

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA

Programa de Iniciação Científica - PIBIC

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DO  
COMPLEXO DE INCLUSÃO OLEO ESSENCIAL DE LIPPIA  
GRATA/β-CICLODEXTRINA EM MODELO DE DOR  
NEUROPÁTICA**

Área de Concentração: **Farmacologia / Fisiologia**

Bolsista: **Erik Willyame Menezes Pereira**

Nº Matricula: **201500436047**

Orientador: **Prof. Dra. Jullyana de Souza Siqueira Quintans**  
Departamento de Fisiologia / Laboratório de Neurociências e Ensaios  
Farmacológicos

Relatório Final

Período  
2016/2017

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC

## Resumo

No presente estudo foi avaliado a atividade do óleo de Lippia grata (Lippia/OE) e do complexo de inclusão contendo Lippia grata em beta-ciclodextrina (Lippia/βCD) em modelo de dor neuropática. Os animais foram submetidos a um processo cirúrgico seguindo modelo descrito por Seltzer (1990), onde é feito uma ligadura parcial no nervo ciático com fio de seda 8-0. Para comparações múltiplas, os dados foram analisados por ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Foi possível notar que tanto o óleo quanto o complexo obtiveram um efeito analgésico para a redução da hiperalgesia induzida por modelo de dor neuropática tendo um tempo-efeito de quatro e seis horas, respectivamente, após o tratamento sem mostrar tolerância, reduzindo assim a hiperalgesia mecânica e térmica provocada por este modelo. Além disso, não foi observado alteração na função motora dos animais. Com isso, a Lippia/OE e Lippia/βCD mostraram ter um perfil farmacológico adequado proporcionando um efeito anti-hiperalgésico em modelo animal de dor neuropática, valendo ressaltar que quando complexada este efeito foi aumentado, sendo assim, uma substância promissora e alvo de posteriores estudos para o tratamento relacionado à dor crônica.

**Palavras-Chave:** Lippia Grata, Dor neuropática, ciclodextrina.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	4
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	6
2.1    Objetivo Geral.....	6
2.2    Objetivos Específicos .....	6
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	6
3.1    Animais.....	6
3.2    Protocolos Experimentais .....	6
3.2.1    Indução da Dor Neuropática.....	7
3.2.2    Avaliação da hiperalgesia Mecânica.....	7
3.2.3    Hiperalgesia Térmica.....	7
3.2.4    Teste de Força Muscular.....	8
3.2.5    Teste de Coordenação motora .....	8
3.3    Descarte de animais .....	8
<b>4 RESULTADOS .....</b>	9
4.1 Avaliação do tempo-efeito na Hiperalgesia Mecânica .....	9
4.2 Avaliação Crônica na Hiperalgesia Mecânica .....	9
4.3 Avaliação do tempo-efeito na Hiperalgesia Térmica.....	10
4.4 Avaliação crônica na hiperalgesia térmica .....	11
4.5 Avaliação da Força Muscular e Coordenação Motora.....	11
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	12
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	14
<b>7 PESPECTIVAS .....</b>	14
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	14

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), “a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais, ou descrita em termos que sugerem tal lesão” (MERSKEY et al., 1979). Essa capacidade de detectar estímulos nocivos tem uma função primordial de alertar o nosso organismo a danos teciduais reais ou potenciais (RAMADABRAN; BANSINATH, 1996)

A dor pode ser classificada tendo em vista a condição temporal, como aguda que é fisiológica (sistema de alerta e proteção) ou crônica oriundas de disfunções no sistema somatossensorial, deixando de ser um sinal de alerta e passa a ser o foco da doença (JULIUS E BASBAUM, 2001). Dentre os vários tipos de dor crônica temos a dor neuropática, que é definida como lesão primária do SNP ou SNC, baseando-se nos diferentes mecanismos neurofisiopatológicos (HANSSON, 2002).

Dados obtidos em 15 países europeus demonstraram uma prevalência de dor crônica em 19% da população estudada, onde 7 a 8% tiveram como característica a dor neuropática (BREIVIK et al., 2006; BENNETT; BOUHASSIRA, 2007). Por ter alta prevalência e complexidade de sintomas, o tratamento para a dor neuropática vem sendo um desafio constante para os pesquisadores, visto isso, uma incansável busca por novas opções terapêuticas.

