



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

ADRIANO DE AVILA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL AÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus* COMPLEXADO
EM β -CICLODEXTRINA EM UM MODELO MURINO DE
DOR MUSCULAR CRÔNICA**

Aracaju/SE

2019

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL AÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus* COMPLEXADO
EM β -CICLODEXTRINA EM UM MODELO MURINO DE
DOR MUSCULAR CRÔNICA**

Monografia apresentada à Universidade
Federal de Sergipe – UFS, como requisito
parcial à conclusão da graduação em
Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Waldecy de Lucca Júnior

Aracaju/SE

2019

UNIVERSIDADE FEDEAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL AÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus* COMPLEXADO
EM β -CICLODEXTRINA EM UM MODELO MURINO DE
DOR MUSCULAR CRÔNICA**

Monografia apresentada à Universidade
Federal de Sergipe – UFS, como requisito
parcial à conclusão da graduação em
Medicina.

Aracaju, ____/____/____

Autor: Adriano de Avila Santos

ADRIANO DE AVILA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL AÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus* COMPLEXADO
EM β -CICLODEXTRINA EM UM MODELO MURINO DE
DOR MUSCULAR CRÔNICA**

Monografia apresentada à Universidade
Federal de Sergipe – UFS, como requisito
parcial à conclusão da graduação em
Medicina.

Aprovada em ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Waldecy de Lucca Júnior
Universidade Federal de Sergipe

BANCA EXAMINADORA

Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal de Sergipe

*Dedico este trabalho a todos aqueles que
ajudaram na sua composição.*

“Porque a cada passo nós somos novos”

Eduardo A.C. Garcia

RESUMO

O *Cymbopogon winterianus* é uma planta tropical. Realizou-se a cromatografia gasosa do óleo onde se observou o geraniol como principal componente, e a complexação em β -ciclodextrina (CCW). Utilizou-se 210 camundongos Swiss (2-3 meses) machos, tratados com CCW (50, 100 e 200 mg/kg; v.o.) ou veículo (água destilada) e submetidos aos testes de hipernocicepção induzida por carragenina, TNF- α , prostaglandina e dopamina; e aos de nocicepção orofacial induzidos por formalina, capsaicina, ou glutamato, seguido de imunofluorescência para Fos encefálica. Os dados foram expressos em média $\pm$ e.p.m, considerando-se significantes $p < 0,05$. Observou-se que o CCW reduziu significativamente ($p < 0,05$) o comportamento hipernociceptivo, bem como o nociceptivo, ativando o SNC. Conclui-se que o CCW tem efeito anti-hipernociceptivo e reduz a nocicepção orofacial com ação central.

Palavras chave: *Cymbopogon winterianus*, hipernocicepção, nocicepção, SNC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de perda de massa (%) em função da temperatura (°C) do Óleo Essencial do *Cymbopogon winterianus* (OEC) e da β -Ciclodextrina (BCD) isolados e no processo de mistura física (MF) e coevaporação (CE).

Figura 2. Curva do fluxo de calor em função da temperatura (°C) do Óleo Essencial do *Cymbopogon winterianus* (OEC) e da β -Ciclodextrina (BCD) isolados e no processo de mistura física (MF) e coevaporação (CE).

Figura 3. Efeitos do CCW sobre o teste da hipernocicepção induzida por carragenina (A) e TNF- α (B). Veículo (controle), CCW (50, 100 e 200 mg/kg; v.o.) ou indometacina (INDO, 10 mg/kg; i.p.) foram administrados 60 min antes da injeção do algógeno. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n = 6, por grupo). *p < 0,05, **p < 0,01 ou ***p < 0,001 quando comparado ao controle (ANOVA, uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Figura 4. Efeitos do CCW sobre o teste da nocicepção orofacial induzida por formalina. Veículo (controle), CCW (50, 100 e 200 mg/kg) ou morfina (MOR, 5 mg/kg) foram administrados, via oral, 60 min antes da injeção de formalina. (A) primeira fase (0-5 minutos) e (B) segunda fase (15 - 30 minutos). Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n = 6, por grupo). *p < 0,05, **p < 0,01 ou ***p < 0,001 quando comparado ao controle (ANOVA, uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Figura 5. Efeitos do CCW sobre a nocicepção orofacial induzida por capsaicina (A) e glutamato (B). Veículo (controle), CCW (50, 100 e 200 mg/kg) ou morfina (MOR, 5 mg/kg) foram administrados, via oral, 60 min antes da injeção do algógeno. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n = 6, por grupo). **p < 0,01 e ***p < 0,001 quando comparado ao controle (ANOVA, uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Figura 6. Imunofluorescência para proteína Fos em neurônios do núcleo dorsal da rafe (A, B, C, D), *locus ceruleus* (E, F, G, H), trato trigemino-talâmico (I, J, K, M), núcleo trigeminal (N, O, P, Q) e área rostroventromedial (R, S, T, U), noventa minutos após o tratamento com CCW (50, 100 ou 200 mg/kg; v.o.) ou veículo (água destilada) e 30 minutos após indução álgica com formalina.

Figura 7. Número de Células FOS positivas no núcleo dorsal da rafe (A), *locus ceruleus* (B), trato trigemino-talâmico (C), núcleo trigeminal espinhal (D) e área rostroventromedial (E). Veículo (água destilada; v.o.) ou CCW (50, 100 e 200 mg/kg; v.o.) foi administrado noventa minutos antes da perfusão. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m (n = 6/por grupo) *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 quando comparado ao controle (ANOVA uma via seguido pelo Teste de *Tukey*).

Tabela 1. Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* obtido por meio de GC-MS.

Tabela 2. Percentagens de perda de massa e etapas de decomposição térmica do OEC, β -ciclodextrina (β -CD), mistura física (MF) e do complexo OEC/ β -CD (CE).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCW- Cymbopogon winterianus

OEC- Óleo Essencial do Cymbopogon winterianus

BCD- β -Ciclodextrina

MF- Processo de mistura física

CE- Coevaporação

INDO- Indometacina

OMS- Organização Mundial de Saúde

CDs- Ciclodextrinas

SNC- Sistema Nervoso Central

IASP-Associação Internacional para o Estudo da Dor

SNP- Sistema Nervoso Periférico

PAG- Substância Cinzenta Periaquedutal

RVM- Medula Rostroventral

GC-Cromatografia Gasosa

GC-MS/FID-Espectrômetro de Massa com Detector de Ionização de Chama

DSC-Calorimetria Exploratória Diferencial

TG/DTG-Termogravimetria/Termogravimetria derivada

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

TR-Tempo de Retenção

GC-MS- Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa

IRR exp*-Índice de Retenção Experimental

IRR lit**-Índice de Retenção Encontrado na Literatura.

KC- Quimiocina Derivada dos Queratinócitos (KC)

IL- Interleucina

IFN-Interferon

NT- Núcleo Trigeminal

NTPO- Núcleo Trigeminal parte oral

NTPI-Núcleo Trigeminal parte interpolar

NTPC-Núcleo Trigeminal parte caudal

DR- Núcleo Dorsal da Rafe

RVM-Área Rostroventromedial

LC- Locus Ceruleus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
7 REFERÊNCIAS.....	18
8 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO.....	24
8.1. DIRETRIZES PARA AUTORES.....	24
8.2. CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO.....	25
8.3. DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL.....	25
8.4. POLÍTICA DE PRIVACIDADE.....	26
8.5. TAXAS PARA AUTORES.....	26
8.6. FORMATAÇÃO DO TEXTO	26
8.8 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	27

I. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define plantas medicinais como todas aquelas, sejam elas silvestres ou cultivadas, empregadas com o intuito de prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico, podendo também ser utilizadas como fonte de fármacos e de seus precursores (CORDEIRO et al., 2005; VEIGA et al., 2005). As plantas medicinais compõem uma fonte de tratamento que se encontra em expansão por todo o mundo. No ano 2000, estipula-se que os produtos à base de plantas medicinais movimentaram cerca de 30 bilhões de dólares (MELO et al., 2007).

O gênero *Cymbopogon* produz óleos essenciais de característica aromática, sendo responsável por cerca de 140 espécies cujos principais destaques brasileiros são o *C. citratus* e o *C. winterianus* (OEC). Diversas propriedades já foram descritas para o *C. winterianus*, dentre elas encontram-se a antifúngica (PEREIRA et al., 2011), antimicrobiana (SCHERER et al., 2009), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008), cardiovascular (MENEZES et al., 2010) e antinociceptivo (LEITE et al., 2010).

Os produtos naturais têm sido fonte de constantes buscas como subsídio ao tratamento de diversas patologias que acometem a população (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2002), a exemplo da dor, sobretudo a orofacial, que tem demonstrado um importante impacto na saúde no mundo, com uma prevalência de 13 a 26% da população (NIXDORF et al., 2012; HARGREAVES, 2011).

Para facilitar a absorção e estabilidade aquosa, bem como a biodisponibilidade de compostos lipofílicos, como é o caso dos óleos essenciais, tem-se desenvolvido a utilização de Ciclodextrinas (CDs) (MOSHER; THOMPSON, 2002), que são produtos cíclicos da hidrólise enzimática do amido por alguns microrganismos (LOFTSSON; MASSON, 2001).

De acordo com o que se refere na literatura, percebe-se a importância dos produtos naturais na saúde mundial, bem como o destaque da biodiversidade

brasileira como potencial fonte de substâncias farmacológicas. Ainda são escassos os trabalhos científicos voltados à utilização e eficácia das plantas medicinais, refletindo o vasto campo ainda a ser estudado. Embora o OEC atue no SNC (LEITE et al., 2011), suas vias de sensibilização neste sistema ainda são desconhecidas, o que torna necessária a determinação do seu mecanismo de ação central. Além disso, as propriedades obtidas com o uso das CDs apontam o complexo do OEC (CCW) como uma possível opção biotecnológica a ser implantada, futuramente, no tratamento de patologias diversas, inclusive no tratamento algico.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

O uso de plantas medicinais tem sido descrito desde os primórdios da humanidade, sendo que a descoberta de suas diversas utilidades é decorrente de uma série de conceitos culturais (MACEDO et al., 2007). Este uso tem aumentado devido a alguns fatores, tais como o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, além da tendência, nos dias atuais, ao uso de produtos de origem natural (BRASILEIRO et al., 2008).

As plantas medicinais têm sido utilizadas por estudiosos com o intuito de obter novos fármacos ou precursores na produção de uma formulação específica (COSTA; MAYWORM, 2011), decorrendo na elaboração de produtos medicinais acabados e etiquetados que, segundo a OMS, recebem o nome de fitoterápicos. (CORDEIRO et al., 2005; VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2005).

