



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DO COMPLEXO DE  
INCLUSÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eplingiella  
fruticosa* (LAMIACEAE) EM  $\beta$ -CICLODEXTRINA SOBRE A  
DOR CRÔNICA MUSCULOESQUELÉTICA EM ROEDORES**

ALLAN JOHN DE OLIVEIRA MELO

SÃO CRISTOVÃO - SE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DO COMPLEXO DE  
INCLUSÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eplingiella  
fruticosa* (LAMIACEAE) EM  $\beta$ -CICLODEXTRINA SOBRE A  
DOR CRÔNICA MUSCULOESQUELÉTICA EM ROEDORES**

ALLAN JOHN DE OLIVEIRA MELO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte

**Coorientador:** Prof. Dr. Tiago Branquinho Oliveira

SÃO CRISTOVÃO - SE

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M528c Melo, Allan John de Oliveira  
Caracterização e efeito do complexo de inclusão contendo óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* (LAMIACEAE) em  $\beta$ -ciclodextrina sobre a dor crônica musculoesquelética em roedores / Allan John de Oliveira Melo; orientador Marcelo Cavalcante Duarte. – São Cristóvão, SE, 2018.  
58 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) —  
Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Lamiaceae. 2. Ciclodextrinas. 3. Dor crônica. 4. Essências e óleos essenciais. 5. Fibromialgia. I. Duarte, Marcelo Cavalcante, orient. II. Título.

CDU 615.322:616.74-009.7

ALLAN JOHN DE OLIVEIRA MELO

**CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DO COMPLEXO DE  
INCLUSÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eplingiella  
fruticosa* (LAMIACEAE) EM  $\beta$ -CICLODEXTRINA SOBRE A  
DOR CRÔNICA MUSCULOESQUELÉTICA EM ROEDORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte

---

Examinadora Interna: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mairim Russo Serafini

---

Examinadora Externa: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luana Heimfarth

PARECER

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

*Dedico este trabalho aos meus pais, Allana Maria de Oliveira Melo e Jamisson Santos Melo; a minha irmã, Emily de Oliveira Melo; a minha noiva, Valéria Costa Santos por toda compreensão e apoio durante essa jornada. Obrigado por tudo!*

## AGRADECIMENTOS

SEM DÚVIDAS ESTA É A PARTE MAIS DIFÍCIL DE TODA ESTA JORNADA, NÃO SOMENTE PELO CUIDADO NAS ESCOLHAS DAS PALAVRAS, MAS PELA RESPONSABILIDADE EM RECORDAR E AGRADECER TODAS PESSOAS QUE CONTRIBUÍRAM COM CADA PEÇA DESTE ENORME QUEBRA-CABEÇA, NA QUAL JAMAIS SERIA POSSÍVEL EM REALIZAR ESTE SONHO SEM A COLABORAÇÃO DO PRÓXIMO.

AGRADEÇO PRIMEIRAMENTE A **DEUS** PELO DOM DA VIDA, POR ME TER DADO A CAPACIDADE DE LUTAR PELOS MEUS SONHOS E SEMPRE ME INSPIRAR COM NOVAS IDEIAS E ASPIRAÇÕES PARA O FUTURO.

AOS MEUS PAIS, **JAMISSON** E **ALLANA**, POR SEMPRE TEREM ACREDITADO EM MEU POTENCIAL E INVESTIREM NA MINHA EDUCAÇÃO E FORMAÇÃO PROFISSIONAL, MESMO EM TEMPOS DIFÍCEIS. MUITO OBRIGADO POR TUDO!

À MINHA IRMÃ, **EMILY**, POR TODO APOIO E CARINHO QUE SEMPRE ME FORNECEU NESTA JORNADA.

À MINHA NOIVA, **VALÉRIA**, PELA ENORME PACIÊNCIA E POR TER ME ACOMPANHADO NESSA JORNADA DE DOIS ANOS, SEMPRE ME INCENTIVANDO A LUTAR PELOS MEUS SONHOS, CONTO COM VOCÊ PARA SEMPRE. EU TE AMO!

AO MEU ORIENTADOR, **PROF. DR. MARCELO CAVALCANTE DUARTE**, PELO INVESTIMENTO E DEDICAÇÃO DO SEU CONHECIMENTO AO LONGO DESSES ANOS, OS QUAIS CONTRIBUÍRAM IMENSAMENTE PARA MINHA FORMAÇÃO PROFISSIONAL. AGRADEÇO IMENSAMENTE PELA OPORTUNIDADE DE TER SIDO SEU ALUNO DE MESTRADO.

AO MEU COORIENTADOR, **PROF. DR. TIAGO BRANQUINHO OLIVEIRA**, PELOS ENSINAMENTOS E CONSELHOS NO DESENVOLVIMENTO DESTE TRABALHO.

AO **PROF. DR. LUCINDO JOSÉ QUINTANS JÚNIOR** E **PROF. DR. ADRIANO ANTUNES DE SOUZA ARAUJO**, PELA OPORTUNIDADE E COLABORAÇÃO CONCEDIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO DESTE TRABALHO.

AS AVALIADORAS DAS BANCAS DE QUALIFICAÇÃO E DEFESA: **PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> ADRIANA GIBARA GUIMARÃES**, **PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> MAIRIM RUSSO SERAFINI** E **PROF.<sup>ª</sup>**

**DR.<sup>a</sup> LUANA HEIMFARTH**, PELAS CRÍTICAS CONSTRUTIVAS E SUGESTÕES QUE CONTRIBUÍRAM PARA CONSTRUÇÃO DESTE TRABALHO.

AOS PROFESSORES: **DR.<sup>a</sup> DANIELLE GOMES SANTANA**, **DR. JOSÉ GUEDES DE SENA FILHO**, **DR.<sup>a</sup> TAMIRES CARDOSO LIMA**, PELAS CONTRIBUIÇÕES DURANTE AS APRESENTAÇÕES DAS DISCIPLINAS SEMINÁRIOS I E II.

A TODAS AMIGAS DE LABORATÓRIO: **ARYANE**, **BRENDA**, **FERNANDA**, **GRACIELLE**, **IRAÊ**, **LETÍCIA**, **RAQUEL** E **TAMILLYS**, PELO COMPANHEIRISMO, CONSELHOS E ENORME AJUDA NOS EXPERIMENTOS, A PRESENÇA DE CADA UMA DE VOCÊS FOI FUNDAMENTAL PARA A CONCLUSÃO DESTE OBJETIVO.

AO PROF. PHD. **SÓCRATES CABRAL DE HOLANDA CAVALCANTE** E A EQUIPE DO **LQF**, PELO ESPAÇO, APOIO E MATERIAL CONCEDIDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DESTA PESQUISA.

A TODOS MEMBROS QUE COMPÕEM O **LEFT**, PELO APOIO E ATENÇÃO PRESTADOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DESTA E OUTRAS PESQUISAS.

A TODA GALERA DO **NUPNAFF**, POR TODAS BRINCADEIRAS, APOIO E PRESENÇA DURANTE ESTES ANOS DE MESTRADO.

A TODO CORPO DOCENTE QUE COMPÕEM O **PPGCF**, PELA ORGANIZAÇÃO E OPORTUNIDADE DE PARTICIPAR DO PROCESSO SELETIVO DO MESTRADO.

À **FAPITEC/CAPES** POR TODO APOIO FINANCEIRO FORNECIDO DURANTES ESTES ANOS DE PESQUISA.

A **TODOS** QUE PARTICIPARAM E CONTRIBUÍRAM DE ALGUMA FORMA NESTA JORNADA E QUE AJUDARAM NA MINHA FORMAÇÃO PROFISSIONAL. MUITO OBRIGADO!

*“Afeto e conhecimento são duas coisas que se você guardar, você perde”.*

Mário Sergio Cortella



Caracterização e efeito do complexo de inclusão contendo óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* (LAMIACEAE) em  $\beta$ -ciclodextrina sobre a dor crônica musculoesquelética em roedores [dissertação]. Allan John de Oliveira Melo, Universidade Federal de Sergipe, 2018.