Medicamentos de primeira escolha são a gabapentina (GABAP), lidocaína, tramadol e Inibidores seletivos de receptação de serotonina e noradrenalina - duloxetina (DWORKIN et al., 2003). Mesmo com tantos fármacos disponíveis no mercado farmacêutico para o tratamento, muitos deles provocam efeitos colaterais que impedem seu uso crônico inviabilizando o tratamento com estes fármacos (CALIXTO, 2000).

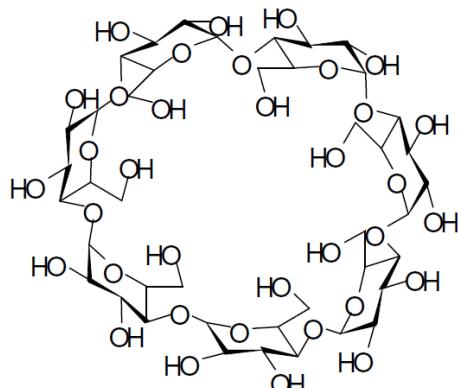
Um recurso que vem sendo muito estudado e com um crescente investimento são os produtos naturais. Desde o exórdio a humanidade faz uso das propriedades curativas das plantas, buscando alternativas para sanar várias enfermidades. (VIEGAS; BOLZANI, 2006). Um exemplo de planta medicinal que vem sendo muito estudada é o gênero *Lippia* da família Verbenaceae com aproximadamente 250 espécies de arbustos encontradas principalmente nas Américas Central e do Sul (TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996).

Uma espécie em especial, a *Lippia grata*, vem sendo estudada e já foi comprovada a presença de uma mistura de terpenóides a exemplo da cânfora (27,22%), (E)-cariofileno (11,6%), canfeno (11,3%), biciclogermacreno (9,4%) e borneol (6%) como principais compostos em seu óleo essencial (SIQUEIRA-LIMA et al., 2014).

Por conter tais substâncias em sua composição este óleo torna-se um grande alvo para estudo em dor. Porém, por se tratar de um óleo, tem baixa solubilidade, pensando nisso Siqueira-Lima et al, 2014 fizeram a sua complexação e sua caracterização em  $\beta$ -cyclodextrina.

De origem natural oriundas do amido e da celulose, as CDs são oligossacarídeos cíclicos, onde as mais conhecidas constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glucopiranose sendo nomeadas como  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CDs respectivamente. São cristalinas, homogêneas, não higroscópicas e com estrutura tridimensional em forma de um toróide, com aberturas superior e inferior indicados pelos grupos hidroxílicos secundários e primários respectivamente. Seu exterior é hidrofílico e sua cavidade lipofílica, resultante de um ambiente rico em elétrons, vindos do oxigênio glicosídico (ATWOOD et al., 1996).

Figura 1. Estrutura da  $\beta$ -CD, com sete unidades de D-glicose.



Levando em consideração todos os aspectos estruturais, as CDs atuam como sistemas carregadores de fármacos, pois aumentam a solubilidade em água, a estabilidade e a biodisponibilidade da molécula hóspede e diminuem a toxicidade e o seu efeito quando se trata de uma droga, (HAIYUN et al., 2003). Sendo assim uma alternativa que vem sendo muito utilizada para melhoramento de substâncias farmacológicas. Esse projeto tem como objetivo testar os efeitos do complexo de inclusão em Dor Neuropática induzida em camundongos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade anti-hiperalgésica do óleo essencial de *Lippia grata* (Lippia/OE) e do óleo essencial de *Lippia grata*/  $\beta$ -ciclodextrina (Lippia/ $\beta$ CD) em modelo de dor neuropática em roedores.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade analgésica da Lippia/OE e da Lippia/ $\beta$ CD em modelo de dor neuropática em camundongos;
- Avaliar a atividade da Lippia/OE e da Lippia/ $\beta$ CD na força muscular;
- Elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos em suas respostas.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25-35 g, com 2 a 3 meses de idade, oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, sob as mesmas condições de temperatura ambiente ( $23 + 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade e ruído. Com ciclo claro escuro de 12:00 horas, com a fase clara iniciando às 6:00 e terminando às 18:00 horas, recebendo ração comercial (Purina; Labina) e água ad libitum, durante todo o período de experimentação científica. Todos os protocolos experimentais propostos respeitaram os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal em Pesquisa (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob protocolo número 65/2015.