As plantas medicinais e os fitoterápicos apresentam um papel essencial na terapêutica, o que se justifica pelo fato de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente serem de origem vegetal, conforme resultados divulgados pela OMS (CORDEIRO et al., 2005). Ainda de acordo com a OMS, 80% da população mundial fazem uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. Pesquisas, realizadas no Brasil, mostram que 91,9% da população já fez uso de alguma planta medicinal e cerca de 46% mantêm o cultivo caseiro dessas plantas (ETHUR et al., 2011).

Os óleos essenciais são expelidos pela planta objetivando-se a defesa ou atração de polinizadores, o que os tornam fontes potenciais de substâncias biologicamente ativas, principalmente antimicrobianas, são de natureza volátil e encontram-se contidos em vários órgãos das plantas. Denominam-se de acordo com sua composição lipofílica, o que os diferencia quimicamente dos demais óleos e gorduras. Esses óleos constituem-se por substâncias terpênicas e eventualmente por fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeias curtas. (OLIVEIRA et al., 2011; SIANI et al., 2006).

Cymbopogon winterianus Jowitt, conhecida popularmente como capim citronela, é uma planta pertencente à família Poaceae (Gramineae). Possui origem indiana e seu cultivo ocorre em todos os países na região dos trópicos, inclusive no Brasil (AKHILA, 1986). Diversas ações já foram descritas para o óleo essencial da *Cymbopogon winterianus* Jowitt (OEC), a exemplo da antioxidante (LEITE et al., 2010; SCHERER et al., 2009), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008), depressora do SNC (LEITE et al., 2011), anti-inflamatória e analgésica (LEITE et al., 2010).

Entre as atividades farmacológicas do OEC se destaca a sua atividade analgésica. Estudos pré-clínicos que comprovem esta ação foram realizados em ratos submetidos a diferentes estímulos nociceptivos, tais como ácido acético, carragenina, formalina e teste da placa quente (LEITE et al., 2011).

A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo uma experiência sensorial e emocional associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão (MOSSEY, 2011). As estimativas da prevalência de dor variam amplamente e normalmente entre 10% e 30% na população adulta, embora as taxas de prevalência variem de 2 a 55%. Estima-se, por exemplo, que mais de 22% dos americanos com mais de 18 anos apresentam dor na região orofacial, prevalência esta que se repete em países como a Inglaterra e Alemanha (NIXDORF et al., 2012; HARGREAVES, 2011).

Na sequência dos eventos que originam o fenômeno sensitivo doloroso, o primeiro passo é a transformação dos estímulos ambientais, físicos ou químicos

intensos em potencial de ação, que são transferidos da fibra nervosa do sistema nervoso periférico (SNP) para o SNC (ALVES NETO, 2010).

Existem três tipos principais de fibras sensoriais no SNP envolvidas na nocicepção, as fibras A β , A δ e C, as quais possuem propriedades diferentes, o que lhes permite transmitir tipos diferentes de informação sensorial. As fibras A β relacionam-se à sensibilidade tátil. Enquanto que as fibras A δ e C são denominadas de nociceptores, por responderem a estímulos nocivos, sejam eles mecânicos, térmicos ou químicos (BASBAUM et al., 2009; RAJA; MEYER; CAMPBELL, 1988).

A substância cinzenta periaquedutal (PAG), região que circunda o aqueduto cerebral a nível mesencefálico, é uma área de grande importância no controle da dor. A PAG recebe sinais do tálamo, hipotálamo, córtex e conexões colaterais do trato espinotalâmico, excitando os núcleos da medula rostroventral (RVM), a exemplo dos núcleos da rafe e a formação reticular que, por sua vez, projeta-se até o corno dorsal da medula espinhal modulando a transmissão de mensagens nociceptivas (CALVINO e GRILO, 2006; PERL, 2011).

Além da dor de origem central, existe a dor derivada da liberação das citocinas inflamatórias, que são produzidas por vários tipos de células em resposta a uma variedade de estímulos e constituem uma ligação entre lesão celular e o desenvolvimento local de sinais e sintomas sistêmicos de inflamação. A dor inflamatória aguda é caracterizada por hipernocicepção devido à sensibilização de neurônios nociceptivos primários sensoriais, que decorre da liberação de primeiros mediadores, após a lesão do tecido, os quais atuam nos 6 receptores metabotrópicos para desencadear a ativação de segundos mensageiros eicosanóides e simpáticos (CUNHA et al., 2004).

Com o intuito de se elucidar os possíveis mecanismos de ação central de novas substâncias envolvidas na analgesia, utiliza-se o estudo da proteína Fos. Esta proteína é um fator de transcrição liberado quando os neurônios despolarizam, sendo utilizada como marcador da atividade neuronal (PRADO; BEL, 1998).

O estudo da proteína Fos é indicado para o controle das atividades neuronais nas vias centrais do sistema sensorial, particularmente na via nociceptiva. A expressão do c-Fos, gene que codifica tal proteína, pode ser estavelmente eliciada por vários estímulos nocivos, tais como os mecânicos, térmicos e químicos. Este gene pode ser detectado nos neurônios por técnicas de imunohistoquímica com cerca de 20 a 90 minutos após a ativação neuronal, desaparecendo dentro de 4 a 16 horas após o estímulo (BURMEISTER et al., 2008; WILLIAMS et al., 1990).

Visando favorecer a descoberta e otimização de novos fármacos tem-se utilizado as ciclodextrinas (CDs), que são oligossacarídeos cíclicos que assumem forma de um cilindro oco com as extremidades abertas, cuja estrutura é formada geralmente por seis (α CD), sete (β CD) ou oito (γ CD) moléculas de glicose. As CDs possuem cavidade de caráter hidrofóbico e superfície hidrofílica, o que permite uma maior solubilização de moléculas hidrofóbicas que estejam implantadas em seu interior pela formação de complexos de inclusão (VEIGA et al., 2006).

O uso das CDs oferecem diversas vantagens quando comparadas aos sistemas convencionais, como o aumento da eficácia terapêutica e estabilidade do fármaco, a redução do número de doses, a redução dos efeitos tóxicos e o prolongamento do efeito terapêutico (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003), o que as tornam uma excelente alternativa biotecnológica capaz de proporcionar uma melhor ação dos princípios ativos das plantas medicinais (VEIGA et al., 2006; VALLE, 2004).

Com isso, o presente trabalho buscou investigar a ação do óleo essencial do *Cymbopogon winterianus* complexado em β CD (CCW) na analgesia central e periférica, bem como um dos seus possíveis mecanismos de ação central, podendo futuramente, ser utilizado como subsídio de novas drogas utilizadas no tratamento algico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4 ed. Carol Stream IL: Allured; 2007.
2. ALVES NETO, O. **Dor: princípios e prática**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa
3. BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. 2009; 139(2): 267–284.
4. BRASILEIRO, B. G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2008; 44(4): 629-636.
5. BRITO, R. G. et al. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Natural Medicines**. 2012; 66: 337-344.
6. BURMEISTER, S. S.; MANGIAMELE, L. A.; LEBONVILLE, C. L. Acoustic modulation of immediate early gene expression in the auditory midbrain of female túngara frogs. **Brain research**. 2008; 1190: 105–114.
7. CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther**. 2005; 106: 179-208.
8. CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**. 2006; 73(1): 10–16.
9. CHEN, T. et al. Neurokinin-1 receptor-expressing neurons that contain serotonin and gamma-aminobutyric acid in the rat rostroventromedial medulla are involved in pain processing. **The Journal of Pain**. 2013; 1-15. In press.
10. CLAVELOU P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**. 1989; 103: 349-353. 25
11. CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2005; 15(3): 272-278.
12. COSTA, V. P.; MAYWORM, M. A. S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes – município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. 2011; 13(3): 282-292.

13. CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**. 1992; 107: 660-664.
14. CUNHA, J. M. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**. 2000; 130: 1418-1424.
15. CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of the North American**. 2005; 102:1755-60.
16. CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**. 2008; 83: 824-832.
17. CUNHA, T.M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**. 2004; 37(3):401-07.
18. HARGREAVES, K. M. Orofacial pain. **Pain**. 2011; 152(3): 25–32.
19. HAYASHIDA, K.; PARKER, R. A.; EISENACH, J. C. Activation of glutamate transporters in the locus coeruleus paradoxically activates descending inhibition in rats. **Brain Res**. 2010; 4(1317): 80-6.
20. HOLANDA PINTO, S. A. et al. Antinociceptive effect of triterpenoid α,β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**. 2008; 15 (8): 630–634.
21. HONDA, K. et al. Involvement of peripheral ionotropic glutamate receptors in orofacial thermal hyperalgesia in rats. **Molecular pain**. 2011; 7: 75.
22. HUANG, S. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2002; 99: 8400-8405.
23. IANARO, A. et al. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced o edema in mice. **Immunology**. 1994; 82(3): 370–375.
24. JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2001; 97: 8134-8139.
25. LEITE, B. L. S. et al. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. **Pharmaceutical biology**. 2010; 48(10): 1164–1169.

26. LEITE, B. L. S. et al. Volatile constituents and behavioral change induced by *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil in rodents. **African Journal of Biotechnology**. 2011; 10(42): 8312-8319.
27. LOFTSSON, M.; MASSON, M. Cyclodextrin in topical drug formulation; theory and practice. **Int. J. Pharm.** 2001; 225:15-30.
28. LUCCARINI, P. et al. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. **The journal of pain**. 2006; 7(12): 908–914.
29. MACEDO, A. F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 2007; 28(1): 123-128.
30. MAGNUSSON, K. R. et al. Localization of glutamate in trigeminothalamic projection neurons: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. **Somatosens Res**. 1987; 4(3): 177-90.
31. MELO, J. G. et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-Índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiática* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**. 2007; 21(1): 27-36.
32. MELO, M. S. et al. Anti-inflammatory and redox-protective activities of citronellal. **Biological Research**. 2011; 44: 363-368.
33. MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 2010; 62: 215–221.
34. MIRZA, R.; KIVRAK, B. G.; ERZURUMLU, R. S. Cooperative slit and netrin signaling in contralateralization of the mouse trigeminothalamic pathway. **The Journal of Comparative Neurology**. 2013; 521:312–325.
35. MONCADA, S.; FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and the Oedema of Inflammation. **Nature**. 1973; 246(5430): 217–219.
36. MOSHER, G.; THOMPSON, D.O. Complexation and Cyclodextrins. In SWARBRICK, J., BOYLAN, J.C. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2nd ed. v.1. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., p.531-558, 2002.
37. MOSSEY, J. M. Defining racial and ethnic disparities in pain management. **Clinical orthopaedics and related research**. 2011; 469(7): 1859–1870.

38. NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**. 1987; 135: 145-153.
39. NIXDORF, D. R. et al. Classifying orofacial pains: a new proposal of taxonomy based on ontology. **Journal of oral rehabilitation**. 2012; 39(3): 161–169.
40. OKAMOTO, K. et al. Central serotonin 3 receptors play an important role in the modulation of nociceptive neural activity of trigeminal subnucleus caudalis and nocifensive orofacial behavior in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. **Neuroscience**. 2005; 135: 569 – 581.
41. OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. 2011; 13(1): 8-16.
42. PELLISIER T.; PAJOR J.; DALLE R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**. 2002; 96: 81-87.
43. PEREIRA, F. O. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. **Braz. J. Microbiol**. 2011; 42 (1): 233–242.
44. PERL, E. R. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. **Progress in neurobiology**. 2011; 94(1): 20–38.
45. PINTO, L. et al. Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. **J Pharm. Biomed**. 2005; 39: 956-963.
46. PRADO, T. C. P.; BEL, E. A. D. C-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. **Medicina, Ribeirão Preto**. 1998; 31: 424-433.
47. QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Antinociceptive activity of citronellal in formalin-, capsaicin- and glutamate- induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **J Orofac Pain**. 2010; 24: 305–312.
48. QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Revista Farmacêutica Banaerense**. 2002; 21(3): 179-184.
49. QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytochemistry**. 2008; 15(8): 619–624.

50. RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 2004; 28(2): 219–226.
51. RADHAKRISHNAN, R.; SLUKA, K. A. Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a pre-clinical model of chronic widespread muscle pain. **Neurosci Lett**. 2009; 457(3):141-5.
52. RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Peripheral mechanisms of somatic pain. **Anesthesiology**. 1988; 68(4): 571–590.
53. reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **J. Nat. Med.** 2012; 66(4)
54. REN, K.; TOREES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**. 2009; 60: 57-64.
55. RIERA C. E. et al. Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels. **Br J Pharmacol**. 2009; 157(8): 1398-409.
56. SANTANA, M. T. et al. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. **Pharmaceutical Biology**. *In Press*.
57. SCHERER, R. et al. Composition and Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. 2009; 11(4): 442-449.
58. SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 2000; 11(1): 57–91.
59. SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 2006; 29: 38-43.
60. STOTZ, S. C. et al. Citral sensing by TRANSient Receptor Potential channels in dorsal root ganglion neurons. **PLoS One**. 2008; 3(5): 1-14.
61. SU, Y. W. et al. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E₂ production in macrophages. **Planta Medica**. 2010; 76: 1666-1671.
62. SUNGAI, E. et al. Pungent qualities of sanshool-related compounds evaluated by a sensory test and activation of rat TRPV1. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2005; 69: 1951-1957.

63. TAKEMURA, M. et al. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. **Archives of histology and cytology**. 2006; 69(2): 79–100.
64. VALLE, E. M. M. D. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochem**. 2004; 39: 1033-1046.
65. VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**. 1963; 11: 463-467.
66. VAN DER STELT, M.; MARZO, V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **Eur. J. Biochem**. 2004; 271: 1827-1834.
67. VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. 2005; 28(3): 519-528.
68. VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica**. 1ed. Coimbra: Minervacoimbra; 2006.
69. VIISANEN, H.; PERTOVAARA, A. influence of peripheral nerve injury on response properties of locus coeruleus neurons and coeruleospinal antinociception in the rat. **Neuroscience**. 2007; 146: 1785-1794.
70. VILARREAL, C.F. et al. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its NaV1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. **Biochemical Pharmacology**. 2009; 77: 867-77.
71. VILLAREAL, C. F. et al. Acute and persistent nociceptive paw sensitisation in mice: The involvement of distinct signalling pathways. **Life Sciences**. 2009; 85: 822-829.
72. VILLARREAL, C. F. et al. The long-lasting sensitization of primary afferent nociceptors induced by inflammation involves prostanoid and dopaminergic systems in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 2013; 103: 678-683.
73. VINOTHKUMAR, M. et al. Geraniol modulates cell proliferation, apoptosis, inflammation, and angiogenesis during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 2012; 1: 17-25.
74. WILLIAMS, S.; EVAN, G. I.; HUNT, S. P. Changing patterns of c-fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat. **Neuroscience**. 1990; 36(1): 73–81.

II. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

SCIENTIA PLENA

Scientia Plena é uma publicação científica mensal, editada pela Associação Sergipana de Ciência, dedicada a ajudar e incentivar o desenvolvimento da ciência. Scientia Plena visa atingir um público amplo, composto de toda a comunidade científica envolvida na pesquisa e no desenvolvimento em todos os níveis. A revista publica artigos de conteúdo original e resultados significativos em todas as áreas da ciência. Os artigos podem ser escritos em Português, Inglês ou Espanhol e devem ser enviadas para o Editor por meio de submissão eletrônica.

2.1. DIRETRIZES PARA AUTORES

Os artigos devem ser preparados de acordo com o modelo que consta no artigo-exemplo:

http://scientiaplenu.org.br/public/journals/1/Modelo_Artigo_2015.docx. Um arquivo com um TUTORIAL completo para submissão pode ser acessado em <http://www.scientiaplenu.org.br/Tutorial.pdf>. São aceitos artigos em Português, Inglês ou Espanhol. No ato de envio do artigo o autor deve: 1) Indicar obrigatoriamente a área do conhecimento, de acordo com a lista a seguir, e uma subárea, de preenchimento livre. Grandes áreas do conhecimento: Ciências Agrárias; Ciências Biológicas; Ciências da Saúde; Ciências Exatas e da Terra; Ciências Humanas; Letras e Artes; Ciências Sociais Aplicadas; Engenharias e Computação; Multidisciplinar. 2) Indicar 3 possíveis nomes de avaliadores (nome completo, email e instituição em que trabalha) para o trabalho. Os avaliadores indicados devem ser pesquisadores de reconhecida competência no tema do trabalho e que não tenham participado do desenvolvimento do artigo submetido. Não indicar avaliadores da mesma instituição de origem do(s) autor(e)s da submissão, visando evitar conflito de interesses. Editores da revista Scientia Plena não deverão ser indicados para a avaliação.

2.2. CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB). Arquivos em pdf não devem ser submetidos. Os artigos estão preparados de acordo com o modelo que consta no artigo exemplo: http://scientiaplena.org.br/public/journals/1/Modelo_Artigo_2015.docx. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#) na seção Sobre a Revista. Indicar, no campo de Comentários ao Editor, área e subárea do conhecimento do trabalho. Indicar, no campo de Comentários ao Editor, três possíveis avaliadores para a submissão (nome completo, e-mail e instituição em que trabalha).

2.3. DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a [Licença Creative Commons Attribution](#) que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado.

2.4. POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

2.5. TAXAS PARA AUTORES

Este periódico cobra as seguintes taxas aos autores. Publicação de artigo: 200,00 (BRL). Caso o manuscrito submetido seja aceito para publicação, será necessário pagamento de uma Taxa de Publicação de Artigo para auxiliar nos custos de publicação. Terá desconto na taxa de submissão: 1) Sócio adimplente da Associação Sergipana de Ciência 2) Avaliador que tenha emitido parecer solicitado pela revista

2.6. FORMATAÇÃO DO TEXTO

Título do trabalho: Usar fonte Times New Roman, tamanho 17, centralizado e utilizar maiúscula apenas na primeira letra da sentença. Title in English: Usar fonte Times New Roman, tamanho 11, centralizado.

Resumo: não pode ultrapassar 250 palavras. Indicar até 3 palavras-chave. Keywords Usar a mesma formatação do resumo e das palavras-chave em português. Em caso de textos em inglês ou espanhol, inserir título, resumo e palavras chaves em português.

Introdução: Na seção de Introdução do artigo, o autor deve descrever o estado-da-arte do problema, além de justificar e apresentar os objetivos do seu trabalho. Aproveitaremos esta seção para apresentar algumas informações sobre a submissão de artigos à **Scientia Plena**. A **Scientia Plena** é uma publicação científica mensal e aceita manuscritos originais e inéditos, redigidos em português, inglês ou espanhol. Artigos de revisão não são aceitos para publicação. Trabalhos que utilizaram seres humanos como objeto de estudo ou experimentação animal devem indicar no texto o número da aprovação pelos respectivos Comitês de Ética. O trabalho não deverá estar sendo avaliado simultaneamente por outra revista e todos os autores devem estar cientes da submissão. O trabalho deve ser submetido pelo sistema eletrônico da revista em

formato “.doc”, com tabelas e figuras incluídas no corpo do texto. Todo o corpo do texto deve ser redigido em Times New Roman, tamanho 11, justificado e com espaçamento simples. As margens das páginas devem ser de 2,5 cm (superior e inferior) e 3,0 cm (esquerda e direita). Todos os parágrafos devem apresentar tabulação de 0,5 cm e as tabelas e figuras devem ser citadas por extenso no corpo do texto (ex: Figura 1; Tabela 1). Ao longo do texto deve ser utilizado o sistema internacional de unidades (SI) para indicação de medidas. Para citação das referências, utilizar o Estilo Vancouver, com a numeração entre colchetes e alinhada ao texto. Exemplos: “... para determinados valores [1]...”; “...Segundo Meneton et al. (2005) [2]...”; “...estudos de raios de tórax [3]...”; “... o tamanho da amostra [4]...”; “... o uso de drogas para alívio da dor [5, 6]...”. A lista de referências deve ser apresentada ao final do texto, em seção específica. Não usar notas de rodapé.

Material e Métodos: A metodologia deve ser descrita com as informações necessárias para permitir a repetição do estudo por outro pesquisador.

Resultados e Discussão: podem ser apresentados em conjunto ou em subtítulos separados. Tabelas e figuras devem ser centralizadas, com legenda objetiva e autoexplicativa. Tabelas não devem apresentar linhas verticais secundárias. Devem-se evitar tabelas e/ou figuras com poucas informações, que podem ser facilmente substituídas por texto corrido. A legenda de figura deve ser abaixo da ilustração, centralizada, em itálico e usando Times New Roman tamanho 10. A legenda da tabela deve ser acima da tabela, centralizada, em itálico e usando Times New Roman tamanho 10.

Conclusão: Uma conclusão deve ser apresentada com as principais contribuições do estudo. **Agradecimentos:** Apresentar os agradecimentos pertinentes, se houver. **Referência:** Usar fonte Times New Roman, tamanho 10, alinhamento justificado". As referências apresentadas são exemplos de artigos [1,2], livro [3], capítulo de livro [4], dissertações e teses [5], artigos publicados em anais de eventos científicos [6].

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO



Avaliação da possível ação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* complexado em β -ciclodextrina em um modelo murino de dor muscular crônica
Evaluation of the possible action of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* complexed in β -cyclodextrin in a murine model of chronic muscular pain

Avila, A,S*; Lucca Jr,W; Quintans Júnior, L. J; Araújo, A. A. S ; Santos, P. L.

Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49060-108, Aracaju-Sergipe, Brasil

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000 São Cristovão, SE, Brazil

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000 São Cristovão, SE, Brazil

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000 São Cristovão, SE, Brazil

*sp_avila@hotmail.com

(Recebido em X de XX de 2016; aceito em X de XX de 2019)

O *Cymbopogon winterianus* é uma planta tropical. Realizou-se a cromatografia gasosa do óleo onde se observou o geraniol como principal componente, e a complexação em β -ciclodextrina (CCW). Utilizou-se 210 camundongos Swiss (2-3 meses) machos, tratados com CCW (50, 100 e 200 mg/kg; v.o.) ou veículo (água destilada) e submetidos aos testes de hipernocicepção induzida por carragenina, TNF- α , prostaglandina e dopamina; e aos de nocicepção orofacial induzidos por formalina, capsaicina, ou glutamato, seguido de imunofluorescência para Fos encefálica. Os dados foram expressos em média $\pm$ e.p.m, considerando-se significantes $p < 0,05$. Observou-se que o CCW reduziu significativamente ($p < 0,05$) o comportamento hipernociceptivo, bem como o nociceptivo, ativando o SNC. Conclui-se que o CCW tem efeito anti-hipernociceptivo e reduz a nocicepção orofacial com ação central.

Palavras-chave: *Cymbopogon winterianus*, hipernocicepção, nocicepção, SNC.

The *Cymbopogon winterianus* is a tropical plant. Gas chromatography of the oil where the geraniol was observed as the main component, and the complexation in β -cyclodextrin (CCW) was performed. A total of 210 male Swiss mice (2-3 months), treated with CCW (50, 100 and 200 mg / kg; v0) or vehicle (distilled water) were subjected to carrageenan, TNF- α , prostaglandin and dopamine; and formalin-induced orofacial nociception, capsaicin, or glutamate, followed by immunofluorescence for Fos encephalic. The data were expressed as mean $\pm$ e.m., considering significant $p < 0.05$. It was observed that CCW significantly reduced ($p < 0.05$) the hypernociceptive behavior, as well as the nociceptive behavior, activating the CNS. It is concluded that CCW has an anti-hypernociceptive effect and reduces orofacial nociception with central action.

Keywords: *Cymbopogon winterianus*, hypernociception, nociception, CNS.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define plantas medicinais como todas aquelas, sejam elas silvestres ou cultivadas, empregadas com o intuito de prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico, podendo também ser utilizadas como fonte de fármacos e de seus precursores (CORDEIRO, CHUNG, SACRAMENTO, 2005; VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2005). As plantas medicinais compõem uma fonte de tratamento que se encontra em expansão por todo o mundo. No ano 2000, estipula-se que os produtos à base de plantas medicinais movimentaram cerca de 30 bilhões de dólares (MELO et al., 2007). O gênero *Cymbopogon* produz óleos essenciais de característica aromática, sendo responsável por cerca de 140 espécies cujos principais destaques brasileiros são o *C. citratus* e o *C. winterianus* (OEC). Diversas propriedades já foram descritas para o *C. winterianus*, dentre elas encontram-se a antifúngica (PEREIRA et al., 2011), antimicrobiana (SCHERER et al., 2009), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008), cardiovascular (MENEZES et al., 2010) e antinociceptiva (LEITE et al., 2010). Os produtos naturais têm sido fonte de constantes buscas como subsídio ao tratamento de diversas patologias que acometem a população (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2002), a exemplo da dor, sobretudo a orofacial, que tem demonstrado um importante impacto na saúde no mundo, com uma prevalência de 13 a 26% da população (NIXDORF et al., 2012; HARGREAVES, 2011). Para facilitar a absorção e estabilidade aquosa, bem como a biodisponibilidade de compostos lipofílicos, como é o caso dos óleos essenciais, tem-se desenvolvido a utilização de Ciclodextrinas (CDs) (MOSHER; THOMPSON,

2002), que são produtos cíclicos da hidrólise enzimática do amido por alguns microrganismos (LOFTSSON; MASSON, 2001). De acordo com o que se refere na literatura, percebe-se a importância dos produtos naturais na saúde mundial, bem como o destaque da biodiversidade brasileira como potencial fonte de substâncias farmacológicas. Ainda são escassos os trabalhos científicos voltados à utilização e eficácia das plantas medicinais, refletindo o vasto campo ainda a ser estudado. Embora o OEC atue no SNC (LEITE et al., 2011), suas vias de sensibilização neste sistema ainda são desconhecidas, o que torna necessária a determinação do seu mecanismo de ação central. Além disso, as propriedades obtidas com o uso das CDs apontam o complexo do OEC (CCW) como uma possível opção biotecnológica a ser implantada, futuramente, no tratamento de patologias diversas, inclusive no tratamento alérgico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 210 camundongos Swiss machos (n= 6/grupo), pesando de 28 a 33 g, com 2 a 3 meses de idade, advindos do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os animais foram mantidos em ciclo claro escuro de 12:00/12:00h (claro: 6 às 18h; escuro: 18 às 6h), à temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com dieta balanceada com ração do tipo “pallet” e acesso livre a água. Os animais foram mantidos em gaiolas no Biotério do Laboratório de Biologia Experimental, localizado no Departamento de Morfologia da UFS (LBE/DMO/UFS) por, no mínimo, uma semana de ambientação. Para execução do seguinte estudo foram respeitados os princípios éticos estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS: 42/12).

Substâncias

Alexa Fluór 594 (Santa Cruz, EUA); Anticorpo c-FOS policlonal (Santa Cruz, EUA); β -Ciclodextrina (Sigma, Brasil); Carragenina (Sigma, EUA); Capsaicina (Sigma, USA); 8 Dipirona (Merck, Brasil); Dopamina (Sigma, Brasil); Formalina (UFS, Brasil); Gelatina (UFS, Brasil); Glutamato (Sigma, USA); Indometacina (Merck, Brasil); Ketamina (Cristália, Brasil); Morfina (Merck, Brasil); Óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (OEC) (UFS, Brasil); Prostaglandina (Sigma, Brasil); Solução de Cloreto de Sódio (UFS, Brasil); Soro Albumina Bovina (BSA) (Santa Cruz, EUA); Solução de Sacarose (UFS, Brasil); Tampão Fosfato Salina, Brasil); TNF- α (Sigma, Brasil); Xylasina (Cristália, Brasil).

Obtenção do óleo Essencial

O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* foi obtido por meio da coleta de folhas da mesma planta na Estação de Pesquisa “Campus Rural da UFS”, da Universidade Federal de Sergipe, Brasil. O óleo essencial foi obtido através de hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger, onde foram depositadas as folhas de *C. winterianus* secas em um forno com circulação e renovação de ar (modelo MA-037/18) à 40°C até alcançar a desidratação completa.

Cromatografia Gasosa

As análises de CG foram realizadas utilizando um equipamento de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa com Detector de Ionização de Chama (GC-MS/FID) (GC-2010 Plus; GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas usando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (polissiloxano 5%-difenil-95%-dimetil) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.) e 0,25- μm de espessura de filme em um fluxo constante de hélio (99,999%) com taxa de 1,2 mL.min⁻¹. Foi utilizado um volume de injeção de 0,5 μL (5 mg.mL⁻¹) com uma razão de split de 1:10. A programação de temperatura do forno utilizada foi a partir de 50°C (isoterma durante 1,5 min) com um aumento de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir 200°C , em seguida, de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 250°C , terminando com uma isoterma de 5 min a 250°C . Os dados de MS e FID foram simultaneamente adquiridos empregando um sistema de separação de detector. A razão de separação de escoamento foi de 4:1 (MS: FID). Um tubo

restritor de 0,62 m x 0,15 milímetros d.i. (coluna capilar) foi usado para ligar o divisor para o detector MS. Um tubo restritor de 0,74 m x 0,22 mm d.i. foi usado para ligar o divisor para o detector FID. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura da fonte de íons foi de 200 °C. Os espectros de massa foram gerados à 70 eV com uma velocidade de varrimento de verificação de 0,3 s, sendo os fragmentos detectados no intervalo de 40-350. A temperatura do FID foi ajustada para 250 °C e os suprimentos de gás para o FID foram ar sintético, hidrogênio e hélio em taxas de fluxo de 30, 300 e 30 mL.min⁻¹, respectivamente. A quantificação de cada constituinte foi estimada por normalização da área do pico gerado no FID (%). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos de GC e foram dispostos por ordem de eluição de GC. A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para o cálculo do Índice de Retenção (IR) foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC9- nC18). Também foram utilizadas três bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST107 e NIST21 que permite a comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes das bibliotecas, utilizando um índice de similaridade de 80%.

PREPARO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

O complexo foi preparado de acordo com o procedimento descrito por Pinto e colaboradores, 2005. O método consistiu nas seguintes etapas: 1) Mistura Física (MF): o OEC (levando-se em consideração a massa do componente majoritário do OEC, o geraniol; 154,24 g/mol) e a β CD (1135 g/mol) foram misturados (1:1, razão molar) mecanicamente em condições ambiente; 2) Malaxagem (MA): o OEC e a β CD foram misturados (1:1, razão molar), adicionando-se em seguida 2,0 ml de água e homogeneizando a preparação em almofariz e pistilo e; 3) Co-evaporação (CE): OEC e β CD foram misturados (1:1, razão molar) em 60 ml de água sob constante agitação por 36h sob 400 rpm até atingir o equilíbrio. Em seguida, as amostras foram secas em dessecador de vidro, foram retiradas e finalmente armazenadas em frascos âmbar.

Caracterização do complexo

Para a caracterização físico-química, as amostras foram submetidas à calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG). As curvas DSC foram obtidas em células DSC-50 (Shimadzu) utilizando porta-amostra de alumínio contendo 2 mg de amostra, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ na faixa de temperatura de 25 a 500°C. A célula DSC foi verificada com índio (P.F. 156.6°C; ΔH_{fus} = 28.54 J.g⁻¹) e zinco (P.F.419.6°C). As curvas TG/DTG foram obtidas em termobalança modelo TGA 50 (Shimadzu) utilizando uma faixa de temperatura de 25 – 900°C, em porta-amostra de platina com ~3 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. A termobalança foi verificada com CaC2O4.H2O.

Ensaio Farmacológicos

Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva, Hipernocicepção induzida por Carragenina, Prostaglandina E2, TNF- α e Dopamina. Estes testes seguirão modelos descritos por Cunha et al, 2004; Cunha et al, 2005; e Vilarreal et al., 2009. Grupos de seis animais serão tratados com CCW (50, 100 e 200 mg/kg; v.o.), veículo (água destilada; v.o.), indometacina (10mg/Kg; i.p.) ou dipirona (60 mg/kg; i.p.). Sessenta minutos após o tratamento, será aplicada uma injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior direita do animal de 20ul de carragenina (300 μ g/pata), 20ul de prostaglandina E2 (100 ng/pata), 20ul de TNF- α (100 μ g/pata) ou 20ul de dopamina (30 μ g/pata). O grau de hipernocicepção será avaliado 0,5, 1, 2 e 3 horas após a injeção dos alógenos através do analgesímetro digital (von Frey). Ao término dos experimentos os animais serão eutanasiados com sobredose de anestésico inalatório (Halotano a 10%).