## RESUMO

*Eplingiella fruticosa* (Lamiaceae) é uma importante erva medicinal aromática utilizada tradicionalmente no nordeste do Brasil para o tratamento da dor, inflamação e convulsão. No entanto, as evidências científicas dessas atividades têm sido pouco exploradas. Estudos utilizando óleos essenciais (OEs) complexados com a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) têm se mostrado promissores para melhorar os efeitos biológicos dos OEs no manejo da dor crônica. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito anti-hiperalgésico do óleo essencial obtido de *E. fruticosa* (EplEO) e seu complexo de inclusão com  $\beta$ CD (EplEO- $\beta$ CD) sobre a dor crônica musculoesquelética em roedores. O EplEO foi extraído por hidrodestilação e sua composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e detector por ionização de chama (CG-EM/DIC). Os complexos EplEO- $\beta$ CD foram preparados através de dois métodos diferentes (mistura física e malaxagem) e posteriormente caracterizados em calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria/termogravimetria derivada, determinação da umidade e microscopia eletrônica de varredura. Após a aprovação do projeto pelo CEPA-UFS (Nº 65/09) o modelo FM foi induzido em camundongos Swiss albinos machos adultos através de duas injeções de solução salina pH 4,0 (20  $\mu$ l) no gastrocnêmio esquerdo, com 5 dias de intervalo. Após a indução da hiperalgesia, os camundongos foram tratados diariamente (6º dia ao 12º dia) com EplEO (50 mg/kg, via oral (v.o.)), EplEO- $\beta$ CD (50 mg/kg, v.o), veículo (salina isotônica, v.o) ou Tramadol (4 mg/kg, i.p) e avaliados quanto a hiperalgesia mecânica. Também foi realizado uma curva tempo-efeito para verificar a administração de EplEO e EplEO- $\beta$ CD. Além disso, os animais foram avaliados quanto a coordenação motora e força muscular utilizando EplEO (50 mg/kg, v.o), EplEO- $\beta$ CD (50 mg/kg, v.o), veículo (salina isotônica, v.o) ou Diazepam (4 mg/kg, i.p). Após os experimentos, os animais foram sacrificados e avaliados quanto a expressão de células Fos positivas na medula espinal por imunofluorescência. O EplEO apresentou rendimento 0,741% (m/m) e a análise por CG-EM/DIC identificou 27 compostos ao total, sendo (E)-cariofileno (14,16%), biciclogermacreno (12,68%), 1,8-cineol (11,03%),  $\alpha$ -pineno (6,79%) e  $\beta$ -pineno (5,10%) os majoritários. A complexação do EplEO- $\beta$ CD por malaxagem mostrou-se mais efetiva pelos testes de caracterização. O tratamento com EplEO- $\beta$ CD produziu um efeito anti-hiperalgésico de longa duração ( $p < 0,05$  vs veículo e  $p < 0,05$  vs EplEO) que teve um tempo de efeito de oito horas quando comparado ao EplEO ( $p < 0,01$  vs veículo) com tempo efeito de quatro horas, sem alterações na coordenação motora ou efeito miorrelaxante. Além disso, o EplEO e o EplEO- $\beta$ CD produziram um efeito anti-hiperalgésico significativo ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ) ao longo de 7 dias consecutivos de tratamento. O ensaio de imunofluorescência demonstrou que o grupo dos animais tratados com EplEO obteve uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) no número de células Fos positivas na medula espinhal quando comparado com o grupo veículo. Diante do exposto, foi demonstrado que o efeito anti-hiperalgésico produzido por EplEO foi melhorado após complexação com  $\beta$ CD com possível relação na via clássica de inibição central da dor.

**Palavras-chave:** *Eplingiella fruticosa*, óleo essencial, ciclodextrina, dor crônica, fibromialgia.

Characterization and effect of inclusion complex containing *Eplingiella fruticosa* essential oil (Lamiaceae) on  $\beta$ -cyclodextrin about chronic musculoskeletal pain in rodents [dissertation]. Allan John de Oliveira Melo, Federal University of Sergipe, 2018.

### ABSTRACT

*Eplingiella fruticosa* (Lamiaceae) is an important aromatic medicinal herb traditionally used in northeastern Brazil for the treatment of pain, inflammation and convulsion. However, the scientific evidence of these activities has been little explored. Studies using essential oils (EOs) complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) have shown promise for improving the biological effects of EOs in the management of chronic pain. Thus, the goal of the present study was to evaluate the antihyperalgesic effect of the essential oil obtained from *E. fruticosa* (EplEO) and its inclusion complex with  $\beta$ CD (EplEO- $\beta$ CD) about chronic musculoskeletal pain in rodents. EplEO was extracted by hydrodistillation and its chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry and flame ionization detector (GC-MS/FID). The EplEO- $\beta$ CD complexes were prepared by two different methods (physical mixing and past complexation) and later characterized in differential scanning calorimetry, thermogravimetry / derivative thermogravimetry, moisture determination and scanning electron microscopy. After approval of the project by CEPAL-UFS (Number 65/09) the FM model was induced in adult male albino Swiss mice by two injections of saline solution pH 4.0 (20  $\mu$ l) in the left gastrocnemius, with a 5-day interval. After induction of hyperalgesia, the mice were treated daily (6th day to day 12) with EplEO (50 mg/kg, p.o.), EplEO- $\beta$ CD (50 mg/kg, p.o.), vehicle (isotonic saline, p.o.) or Tramadol (4 mg/kg, i.p.) and evaluated for mechanical hyperalgesia. Previously, a time-effect curve was performed to verify the administration of EplEO and EplEO- $\beta$ CD. In addition, the animals were evaluated for motor coordination and muscle strength using EplEO (50 mg/kg, p.o.), EplEO- $\beta$ CD (50 mg/kg, p.o.), vehicle (isotonic saline, p.o.) or Diazepam (4 mg/kg, i.p.). After the experiments, the animals were sacrificed and evaluated for expression of Fos-positive cells in the spinal cord by immunofluorescence. EplEO produced a yield of 0.741% (m/m) and GC-MS/FID analysis identified 27 compounds in total, being (E)-cariophyllene (14.16%), bicyclogermacrene (12.68%), 1,8-cineole (11.03%),  $\alpha$ -pinene (6.79%) and  $\beta$ -pinene (5.10%) the majority. The complexation of EplEO- $\beta$ CD by past complexation was shown to be more effective by the characterization tests. Treatment with EplEO- $\beta$ CD produced a long-acting antihyperalgesic effect ( $p < 0.05$  vs. vehicle and  $p < 0.05$  vs EplEO) which had an effect time of eight hours when compared to EplEO ( $p < 0.01$  vs vehicle) with time effect of four hours, without changes in motor coordination or myorelaxant effect. In addition, EplEO and EplEO- $\beta$ CD produced a significant antihyperalgesic effect ( $p < 0.01$  or  $p < 0.001$ ) over 7 consecutive days of treatment. The immunofluorescence assay demonstrated that the group of animals treated with EplEO had a significant ( $p < 0.001$ ) decrease in the number of Fos-positive cells in the spinal cord when compared to the vehicle group. In view of the foregoing, it has been demonstrated that the anti-hyperalgesic effect produced by EplEO has been improved following  $\beta$ CD complexation with a possible relationship in the classic central pain inhibition pathway.

**Keywords:** *Eplingiella fruticosa*, essential oil, cyclodextrin, chronic pain, fibromyalgia

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação da hiperalgesia. ....	21
<b>Figura 2:</b> Representação dos dezoito pontos sensíveis na fibromialgia. ....	21
<b>Figura 3:</b> <i>Eplingiella fruticosa</i> (Salzm. Ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore. ....	24
<b>Figura 4:</b> Diterpenos isolados das raízes de <i>E. fruticosa</i> . ....	25
<b>Figura 5:</b> A) Representação espacial das estruturas de $\alpha$ CD, $\beta$ CD e $\gamma$ CD, B) Representação cônica da $\beta$ CD mostrando a parte exterior hidrofílica e cavidade hidrofóbica. Fonte: Adaptado de VENTURINI et al. (2008) e SRINIVASAN et al. (2011). ....	28
<b>Figura 6:</b> Resumo esquemático da indução da dor crônica muscular induzida por salina ácida. ....	35
<b>Figura 7:</b> Resumo esquemático da avaliação do tempo de resposta. ....	36
<b>Figura 8:</b> Resumo esquemático da avaliação da curva tempo-efeito. ....	36
<b>Figura 9:</b> Resumo esquemático da avaliação da força muscular e coordenação motora. ....	37
<b>Figura 10:</b> Estruturas dos compostos majoritários do EplEO ....	39
<b>Figura 11:</b> Análise térmica do óleo essencial de <i>Eplingiella fruticosa</i> (EplEO), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e malaxagem (MA). A) Curvas DSC: fluxo de calor (mW) em função da temperatura ( $^{\circ}$ C). B) Curvas TG/DTG: perda de massa (%) ....	41
<b>Figura 12:</b> Microfotografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e malaxagem com ampliações de 500 e 800x. ....	43
<b>Figura 13:</b> A) Curva tempo-efeito da administração do veículo, óleo essencial de <i>Eplingiella fruticosa</i> (EplEO) e EplEO complexado com $\beta$ -ciclodextrina (EplEO- $\beta$ CD), ambos 50 mg/kg (v.o). B) Efeito da administração crônica de veículo, EplEO, EplEO- $\beta$ CD (50 mg/kg, v.o.) e Tramadol (TRAM, 4 mg/kg, i.p). Cada ponto representa a média $\pm$ S.E.M. (n = 7, por grupo) do limiar de retirada da pata (em gramas) para estimulação tátil da pata traseira ipsilateral. *p <0,05, ** p <0,01 *** p <0,001 vs. grupo vehicle; #p <0,05 e ## p <0,01 vs. grupo EplEO (ANOVA duas vias seguido do pós-teste de Tukey). ....	45
<b>Figura 14:</b> A) Efeito da coordenação motora no grupo veículo, óleo essencial de <i>Eplingiella fruticosa</i> (EplEO) e EplEO complexado com $\beta$ -ciclodextrina (EplEO- $\beta$ CD), ambos 50 mg / kg (v.o.), diazepam (DZP, 3 mg / kg; i.p.) e veículo (vehicle, v.o) nos testes de rota-rod e (B) de força muscular em camundongos. Os valores são expressos como média $\pm$ S.E.M. (n = 7, por grupo). *p<0,001 e vs. Grupo veículo (ANOVA uma via seguido do pós-teste de Tukey). ...	47

