o veículo ($1288,00 \pm 126,30$), como mostra o gráfico 11.

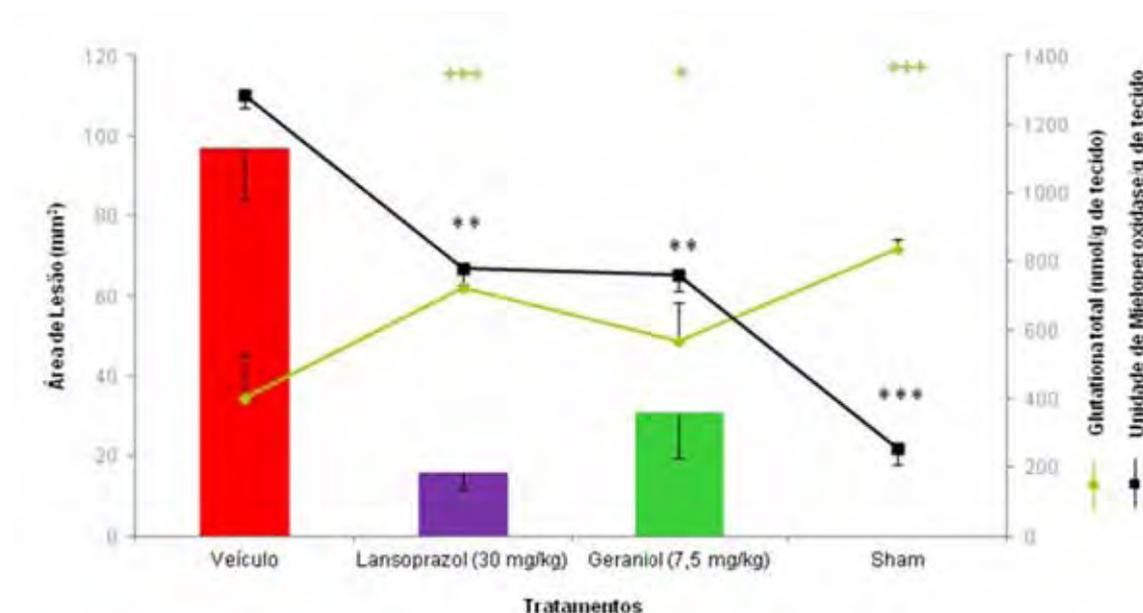


Gráfico 11 – Avaliação dos níveis de GSH e MPO no duodeno de animais submetidos ao modelo de úlcera por cisteamina. Os dados representam a média \pm e.p.m. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ ($n=5-6$). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

4.3.4 Avaliação da Participação da NOS na Gastroproteção

Os resultados obtidos sugerem uma participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na gastroproteção do geraniol (7,5 mg/ Kg). Atribui-se esse envolvimento ao aumento significativo da área ulcerativa do geraniol na presença do bloqueador da NOS (L-NAME). O grupo Salina + Geraniol diminuiu de forma significativa as lesões ulcerosas ($30,23 \pm 7,43 \text{ mm}^2$) quando comparado com Salina+Veículo ($102,4 \pm 17,54 \text{ mm}^2$). Enquanto que no grupo L-NAME + Geraniol a proteção foi perdida ($198,00 \pm 13,40 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo L-NAME + Veículo ($271,10 \pm 27,31 \text{ mm}^2$), como mostra o gráfico 12.

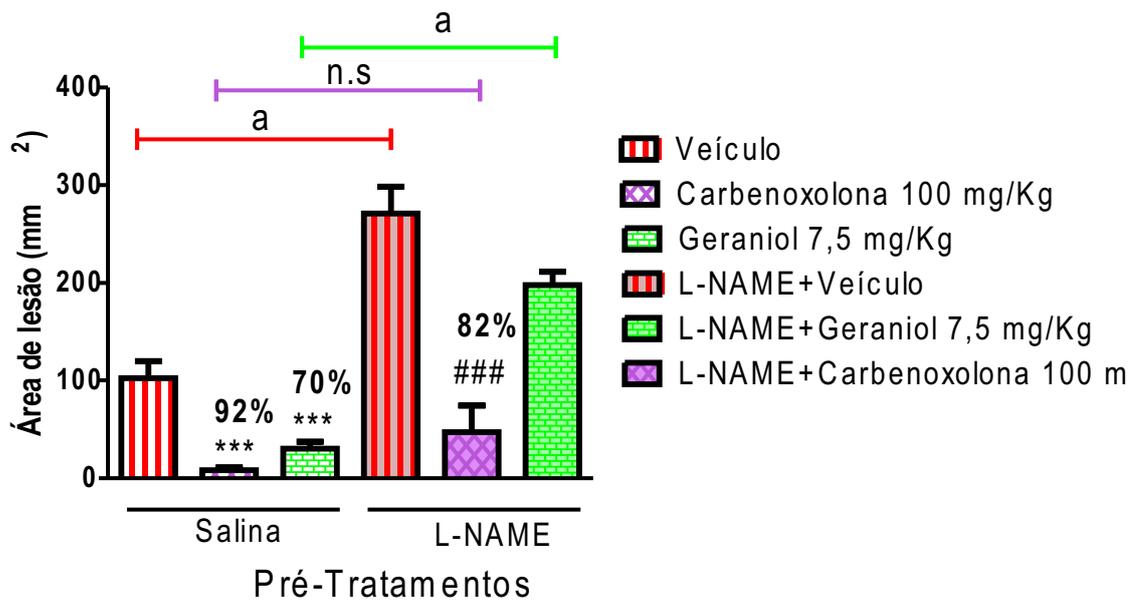


Gráfico 12 – Participação da NO sintase na gastroproteção do geraniol (GER) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. (n=5-6), ***p < 0.001, quando comparado ao grupo salina+veículo, ###p < 0.001 quando comparado ao grupo L-NAME+veículo. ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet. Para comparação entre os grupos com pré-tratamentos distintos utilizou-se ANOVA, seguida do teste de Tukey, cujas letras representadas na barra horizontal expressam: ^ap < 0.001 e n.s.=não significativo.

4.3.5 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidrilas na Gastroproteção

Ocorreu aumento significativo da área ulcerativa do geraniol na presença do bloqueador dos grupamentos sulfidrilas (NEM). O grupo Salina + Geraniol diminuiu de forma significativa as lesões ulcerosas ($30,23 \pm 7,43 \text{ mm}^2$) quando comparado com Salina + Veículo ($102,4 \pm 17,54 \text{ mm}^2$). Enquanto que no grupo NEM + Geraniol a proteção foi perdida ($424,10 \pm 46,66 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo NEM + Veículo ($316,30 \pm 64,36 \text{ mm}^2$), como mostra o gráfico 13.