### **3.2 Protocolos Experimentais**

### 3.2.1 Indução da Dor Neuropática

Foram utilizados camundongos dispostos em grupos de oito animais previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal contendo Xilazina (8 mg/kg) e Cetamina (80 mg/Kg) (BENTO et al., 2008). Após a verificação da perda do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), foi efetuada a tricotomia da área a ser operada. Em seguida, foi realizada uma incisão curvilínea na coxa direita do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa poplítea, ao nível da inserção dos músculos ísquiotibiais. A exposição do nervo ciático será obtida após a divulsão dos músculos semitendinoso e reto femoral. Utilizando fio de seda número 0-8, foi feito o laçamento parcial do nervo ciático sendo amarrado com um nó de sutura simples. Logo após, a divulsão muscular foi reparada com um ponto de sutura, com fio de nylon (0-6) e realizada a assepsia no local com antisséptico (Povidine®). Sete dias após o procedimento cirúrgico e uma hora após a administração do tratamento, os animais foram avaliados quanto a parâmetros comportamentais: hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica, descritos a seguir (adaptado de SELTZER, 1990).

### 3.2.2 Avaliação da hiperalgesia Mecânica

Os animais foram colocados em caixas de acrílico durante 15-30 minutos para adaptação. O assoalho da caixa é feito de arame não maleável na forma de rede. As alterações nos limiares hiperalgésicos foram avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida (retirada) da pata estimulada. A intensidade de hiperalgesia foi então quantificada como sendo a variação na força obtida na média dos cinco valores expressos em gramas (força) avaliados diariamente após o protocolo cirúrgico. Sendo observado também, antes do procedimento cirúrgico (zero hora ou estado basal), esses valores em gramas (força), usados para comprovar que os animais estavam saudáveis e aptos a experimentação (Cunha et al., 2004).

### 3.2.3 Hiperalgesia Térmica

A hiperalgesia térmica foi avaliada utilizando a placa quente (Insight, Brasil). O teste é comumente utilizado na avaliação do efeito de drogas analgésicas, geralmente por alteração no limiar nociceptivo, consistindo na exposição dos animais a um estímulo térmico

nociceptivo. A latência para as respostas comportamentais inclui salto, retirada da pata e lamber a pata (EDDY; LEIMBACH, 1953). No dia anterior à cirurgia, os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal. Cada animal foi colocado sobre a placa quente mantida a  $55 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e a latência foi medida 60 min após a administração das substâncias. Um tempo de corte de 20s será escolhido para indicar completa analgesia e para proteger o animal de lesão tecidual.

### 3.2.4 Teste de Força Muscular

Os animais foram divididos em grupos ( $n=8$ ) de camundongos tratados com o Lippia/OE (24 mg/kg; v.o.); Lippia/ $\beta$ CD (24 mg/kg; v.o.); veículo (salina 0,9% com tween 80 a 0,2%; v.o.) e grupo Sham (falso operatório). O Grip Strength foi utilizado para avaliar o tônus dos animais e/ou a força dos membros anteriores e posteriores (em gramas) ao mesmo tempo ou separadamente, baseado na tendência natural do animal para agarrar uma barra ou grade quando suspenso pela cauda (MAURISSEN et al., 2003).

### 3.2.5 Teste de Coordenação motora

Os possíveis efeitos motores promovidos pela indução da dor nos animais foram testados através da esteira Rota-rod (Aparato de Rota-rod). Especificamente, os animais foram colocados em uma barra giratória (Rota-rod) a uma velocidade gradual de 1 a 7 rotações por minuto (rpm) por 120 segundos e mantida por outros 30 segundos em 9 rpm (SLUKA et al., 2001b). Para resultados confiáveis, os animais foram treinados durante dois dias antes da injeção. Três sessões com três tentativas cada foram realizadas em um intervalo entre as sessões maior que 1 hora e um intervalo entre as séries maior que 5 minutos. O tempo de desempenho, em minutos, foi registrado até que o animal tenha dificuldade de permanecer na esteira ou atingisse 150 segundos.