**Figura 15:** Efeito da administração aguda de veículo (vehicle) ou óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* (EplEO) (50 mg/kg, v.o.) em células positivas para Fos na medula espinhal. A) Gráfico de barras resumindo as células positivas para Fos na medula espinhal. B) Amostras representativas da medula espinhal lombar imunocorada para expressão de proteína nuclear Fos 1,5 h após tratamento com vehicle ou EplEO (50 mg/kg, v.o.). Os valores são expressos em média  $\pm$  S.E.M. (n = 6, por grupo). \*\*\* p <0,001 (ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey). 60  $\mu$ m.....48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Total de novos medicamentos aprovados (1981-2014) e suas respectivas fontes de origem.....	23
<b>Tabela 2:</b> Exemplos de fármacos comercializados contendo $\beta$ CDs.....	29
<b>Tabela 3:</b> Compostos químicos presentes no EplEO.....	40
<b>Tabela 4:</b> Porcentagem de perda de massa demonstrada pelas curvas de termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) e teor de água (% H <sub>2</sub> O) do óleo essencial de <i>Eplingiella fruticosa</i> (EplEO), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e malaxagem (MA) obtidas pelo método de Karl Fischer.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR – Administração de Comidas e Remédios

ASICs – Acid-sensing ion channel

BSA – Albumina de soro bovino

CAR – Conselho Americano de Reumatologia

CDs – Ciclodextrinas

CG-EM/DIC – Cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa e detector por ionização de chama

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

DZP – Diazepam

EpLEO – Óleo essencial de *Eplingiella fruticosa*

EpLEO- $\beta$ CD – Óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* complexado com  $\beta$ -ciclodextrina

E.M.P – Erro médio padrão

FM – Fibromialgia

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

OE – Óleos essenciais

PBS – Tampão fosfato salino

MA – Malaxagem

MF – Mistura física

PNs – Produtos naturais

SNC – Sistema Nervoso Central

TG/DTG – Termogravimetria/termogravimetria derivada

TRAM – Tramadol

TRP – Transient receptor potential;

TRPA1 – Transient receptor potential ankyrin 1;

TRPM8 – Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8

$\beta$ CD –  $\beta$ -ciclodextrina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
<b>2.1. Fibromialgia</b> .....	20
<b>2.2. Produtos naturais e plantas medicinais</b> .....	22
<b>2.3. Considerações sobre <i>Eplingiella fruticosa</i> (Salzm. ex Benth) Harley &amp; J.F.B. Pastore</b> .....	24
<b>2.4. Óleos essenciais</b> .....	26
<b>2.5. Ciclodextrinas</b> .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	31
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
<b>4.1. Reagentes</b> .....	32
<b>4.2. Material vegetal</b> .....	32
<b>4.3. Extração do EplEO</b> .....	32
<b>4.4. Análise cromatográfica</b> .....	32
<b>4.5. Preparação dos complexos</b> .....	33
<b>4.6. Caracterização físico-química e morfológica dos complexos</b> .....	33
4.6.1. <i>Análise térmica</i> .....	33
4.6.2. <i>Determinação da umidade</i> .....	34
4.6.3. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	34
<b>4.7. Estudos farmacológicos</b> .....	34
4.7.1. <i>Animais</i> .....	34
4.7.2. <i>Dor crônica muscular induzida por salina ácida</i> .....	35
4.7.3. <i>Avaliação da hiperalgesia mecânica</i> .....	35
4.7.4. <i>Avaliação da força muscular e coordenação motora</i> .....	36
4.7.5. <i>Imunofluorescência para Fos</i> .....	37
4.7.6. <i>Aquisição e análise das imagens</i> .....	37
<b>4.8. Análise estatística</b> .....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>5.1. Identificação da composição química do EplEO</b> .....	39

<b>5.2. Caracterização dos complexos obtidos pelos métodos MF e MA.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3. Efeito anti-hiperalgésico do EplEO e do EplEO-βCD .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4. Expressão da proteína Fos na medula espinhal.....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>9. ANEXO(S).....</b>	<b>58</b>
<b>9.1. Anexo 1 – Registros cromatográficos do EplEO representados pelo tempo de retenção em função da intensidade dos picos. A) CG-EM. B) CG-DIC.....</b>	<b>58</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A Fibromialgia (FM) é uma síndrome que acomete o sistema musculoesquelético caracterizada por dor crônica generalizada, fadiga, distúrbios do sono, cognição prejudicada, depressão e ansiedade (HEIDARI; AFSHARI; MOOSAZADEH, 2017; SLUKA, 2009). Essa síndrome possui etiologia desconhecida, sendo comumente chamada de “dor disfuncional” por apresentar características clínicas que limitam muito a qualidade de vida do paciente (NAGAKURA, 2015). Devido à complexidade e as dificuldades no tratamento dessa síndrome, estudos vem sendo desenvolvidos para descoberta de novos tratamentos com medicamentos mais seguros e eficazes (NAGAKURA, 2015; PINA et al., 2017).

A natureza tem sido uma fonte de medicamentos por milênios, os quais foram desenvolvidos a partir de compostos derivados da biossíntese de várias espécies, esses conhecidos como produtos naturais (PNs) (HONG, 2011). Os PNs têm sido sugeridos como possíveis fontes de novas biomoléculas para o tratamento de condições crônicas devido à variabilidade de compostos e mecanismos moduladores da função biomolecular em importantes vias de sinalização celular (HONG, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2016; PINA et al., 2017). Entre as principais fontes dos PNs, destaca-se as plantas medicinais, as quais desempenham papel essencial no sistema de saúde de diferentes povos e culturas (CRAGG; NEWMAN, 2013). No contexto nacional, a população brasileira possui uma cultura de uso de ervas medicinais para o tratamentos de diversas enfermidades, desde de distúrbios menores até doenças crônicas (DUTRA et al., 2016).

*Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore, conhecido popularmente como “alecrim de tabuleiro” ou “alecrim do campo”, é uma importante erva medicinal de característica aromática encontrada em algumas partes do Nordeste e Sudeste do Brasil. Suas folhas são diretamente mastigadas ou usadas em forma de chá para tratar a dor em processos inflamatórios e como anticonvulsivante (FRANCO et al., 2011a; LIMA et al., 2013). Estudo prévios utilizando o óleo essencial de *E. fruticosa* (EplEO) relataram atividade antinociceptiva periférica e baixa toxicidade aguda em camundongos (MENEZES et al., 2007). FRANCO et al., (2011a) demonstraram alguns fatores importantes que podem influenciar na composição química do EplEO, incluindo variabilidade sazonal, tipos de solo e diferentes tipos de estresse hídrico que determinam as concentrações e, mais importante, a presença ou ausência de alguns compostos bioativos. Esta variabilidade química do EplEO foi correlacionada com diferentes efeitos na atividade antinociceptiva central e periférica em roedores (FRANCO et al., 2011b). Até onde sabemos, não há estudos de *E. fruticosa*, especialmente no óleo essencial,

em protocolos experimentais de dor crônica, embora seja usado para o tratamento da dor crônica na medicina popular.

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos hidrofóbicos constituídos por compostos voláteis extraídos de plantas aromáticas (REHMAN et al., 2016). Os principais compostos dos OEs são os monoterpenos e sesquiterpenos que geralmente estão relacionadas com as principais características químicas e farmacológicas das plantas medicinais (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014; GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013). A função dos OEs e seus principais compostos no tratamento de condições dolorosas tem sido amplamente explorado em abordagens clínicas e pré-clínicas (GOUVEIA et al., 2017; GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013).