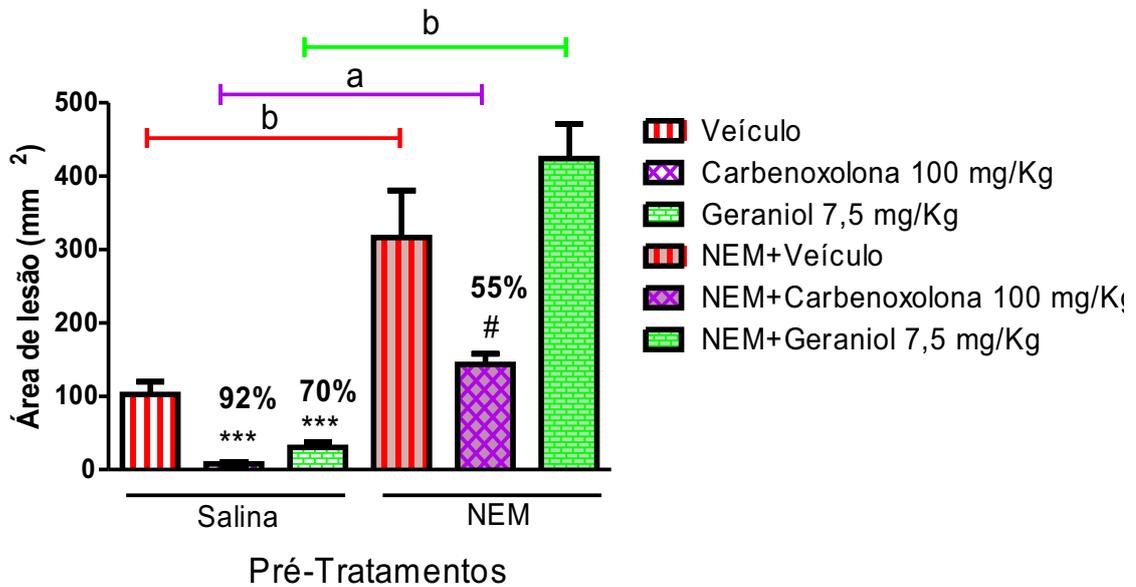


Gráfico 13 – Participação dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção do geraniol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos. Os dados representam a média \pm e.p.m. (n=5-6), *** $p < 0.001$, quando comparado ao grupo salina+veículo, # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo NEM + veículo. ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet. Para comparação entre os grupos com pré-tratamentos distintos utilizou-se ANOVA, seguida do teste de Tukey, cujas letras representadas na barra horizontal expressam: ^a $p < 0.05$ e ^b $p < 0.001$.

4.3.6 Quantificação do Muco Aderido à Parede Gástrica no Modelo de Etanol

Através da quantificação do muco aderido à mucosa gástrica no modelo de úlcera induzida por etanol foi possível observar que o geraniol (7,5 mg/ Kg) foi capaz de aumentar em 76% a quantidade de muco gástrico secretado no estômago quando comparado ao veículo (Gráfico 14).

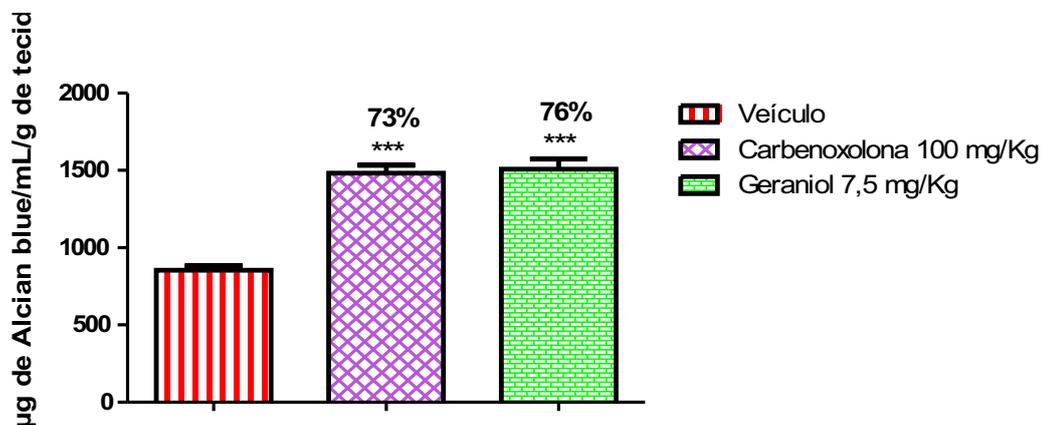


Gráfico 14 – Quantificação de muco aderido à mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$ (n=5-6). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

4.3.7 Avaliação da Atividade Anti-secretora no Modelo de Ligadura do Píloro

Na avaliação dos parâmetros do suco gástrico de animais submetidos ao modelo de ligadura do píloro, observou-se que o tratamento com geraniol (7,5 mg/Kg), tanto por via oral quanto por via intraduodenal, não alterou o volume gástrico, a concentração de H^+ e nem o pH gástrico quando comparado ao veículo (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação da atividade anti-secretora do geraniol (7,5 mg/Kg) no modelo de ligadura do píloro (n= 7-8). Os dados representam a média \pm e.p.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

MODELO EMPREGADO	TRATAMENTOS (V.O.)	DOSE (mg/Kg)	VOLUME DO SUCO GÁSTRICO (4 mL/4h)	CONCENTRAÇÃO DE HIDROGÊNIO $[H]^+$ (mEq/mL)	pH
Píloro Intraduodenal	Veículo	-	5,76 \pm 2,03	5,14 \pm 0,69	-
	Cimetidina	100	4,37 \pm 1,64	3,56 \pm 1,13*	-
	Geraniol	7,5	5,84 \pm 0,70	5,62 \pm 1,73	-
Píloro Oral	Veículo	-	6,35 \pm 1,58	6,26 \pm 0,68	1,29 \pm 0,49
	Cimetidina	100	3,46 \pm 1,10**	2,28 \pm 0,93***	3,71 \pm 0,95**
	Geraniol	7,5	7,14 \pm 1,19	7,08 \pm 0,66	1,12 \pm 0,35

4.3.8 Efeito do Geraniol nos Níveis Séricos de Colecistocinina e Somatostatina no Modelo de Ligadura de Píloro

Os dados obtidos demonstraram que não houve diferença estatística nos níveis hormonais de colecistocinina e somatostatina nos animais submetidos à ligadura do píloro tratados com geraniol.