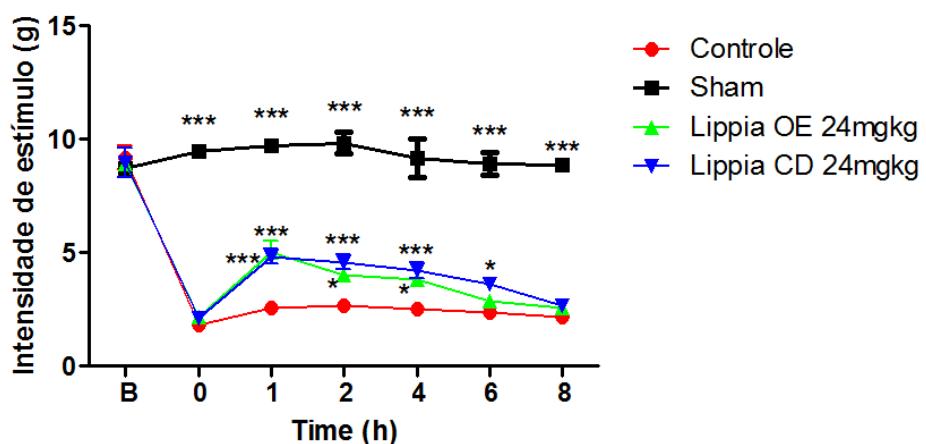
## 3.3 Descarte de animais

Após a realização dos protocolos experimentais os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados como material infectante e colocados no freezer do biotério setorial até a coleta seletiva de lixo biológico da instituição para o descarte adequado, de acordo com a legislação vigente.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do tempo-efeito na Hiperalgesia Mecânica

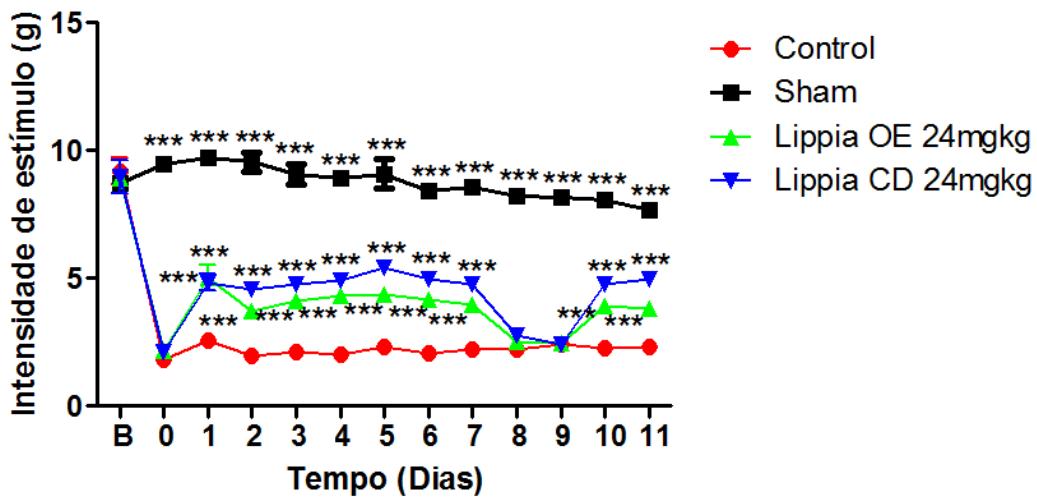
A administração oral da Lippia/βCD (24 mg/kg) foi capaz de aumentar significativamente ( $p<0,001$ ) o limiar de retirada da pata por um período de até seis horas quando comparado ao veículo. Esse efeito foi superior a Lippia/OE ( $p<0,001$ ) que teve um tempo de efeito de quatro horas (Figura 2).



**Figura 2.** Avaliação do tempo de resposta após administração do veículo, Lippia/OE (24 mg/kg) ou Lippia/βCD (24 mg/kg) na hiperalgesia mecânica induzida após a cirurgia de lesão parcial do nervo ciático. B indica a média dos valores basais antes do procedimento cirúrgico. Os valores foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo controle. (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