Geralmente, os OEs apresentam alta volatilidade, baixa solubilidade na água e instabilidade química em resposta à luz, calor, umidade e ar (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). Algumas estratégias tecnológicas, incluindo a complexação em sistemas de liberação de fármacos, como ciclodextrinas (CDs) ou o uso de nanocarreadores, têm sido empregadas para tentar melhorar essas características físico-químicas, tendo em vista a possível aplicabilidade terapêutica desses OEs ricos em terpenos (LIMA et al., 2016; MARQUES, 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2017). As CDs são oligossacarídeos cíclicos com a capacidade de formar complexo de inclusão com uma variedade de moléculas orgânicas, inorgânicas, biológicas e farmacêuticas. Esses complexos podem vincular fármacos hidrofóbicos dentro de sua cavidade lipofílica e, assim, reduzir sua volatilidade e toxicidade, aumentar a estabilidade e a solubilidade em água, controlar a biodisponibilidade e mascarar características organolépticas (DEL VALLE, 2004; LAZA-KNOERR; GREF; COUVREUR, 2010).

Os benefícios da complexação dos OEs em CDs têm sido demonstrados em alguns estudos. MENEZES et al. (2015), dispo de conhecimentos das propriedades analgésicas e anti-inflamatórias de *Hyptis pectinata* (ARRIGONI-BLANK et al., 2008; RAYMUNDO et al., 2011b), complexou o OE dessa espécie em  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) e demonstrou o aumento na biodisponibilidade e efetividade da dose quando relacionado ao efeito antinociceptivo em roedores. Resultados semelhantes tem sido relatados em um estudo a respeito do efeito anti-hiperalgésico utilizando linalol (monoterpeno) complexado em  $\beta$ CD (NASCIMENTO et al., 2014). Vários autores descrevem que esses benefícios estão associados à capacidade das CDs em incorporar os OEs e transformá-los em pós dispersíveis em água e fáceis de manusear (LAZA-KNOERR; GREF; COUVREUR, 2010; MARQUES, 2010; QUINTANS et al., 2013; SERAFINI et al., 2012; SIQUEIRA-LIMA et al., 2017).

Desse modo, a partir do uso popular de *E. fruticosa* em preparações de chá para o alívio da dor, facilitado pela sua fácil disseminação nos estados do Nordeste e Sudeste brasileiro, junto às constatações das atividades antinociceptivas do OE dessa espécie em estudos científicos descritos anteriormente, tornou-se oportuno a busca de novos PNs que venham contribuir com tratamentos alternativos para os sintomas da FM. Além disso, devido à escassez de informações que relacionam o EplEO a estudos em modelos de dor crônica, sobretudo no sistema musculoesquelético, buscou-se estudar o efeito anti-hiperalgésico do EplEO na sua forma livre e complexada em  $\beta$ CD (EplEO-  $\beta$ CD), visto que a complexação de OEs em  $\beta$ CD pode proporcionar melhorias na biodisponibilidade e propriedades farmacológicas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

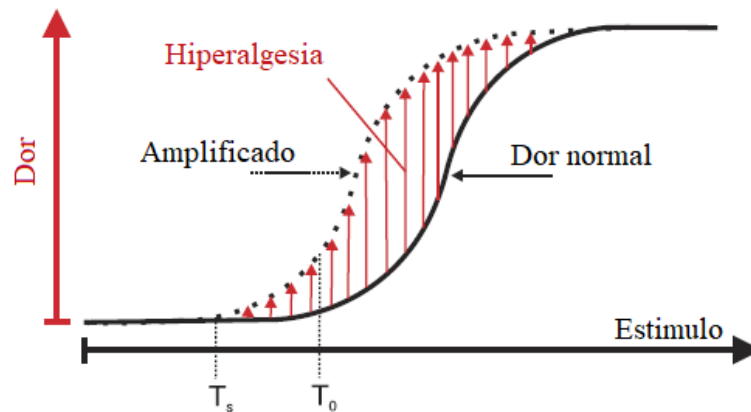
### 2.1. Fibromialgia

O que hoje é definido como fibromialgia (FM) já havia sido descrita no século XIX. O termo “*fibrosite*” foi cunhado por Gowers em 1904, mas foi em 1950 que Graham introduziu o conceito moderno da FM como “síndrome da dor”. Nos anos setenta e oitenta do século passado, a FM teve sua etiologia associada a uma perturbação no sistema nervoso central (BELLATO et al., 2012). A FM ocorre em 2-8% da população, com incidência maior entre mulheres, sendo caracterizada pela dor crônica generalizada, em pontos dolorosos à palpação, acompanhado por episódios depressivos, rigidez articular e sintomas sistêmicos como por exemplo, transtornos de humor, insônia e fadiga (BELLATO et al., 2012; CLAUW, 2014).

Na FM, as fibras nervosas aferentes mielinizadas do tipo A $\delta$  obtêm características semelhantes às de fibras não mielinizadas do tipo C, produzindo dor secundária. Dessa forma, um simples toque ou pressão sobre a pele do indivíduo provoca dor (BENDTSEN et al., 1997). Além disso, é observado que as atividades neurotransmissoras serotoninérgica e noradrenérgica estão atenuadas e os níveis séricos de serotonina, do seu precursor L-triptofano e do líquido cefalorraquidiano são reduzidos em pacientes com fibromialgia (SLUKA; CLAUW, 2016; WILLIAMS; SCHILLING, 2009).

O mecanismo crucial para o desenvolvimento da FM pode incluir a predisposição genética e familiar, estresse ambiental como pontos gatilhos, disfunções no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal e no sistema nervoso autônomo, assim como vários fatores cognitivos, comportamentais e psicológicos. A combinação dos sintomas apresentados pela FM dificulta o diagnóstico dessa síndrome, sendo necessário a consulta do histórico familiar e realização de exames físicos e laboratoriais para descartar outras patologias como a síndrome da dor miofascial, síndrome da fadiga crônica e hipotireoidismo (NÖLLER; SPROTT, 2003; SLUKA; CLAUW, 2016).

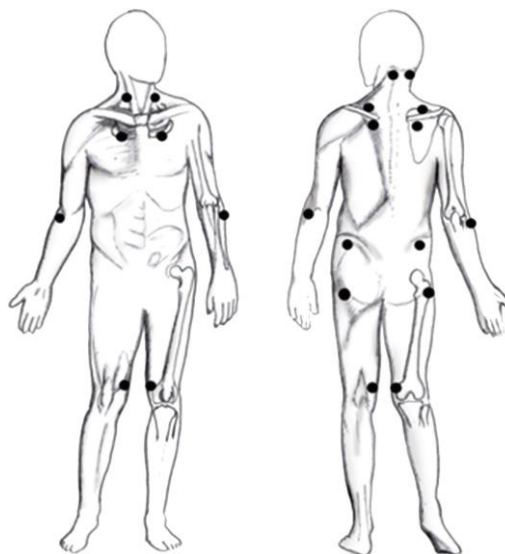
A sensibilização central e a falta de atividade analgésica endógena da via descendente, provocadas pelos desequilíbrios neuroquímicos no SNC, surgiram como o mecanismo principal para a amplificação central da percepção da dor e processamento sensorial na FM (SANDKÜHLER, 2009). Essa amplificação leva ao portador dessa síndrome sentir dor a estímulos que normalmente não causariam um aumento da resposta a estímulos dolorosos, esse último caracterizado como hiperalgesia (Figura 1, página 17) (CLAUW et al., 2011; SANDKÜHLER, 2009).



**Figura 1:** Representação da hiperalgesia.

Fonte: Adaptado de SANDKÜHLER (2009).

Os critérios de diagnóstico foram modificados para a FM pelo Colégio Americano de Reumatologia (CAR) em 2010 (BELLATO et al., 2012). Com base nestes critérios, um portador de fibromialgia deve apresentar dor crônica (duração igual ou superior a três meses) e generalizada, em ambos os lados do corpo e as áreas acima e a abaixo da cintura, com presença da dor axial e pelo menos onze dos dezoito pontos sensíveis devem ser dolorosos quando submetido à uma pressão de aproximadamente de quatro quilos (Figura 2) (BELLATO et al., 2012; MARCUS, 2009).



**Figura 2:** Representação dos dezoito pontos sensíveis na fibromialgia.

Fonte: Adaptado de BELLATO et al. (2012).