Avaliação da atividade nociceptiva orofacial

Teste de nocicepção orofacial induzida por Formalina, Capsaicina ou Glutamato. Esse teste consistiu na injeção subcutânea de formalina (20 µl), a uma concentração de 2%, conforme descrito por Clavelou et al. (1989); capsaicina (20 µl, 2,5 µg) ou glutamato (40 µl, 25 µM) (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010) no lábio superior de camundongos. Inicialmente, cada animal foi colocado em uma caixa de madeira (30x30x30 cm) com bases e laterais espelhadas e frente de vidro, por um período de 30 min para minimizar o estresse ao novo ambiente. Foi realizada a injeção de formalina, capsaicina ou glutamato e, imediatamente após, o animal retornou a caixa para o período de observação, dividido em 2 blocos de 0-5 min e de 15-30 min, 1 bloco de 42 min ou 15 min; respectivamente. A intensidade da nocicepção foi determinada, para cada bloco, pela contagem do tempo (em segundos) que o animal permaneceu friccionando a área injetada com as patas traseiras e/ou dianteiras. Sessenta minutos antes da injeção de formalina, grupos de seis animais foram tratados com CCW (50, 100 e 200 mg/kg; v.o.), água destilada (v.o) ou morfina (5 mg/kg; i.p.). Avaliação da ação central, Imunofluorescência para proteína Fos. Imediatamente após o teste de nocicepção orofacial induzida por formalina, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina (Dopalen® 80mg/kg) e xylazina 11 (Anasedan® 8mg/kg). Assim que os animais aprofundaram-se na anestesia, foi realizada perfusão intracárdica, onde se injetou no ventrículo esquerdo uma agulha sem bixel conectada a um sistema de perfusão, que tem por objetivo trocar o tecido sanguíneo por PBS (pH 7,4; 10 mM) à temperatura ambiente, por um período de 5 min a um fluxo de 6 ml/min. Após perfusão por 5 min, o PBS foi substituído por uma solução de formalina tamponada 10% (pH 7,4) à temperatura ambiente, por um período de 30 min a um fluxo de 6 ml/min. Posteriormente, o cérebro foi retirado para o processo de pós-fixação, crioproteção e congelamento. A pós-fixação consistiu em submergir o cérebro em formalina tamponada 10% por 2 h. Após o processo de pós-fixação, o cérebro foi submetido ao processo de crioproteção que consistiu em transferi-lo para uma solução de sacarose 30% em PB (pH 7,4), onde permaneceu até sua completa precipitação à temperatura - 4 °C. Após a crioproteção, o cérebro foi congelado envolto em papel alumínio à -22°C.

Os cérebros congelados foram levados ao criostato a -23 °C para obtenção de secções com 20 µm de espessura, montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Todas as secções cerebrais foram processadas a temperatura ambiente (22 °C) e lavadas (5 x por 5 min cada lavagem em constante agitação) em PBS (pH 7,4; 10 mM) após cada etapa de exposição aos reagentes. A exposição aos reagentes teve início com a glicina (0,01%) diluída em PBS, por 10 min, para reduzir a autofluorescência do tecido. Em seguida, as ligações para gamaglobulina foram bloqueadas com BSA (2%) em PBS por 30 min. Após a realização dessas etapas para bloqueio de reações inespecíficas, se seguiram as incubações com os anticorpos primários e secundários. As secções cerebrais foram incubadas com o anticorpo primário policlonal produzido em coelho, específico contra a proteína FOS (SC 52, Santa Cruz Biotechnologies, USA), diluído em PBS 1/2000, adicionado a BSA 1% e Triton 0,2%, por 16 horas. Em seguida, os cortes foram expostos ao segundo anticorpo (anti-IgG de coelho produzido em jumento e conjugado com Alexa Fluor 594), diluído 1/2000 em PBS, por 2 h. Finalmente, os cortes foram montados em solução de glicerol.

As secções cerebrais contendo neurônios marcados positivamente para FOS foram adquiridas e classificadas em regiões de acordo com o Atlas Paxinos & Watson 1997 e fotografadas bilateralmente utilizando-se um microscópio de fluorescência com câmera digital (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Germany).

Análise das imagens

Nas fotomicrografias das regiões cerebrais em cada animal foi contado o número de neurônios FOS positivos. Para análise quantitativa das marcações foi utilizada uma macro no 12 programa computacional image J® (programa computacional disponibilizado gratuitamente pelo National Institute of Health, USA - <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste de variância ANOVA, uma via, seguido pelo teste de Tukey, utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0® (San Diego, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise qualitativa da amostra do OEC, por meio da GC-MS, permitiu observar a existência de 20 componentes. Os principais constituintes identificados no óleo foram geraniol (37,57%), citronelal (27,09%), geranial (9,63%), citronelol (9,53%) e neral (7,32%) (Tabela 1). Para o tratamento dos animais submetidos aos seguintes testes experimentais foi utilizado o OEC complexado com β -ciclodextrina (CCW), com o intuito de favorecer a absorção deste.

Tabela 1. Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* obtido por meio de GC-MS.

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	(%) GC/FID	IRR exp.*	IRR lit.**
1	10.505	6-metil-5-hepten-2-ona	0.22	0.22	988	981
2	12.060	Limoneno	1.36	2.03	1031	1024
3	12.980	Bergamal	0.26	0.33	1056	1051
4	13.675	NI	0.31	0.30	1074	NI
5	14.705	Linalol	0.58	0.73	1102	1095
6	15.815	NI	0.17	0.24	1131	NI
7	16.520	Isopulegol	0.42	0.43	1150	1145
8	16.795	Citronelal	27.09	28.55	1157	1148
9	17.180	Z-isocitral	0.31	0.22	1167	1160
10	17.875	E-isocitral	0.31	0.34	1185	1177
11	18.710	n-decanal	0.34	0.34	1208	1201
12	19.575	Citronelol	9.53	10.14	1231	1223
13	20.095	Neral	7.32	6.94	1246	1235
14	20.615	Geraniol	37.57	35.43	1260	1249
15	21.180	Geranial	9.63	8.99	1275	1264
16	24.010	acetato de citronelila	0.54	0.40	1355	1350
17	25.075	acetato de geranila	1.45	1.22	1386	1379
18	26.550	E-cariofileno	0.34	0.52	1430	1417
19	31.910	óxido de cariofileno	0.28	0.41	1597	1582
20	39.635	NI	1.97	2.21	1844	NI

Total

TR = Tempo de retenção, GC-MS = Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa, GC/FID = Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, IRR exp* = Índice de retenção experimental, IRR lit** = Índice de retenção encontrado na literatura.

Caracterização do Complexo

A curva DSC do OEC exibiu um evento endotérmico em 146°C, seguido de decomposição. O evento observado em 146°C é típico da volatilização do óleo, o que pode ser verificado pelas curvas TG/DTG, onde o óleo tem uma perda de massa (Δm) de 93,9% (Figura 1). A curva DSC da β -CD mostrou três eventos endotérmicos, seguidos de um evento exotérmico.

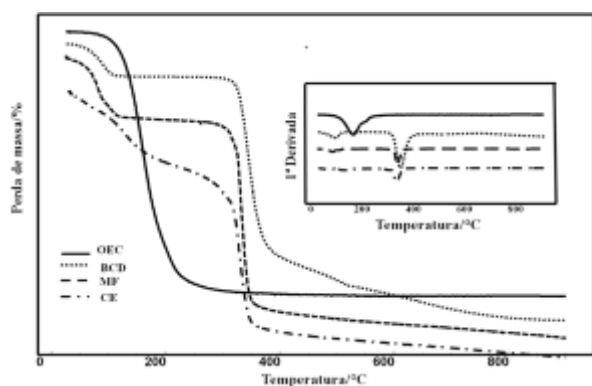


Figura 1. Curva de perda de massa (%) em função da temperatura (°C) do Óleo Essencial do *Cymbopogon winterianus* (OEC) e da β-Ciclodextrina (BCD) isolados e no processo de mistura física (MF) e coevaporação (CE).

O primeiro evento se deu na faixa de 27-120°C ($\Delta m=12,51\%$) e é referente à liberação de moléculas de água presentes na sua estrutura molecular. O segundo, por sua vez, ocorreu entre 212-232°C e é característico de transição de fase cristalina, neste não há variação de massa, uma vez que se trata de um fenômeno físico. Já o terceiro, aconteceu na faixa de 277-345°C (72,88%) e é referente à fusão seguida de decomposição do material. A partir daí inicia-se o processo de decomposição de forma exotérmica com formação de carbono elementar, que constitui a quarta fase de perda de massa revelada na TG/DTG com um $\Delta m=10,76$. A curva DSC da MF apresentou dois eventos endotérmicos. A faixa de 27-152°C compreende o somatório da fase de liberação de água da molécula de β-CD e da volatilização do OEC e no intervalo de temperatura de 269-326°C observa-se o processo de degradação. A curva TG/DTG corrobora com este resultado mostrando quatro etapas de perdas de massa da MF, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Percentagens de perda de massa e etapas de decomposição térmica do OEC, β-ciclodextrina (β-CD), mistura física (MF) e do complexo OEC/β-CD (CE).

	Perda de massa/%			
	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa	4ª Etapa
OEC	93,94 [#]	-	-	-
β-CD	12,51 [*]	-	72,88 ^{**}	10,76 ^{***}
MF	21,06 ⁺	1,99 ⁺⁺	67,22 ^{**}	11,20 ^{***}
CE	13,39 ⁺	18,02 ⁺⁺	54,48 ^{**}	10,86 ^{***}

[#] Percentagem do OEC evaporada até 291°C; ^{*} Percentagem de água liberada até 120°C; ⁺ Perda de massa relacionada à evaporação do OEC e liberação de água até 120°C; ⁺⁺ perda de massa atribuída à liberação do OEC no intervalo de 120 a 270°C; ^{**} Decomposição térmica no intervalo de 270 a 365°C; ^{***} Formação de carbono elementar devido à carbonização no intervalo de 365 a 900°C.

A curva DSC do CE, por sua vez, apresentou três eventos endotérmicos seguidos de decomposição. Nas curvas TG/DTG esses resultados estão expressos em quatro etapas de perdas de massa, de forma similar à MF. Entretanto, na faixa de temperatura de 120-270°C, a curva TG/DTG do CE mostrou uma perda de massa de 18,02%, enquanto a MF, teve um percentual de perda de massa de apenas 1,99%. Esse resultado é uma evidência clara da formação dos complexos de inclusão, uma vez que o óleo encapsulado na β-CD pelo método da CE não consegue volatilizar-se em temperaturas inferiores a 120°C (Figura 2). Ou seja, ele necessita de uma temperatura maior para que o referido processo ocorra, sugerindo a presença de óleo na cavidade da β-CD.