### 4.2 Avaliação Crônica na Hiperalgesia Mecânica

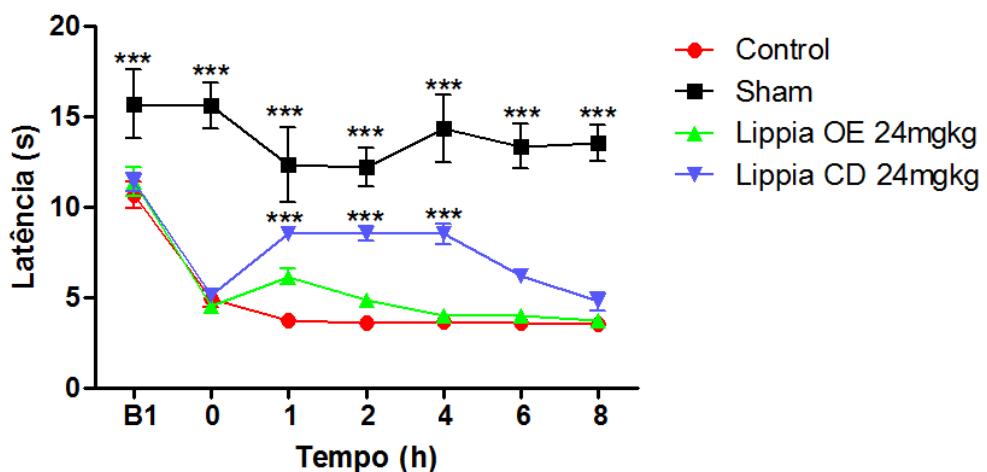
Através do tratamento diário, foi possível observar que os animais tratados com Lippia/βCD (24 mg/kg) aumentaram o limiar de retirada da pata ( $p<0,001$ ) em todos os dias de tratamento quando comparado com o controle. No oitavo e nono dias de tratamento, houve uma parada no tratamento e continuidade nas avaliações afim de verificar um possível efeito de tolerância. Observou-se que nestes dias os animais tiveram seu limiar de retirada reduzido não apresentando diferença significativa quando comparado ao controle e que no décimo dia com a volta do tratamento os animais tiveram seu limiar de retirada da pata novamente aumentado, seguindo os mesmos padrões do inicio do tratamento (figura 3).



**Figura 3.** Avaliação crônica da administração do veículo, Lippia/OE (24 mg/kg) ou Lippia/ $\beta$ CD (24 mg/kg) na hiperalgesia mecânica induzida após a cirurgia de lesão parcial do nervo ciático diariamente durante 11 dias, no oitavo e nono dia houve uma parada no tratamento mas com continuidade nas avaliações. B indica a média dos valores basais antes do procedimento cirúrgico. Os valores foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo controle. (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.3 Avaliação do tempo-efeito na Hiperalgesia Térmica

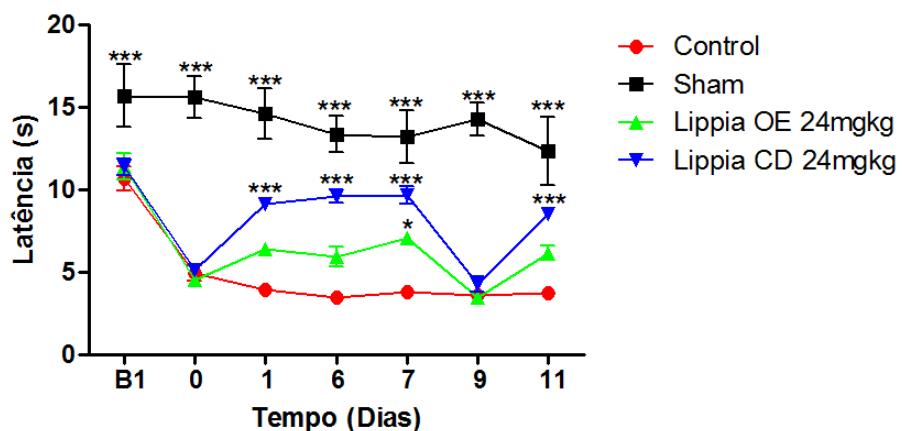
A administração oral da Lippia/ $\beta$ CD (24 mg/kg) foi capaz de aumentar significativamente ( $p < 0,001$ ) o tempo de reação por um período de até quatro horas quando comparado ao veículo. Esse efeito foi superior a Lippia/OE que não mostrou diferença significativa quando comparada ao veículo (Figura 4).