Porém na prática clínica, os critérios do Conselho Americano de Reumatologia (CAR) para a FM não são utilizados como diagnóstico rigoroso, pois o indivíduo que tem a síndrome nem sempre irá sentir dor em todo corpo ou nos onze pontos sensíveis. Assim, os profissionais da saúde devem suspeitar da FM em indivíduos que apresentam dor multifocal que não pode ser explicado com base nos danos ou inflamação nas regiões do corpo afetadas. Um critério alternativo utilizado no diagnóstico consiste em um levantamento de auto relato dos pacientes, no qual estes preenchem um questionário sintomático sobre a localização da dor, bem como a presença e a gravidade da fadiga, distúrbios do sono, dificuldades de memória, dores de cabeça, intestino irritável e problemas de humor (CLAUW, 2014; SLUKA; CLAUW, 2016).

A farmacoterapia é um dos alvos de pesquisas para descoberta de novos tratamentos para o alívio dos sintomas da FM (OLIVEIRA et al., 2017). Inicialmente, foram aprovados três medicamentos para tratamento pela Administração de Comidas e Remédios (ACR) dos Estados Unidos em 2007, sendo os inibidores seletivos de recaptção de serotonina e noradrenalina a classe mais predominante (HÄUSER et al., 2009; OKIFUJI; HARE, 2013). Atualmente, outras classes de fármacos são utilizadas, tais como antidepressivos tricíclicos, bloqueadores seletivos de captação de serotonina, hipnóticos, opioides, neuromoduladores, relaxantes musculares (OKIFUJI; HARE, 2013). Entretanto, em decorrência aos efeitos colaterais ou respostas insatisfatórias aos sintomas, sendo destacada a tontura, náusea, dificuldade de concentração e aprendizagem, entre outras, uma parcela significativa dos pacientes não adere ao tratamento farmacoterapêutico (STAUD, 2010).

Logo, a busca por novas moléculas tem sido alvo de muitos estudos, visto que uma grande parcela dos portadores de FM abandona o tratamento devido aos efeitos colaterais e com os altos custos da farmacoterapia. Esses fatos corroboram que a utilização dos PNs é uma alternativa promissora na descoberta de novas formas de tratamento.

## **2.2. Produtos naturais e plantas medicinais**

Os produtos naturais (PNs) são utilizados pela humanidade desde os primórdios e estão fortemente relacionado com a própria evolução das civilizações, especialmente a Egípcia, Greco-romana e Chinesa (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006). Uma das primeiras referências escritas sobre o uso de PNs, sobretudo plantas medicinais, pode ser encontrada na obra *Pen Ts'ao* ("A Grande Fitoterapia") do autor chinês Shen Nung, datado 2.800 anos antes de Cristo (a.C.). O emprego de plantas foi um dos primeiros recursos terapêuticos utilizados

pelos povos para o tratamento de uma ampla variedade de enfermidades e seus respectivos sintomas (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

No Brasil, o emprego da fitoterapia tem suas bases na prática indígena, que influenciada pela tradição africana e portuguesa, gerou uma vasta miscigenação cultural herdada pelos respectivos costumes (ALVES; SILVA, 2003). Nos dias atuais, esse conhecimento é utilizado sistematicamente pela população na forma de preparações caseiras para suprir as deficiências no sistema de saúde e as carências na alimentação (VIEIRA; SOUSA; LEMOS, 2015).

Newman e Cragg em 2016 demonstraram a importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos por meio de um estudo, onde contabilizaram um total de 1.562 novos medicamentos aprovados no período de Janeiro de 1981 a Dezembro de 2014. Desse número, 27% correspondiam a substâncias de origem totalmente sintética e, aproximadamente, 73% a substâncias de procedência natural ou derivadas desta (Tabela 1) (NEWMAN; CRAGG, 2016).

**Tabela 1:** Total de novos medicamentos aprovados (1981-2014) e suas respectivas fontes de origem. (Fonte: NEWMAN; CRAGG, 2016)

<b>Origem</b>	<b>Nº de novos fármacos aprovados</b>	<b>% de novos fármacos aprovados</b>
Biológica	250	16%
Vacina	101	6%
Produto natural	67	4%
Produto natural “botânico”	9	1%
Derivado de produto natural e geralmente modificado por Semissíntese	320	21%
Totalmente sintético	420	27%
Totalmente sintético com farmacóforo baseado em um produto natural	61	4%
Composto sintético com farmacóforo natural e que mimetiza substratos naturais	162	10%
Composto obtido totalmente por síntese e que mimetiza substratos naturais	172	11%
<b>Total</b>	<b>1562</b>	<b>100%</b>

Entre as substâncias derivadas diretamente ou indiretamente das plantas, são destacados o ácido acetilsalicílico (anti-inflamatório), morfina (analgésico), codeína (antitussígeno),

reserpina (anti-hipertensivo), digoxina (cardiotônico), vimblastina (antineoplásico) e artemisinina (antimalárico) (CRAGG; NEWMAN, 2013; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Atualmente, muitas espécies vegetais e microrganismos são estudados para a busca e compreensão de seus mecanismos de ação e no isolamento de novas substâncias. Muitos desses compostos são oriundos do metabolismo secundário, exercendo um papel importante no desenvolvimento de novos protótipos bioativos, visto que muitos fármacos são baseados na complexidade química ou são simplesmente análogos dos compostos naturais (CALIXTO, 2005; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

### **2.3. Considerações sobre *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore**

*Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore (Sinonímica botânica: *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth) (Figura 3), é uma planta com características aromáticas, apresenta folhas pequenas e xeromórfica. flores de cor azul a azul-violeta com grande disseminação pela região Sudeste e Nordeste do Brasil (HARLEY; PASTORE; PASTORE, 2012; SILVA et al., 2017).

Esta espécie é conhecida pelo nome popular “alecrim-do-campo”, “alecrim de tabuleiro” ou ainda “alecrim-de-vaqueiro” a depender da localidade. Suas folhas são utilizadas tradicionalmente, na forma de chá ou diretamente mastigada, para tratar a dor, processos inflamatórios e transtornos convulsivos (LIMA et al., 2013).

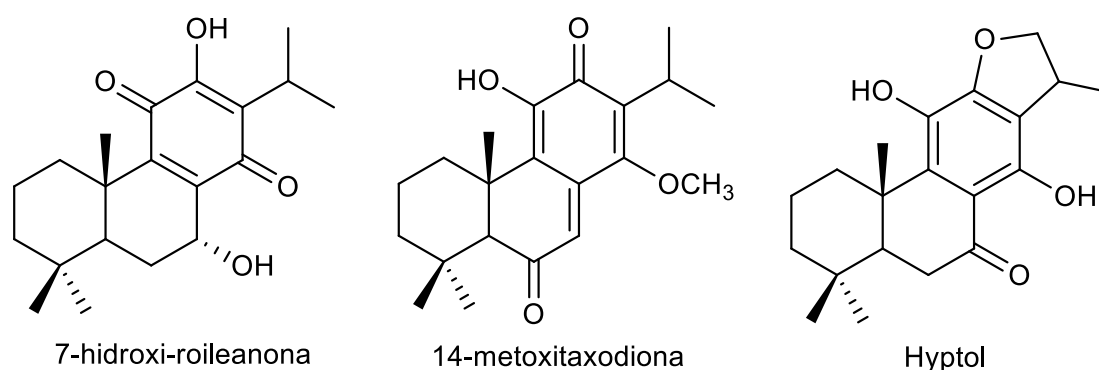


**Figura 3:** *Eplingiella fruticosa* (Salzm. Ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore.

Fonte: Marcelo Cavalcante Duarte, 2017



Estudos fitoquímicos e farmacológicos foram realizados com partes variadas de *E. fruticosa* por diferentes solventes extratores. Pioneiramente, ARAUJO et al., (1974) associaram dois compostos quinonóides isolados do extrato metanólico das raízes a diferentes (modelos) atividades antineoplásicas e antibacterianas. Posteriormente, MARLETTI et al., (1976) elucidaram esses compostos, através de métodos espectroscópicos, sendo diterpenos quinonóides e identificados como 7-hidroxi-roileanona ( $C_{20}H_{28}O_4$ ) (Figura 4), também conhecido como horminona, e 14-metoxitaxodiona ( $C_{21}H_{28}O_4$ ) (Figura 4). Adicionalmente, um terceiro diterpeno foi isolado do extrato metanólico descrito anteriormente e identificado como Hyptol ( $C_{20}H_{26}O_4$ ) (Figura 4) por DELLE-MONACHE et al., (1977). Além disso, outros estudos correlacionaram atividades antioxidantes e anti-inflamatórias diferentes partições das folhas de *E. fruticosa* (ANDRADE et al., 2010), efeito antinociceptivo e antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas (LIMA et al., 2013) e efeito vasorrelaxante do extrato diclorometano das partes aéreas dessa espécie (MOREIRA et al., 2010).