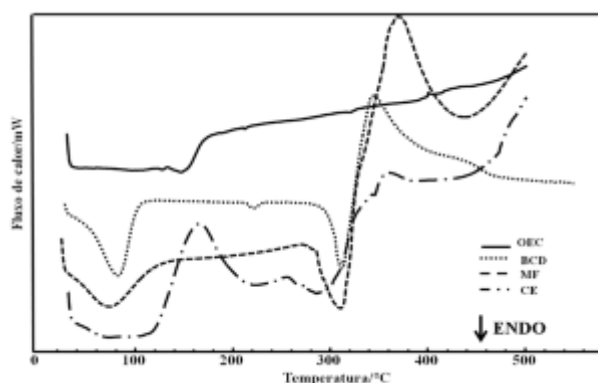


Figura 2. Curva do fluxo de calor em função da temperatura (°C) do Óleo Essencial do *Cymbopogon winterianus* (OEC) e da β -Ciclodextrina (BCD) isolados e no processo de mistura física (MF) e coevaporação (CE).

Já na MF, essa volatilização do OEC se deu na primeira etapa de perda de massa, onde se tem 21,06% de eliminação de moléculas de água, bem como de OEC possivelmente adsorvido na superfície da β -CD. O componente majoritário do óleo de *Cymbopogon winterianus* é o geraniol, um monoterpene com um percentual de 37,57%. Resultados similares ao mostrado na curva da MF foram encontrados em um trabalho do nosso grupo de estudo acerca da formação de complexos de inclusão do geraniol puro com β -CD (MENEZES et al., 2012).

Testes de Hipernociceção

O CCW apresentou resultado positivo nos testes de hipernociceção realizados. No teste de hipernociceção induzida por carragenina, pode-se observar diferença estatisticamente significativa 30 min após a indução nas doses de 100 ($p < 0,05$) e 200 mg/kg ($p < 0,01$). Sessenta minutos após a administração de carragenina, observou-se significância nas duas maiores doses, 100 e 200 mg/kg ($p < 0,001$), o que se repetiu após 120 min ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) e 180 min ($p < 0,01$), respectivamente (Figura 3). Ao se avaliar a hipernociceção induzida por TNF- α , observou-se diferença significativa na dose de 100 mg/kg nos dois primeiros tempos de observação ($p < 0,01$ e $p < 0,05$). Cento e vinte após a injeção de TNF- α , houve redução da hipernociceção em todas as doses, 50, 100 ($p < 0,01$) e 200 mg/kg ($p < 0,001$) e 180 min após houve redução nas doses de 100 e 200 mg/kg ($p < 0,001$). Neste período, não houve significância da dose de 50 mg/kg (Figura 3).

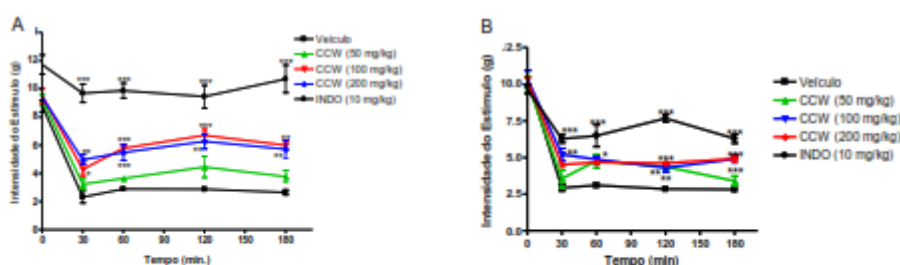


Figura 3. Efeitos do CCW sobre o teste da hipernociceção induzida por carragenina (A) e TNF- α (B). Veículo (controle), CCW (50, 100 e 200 mg/kg; v.o.) ou indometacina (INDO, 10 mg/kg; i.p.) foram administrados 60 min antes da injeção do alógeno. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$, por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (ANOVA, uma via, seguido pelo teste de Tukey)

A administração subplantar de carragenina gera uma cascata de citocinas, sendo que o TNF- α e a Quimiocina Derivada dos Queratinócitos (KC) são as primeiras a serem liberadas (CUNHA et al., 2005). O TNF- α aumenta os níveis de IL-1B, que induz a enzima ciclooxigenase (COX), a qual leva a formação dos protanóides, como a PGE (CUNHA et al., 2000). Em camundongos, a KC leva à formação de aminas simpáticas, como a dopamina (DA), e está associada à formação de IL-1B. Juntos, PGE e DA levam à sensibilização das fibras aferentes, o que resulta em

diminuição do limiar nociceptivo do animal, caracterizando a hipernocicepção (CUNHA et al., 2005). A atividade anti-hipernociceptiva do CCW no teste da carragenina (Figura 3) pode estar associada à redução da migração leucocitária descrita para o OEC (LEITE et al., 2010), já que a administração de um bloqueador da migração leucocitária aumenta o limiar nociceptivo do animal. Isso se deve ao bloqueio do processo quimiotático decorrente da diminuição da produção de Interleucina (IL)-1B e PGE (CUNHA et al., 2008). Como descrito, Citronelol e Citronelal são dois dos constituintes do óleo essencial de CCW (Tabela 2), cuja propriedade anti-inflamatória já foi descrita na literatura (MELO et al., 2011; BRITO et al., 2012). Estes trabalhos demonstram que o citronelal reduz a migração leucocitária e que o citronelol além de reduzir a migração leucocitária, diminui a produção da citocina TNF- α e a produção de nitrito. Desta forma, um dos possíveis mecanismos de ação do CCW na hipernocicepção induzida por carragenina é a inibição do TNF- α , já que um dos seus constituintes majoritários é capaz de reduzir a expressão desta citocina. Segundo Su (2010), citronelol e geraniol (outro constituinte do OEC) são capazes de reduzir a produção de prostaglandinas e de óxido nítrico, sendo assim, a inibição da produção de um dos mediadores finais da cascata induzida pela carragenina acarretará no aumento do limiar nociceptivo (SU et al., 2010). A atenuação da produção do óxido nítrico diminui a produção de citocinas pro inflamatórias como IL-1B, IFN (Interferon)- γ e IL-6; e aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (IANARO et al., 1994). Além disso, o geraniol reduz a expressão da enzima COX e do NF (Fator Nuclear) - κ B, sugerindo assim a diminuição na produção de prostanóides e de citocinas inflamatórias, a exemplo do TNF- α , apontando essas possibilidades como possíveis mecanismos de ação anti-hipernociceptivo do CCW (VINOTHKUMAR et al., 2012).

A figura 3 ilustra o efeito do CCW na hipernocicepção induzida por TNF- α . Esta citocina atua na via da produção dos prostanóides, desta forma, a capacidade do citronelol e do geraniol em reduzir a produção de PGE e de óxido nítrico, sugerem essa explicação à atenuação da hipernocicepção nesse teste. Outro possível efeito poderia ser o bloqueio dos receptores do TNF- α , principalmente o TNFR1 (CUNHA, 1992; REN, 2009). Apesar de diminuir a hipernocicepção nos dois testes citados, o CCW não reduziu o limiar no teste da hipernocicepção induzida por PGE (Figura 4).

A PGE atua sensibilizando diretamente a fibra aferente, assim, drogas que atenuam a produção de mediadores inflamatórios não reduzem a hipernocicepção induzida por esta (MONCADA, 1973; VILLARREAL et al., 2009; VILLARREAL et al., 2013). Interessantemente, o CCW foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo no teste da hipernocicepção induzida por dopamina (Figura 4). Apesar de não ter reduzido a hipernocicepção induzida por PGE, o CCW foi capaz de inibir um dos mediadores finais do processo iniciado pela carragenina. Desta forma, podemos destacar que o CCW atua na via de formação de aminas simpáticas, existindo vários possíveis mecanismos de ação para a redução da hipernocicepção induzida pela dopamina, tais como o bloqueio do receptor de dopamina ou o antagonismo adrenérgico (NAKAMURA, 1987). Portanto, conclui-se que CCW reduz a hipernocicepção mecânica inflamatória induzida por carragenina, TNF- α , PGE e dopamina, provavelmente por inibir a migração leucocitária, a produção de prostanóides, óxido nítrico e citocinas inflamatórias, da mesma maneira que seus constituintes majoritários, ou como bloqueador do receptor de dopamina ou como bloqueador adrenérgico.

Testes de Nocicepção Orofacial

O CCW diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o tempo de fricção da região orofacial no teste de nocicepção orofacial induzida por formalina em todas as doses administradas (Figura 5).

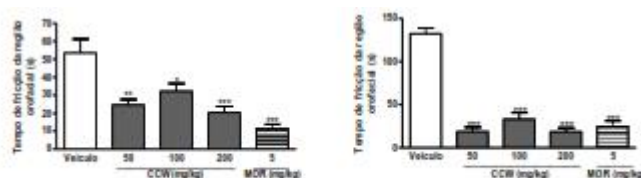


Figura 5. Efeitos do CCW sobre o teste da nocicepção orofacial induzida por formalina. Veículo (controle), CCW (50, 100 e 200 mg/kg) ou morfina (MOR, 5 mg/kg) foram administrados, via oral, 60 min antes da injeção de formalina. (A) primeira fase (0-5 minutos) e (B) segunda fase (15 - 30 minutos). Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n = 6, por grupo). *p < 0,05, **p < 0,01 ou ***p < 0,001 quando comparado ao controle (ANOVA, uma via, seguido pelo teste de Tukey).

No teste de nocicepção orofacial induzida por capsaicina, o CCW, em todas as doses testadas, diminuiu significativamente ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) o tempo de fricção da região orofacial quando comparado ao grupo controle (Figura 6). No teste de nocicepção orofacial induzida por glutamato, o CCW reduziu significativamente ($p < 0,001$), nas doses de 100 e 200 mg/Kg, o comportamento nociceptivo quando comparado ao grupo veículo (controle), porém não se observou diferença significativa na dose de 50 mg/Kg (Figura 6).

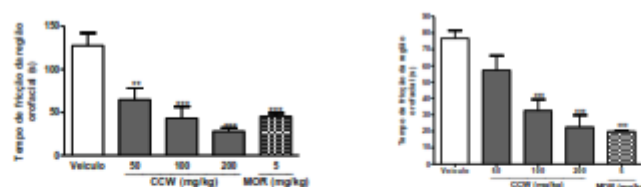


Figura 6. Efeitos do CCW sobre a nocicepção orofacial induzida por capsaicina (A) e glutamato (B). Veículo (controle), CCW (50, 100 e 200 mg/kg) ou morfina (MOR, 5 mg/kg) foram administrados, via oral, 60 min antes da injeção do alógeno. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n = 6, por grupo). **p < 0,01 e ***p < 0,001 quando comparado ao controle (ANOVA, uma via, seguido pelo teste de Tukey).