4.3.9 Avaliação da Motilidade Intestinal no Modelo de Carvão Ativado

O geraniol (7,5 mg/Kg) diminuiu de maneira significativa o trânsito intestinal ($0,84 \pm 0,07$) quando comparado ao veículo ($1,43 \pm 0,12$), como mostra o gráfico 17.

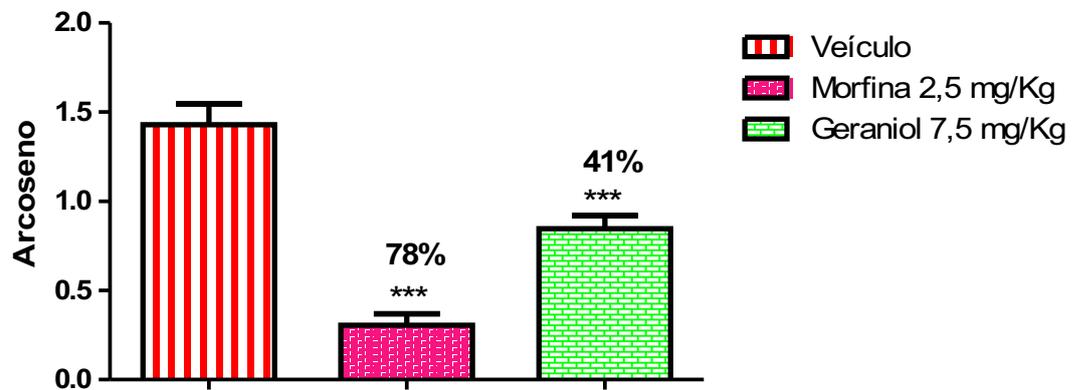


Gráfico 15: Avaliação da motilidade intestinal de camundongos no modelo de carvão ativado. Os dados representam a média \pm e.p.m. *** $p < 0.001$ (n=7-8). ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo realizado com o monoterpreno acíclico geraniol na investigação do efeito antiulcerogênico, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos, o principal achado foi a eficácia dessa substância em proteger a mucosa gástrica e o duodeno nos modelos testados.

O potencial toxicológico do geraniol vem sendo investigado em vários organismos e em diferentes formas de administração, uma vez que esse monoterpreno é um importante material de fragrância (CHEN e VILJOEN, 2010). Em nossos estudos de toxicidade subaguda, o geraniol (7,5 mg/Kg) não apresentou efeito tóxico, após a administração diária durante 14 dias em ratos (Gráfico 1, Tabelas 1 e 2).

Um estudo de toxicidade aguda realizado com ratos que receberam várias doses de geraniol (por via oral) solubilizado em propilenoglicol obteve uma DL_{50} de 4,8 g/Kg para essa substância (YAMAWAKI, 1962). Enquanto que outra pesquisa caracterizou uma DL_{50} de 4 g/Kg para a via intramuscular e 1,1 g/Kg para a via subcutânea em camundongos (NORTHOVERAND e VERGHESE, 1962; NOZAWA, 1952). Outros estudos demonstraram que a administração de geraniol (1000 mg/Kg/dia) na dieta de ratos durante 16 semanas, e a inclusão de geraniol (100 mg/Kg/dia) na dieta por 28 semanas não produziram quaisquer efeitos adversos (HAGAN et al., 1967). Nenhum efeito mutagênico também foi observado em um teste de Ames realizado em *Salmonella typhimurium* com 0,5 mg de geraniol em DMSO com e sem ativação da fração microssomal S9 (LAPCZYNSKI et al., 2008).

Portanto, os dados de toxicidade obtidos em nosso laboratório corroboram com os dados na literatura que descreve a ausência de toxicidade para altas doses de geraniol durante um período de tempo prolongado. Essas informações nos permitiram uma escolha segura das doses utilizadas nos modelos experimentais de úlcera péptica em animais, com o objetivo de investigar o efeito antiulcerogênico do monoterpreno geraniol.

Os experimentos realizados para a avaliação da gastroproteção foram selecionados por envolverem diferentes agentes e mecanismos, conhecidos na

literatura por induzir as lesões ulcerosas pépticas. A formação de lesões ulcerativas em modelos experimentais, assim como as decorrentes em humanos, é provocada por um desequilíbrio entre os fatores protetores e lesivos da mucosa gástrica (MAITY *et al.*, 2003). Esse desequilíbrio pode ser desencadeado por procedimentos invasivos, tais como cirurgia, ou até mesmo pela administração de substâncias químicas (KUSHIMA, 2006).

O modelo de indução de úlcera por etanol absoluto promove lesões necróticas de maneira multifatorial na mucosa gástrica. Essas lesões são ocasionadas por efeitos tóxicos diretos através da redução da produção de muco, da produção de bicarbonato, dos níveis de glutathiona endógena e de prostaglandinas, e através do aumento da liberação de histamina, aumento do influxo de cálcio e geração de radicais livres (GLAVIN e SZABO, 1992).

O etanol concentrado causa rapidamente a necrose das células superficiais da mucosa em decorrência da precipitação dos constituintes citoplasmáticos e interrupção das funções da membrana, dentre elas a perda de fluidez e transporte de íons. Em poucos segundos, o etanol também perturba as funções de outras células da mucosa, os mastócitos, que liberam mediadores vasoativos, tais como leucotrienos C4 (LTC4) e histamina. O LTC4 desencadeia vasoconstricções intensas em série que progridem desde as pequenas vênulas da mucosa para as veias de maior calibre. Esse quadro de estase venosa é agravado pela contração da musculatura gástrica adjacente aos locais de penetração do etanol nos leitos venosos (OATES e HAKKINEN, 1988).