**Figura 4:** Diterpenos isolados das raízes de *E. fruticosa*.

Em estudos realizados com o OE obtido desta espécie, foram reportados efeitos antinociceptivo periférico (teste de contorção e placa quente) e baixa toxicidade aguda em camundongos (MENEZES et al., 2007); cardiovascular em artéria mesentérica (com e sem endotélio) de ratos (SANTOS et al., 2007); larvicida frente ao *Aedes aegypti* nos 4 estágios de desenvolvimento (SILVA et al., 2008). Além disso, FRANCO et al., (2011a) observaram variações nas composições química dessa espécie, dependendo do período de amostragem, localização e as partes extraídas da respectiva planta. Essas variações dos constituintes químicos foram relacionados com diferentes efeitos na atividade antinociceptiva central e periférica em roedores (FRANCO et al., 2011b).

## 2.4. Óleos essenciais

Desde a idade média, os OEs têm sido vastamente utilizados para o combate de doenças bacterianas, virais, fúngicas, parasitárias, no controle de insetos e na elaboração de cosméticos e perfumes. Atualmente, são utilizados nas indústrias farmacêutica, sanitários, de cosméticos e agrícola (BAKKALI et al., 2008).

Os OEs constituem misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas a temperatura ambiente, apresentando como principal característica a volatilidade. São substâncias sensíveis que podem sofrer processo de degradação sob a ação da luz, oxigênio e temperaturas moderadas (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

A maioria destes óleos são provindos principalmente de derivados de terpenoides ou uma parte de fenilpropanoides. Os terpenoides são oriundos da condensação unidades isoprenicas e os fenilpropanoides se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico (REHMAN et al., 2016).

Os óleos voláteis, normalmente, apresentam dois ou três componentes em concentrações elevadas (20-70%) e os outros em concentrações vestigiais, podendo chegar a sessenta constituintes. As variações de composição assim como as respectivas concentrações e rendimento dos óleos voláteis, para uma mesma espécie, variam com as diferenças climáticas, localização, estações do ano e métodos de extração (BAKKALI et al., 2008; FRANCO et al., 2011a; REHMAN et al., 2016).

Geralmente, os componentes principais determinam as propriedades biológicas e biofísicas do óleo essencial, contudo, estudos farmacológicos tem mostrado que a intensidade dos efeitos dos OEs depende da concentração dos componentes majoritários modulada sinergicamente por outros componentes de menores concentrações (MENDES et al., 2010).

Dentre os diversos métodos extrativos dos compostos aromáticos, podem ser aplicados diversos métodos como a hidrodestilação, sendo esse o método de maior aplicação; extração por solvente; maceração; micro-ondas e fluido supercrítico, onde cada método influenciará no tempo de extração, rendimento, formação de artefatos e quantidade dos constituintes aromáticos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Estudos tem demonstrado uma grande variedade de OEs apresentam atividades anticancerígena (BHALLA; GUPTA; JAITAK, 2013; MOURA et al., 2016), antimicrobiana

(BURT, 2004), antinociceptiva (LENARDÃO et al., 2015), cardiovascular (DE ANDRADE et al., 2017), entre outras.

O gênero *Hyptis* Jacq. possui algumas espécies aromáticas com atividades relatadas, como, por exemplo, a *Hyptis martiusii* Benth. (CALDAS et al., 2011), *Hyptis pectinata* L. Poit (ARRIGONI-BLANK et al., 2008; RAYMUNDO et al., 2011a) e *Hyptis mutabilis* Briq. (BARBOSA; RAMOS, 1992).

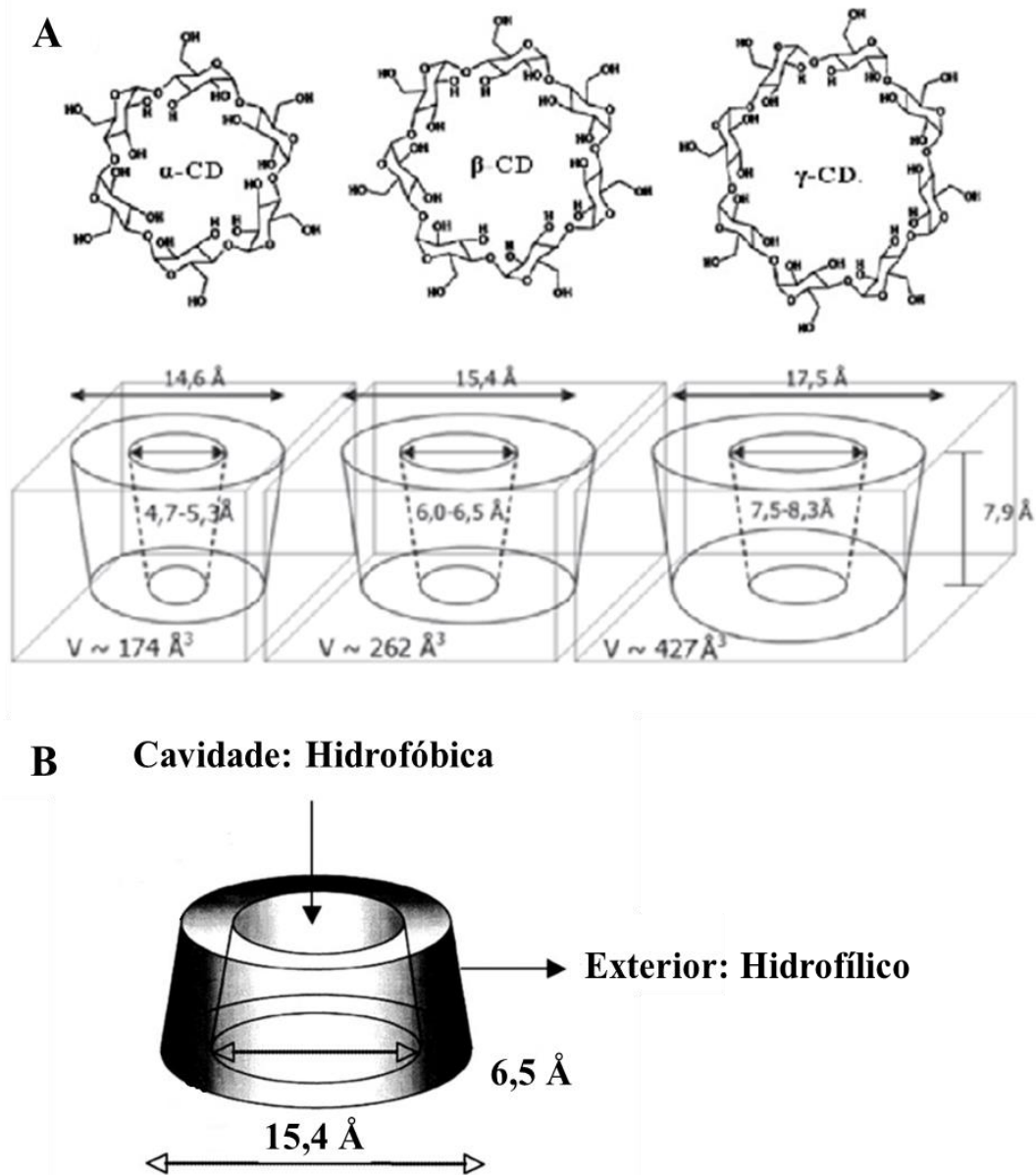
## 2.5. Ciclodextrinas

Na área da tecnologia farmacêutica, com finalidade de melhorar a solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e até mascarar odores e sabores de algumas biomoléculas, principalmente dos compostos encontrados nos óleos essenciais, são utilizados diversos excipientes, dos quais uma nova classe vem sendo exaustivamente explorada, conhecida como ciclodextrina (CDs) (DAVIS; BREWSTER, 2004).

As ciclodextrinas, ou simplesmente CDs, constituem um grupo de excipientes farmacêuticos compostas por unidades de D-glicopiranosose (açúcares cíclicos) que ligadas originam estruturas cíclicas tronco-cônicas. As CDs naturais são compostas por seis, sete e oito unidades de glicose, sendo denominadas de  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ CD) (Figura 5, página 24) (VENTURINI et al., 2008). A  $\beta$ CD é comumente utilizada em formulações farmacêuticas (Tabela 2, página 25) devido ao tamanho favorável de sua cavidade, produção fácil e baixo custo (YAO et al., 2014).

A presença da estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior atribuem as ciclodextrinas propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas. Essas características conferem as CDs uma consolidação em sistemas farmacêuticos, melhorando a biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

A presença da estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior atribuem as ciclodextrinas propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas. Essas características conferem as CDs uma importante ferramenta em sistemas farmacêuticos, melhorando a biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (JAMBHEKAR; BREEN, 2016).



**Figura 5:** A) Representação espacial das estruturas de  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD, B) Representação cônica da  $\beta$ CD mostrando a parte exterior hidrofílica e cavidade hidrofóbica. Fonte: Adaptado de VENTURINI et al. (2008) e SRINIVASAN et al. (2011).