**Figura 4.** Avaliação do tempo de resposta após administração do veículo, Lippia/OE (24 mg/kg) ou Lippia/ $\beta$ CD (24 mg/kg) na Hiperalgesia Térmica induzida após a cirurgia de lesão parcial do nervo ciático. B indica a média dos valores basais antes do procedimento cirúrgico. Os valores foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo controle. (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.4 Avaliação crônica na hiperalgesia térmica

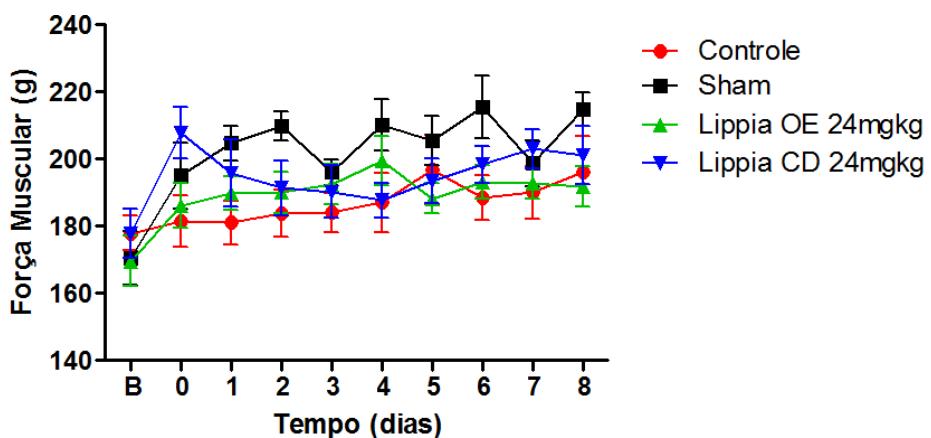
No teste da placa quente, foi possível observar que após a administração crônica do Lippia/βCD houve um aumento significativo no tempo de reação quando comparado ao controle ( $p<0,001$ ) e que sua forma não complexada só obteve resultado significativo no sétimo dia. No nono dia houve uma parada no tratamento e continuidade nas avaliações, observou-se que neste dia os animais tiveram uma redução no seu tempo de reação, não apresentando diferença significante em relação ao controle. No décimo primeiro dia com a volta do tratamento os animais reestabeleceram seu tempo de reação a níveis que coincidem com os do inicio do tratamento (figura 5).



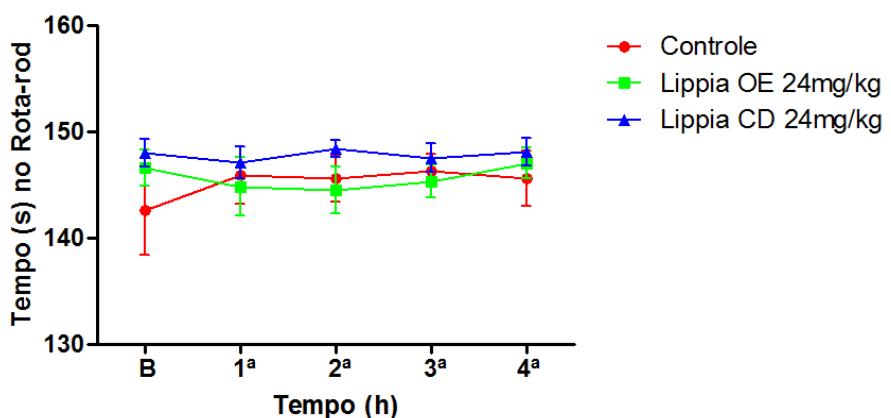
**Figura 5.** Avaliação crônica da administração do veículo, Lippia/OE (24 mg/kg) ou Lippia/βCD (24 mg/kg) na hiperalgesia térmica induzida após a cirurgia de lesão parcial do nervo ciático durante nos dias 1, 6, 7 e 11, no nono dia houve uma parada no tratamento mas com continuidade nas avaliações. B indica a média dos valores basais antes do procedimento cirúrgico. Os valores foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo controle. (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.5 Avaliação da Força Muscular e Coordenação Motora

Através do *grip strength meter* e do rota-rod foi possível observar que não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os grupos tratados com Lippia/OE, Lippia/βCD e o grupo controle (Figura 6 e 7). Esses resultados nos indicam que os compostos estudados não tiveram ação sobre a força muscular dos animais, descartando a hipótese de que um possível relaxamento da musculatura pudesse interferir na resposta de retirada da pata e, assim, afete o resultado analgésico da substância testada.