A dilatação das arteríolas começa logo após os eventos mencionados acima, mediada pela histamina, sendo provável que outros autacóides e metabólitos do etanol também contribuam para esse evento. A potente dilatação arterial juntamente com a severa constrição venosa causa intensa distensão dos capilares da mucosa gástrica, ocasionando a hiperemia, elevando de forma exacerbada a pressão no interior desses capilares, que, em conjunto com o aumento da permeabilidade mediado pela histamina, LTC4 e etanol, causam edema na mucosa gástrica. Por conseguinte, as concentrações do etanol continuam a aumentar no interior da mucosa do tecido já hiperêmico, provocando hemólise de hemácias estagnadas no tecido, com precipitação de componentes teciduais e sanguíneos ao redor dos capilares distendidos. O etanol também provoca espasmos rigorosos na

musculatura lisa vascular provocando hemorragia, intensificando a estase vascular (OATES e HAKKINEN, 1988).

O monoterpeno geraniol, administrado por via oral, nas doses de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg, reduziu as lesões induzidas por etanol absoluto (Gráfico 2, 3 e 4) sem demonstrar uma relação de dependência da dose com o efeito farmacológico evidenciado. Essa proteção pode estar associada ao aumento na liberação de substâncias protetoras da mucosa, já que as úlceras induzidas por etanol são inibidas por agentes que estimulam a produção dos fatores defensivos da mucosa, fatores esses semelhantes às prostaglandinas (MORIMOTO *et al.*, 1991). Essa observação pode ser comprovada ao avaliarmos a eficácia da carbenoxolona na dose de 100 mg/ Kg (utilizada como controle positivo) em diminuir as lesões gástricas no modelo de etanol (Gráficos 2, 3 e 4).

Visto que a carbenoxolona é um derivado do ácido glicirretínico que confere efeito gastroprotetor através da inibição de enzimas inativadoras de prostaglandinas (PG), prolongando o efeito citoprotetor das prostaglandinas; aumento da secreção de prostaglandina E_2 , na luz gástrica; inibição de fosfodiesterases sistêmicas, prolongando o efeito vasodilatador do óxido nítrico via GMPc; e através da estimulação da produção de muco (FRANCO *et al.*, 1993).

Outra ferramenta utilizada para avaliar a atividade gastroprotetora do geraniol foi a úlcera causada por DAINES, utilizando-se o modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina.

Os DAINES geralmente são ácidos fracos que, ao entrarem em contato com o ambiente ácido do estômago em jejum (pH=2), apresentam-se predominantemente em sua forma não ionizada, lipofílica, penetrando no interior das células. Visto que o pH intracelular é neutro, os DAINES são configurados para sua forma ionizada, alterando o equilíbrio eletrolítico do potencial de membrana, causando lesão celular (LAINE, 1996). Outro mecanismo de ulceração se dá através da inibição da cicloxigenase (COX) 1, resultando em fluxo sanguíneo reduzido, e inibição da COX-2, culminando no aumento da aderência de leucócitos no endotélio vascular (WALLACE, 2006).

No experimento de úlcera induzida por indometacina (Gráfico 5) constatou-se que o geraniol não foi eficaz em diminuir a média das lesões em relação ao grupo tratado com veículo. A partir disso foi pressuposto que o efeito gastroprotetor do geraniol possivelmente esteja relacionado com a via da COX.

A literatura aponta que essa via tem participação na gastroproteção no modelo de etanol mediada pelas PGs. Estas que participam de importantes processos fisiológicos no estômago, bem como produção de muco, secreção de bicarbonato, melhora do fluxo sanguíneo, inibição da secreção ácida e inibição da motilidade gástrica (TAKEEDA *et al.*, 2004).

Para comprovar essa hipótese buscou-se identificar qual seria o possível papel da via da COX no efeito gastroprotetor do geraniol, através do bloqueio dessa via e a indução de úlcera com o etanol, para avaliação do comportamento desse monoterpeno. No modelo de lesão gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados com indometacina (Gráfico 6) pode-se observar que o o pré-tratamento com indometacina abole o efeito gastroprotetor do geraniol, evidenciando que essa atividade depende, pelo menos em parte, do envolvimento das prostaglandinas (NUNES *et al.*, 2009).

O modelo de isquemia e reperfusão (I/ R) causa ulceração gástrica devido à formação excessiva de metabólitos reativos de oxigênio, a adesão de neutrófilos às células endoteliais, disfunção microvascular, a secreção de ácido gástrico, a histamina endógena e liberação de gastrina (BRZOWSKI *et al.*, 2000). Nesse modelo a isquemia, por si só, lesiona e provoca morte celular. Entretanto, é na reperfusão do tecido isquêmico que ocorre uma série de modificações teciduais, que tem como consequência o aparecimento das lesões (RIBEIRO e YOSHIDA, 2005).

Durante a fase de isquemia, ocorre diminuição do aporte de oxigênio, levando à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e à queda da produção e estoque do trifosfato de adenosina (ATP). Entretanto, o ATP continua sendo consumido e degradado à difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) e, posteriormente, em adenosina, inosina e hipoxantina. A falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+ -ATPase) e, devido à falência da bomba, passa a haver maior acúmulo de Na^+ intracelular e perda de K^+ para fora da célula, com consequente edema celular e de suas organelas. Ao mesmo tempo, ocorre influxo de Ca^{2+} e de cloreto para o meio intracelular, com acúmulo de Ca^{2+} no citosol, que provoca a ativação da protease calpaína que, por sua vez, promove a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), levando à formação da enzima xantina oxidase (XO), que necessita de oxigênio para realizar a conversão da hipoxantina em xantina. Assim, na fase de isquemia, portanto, ocorre acúmulo de hipoxantina e xantina

oxidase. Com a reperfusão, a hipoxantina é oxidada à xantina, e esta, em ácido úrico, tendo como subproduto dessa reação a formação do ânion superóxido (O_2^-). O radical superóxido promove a liberação do íon ferroso da ferritina que reage com o peróxido de hidrogênio, formando um radical hidroxila altamente tóxico (RIBEIRO e YOSHIDA, 2005).

O radical hidroxila inicia a peroxidação das membranas celulares, liberando ácido araquidônico e radicais livres, lipídios peroxil (UEDA *et al.*, 1989). O ácido araquidônico é metabolizado pela COX em tromboxano, prostaglandinas do tipo PGE_1 e PGI_2 ; ou pela lipoxigenase, em leucotrienos do tipo LTB₄, C₄, D₄ e E₄. O radical peroxil promove lipoperoxidação adicional, retirando um hidrogênio do ácido graxo, dando origem a uma reação em cadeia, cujo produto final é o dialdeído malônico (MDA). Os radicais livres podem, também, atuar de forma indireta, atraindo e ativando neutrófilos nos tecidos envolvidos. Os neutrófilos por sua vez, secretam enzimas proteolíticas (mieloperoxidases, elastases e proteases), sintetizam prostaglandinas e ocluem a microcirculação na fase de reperfusão, dificultando o fluxo sanguíneo, além de produzirem mais radicais O_2 , reiniciando o ciclo, com formação de mais radical hidroxila (RIBEIRO e YOSHIDA, 2005).