A principal interação que proporciona a formação dos complexos de inclusão consiste na substituição de moléculas de água, presentes nas estruturas das ciclodextrinas, por moléculas hóspedes de menor entalpia, gerando um processo energeticamente favorável por desencadear uma alteração de entalpia, aumento da entropia e redução da energia total do sistema, corroborando para o aumento da estabilidade do complexo. Outras interações, como as forças de Wan der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, também auxiliam para a formação e estabilização da complexação (LAZA-KNOERR; GREF; COUVREUR, 2010; YAO et al., 2014).

**Tabela 2:** Exemplos de fármacos comercializados contendo  $\beta$ CDs.

Fonte: DAVIS; BREWSTER, (2004).

<b>Fármaco</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Laboratório/País</b>
Ácido tiaprofénico	Oral	Surgamil <sup>®</sup>	Roussel-Maestrelli/Itália
Benexate	Oral	Ulgut <sup>®</sup>	Teikoky/Japão
Dexametasona	Dérmico	Glymesason <sup>®</sup>	Fulinaga/Japão
Iodo	Tópico	Mena-Gargle <sup>®</sup>	Teikoky/Japão
Nicotina	Sublingual	Nicorette <sup>®</sup>	Pharmacia&Upjohn/Suécia
Nimesulida	Oral	Nimedex <sup>®</sup> ; Mesulid <sup>®</sup>	Vários
Nitroglicerina	Sublingual	Nitropen <sup>®</sup>	Nihon Kayaku/Japão
Omeprazol	Oral	Omebeta <sup>®</sup>	Betapharm/Alemanha
PGE <sub>2</sub>	Sublingual	Prostarmon E <sup>®</sup>	Ono/Japão
Piroxicam	Oral	Brexin <sup>®</sup> ; Flogene <sup>®</sup>	Vários

Existem diversas metodologias para a complexação de moléculas com ciclodextrinas, onde primeiramente são classificados em complexos de soluções aquosas e complexos de fase sólida. A obtenção pelo método de solução aquosa é simples e rápido, uma vez que o processo consiste apenas na solubilização das CDs em água ou solução tampão com posterior adição do composto desejado em excesso com agitação e temperatura constante durante uma faixa de tempo suficiente para alcançar o equilíbrio termodinâmico do processo de encapsulamento (LIMA et al., 2016).

Entre os métodos mais comuns utilizados na obtenção do processo de inclusão, são citadas a mistura física (RIEKES et al., 2010), malaxagem (PETRALITO et al., 2014), moagem (MENNINI et al., 2014), spray drying (FERNANDES et al., 2009), liofilização (DEL VALLE, 2004; LAZA-KNOERR; GREF; COUVREUR, 2010), co-precipitação (COCERO et al., 2009), co-evaporação (MENEZES et al., 2015) e fluidização supercrítica (MARTÍN et al., 2014).

Para confirmar o sucesso dos fenômenos de inclusão, é necessário lançar mão de técnicas e metodologias que possuam sensibilidade, nas quais, somada às informações, apresentem a capacidade para avaliar as mudanças das propriedades físico-químicas que ocorrem nos fármacos e ciclodextrinas, ocasionadas pelo fenômeno de complexação. Entre os

métodos mais empregados para caracterização dos diversos tipos de complexos, líquido e sólido, são apresentados os diagramas de solubilidade de fase, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia de fluorescência e de UV-VI, modelagem molecular, métodos térmicos (termogravimétrica e calorimetria diferencial exploratória, por exemplo), técnicas espectroscópicas, técnicas cristalográficas com raios-X, propriedades de dissolução, tamanho e morfologia das partículas (DAVIS; BREWSTER, 2004; HEDGES, 1998).

Diversos autores têm demonstrado que a  $\beta$ CD forma complexos de inclusão com os OEs, e seus derivados isolados, melhorando a biodisponibilidade, efeito e estabilidade (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016; SANTOS et al., 2016; SIQUEIRA-LIMA et al., 2017; TAKAISHI et al., 2012). Os estudos com a complexação dos OEs das espécies *Hyptis pectinata* L. Poit. (MENEZES et al., 2015) e *Hyptis martiusii* Benth (ANDRADE et al., 2017) contribuíram para o desenvolvimento do presente estudo que visou complexar o EplEO em a  $\beta$ CD e analisar o efeito anti-hiperalgésico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-hiperalgésico do óleo essencial obtido de *E. fruticosa* (EplEO) e seu complexo de inclusão com  $\beta$ CD (EplEO- $\beta$ CD) sobre a dor crônica musculoesquelética em roedores.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Identificar a composição do óleo essencial de *E. fruticosa* (EplEO);
- Obter e caracterizar os complexos de inclusão contendo o óleo essencial de *E. fruticosa* em  $\beta$ -ciclodextrinas (EplEO- $\beta$ CD);
- Avaliar a curva tempo-efeito da administração do EplEO e EplEO- $\beta$ CD;
- Avaliar o efeito anti-hiperalgésico do EplEO e EplEO- $\beta$ CD na administração crônica;
- Verificar possíveis alterações na coordenação motora e efeitos miorreaxantes do EplEO e EplEO- $\beta$ CD;
- Investigar o envolvimento do EplEO no SNC.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes

Alexa Fluor 555 (Life Technologies, Carlsbad, California, USA); Albumina de Soro Bovino (BSA) (Santa Cruz, USA); Anticorpo policlonal c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA); Diazepam (Merck, Brasil); Gelatina (Synth, Brasil); Cetamina (Cristália, Brasil); Tampão fosfato salino (PBS) (Neon, Brasil); Cloreto de sódio (Dinâmica, Brasil); Sacarose (Synth, Brasil); Tramadol (Merck, Brasil); Xilazina (Cristália, Brasil);  $\beta$ -Ciclodextrina (Sigma, USA).

### 4.2. Material vegetal

Folhas de *Eplingiella fruticosa* foram coletadas em março de 2014 no povoado Feijão, São Cristóvão, Sergipe, Brasil (11 ° 01'47" S, 37 ° 20'64" W, err:  $\pm$  23587 WGS84). A espécie foi identificada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marla Ibrahim Uehbe de Oliveira e uma exemplar foi depositada (número de registro ASE 39138) no Herbário da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

### 4.3. Extração do EplEO

Folhas frescas de *E. fruticosa* (970 g) foram submetidas a extração pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger por 3 horas. Após a extração, o óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrado e armazenado em freezer. O rendimento (m/m %) foi calculado com base na massa do material vegetal fresco.

### 4.4. Análise cromatográfica

As análises do EplEO foram realizadas por cromatografia gasosa multidimensional acoplado a um espectrômetro de massa e detector por ionização de chama (CG-EM/DIC) (QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um auto injetor AOC-20I (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) empregando as seguintes condições: Coluna capilar de sílica fundida RestekRtx<sup>®</sup>-5MS (filme de 30 m x 0,25 mm di x 0,25 mm de espessura, composto por 5% -difetil-95-dimetil polissiloxano). Hélio (99,999%) foi utilizado como gás carreador a um fluxo constante de 1,2 mL min<sup>-1</sup> e um volume de injeção de 2,0  $\mu$ L (razão de divisão 1:10). A temperatura do injetor era de 250°C e a temperatura da fonte de íons era de 200°C. A temperatura do forno foi programada de 60°C a 230°C com uma razão de aquecimento de 3 °C·min<sup>-1</sup>.



Os dados de DIC e EM foram adquiridos simultaneamente usando um sistema de separação de detectores e a taxa de divisão de fluxo foi de 4:1 (EM:DIC). Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV, um intervalo de varrimento de 0,3 scan s<sup>-1</sup> e fragmentos de 40 a 350 Da. A temperatura do DIC foi ajustada para 250°C e os gases fornecidos ao sistema foram ar sintético, hidrogênio e hélio em vazões de 30, 300 e 30 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. A quantificação de cada constituinte foi estimada através da normalização da área do pico gerada pelo DIC (%). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos e organizadas por ordem de eluição do CG.

A identificação dos compostos foi realizada por meio de comparação computadorizada dos espectros de massa obtidos com aqueles armazenados nas bibliotecas espectrais de massa (NIST107 e NIST21; WILEY8), seguido do cálculo do índice de retenção (IR) obtido com uma equação proposta por VAN DEN DOOL; KRATZ, (1963) para cada constituinte, como descrito anteriormente (ADAMS R.P, 2007). Os parâmetros descritos foram adaptados de MENEZES et al., (2015).