O teste de nocicepção orofacial induzida por formalina, diferentemente dos demais testes de nocicepção, divide-se em duas fases. A primeira refere-se a um estímulo direto dos nociceptores, enquanto a segunda condiz a um processo inflamatório com consequente sensibilização central, o que o considera o teste mais indicado para avaliação central (CLAVELOU et al., 1989). Assim como o teste de nocicepção orofacial induzida por capsaicina, o teste de nocicepção orofacial induzida por formalina também consiste na ativação de fibras nociceptivas trigeminais. Com isso, a resposta comportamental expressa pelo animal difere consideravelmente à medida que é comparado aos testes mais comuns, cujo estímulo algíco ocorre na pata traseira. As vias que controlam essas respostas motoras são distintas, o que ajuda a compreender as diferenças nos processos de informação nociceptiva entre as regiões da coluna vertebral e do trigêmeo, sendo possível examinar diferentes níveis de integração do mesmo estímulo nocivo no sistema nervoso periférico e central (RABOISSON; DALLEL, 2004). A ação do CCW na segunda fase pode ser resultado da ação anti-inflamatória já descrita para o óleo. Os resultados encontrados com o presente teste corroboram com o ensaio de nocicepção induzido por formalina cujo estímulo algíco é aplicado na pata, onde as duas fases do teste também foram reduzidas (LEITE et al., 2010). A capsaicina atua sobre fibras sensitivas responsáveis pela transmissão dolorosa e ativa o receptor vaniloide 1 (PELISSIER; PAJOT; DALLEL, 2002), um canal iônico sensível ao calor, pH ácido (JULIUS; BASBAUM, 2001), mediadores de lipídios (HUANG et al., 2002; VAN DER STELT; MARZO, 2004) e vários produtos naturais (CALIXTO et al., 2005; SUGAI et al., 2005;

RIERA et al., 2009). Este receptor encontra-se presente em neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, o que resulta em vasodilatação reflexa do axônio, bem como no aumento da excitabilidade dos neurônios nociceptivos trigeminais (PELISSIER; PAJOT; DALLEL, 2002).

A diminuição da fricção da região orofacial nos camundongos, após a administração do CCW, no teste de nocicepção orofacial induzida por capsaicina, pode estar relacionada à suposta inibição dos receptores vaniloides 1, possivelmente derivada da ação do geraniol, geranial, neral (STOTZ et al., 2008), citronelol (BRITO et al., 2012) e citronelal (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), componentes majoritários do óleo em questão, neste tipo de receptor.

A inibição observada nos testes de nocicepção orofacial induzida por formalina e por capsaicina pode estar vinculada a uma inibição da substância P ou ao bloqueio do receptor neuroquinina-1 (NK-1) (HOLANDA PINTO et al., 2008), já que estudos anteriores utilizando um antagonista deste receptor foram capazes de demonstrar o bloqueio do NK-1 na segunda fase do teste de formalina (LUCCARINI et al., 2003). Estudos anteriores utilizando a cetamina, um antagonista do receptor NMDA, na articulação temporomandibular (ATM), demonstraram uma diminuição significativa da dor induzida por glutamato, visto que este neurotransmissor é capaz de ativar nociceptores aferentes primários após a sua liberação a partir de tecidos inflamados (HONDA et al., 2011). Tal afirmação sugere o envolvimento do CCW com o sistema glutamatérgico na diminuição da nocicepção orofacial induzida por glutamato. Leite et al. (2011), ao avaliar a resposta motora de animais que foram tratados com o OEC, utilizando o aparelho Rota-Rod, demonstrou que a ação depressora deste óleo sobre o SNC não interfere na atividade motora, com isso, pode-se dizer que o efeito antinociceptivo na região orofacial não decorre da ação depressiva do SNC. Outro mecanismo de ação sugerido para o CCW seria a inibição da liberação da vesícula pré-sináptica por meio da possível ausência da formação do complexo cálcio-calmodulina, responsável pela exocitose de neurotransmissores capazes de ativar ou inibir neurônios pós-sinápticos (LARKMAN; JACK, 1995). Este fato decorreria da ação do CCW na inibição de canais para Ca^{2+} , impedindo assim o influxo deste íon (MENEZES et al., 2010). Desta forma, o CCW estaria agindo na inibição do estímulo nociceptivo, o que pode ser observado nos resultados dos ensaios de nocicepção acima descritos.

Avaliação da ação central

Imunofluorescência para proteína Fos, Através da análise dos dados, observou-se ativação neuronal positivamente para Fos no núcleo dorsal da rafe (DR), locus ceruleus (LC), trato trigemino-talâmico (TTT), núcleo trigeminal espinal (TTT) e área rostroventromedial (RMV) (Figura 7).

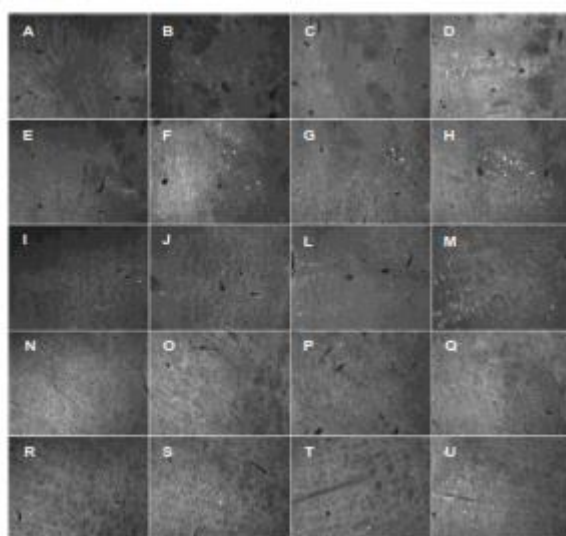


Figura 7. Imunofluorescência para proteína Fos em neurônios do núcleo dorsal da rafe (A, B, C, D), locus ceruleus (E, F, G, H), trato trigemino-talâmico (I, J, K, M), núcleo trigeminal (N, O, P, Q) e área rostroventromedial (R, S, T, U), noventa minutos após o tratamento com CCW (50, 100 ou 200 mg/kg; v.o.) ou veículo (água destilada) e 30 minutos após indução alérgica com formalina.

Observou-se maior ativação neuronal nos grupos tratados com 200 mg/kg de CCW quando comparados ao grupo controle, nas seguintes áreas cerebrais: DR ($p < 0,01$), LC ($p < 0,001$) e TTT ($p < 0,05$), com exceção do NT, que teve sua maior ativação nos grupos tratados com 100 mg/kg de CCW, e da área rostroventromedial (RMV) nas doses de 100 ($p < 0,001$) e 200 mg/kg ($p < 0,01$) (Figura 8). O nervo trigêmeo, V par de nervos cranianos, divide-se em três ramificações responsáveis pela sensibilidade da face, são elas a oftálmica, maxilar e mandibular (SESSLE, 2000). O teste de nocicepção orofacial induzida por formalina, que antecedeu a retirada tecidual para posterior submissão à imunofluorescência para proteína Fos, se deu por conta da aplicação de um estímulo algico na área maxilar do animal, região innervada por uma das ramificações do nervo descrito, o que condiz à ativação do núcleo trigeminal espinal (NT). Este núcleo é capaz de receber estímulos algicos e enviá-los para outras regiões do córtex a fim de se obter uma resposta a tal estímulo (RABOISSON; DALLEL, 2004).

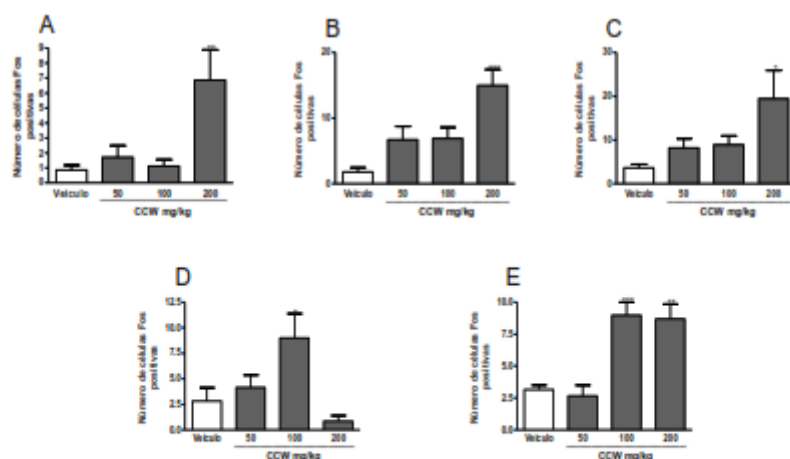


Figura 11. Número de Células FOS positivas no núcleo dorsal da rafe (A), locus ceruleus (B), trato trigemino-talâmico (C), núcleo trigeminal espinal (D) e área rostroventromedial (E). Veículo (água destilada; v.o.) ou CCW (50, 100 e 200 mg/kg; v.o.) foi administrado noventa minutos antes da perfusão. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m ($n = 6$ /por grupo) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (ANOVA uma via seguido pelo Teste de Tukey).

O NT divide-se em três regiões, a parte oral (NTPO), a interpolar (NTPI) e a caudal (NTPC). Um estudo, utilizando uma microinjeção de morfina no NPTC, mostrou que a atividade nociceptiva do NPTO foi inibida após reversão por naloxona, o que comprova a íntima conexão existente entre estes subnúcleos (DALLEL et al., 1998). Diversas substâncias neuroativas processam tais informações no NPTO e no NPTC, a exemplo do glutamato, serotonina e óxido nítrico (NO) (TAKEMURA et al., 2006); o que sugere a ação do CCW sobre os sistemas descritos, sobretudo para o glutamatérgico, que já possui atividade inibidora descrita para o OEC (QUNTANS-JÚNIOR et al., 2008). As informações entre diferentes áreas do sistema nervoso central, geralmente são transmitidas por tratos e, neste caso, houve o envolvimento do trato trigeminotalâmico (TTT), também conhecido como lemnisco trigeminal, evidenciado pela marcação de neurônios positivos para proteína Fos nesta área. Como o próprio nome já diz, o TTT envia aferências do núcleo trigeminal para o tálamo, mais precisamente para o núcleo ventral pósterolateral. Este núcleo participa da via sensitiva e envia projeções para o córtex sensorial primário (MIRZA; KIVRAK; ERZURUMLU, 2013). Estudo anterior utilizando um antagonista do receptor de serotonina (5-HT) comprovou a redução da sensibilidade nociceptiva de uma injeção de formalina em testes orofaciais na fase inflamatória, desta forma, sugere-se a via serotoninérgica como uma das prováveis vias de aferência nociceptiva ativada neste estudo (OKAMOTO et al., 2005). Outro possível mecanismo de ação seria o glutamatérgico, presente no TTT, proveniente do NTPI e NTPC (MAGNUSSON et al., 1987), cujas ações do OEC já

foram descritas para este sistema. Como visto, a via serotoninérgica apresenta importante função na via nociceptiva. Os receptores da 5-HT estão presentes também na área rostroventromedial (RVM), que se conecta com o núcleo dorsal da rafe (DR), ainda por esta via (CHEN et al., 2013). Estes núcleos participam do mecanismo de modulação da dor e a ativação destes, evidenciada no estudo em questão, propõe esta via como um dos possíveis mecanismos de ação do CCW na antinocicepção orofacial.