Os resultados encontrados no modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão constataram uma diminuição significativa das lesões ulcerativas com uma proteção gástrica de 71% quando comparada ao grupo veículo (Gráfico 7). O lansoprazol (30 mg/ Kg), utilizado como controle positivo, foi eficaz em diminuir as lesões ulcerosas por inibir a secreção de ácido que encontra-se hiperestimulada no processo de isquemia e reperfusão.

Segundo Ribeiro e Yoshida (2005), uma série de fatores pode estar envolvida na gastroproteção provocada pela I/R, sendo eles enzimáticos hidrossolúveis (SOD, catalase, glutathione peroxidase), lipossolúveis (tocoferóis, carotenóides e quinonas) e bloqueadores de leucotrienos. O geraniol pode estar envolvido nas vias antioxidantes, modulando e preservando as enzimas antioxidantes ou ainda funcionando como seqüestrador direto de radicais livres produzidos.

O estresse oxidativo através das mudanças no ambiente intracelular e geração de radicais livres, como superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila pode levar a peroxidação lipídica, danos à proteínas e mutações no DNA (ácido desoxirribonucléico). A sinalização redox nas células constitui um sistema

complexo que serve tanto como mecanismo de defesa quanto resposta ao estresse oxidativo. A cisteamina é um aminotiol redutor formado a partir da via catabólica da coenzima A que induz úlceras perfurantes no duodeno proximal de rato dentro de 24 horas (KHOMENKO *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que o efeito citotóxico da cisteamina depende da geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e da oxidação da cisteamina ao seu correspondente dissulfeto. O H₂O₂ tiol derivado reage com os metais de transição reduzidos e produz o radical hidroxila. Estes radicais são os mediadores finais de toxicidade causada pela cisteamina (JEITNER e LAWRENCE, 2001), como evidenciado pela enzima catalase ao inibir completamente essa toxicidade (HELD e BIAGLOW, 1994).

Os resultados demonstram que o pré-tratamento com o geraniol foi capaz de inibir a formação de lesão duodenal pela cisteamina quando comparado ao veículo (Gráfico 8), reforçando a premissa de que esse monoterpene tem atividade antioxidante, visto que em dois modelos (I/ R e cisteamina) que envolve estresse oxidativo, ele foi eficaz. Além disso, esses dados corroboram com a literatura que vêm demonstrando o potencial antioxidante do geraniol através da atividade de varredura contra o radical DPPH, aumento na atividade da superóxido dismutase, da catalase, restauração do potencial de membrana mitocondrial, diminuição da lipoperoxidação e inibição da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células pré-tratadas com geraniol em comparação com as células que só passaram pelo estresse oxidativo (CHEN e VILJOEN, 2010).

A caracterização da atividade antiulcerogênica do geraniol no controle das lesões gástricas nos modelos descritos acima, nos levou à realização de experimentos que possibilitassem explicar possíveis mecanismos pelo qual esse monoterpene atua. Foram executados experimentos que visavam verificar o envolvimento dos níveis de GSH e de mieloperoxidase, da participação da NOS, dos grupamentos sulfidrilas, produção de muco aderido, secreção gástrica e a motilidade intestinal no efeito evidenciado.

O GSH é um tripeptídeo (- L- Glu- L- Cys- Gly) com alta capacidade doadora de elétrons (alto potencial redox negativo) devido ao grupamento tiol (-SH) na porção cisteína, combinada com uma alta concentração intracelular, que resulta em um alto poder redutor. Estas características justificam sua potente atividade antioxidante e sua propriedade de cofator enzimático, importantes para regulação da atividade celular. Está presente no organismo em suas formas; reduzida (GSH) e

oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Sob condições de estresse oxidativo, as EROs são reduzidas por GSH com concomitante formação do dissulfeto oxidado, a GSSG (glutathiona oxidada) (GRIFFITH; MULCAHY, 1999).

Para manter o equilíbrio redox celular, o GSSG é exportado das células por proteínas de transporte dependentes de ATP, implicando que condições severas de stress diminuem os níveis celulares de GSH (CNUBBEN *et al.*, 2001). Esta depleção de GSH está relacionada com a patofisiologia de muitas doenças. (BUNNELL e PACTH, 1993; ROUM *et al.*, 1994), sugerindo um importante papel do GSH na manutenção da integridade dos sistemas fisiológicos.

Na quantificação dos níveis de glutathiona total no estômago dos animais tratados com o geraniol nos modelos de indução de úlcera gástrica que evidenciaram o efeito gastroprotetor desse monoterpeneo, verificou-se que os níveis de glutathiona total (representados pela linha verde nos gráficos 9, 10 e 11) apresentaram-se elevados em comparação aos níveis encontrados no grupo tratado somente com veículo. Este resultado reforça os dados da literatura que apontam o geraniol como um agente antioxidante e comprovam que essa substância depende desta via para proteger a mucosa gástrica contra os danos causados pelos agentes ulcerogênicos.

Os radicais livres têm um papel de destaque no desenvolvimento das lesões gástricas e os neutrófilos são descritos como umas das maiores fontes geradoras desses radicais livres. Esses neutrófilos promovem a liberação de espécies reativas de oxigênio e proteases, resultando em um dano tecidual inflamatório dependente de neutrófilos, sendo os níveis da mieloperoxidase um marcador indireto da resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais, caracterizando assim um quadro de infiltração celular (DENGIZ *et al.*, 2007).

Na quantificação dos níveis de mieloperoxidase no estômago dos animais tratados com o geraniol nos modelos de indução de úlcera gástrica, verificou-se que os níveis de MPO (representados pela linha preta nos gráficos 9, 10 e 11) apresentaram-se baixos na presença do monoterpeneo em comparação aos níveis encontrados no grupo tratado somente com veículo. Este resultado aponta que a atividade gastroprotetora do geraniol está relacionada com um mecanismo de diminuição de infiltração celular.