**Figura 6.** Avaliação força muscular da administração do veículo, Lippia/OE (24 mg/kg) ou Lippia/ $\beta$ CD (24 mg/kg) após a cirurgia de lesão parcial do nervo ciático diariamente durante oito dias. B indica a média dos valores basais antes do procedimento cirúrgico. Os valores foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* p < 0,001 vs. grupo controle. (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 7.** Avaliação da coordenação motora após administração do veículo, Lippia/OE 24 mg/kg ou Lippia/ $\beta$ CD. B indica a média dos valores basais antes do tratamento. Os valores foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* p < 0,001 vs. grupo controle. (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

## 5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas ocorreu uma evolução tangencial nos modelos animais de dor, proporcionando assim um aumento no entendimento na fisiopatologia de diversos processos dolorosos ligados a vários fatores etiológicos (RICE et al., 2009). Dentre esses processos dolorosos está à dor neuropática, uma das síndromes em que a terapêutica farmacológica atual reverte parcialmente à dor e que acarreta vários efeitos colaterais (LOESER, 2008). Demonstrado a necessidade de estudos para obter outras formas de tratamento, que possam ser mais eficazes e menos prejudiciais ao usuário.

No presente estudo utilizou-se um modelo de dor neuropática adaptado do método desenvolvido por Seltzer em 1990, no qual o nervo ciático é ligado parcialmente por um fio de seda 8-0 em seu terço dorsal com um nó de sutura, distal ao ponto em que os ramos posteriores do bíceps semitendinosos emergem. Seltzer constatou que uma semana após o processo cirúrgico os animais desenvolveram comportamento de lambadura do membro afetado, sinal sugestivo de dor espontânea. Além disso, o modelo provocou alterações como sensibilidade ao frio e hiperalgesia mecânica com duração de aproximadamente seis semanas. Todas essas características tornam o modelo viável para o estudo de dor neuropática.

Testou-se então a Lippia/OE e Lippia/βCD quanto à hiperalgesia mecânica e térmica provocada pela lesão parcial do nervo ciático. A Lippia/βCD foi complexada e caracterizada anteriormente por Siqueira-Lima, onde foi constatado que o seu componente majoritário foi a Cânfora (terpenóide, com efeito, antinflamatório e analgésico) tornando-a ideal para o estudo da dor neuropática (SIQUEIRA-LIMA et al., 2014).

A ação da cânfora e de outros terpenos foi demonstrada por GUIMARÃES, SERAFINI e QUINTANS-JUNIOR, 2014; em revisão de patentes resumindo a quantidade de pedidos de patentes referente ao emprego de terpenos para o alívio da dor e mostrando o potencial desses compostos em se tornar candidatos a novos medicamentos para o controle da dor.

A complexação de óleos essenciais vem sendo um artifício muito utilizado por pesquisadores para conseguir melhorar propriedades físicas dessas substâncias, conseguindo assim um aprimoramento nos efeitos antinflamatórios e analgésicas em modelos de dor crônica (ARAÚJO-FILHO et al, 2017; SANTOS et al, 2016; OLIVEIRA et al, 2016; SILVA et al, 2016).

Siqueira-Lima, 2017 demonstrou que a Lippia/βCD foi capaz de reduzir a hiperalgesia primária e secundária em modelo de dor muscular crônica não inflamatória, mostrando o possível envolvimento com receptores opioides e serotoninérgicos. Esse efeito foi apoiado pela imunofluorescência que demonstrou expressão da proteína FOS no chifre dorsal da medula.

Todas as evidências encontradas na literatura demonstram que a Lippia/OE tem um grande potencial para reduzir a dor neuropática e que sua complexação pode melhorar esse efeito. Sendo assim esses dados corroboram com os resultados obtidos após testar a Lippia/OE e Lippia/βCD no modelo de dor neuropática em estudo.

## 6 CONCLUSÃO

A Lippia/βCD teve um efeito positivo no que diz respeito à redução da hiperalgesia causada pela ligadura do nervo ciático, foi capaz de reduzir tanto a hiperalgesia mecânica quanto a hiperalgesia térmica, sem influência sobre a força muscular, e demonstrando um tempo-efeito de seis horas, tornando-a assim um possível recurso para o tratamento da dor muscular não inflamatória, porém necessita de mais estudos para traçar seu mecanismo de ação.