Em estudo realizado por Radhakrishnan e Sluka (2009) demonstrou-se o aumento da liberação de glutamato na RMV subsequente da indução de dor muscular crônica, o que corrobora com a relação deste neurotransmissor em processos algícos e colabora com a hipótese da ação do CCW na inibição de tal sistema, resultando assim no comportamento antinociceptivo. O locus ceruleus (LC) é um núcleo de extrema importância, participante da via ascendente da dor. Além de apresentar importante papel no processamento e inibição da dor, tem sido utilizado em diversos estudos clássicos de modulação da dor aguda (DELGADO et al., 2012). Testes realizados em ratos foram capazes de comprovar a ação deste núcleo na via antinociceptiva (VIISANEM; PERTOVAARA, 2007). Estudo recente mostrou a importância do glutamato na inibição descendente em ratos (HAYASHIDA; PARKER; EISENACH, 2010). Diante da atividade inibitória sobre o sistema glutamatérgico já descrita para o OEC (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008) e do resultado obtido com o presente trabalho, onde o CCW foi capaz de reduzir o comportamento de fricção no teste de nocicepção orofacial induzida por glutamato, podemos sugerir a importância do sistema glutamatérgico como a principal via do mecanismo de ação do CCW na atividade antinociceptiva da região orofacial; além de despertar acerca do possível envolvimento da via serotoninérgica no efeito antinociceptivo orofacial do CCW.

4. CONCLUSÃO

O complexo do OEC pôde ser realizado, aumentando sua solubilidade e absorção pelo organismo. Além disso, foi possível comprovar a ação anti-hipernociceptiva do CCW, bem como sua atividade nociceptiva na dor orofacial e sua ativação do SNC, onde se observou ativação neuronal significativa de áreas relacionadas à via descendente da dor, que foram o núcleo dorsal da rafe, locus ceruleus, trato trigemino-talâmico, núcleo trigeminal espinhal e área rostroventromedial. Tais achados corroboram com seu efeito antinociceptivo visto no presente estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4 ed. Carol Stream IL: Allured; 2007.
2. ALVES NETO, O. **Dor: princípios e prática**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa
3. BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. 2009; 139(2): 267–284.
4. BRASILEIRO, B. G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2008; 44(4): 629-636.
5. BRITO, R. G. et al. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Natural Medicines**. 2012; 66: 337-344.
6. BURMEISTER, S. S.; MANGIAMELE, L. A.; LEBONVILLE, C. L. Acoustic modulation of immediate early gene expression in the auditory midbrain of female túngara frogs. **Brain research**. 2008; 1190: 105–114.

7. CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther.** 2005; 106: 179-208.
8. CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine.** 2006; 73(1): 10–16.
9. CHEN, T. et al. Neurokinin-1 receptor-expressing neurons that contain serotonin and gamma-aminobutyric acid in the rat rostroventromedial medulla are involved in pain processing. **The Journal of Pain.** 2013; 1-15. In press.
10. CLAVELOU P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett.** 1989; 103: 349-353. 25
11. CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 2005; 15(3): 272-278.
12. COSTA, V. P.; MAYWORM, M. A. S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes – município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.** 2011; 13(3): 282-292.
13. CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology.** 1992; 107: 660-664.
14. CUNHA, J. M. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology.** 2000; 130: 1418-1424.
15. CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of the North American.** 2005; 102:1755-60.
16. CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology.** 2008; 83: 824-832.
17. CUNHA, T.M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res.** 2004; 37(3):401-07.
18. HARGREAVES, K. M. Orofacial pain. **Pain.** 2011; 152(3): 25–32.
19. HAYASHIDA, K.; PARKER, R. A.; EISENACH, J. C. Activation of glutamate transporters in the locus coeruleus paradoxically activates descending inhibition in rats. **Brain Res.** 2010; 4(1317): 80-6.
20. HOLANDA PINTO, S. A. et al. Antinociceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine.** 2008; 15 (8): 630–634.
21. HONDA, K. et al. Involvement of peripheral ionotropic glutamate receptors in orofacial thermal hyperalgesia in rats. **Molecular pain.** 2011; 7: 75.
22. HUANG, S. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2002; 99: 8400-8405.
23. IANARO, A. et al. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced o edema in mice. **Immunology.** 1994; 82(3): 370–375.
24. JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2001; 97: 8134-8139.

25. LEITE, B. L. S. et al. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. **Pharmaceutical biology**. 2010; 48(10): 1164–1169.
26. LEITE, B. L. S. et al. Volatile constituents and behavioral change induced by *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil in rodents. **African Journal of Biotechnology**. 2011; 10(42): 8312–8319.
27. LOFTSSON, M.; MASSON, M. Cyclodextrin in topical drug formulation; theory and practice. **Int. J. Pharm.** 2001; 225:15-30.
28. LUCCARINI, P. et al. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. **The journal of pain**. 2006; 7(12): 908–914.
29. MACEDO, A. F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 2007; 28(1): 123-128.
30. MAGNUSSON, K. R. et al. Localization of glutamate in trigeminothalamic projection neurons: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. **Somatosens Res**. 1987; 4(3): 177–90.
31. MELO, J. G. et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-Índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiática* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**. 2007; 21(1): 27-36.
32. MELO, M. S. et al. Anti-inflammatory and redox-protective activities of citronellal. **Biological Research**. 2011; 44: 363-368.
33. MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 2010; 62: 215–221.
34. MIRZA, R.; KIVRAK, B. G.; ERZURUMLU, R. S. Cooperative slit and netrin signaling in contralateralization of the mouse trigeminothalamic pathway. **The Journal of Comparative Neurology**. 2013; 521:312–325.
35. MONCADA, S.; FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and the Oedema of Inflammation. **Nature**. 1973; 246(5430): 217–219.
36. MOSHER, G.; THOMPSON, D.O. Complexation and Cyclodextrins. In SWARBRICK, J., BOYLAN, J.C. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2nd ed. v.1. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., p.531-558, 2002.
37. MOSSEY, J. M. Defining racial and ethnic disparities in pain management. **Clinical orthopaedics and related research**. 2011; 469(7): 1859–1870.
38. NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**. 1987; 135: 145-153.
39. NIXDORF, D. R. et al. Classifying orofacial pains: a new proposal of taxonomy based on ontology. **Journal of oral rehabilitation**. 2012; 39(3): 161–169.
40. OKAMOTO, K. et al. Central serotonin 3 receptors play an important role in the modulation of nociceptive neural activity of trigeminal subnucleus caudalis and nocifensive orofacial behavior in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. **Neuroscience**. 2005; 135: 569 – 581.

41. OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 2011; 13(1): 8-16.
42. PELLISIER T.; PAJOR J.; DALLE R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**. 2002; 96: 81-87.
43. PEREIRA, F. O. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. **Braz. J. Microbiol.** 2011; 42 (1): 233–242.
44. PERL, E. R. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. **Progress in neurobiology**. 2011; 94(1): 20–38.
45. PINTO, L. et al. Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. **J Pharm. Biomed.** 2005; 39: 956-963.
46. PRADO, T. C. P.; BEL, E. A. D. C-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. **Medicina, Ribeirão Preto**. 1998; 31: 424-433.
47. QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Antinociceptive activity of citronellal in formalin-, capsaicin- and glutamate- induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **J Orofac Pain**. 2010; 24: 305–312.
48. QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Revista Farmacêutica Banaerense**. 2002; 21(3): 179-184.
49. QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**. 2008; 15(8): 619–624.
50. RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 2004; 28(2): 219–226.
51. RADHAKRISHNAN, R.; SLUKA, K. A. Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a pre-clinical model of chronic widespread muscle pain. **Neurosci Lett**. 2009; 457(3):141-5.
52. RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Peripheral mechanisms of somatic pain. **Anesthesiology**. 1988; 68(4): 571–590.
53. reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **J. Nat. Med.** 2012; 66(4)
54. REN, K.; TOREES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**. 2009; 60: 57-64.
55. RIERA C. E. et al. Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels. **Br J Pharmacol**. 2009; 157(8): 1398-409.
56. SANTANA, M. T. et al. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. **Pharmaceutical Biology**. *In Press*.
57. SCHERER, R. et al. Composition and Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. 2009; 11(4): 442-449.
58. SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 2000; 11(1): 57–91.

59. SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 2006; 29: 38-43.
60. STOTZ, S. C. et al. Citral sensing by TRANSient Receptor Potential channels in dorsal root ganglion neurons. **PLoS One**. 2008; 3(5): 1-14.
61. SU, Y. W. et al. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E₂ production in macrophages. **Planta Medica**. 2010; 76: 1666-1671.
62. SUNGAI, E. et al. Pungent qualities of sanshool-related compounds evaluated by a sensory test and activation of rat TRPV1. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2005; 69: 1951-1957.
63. TAKEMURA, M. et al. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. **Archives of histology and cytology**. 2006; 69(2): 79–100.
64. VALLE, E. M. M. D. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochem**. 2004; 39: 1033-1046.
65. VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**. 1963; 11: 463-467.
66. VAN DER STELT, M.; MARZO, V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **Eur. J. Biochem**. 2004; 271: 1827-1834.
67. VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. 2005; 28(3): 519-528.
68. VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica**. 1ed. Coimbra: Minervacoimbra; 2006.
69. VIISANEN, H.; PERTOVAARA, A. influence of peripheral nerve injury on response properties of locus coeruleus neurons and coeruleospinal antinociception in the rat. **Neuroscience**. 2007; 146: 1785-1794.
70. VILARREAL, C.F. et al. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its NaV1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. **Biochemical Pharmacology**. 2009; 77: 867-77.
71. VILLAREAL, C. F. et al. Acute and persistent nociceptive paw sensitization in mice: The involvement of distinct signalling pathways. **Life Sciences**. 2009; 85: 822-829.
72. VILLARREAL, C. F. et al. The long-lasting sensitization of primary afferent nociceptors induced by inflammation involves prostanoid and dopaminergic systems in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 2013; 103: 678-683.
73. VINOTHKUMAR, M. et al. Geraniol modulates cell proliferation, apoptosis, inflammation, and angiogenesis during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 2012; 1: 17-25.
74. WILLIAMS, S.; EVAN, G. I.; HUNT, S. P. Changing patterns of c-fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat. **Neuroscience**. 1990; 36(1): 73–81.