Estudos indicam que o NO está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera por promover vasodilatação, estimular a produção de muco, reduzir a peroxidação lipídica e também por uma ação antiinflamatória nos tecidos (CHO, 2001; KWIECIEN *et al.*, 2002). O NO endógeno parece estar envolvido na regulação da secreção ácida gástrica pós-prandial. Este efeito pode estar mediado pela mudança na liberação de gastrina e somatostatina. O NO endógeno também retarda o esvaziamento gástrico e a atividade motora antral sem afetar a atividade mioelétrica gástrica (KONTUREK *et al.*, 1999).

O NO é sintetizado pela enzima NOS a partir de oxigênio (O₂) e L-arginina (TODA e HERMAN, 2005). Existem três isoformas dessa enzima codificadas por genes diferentes, a óxido nítrico sintase neuronal, endotelial e induzida (nNOS, eNOS e iNOS respectivamente). Tanto a nNOS quanto a eNOS são expressas em condições fisiológicas normais e ditas como constitutivas, produzem NO citoprotetor. Já a NO sintase induzida (iNOS), forma NO com ação citotóxicas (NISHIDA *et al.*, 1997; NAHAVANDI *et al.*, 1999).

Uma vez inibida a enzima NOS, os mecanismos de proteção do NO são seriamente comprometidos. Os resultados do experimento (Gráfico 12) com o inibidor da NOS (L-NAME) mostram que o efeito gastroprotetor do geraniol foi revertido com a prévia administração deste inibidor, sugerindo que a gastroproteção desse monoterpeno atua de maneira dependente da via da NOS.

Outro fator que contribui para a integridade da mucosa gástrica é a formação de grupamentos sulfidrilas endógenos. Esses compostos participam da proteção da mucosa pela ligação a radicais livres e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades glicoprotéicas do muco de maneira a impedir a sua dissociação, se houver redução dessas ligações, o muco torna-se hidrossolúvel (Avila *et al.*, 1996). Além disso, esses grupamentos estão presentes na glutathione e conforme mencionado anteriormente tem importância na redução do estresse oxidativo.

A administração prévia do inibidor da formação dos compostos sulfidrilas endógenas (NEM) no grupo tratado com geraniol provocou um aumento expressivo das lesões gástricas induzidas pelo etanol (Gráfico 13). Evidenciando a importância desses grupamentos na proteção promovida pelo geraniol.

O muco gel, secretado por expulsão da superfície apical das células epiteliais gástricas, consiste de um gel viscoso, elástico, aderente e transparente

formado por 95 % de água e 5 % de glicoproteínas (REPETTO e LLESUY, 2002). É secretado por células secretoras de muco encontradas entre as células superficiais por toda a mucosa gástrica (KUTCHAI, 1996). Nessa mucosa o bicarbonato e os fosfolípidios ficam retidos. O bicarbonato retido no muco mantém o pH deste microambiente neutro, impedindo a ação digestória proteolítica da pepsina. A regulação fisiológica desta secreção envolve diversos fatores, como as prostaglandinas, peptídeos e fatores neuronais. No estômago, o aumento da secreção de muco e HCO_3 é regulado pelas prostaglandinas PGE_2 através da interação com receptores EP_1 (TAKEUCHI *et al*, 2006).

Visto que o efeito gastroprotetor do geraniol depende de fatores que estimulam e regulam a produção de muco, resolveu-se quantificar a produção de muco aderido à mucosa gástrica nos animais tratados com essa substância. Através da quantificação de muco aderido à mucosa gástrica de animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol (Gráfico 14) foi possível observar que os animais tratados com geraniol foram capazes de aumentar significativamente a quantidade de muco gástrico secretado no estômago quando comparado ao veículo.

Outro mecanismo de ação avaliado para o efeito gastroprotetor evidenciado foi a atividade antissecretora desse monoterpeneo no modelo de ligadura de piloro. Sabe-se que a ligadura de piloro causa uma hipersecreção gástrica, mas as razões ainda não estão completamente esclarecidas (ANDREO *et al.*, 2006). De acordo com Brodie (1966), esta cirurgia causa expansão do estômago, aumentando a pressão nos receptores sensitivos da mucosa antral que ativam o reflexo vagal, aumentando a secreção gástrica.

Segundo Sairam *et al.* (2002), este tipo de indução de úlcera ocorre devido à autodigestão da mucosa gástrica e pelo rompimento da barreira de proteção da mucosa gástrica. Nesse modelo experimental não foi evidenciado redução em nenhum dos parâmetros mensurados em comparação com o veículo (Tabela 3), tal fato nos leva a sugerir que o geraniol não apresenta atividade antissecretora. Os resultados de quantificação dos níveis séricos de somatostatina e colecistocinina, dois hormônios que regulam a secreção gástrica e que se mostraram inalterados confirmam essa hipótese.

Outro local em que o geraniol poderia estar atuando para promover a proteção da mucosa gástrica seria através do aumento da motilidade gastrointestinal (Gráfico 15), assim, o esvaziamento gástrico aumentado diminuiria a quantidade de

ácido presente no estômago e reduziria o efeito agressor do ácido (SUZUKI *et al.*, 2000).

Foi observado que o geraniol diminui a motilidade intestinal, provavelmente esse mecanismo esteja relacionado com o seu efeito gastroprotetor. Entretanto, faz-se necessários mais estudos que indiquem qual via está envolvida nessas alterações de motilidade.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho comprovam a ação gastroprotetora do geraniol que exerce sua ação através do aumento dos fatores protetores da mucosa e fortalecimento da defesa antioxidante.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho apontam o geraniol como um promissor agente de origem natural para a utilização em terapias preventivas de úlceras gástricas. Sua ação gastroprotetora se dá através do fortalecimento dos fatores endógenos e não em decorrência da inibição dos fatores agressores.

REFERÊNCIAS

ABU-LAFI, S. *et al.* Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. **Bioresource Technology**, 99: 3914-3918, 2007.

AIHARA, T. *et al.* Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacology & Therapeutics**, 98: 109-127, 2003.

ALLEN, J. C. e HALIMTON, R. J. Rancidity and foods, **Blackie Academic and Professional**, London, UK, 2000.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Meth. Enzymol.**, 113: 548-555, 1985.

ANDREO, M. A. *et al.* Effect of Mouriri pusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **J. Ethnopharmacol.**, 54: 131-138, 2006.

AVILA, J. R. *et al.* Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflamm. Res.**, 45: 83-88, 1996.