## 7 PESPECTIVAS

Os resultados foram promissores, mostrando que a Lippia grata tem sim um grande potencial na redução da hiperalgesia em modelo de dor neuropática e esse potencial foi otimizado com a complexação com β-CD. Para a parte final serão feitos outros protocolos experimentais.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALVES NETO, et al. Dor: princípios e prática, São Paulo: **Artmed**, 2009.
- AGGIO CH, FREITAS CS, MARCON R, WERNER MFD, RAE GA, et al. Antinociception of beta-D-glucan from Pleurotus pulmonarius is possibly related to protein kinase C inhibition. **Int J Biol Macromol.** v. 50, n. 3, p. 872–877, 2012.
- ARAÚJO-FILHO, et al. D-limonene exhibits superior antihyperalgesic effects in a β-Cyclodextrin-complexed form in chronic musculoskeletal pain reducing Fos protein expression on spinal cord in mice. **Neuroscience.** pii: S0306-4522(17)30442-6. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.06.037. Jul 1. 2017.
- BASBAUM AI, JULIUS D. Toward better pain control. **Sci. Am.** v. 294, n. 6, p. 60-67, 2006.
- BENNETT, M.I.; BOUHASSIRA, D. Epidemiology of neuropathic pain: can we the screening tools? **Pain.** v. 132, n. 1-2, p. 12—13, 2007.
- BREIVICK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence impact on daily life, and treatment. **Eur. J. pain.** v. 10, n. 4, p. 287-333, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. **Lisboa: Fundação Caloueste Gulbenkian**, v. 1, p. 301, 2003.

DWORKIN, R.H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnostic, mechanism, and treatment recommendations. **Arch. Neurosc.** v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.

GASIC GP, HOLLMANN M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu Rev Physiol.** v. 54, n. 3, p. 507-536, 1992.

GUIMARÃES, A.G.; SERAFINI, M. R.; e QUINTANS-JUNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 243-265, 2014.

HANSSON, P. Neuropsthic pain: clinical characteristics and diagnostic workup. **Eur. J. Pain.** v. 6, p. 47-50, 2002.

HAIYUN D, JIANBIN C, GUOMEI Z, SHAOMIN S, JINHAO P. Preparation and spectral investigation on inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with rutin. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 59 p. 3421–3429, 2003.

LOESER, J.D.; What's to be done? Comments on Grabow et al. **The clinical Journal of Pain.** v. 19, n. 6, p. 384, 2003

MERSKEY, H.; ALBE—FESSARD, D.; BONICA, J.J., et al. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. **Pain** , v. 6, n. 3, p. 249-252, 1979.

OLIVEIRA, M.G.B. et al.  $\alpha$ -Terpineol, a monoterpenic alcohol, complexed with  $\beta$ -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 254, p.54-62. 2016.

RAMADABRAN, K.; BANSINATH, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmac. Res.** v. 3, n. 1, p. 263-269, 1996.

RICE, A.S.C.; CIMINO-BROWN, D.; EISENACH, J.C.; et al. Animals models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: A critical appraisal and call for uniform reporting standards. **Pain.** v. 139, n. 2, p. 243-247, 2008.

SANTOS, P.L.; et al. Docking, characterization and investigation of  $\beta$ -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpenic present in the essential oil of Cymbopogon species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine.** v. 23, n. 9, p.948-957. 2016.

SILVA, et al. Enhancement of orofacial antinociceptive effect of carvacrol, a monoterpenic present in oregano and thyme oils, by  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in mice. **Biomed Pharmacother.** v. 84, p. 454-461, 2016.

SLUKA KA, KALRA A, MOORE SA (2001b) Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. **Muscle Nerve** v. 24, n. 1, p. 37-46, 2001.

TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *lippie* (*Verbenaceae*): A literature review. **J. Essent. Oil Res.** v.8 p. 471-485, 1996.

SELTZER ZR, DUBNER R, SHIR Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain.** v. 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SIQUEIRA-LIMA P.S.; ARAÚJO A.A.; LUCCHESE A.M.; QUINTANS J.S.; et al  $\beta$ -cyclodextrin complex containing *Lippia grata* leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice - evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v. 114, n. 2, p. 188-196, 2014.

VIEGAS, C.J. E BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova.** v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.