BERARDI, R. R. e WELAGE, L. S. Peptic ulcer disease. In: DIPIRO, J. *et al.* (eds.) **Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach**. 7. ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2008, p. 569-587.

BESERRA, A. M *et al.* Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59 (13): 6957-65, 2011.

BORRELLI, F. e IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, 14: 581-591, 2000.

BRUNTON, L.L. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN A.G. **Goodman e Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th edition, New York: McGraw-Hill, p. 663-691, 1996.

BRODIE, D.A. The mechanism of gastric hyperacidity produced by pylorus ligation in the rat. **Am. J. Dig. Dis.**, 11: 231-241, 1966.

BRZOZOWSKI, T. *et al.* Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers. **Eur. J. Pharmacol.** 398: 147-158, 2000.

BUCINSKAITE, V.; KUROSAWA, M.; LUNDEBERG, T. Exogenous cholecystokinin-8 reduces vagal efferent nerve activity in rats through CCK_A receptors. **Br. J. Pharmacol.**, 129: 1649-1654, 2000.

BUNNELL, E., PACT, E.R. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 148: 1174-1178, 1993.

CARNESECCHI, S. *et al.* Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, 298 (1), 197–200, 2001.

CHAN, F. L. e LEUNG, W. K. Peptic ulcer disease. **Lancet.**, 360: 933-941, 2002.

CHEN, W. e VILJOEN, A. M. Geraniol – A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, 76 (4): 643-651, 2010.

CHO, C. H. Current roles of oxide nitric in gastrointestinal disorders. **Journal of physiology.**, 95: 253-256, 2001.

CHOI, H.S. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1- diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 48: 4156-4161, 2000.

CNUBBEN, N. H. P. *et al.* The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 10: 141-52, 2001.

CURTIS, G. H. *et al.* Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 73: 130-134, 1995.

D'ACAMPORA, A. J. *et al.* Perfil Epidemiológico Dos Pacientes Portadores De Úlcera Péptica Perfurada Atendidos No Centro Cirúrgico Do Hospital Florianópolis. **Rev. Med. Res. Vol.** 10 (4): 138, 2008.

DENGIZ, G.O. *et al.* Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. **Arch. Pharm. Res.**, 30: 1426-1434, 2007.

FEINSTEIN, L. B. *et al.* Trends in hospitalizations for peptic ulcer disease, United States, 1998-2005. **Emerg. Infect. Dis.**, 16 (9):1410-1418, 2010.

FERREIRA, M. P. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **J. Ethnopharmacology**, 117: 170-174, 2008.

FRANCO, L. *et al.* Anti-ulcer activity of carbenoxolone and ISF 3401 on PGE2 release in rat gastric mucosa. **Pharmacological Research**, 27 (2), 1993.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, 10: 1545-1560, 2002.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, Rio de Janeiro: Guanabara, 11 ed., 2007.

GLAVIN, G. B e SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms and new therapeutic strategies. **FASEB J.**, 6: 825-831, 1992.

GRIFFITH, O.W. e MULCAHY R.T. The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, 73: 209-267, 1999.

GUIDOBONO, F. *et al.* Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **Br. J. Pharmacology**, 120: 581-586, 1997.

HAGAN, E.C.; HANSEN, W.H.; FITZHUGH, O.G.; JENNER, P.M.; JONES, W.I.; TAYLOR, J.M.; LONG, E.L.; NELSON, A.M.; BROUWER, J.B. Food flavorings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. **Food and Cosmetics Toxicology**, 5: 141-157, 1967.

HELD, K. D.; BIAGLOW, J. E. Mechanisms for the oxygen radical mediated toxicity of various thiol-containing compounds in cultured mammalian cells. **Radiat. Res.**, 139: 15-23, 1994.

HIERRO, I. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. **Phytomedicine**, 11: 77-82, 2004.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 47: 565-573, 2001.

JEITNER, T. M. E LAWRENCE, D. A. Mechanisms for the cytotoxicity of cysteamine. **Toxicol. Sci.**, 63: 57-64, 2001.

JEON, J. H.; LEE, C. H.; LEE, H. S. Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites. **Journal of Food Protection**, 72: 1468-1471, 2009.

KARMELI, F. *et al.* Gastric and mucosal damage by ethanol is mediated by substance P and prevented by ketotifen, a mast cell stabilizer. **Gastroenterology**, 10: 1206-1216, 1994.

KHALLAAYOUNE, K. *et al.* Efficacy of 1% geraniol (Fulltec) as a tick repellent. **Parasite**, 16, 223-226, 2009.

KHOMENKO, T. Cysteamine alters redox state, HIF-1 α transcriptional interactions and reduces duodenal mucosal oxygenation: Novel insight into the mechanisms of duodenal ulceration. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 317: 121-127, 2004.

KONTUREK, J. W. Endogenous nitric oxide in the regulation of gastric secretory and motor activity in humans. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 13 (12), 1683-1691, 1999.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. **Gastroenterology**, 87: 1344-1350, 1984.

KUMARAN, A. M. *et al.* Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, 17: 957, 2003.

KURATA, J. H. e NOGAWA, A. N. Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Helicobacter pylori*, and smoking. **J. Clin. Gastroenterol**, 24: 2-17, 1997.

KUSHIMA, H. Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davilla elliptica* St. Hil. e *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (Dilleniaceae). Botucatu: UNESP, 2006. 122p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil.

KUTCHAI, H. C. Secreções gastrintestinais. In: _____. BERNE, R. M. e LEWI, M. N. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996.

KWIECIEN, S. *et al.* The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **Journal of physiology and pharmacology**, 53 (4): 761-773, 2002.

LAINÉ L. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.**, v. 6, p. 489-504, 1996.

LAPCZYNSKI, A. *et al.* Fragrance material review on geraniol. **Food and Chemical Toxicology**, 46 (11-S1): S160-S170, 2008.

LEWIS, J. H. Safety profile of long-term H₂-antagonist therapy. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 5: 49-57, 1991.

MAIMONE, T. J. e BARAN, P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature Chemical Biology**, 7 (3): 396-407, 2007.

MAITY, P. *et al.* Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 253: 329-338, 2003.

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

MARCOLIN, M. A.; CANTARELLI, M. G.; GARCIA JUNIOR, M. Interações farmacológicas entre medicações clínicas e psiquiátricas. **Rev. Psiq. Clín.**, 31 (2): 70-81, 2004.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotection Of escins Ia, Ib, Iia, And Iib on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Eur. J. Pharmacology**, 373: 63-70, 1999.

MILANI, S. e CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microsc. Res. Tech.**, 53: 360-371, 2001.

MORIMOTO, Y. *et al.* Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. **Jap. J. Pharmacol.**, 57: 495-505, 1991.

NAHAVANDI, A. *et al.* NG –nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 170: 283-286, 1999.

NAPOLITANO, L. Refractory peptic ulcer disease. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, 38: 267-288, 2009.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; ISHIGURO, I. Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthesis in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 236: 275-279, 1997.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus

e as contribuições de Overton e de Hansch. **Rev. Virtual Quim.**, 1 (3): 227-240,

2009.

NORTHOVER, B.J., VERGHESE, J. The pharmacology of certain terpene alcohols & oxides. **Journal of Scientific and Industrial Research**, 21C: 342–345, 1962

NOZAWA, Y. A report on studies of anthelmintic actions of principles of volatile oils. III. Toxicity for mice and the efficacy against pig ascaria and earthworm muscles. **Sapporo Igaku Zasshi**, 3: 73–77, 1952.

NUNES, P. H. *et al.* Antiulcerogenic activity of Combretum leprosum. **Pharmazie**, 64(1): 58-62, 2009.

OATES, P. J. e HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of ethanol induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, 94: 10-21, 1988.

O'MALLEY, P. Gastric ulcers and GERD: the new “plagues” of the 21st century update for the clinical nurse specialist. **Clinical Nurse Specialist**, 17, 286-289, 2003.

PEURA, D.A. e CZINN, S.J. What I need to know about Peptic Ulcers. In: **National Digestive Diseases Information Clearinghouse**. Disponível em http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/pepticulcers_ez/pepticulcers.pdf. Acesso em 20/12/2011.

RAFATULLAH, S. *et al.* Evaluation of tumeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J. Ethnopharmacology**, 29: 25-34, 1990.

RAMAKRISHNAN, K e SALINAS, R. C. Peptic ulcer disease. **Am. Fam. Physician.**, 76:1005-1012, 2007.

REPETTO, M. G. e LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural 89 compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35: 523-534, 2002.

REYNOLDS, J. C. The clinical importance of drug interactions with antiulcer therapy. **J. Clin. Gastroenterol.**, 12 (2): 54-63, 1990.

RIBEIRO, M. E.; YOSHIDA, W. B. Reperfusion injury after intestinal ischemia: pathophysiology and experimental models. **J. Vasc. Br.**, 4: 183-194, 2005.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. E.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

ROUM, J. H. *et al.* Sulphydryls protect patients against complications of erosive gastritis. **Dig. Dis. Sci.**, 11: 1436-1437, 1994.

RUZICKA, L. Isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia**, 9: 357-367, 1953.

SABESIN, S. M. Safety issues relating to long-term treatment with histamine H₂-receptor antagonists. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 7: 35-40, 1993.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. e YESILADA, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 61-66, 2005.

SELL, C. S. e PYBUSS, D.H. **The Chemistry of Fragrances**. Springer Verlag, 1999.

SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterol.**, 5: 43-61, 1945.

SHOFF, S.M. *et al.* Concentration- dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. **Cancer Res.**, 51: 37-42, 1991.

SI, W. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 100: 296-305, 2006.

SILVA, F. M. *et al.* Omeprazole, furazolidone, and tetracycline: an eradication treatment for resistant *H.pylori* in brazilian patients with peptic ulcer disease, **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo** 57(5): 205-208, 2002.

SIMÕES, C. M. O. e SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2007. p. 467-495.

SONNENBERG, A. e EVERHART, J. E. The prevalence of self-reported peptic ulcer in the United States. **Am. J. Public. Health.**, 86 (2): 200-205, **1996**.

SOUZA BRITO, A. R. M. **Manual de Ensaios Toxicológicos *In vivo***. UNICAMP (ed.) Campinas. São Paulo, 1995. p.122.

STICKNEY, J. C. e NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 101: 582–583, 1959.

SUZUKI, H, IWASAKI, E, HIBI, T. Helicobacter pylori and gastric cancer. **Gastric Cancer**,12: 79-87, 2009.

SUZUKI, K. Permissive role of neutrophils in pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats. **Med. Sci. Monit.**, 6 (5): 908-914, 2000.

SZABO, S. Animal model for human disease: duodenal ulcer disease. **Am. J. Pathol.**, 93: 273–276, 1978.

SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **Journal of Clinical Gastroenterol**, 13: 21-34, 1991.

SZABO, S. e VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **Journal of Physiology**, 94: 77-81, 2000.

TAKEEDA, M. *et al.* Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isozymes in mucosal defence of inflamed rat stomach. **J. Physiol. Pharmacol.**, 55: 193-205, 2004.

TAKEUCHI K. *et al.* Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced HCO₃⁻ secretion in stomach. **Journ. of Phys. and Pharm.**, 57: 661-676, 2006.

TIWARI, M. e KAKKAR, P. Plant derived antioxidants-geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, 23: 295-301, 2009.

TODA, N. e HERMAN, A. G. Gastrointestinal Function Regulation by Nitrgic Efferent Nerves. **Pharmacological Reviews**, 57 (3): 315-338, 2005.

TRAINA, O. *et al.* In vitro acaricidal activity of four monoterpenes and solvents against *Otodectes cynotis* (Acari: Psoroptidae). **Experimental and Applied Acarology**, 37: 141-146, 2005.

TUMMALA, S.; KEATES, S.; KELLY, C. P. Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, 20: 592–597, 2004.

UE, A. P. F. *et al.* Ginecomastia induzida por anti-histamínicos no tratamento da urticária crônica. **An. Bras. Dermatol.**, 82 (3): 253-6, 2007.

UEDA, S. *et al.* Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia–reperfusion in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, 162: 55–58, 1989.

UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S. Role of free radicals and lipid in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, 24: 55-58, 1989.

WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Amer. J. Med.**, 110 (1A): 19S-23S, 2001.

WALLACE, J. L. COX-2: A Pivotal Enzyme in Mucosal Protection and Resolution of Inflammation. **The Scientific World Journal**, 6: 577-588, 2006.

WALLACE, J. L. e GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J.**, 10: 731-740, 1996.

YAMAWAKI, T. Pharmacological effects of geraniol. **Nippon Yakurigaku Zasshi** 58: 394–400, 1962.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.** 3: 80-89, 2006.