#### **4.5. Preparação dos complexos**

As amostras foram preparadas através de dois diferentes métodos: mistura física (MF) e malaxagem (MA), conforme descrito por MARRETO et al., (2008) e MENEZES et al., (2015). Essas amostras foram preparadas com base na massa molecular do composto majoritário de EplEO ((*E*)-cariofileno-204 g mol<sup>-1</sup>) numa proporção molar de 1:1. A MF foi preparada pela adição de EplEO (204 mg) em um almofariz contendo βCD (1135 mg) sob agitação manual e foram então armazenados em frascos de vidro âmbar. Posteriormente, a MA foi preparada através da homogeneização de EplEO (204 mg) e βCD (1135 mg) em água (2 mL) diretamente em um almofariz. Em seguida, o material foi seco à temperatura ambiente (em um dessecador) até a formação de um filme, que foi removido por trituração manual e armazenado em recipientes de vidro hermeticamente fechados. O complexo obtido que apresentou o melhor perfil nas caracterizações foi utilizado nos testes farmacológicos.

#### **4.6. Caracterização físico-química e morfológica dos complexos**

##### *4.6.1. Análise térmica*

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) foram obtidas conforme descrito por (SERAFINI et al., 2012). As curvas DSC foram realizadas em células DSC-60 (Shimadzu), utilizando cadinhos

de alumínio contendo cerca de 1 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL·min<sup>-1</sup>) e taxa de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>. a temperatura varia de 25°C a 500°C. A célula DSC foi verificada com índio (p.f. 156,6 °C;  $\Delta H_{\text{fusão}} = 28.54 \text{ J g}^{-1}$ ) e zinco (p.f. 419,6 °C). As curvas TG/DTG foram obtidas com uma termobalança TGA 60 (Shimadzu) na faixa de temperatura de 25-900°C, em cadinhos de platina contendo aproximadamente 3 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>) e a uma taxa de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>. O TG/DTG foi verificado com oxalato de cálcio monohidratado (CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), de acordo com o padrão ASTM (ASTM, 1993).

#### *4.6.2. Determinação da umidade*

Os teores de umidade do EplEO,  $\beta$ CD, MF e MA foram determinados pelo método de Karl Fischer usando um Analisador KF 1000 (Brasil) e Hydranal (Merck) como solução titulante. As análises foram realizadas em triplicata.

#### *4.6.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

As amostras foram montadas em fita de carbono e depois cobertas com íons de ouro. Posteriormente, as amostras foram visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL modelo JSM-7410-F), a uma aceleração de voltagem de 8 kV.

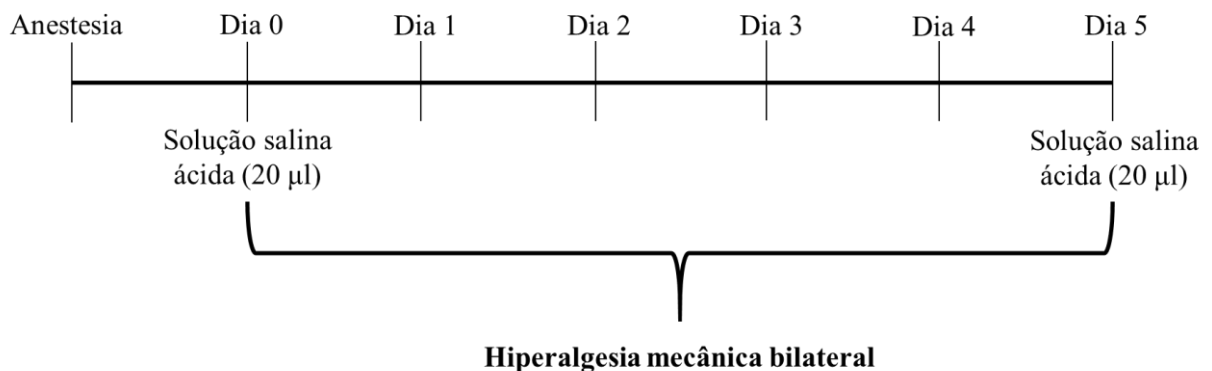
### **4.7. Estudos farmacológicos**

#### *4.7.1. Animais*

Camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* machos (28-32 g, 3 meses de idade) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) foram alojados aleatoriamente em gaiolas apropriadas a  $22 \pm 2$  °C em ciclo claro-escuro (luz das 06:00 às 18:00), com livre acesso a alimentação (Purina<sup>®</sup>, Brasil) e água da torneira até 60 min antes dos experimentos.. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS # 65/09). Os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) foram respeitados na condução de nossos protocolos experimentais. O veículo e a droga experimental foram administrados por meio de gavagem. Todo esforço foi feito para minimizar o possível sofrimento dos animais. Os testes comportamentais foram encorbetos para evitar possíveis resultados falso-positivos.

#### 4.7.2. Dor crônica muscular induzida por salina ácida

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/ kg) e xilazina (1 mg/ kg), e 20 µl de solução salina ácida (pH 4,0) foram injetados no músculo gastrocnêmio esquerdo. Este procedimento foi realizado novamente 5 dias após a primeira injeção, e produziu hiperalgesia mecânica bilateral com duração de 4 semanas após a segunda injeção (Figura 6). Esse procedimento experimental é utilizado para induzir a dor crônica muscular sem danos teciduais, sendo descrito como um modelo animal para FM (SLUKA et al., 2002; SLUKA; KALRA; MOORE, 2001).



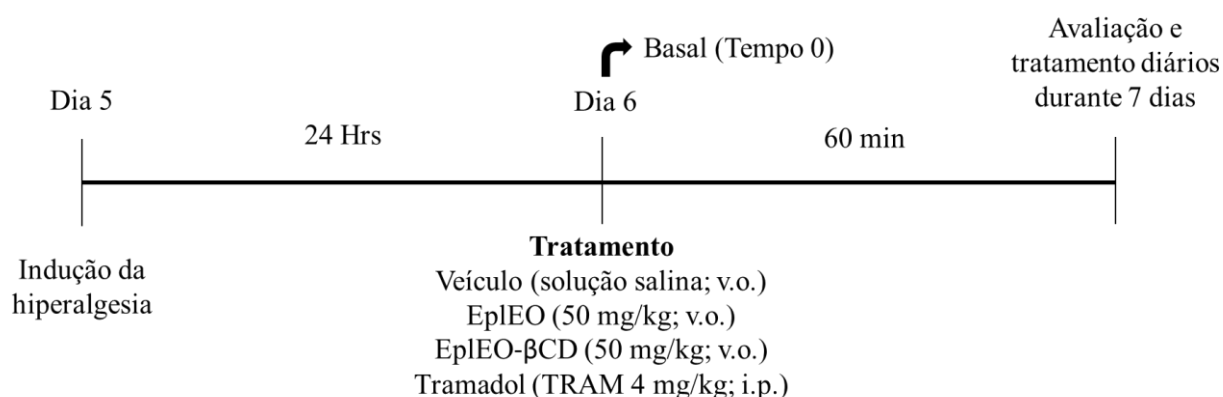
**Figura 6:** Resumo esquemático da indução da dor crônica muscular induzida por salina ácida.

#### 4.7.3. Avaliação da hiperalgesia mecânica

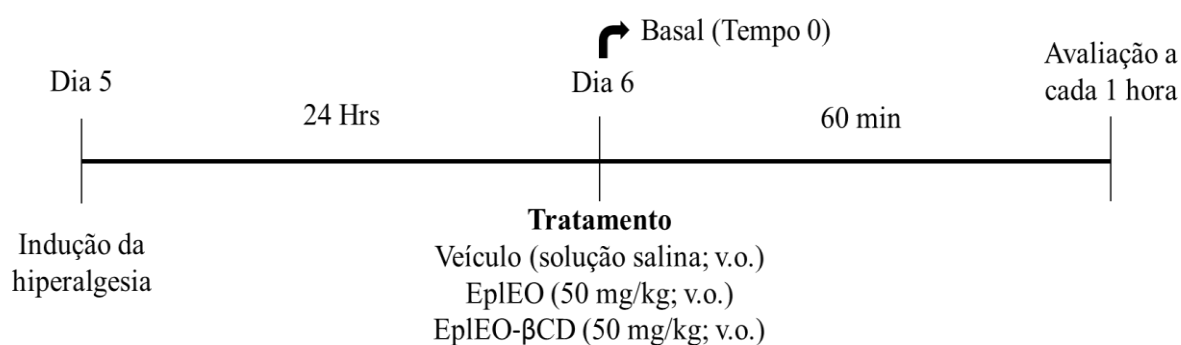
Para avaliar a hiperalgesia mecânica dos animais, foi realizada uma avaliação 24 horas após a segunda injeção de salina ácida (basal), conforme relatado por SLUKA; KALRA; MOORE, (2001) com modificações (NASCIMENTO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 10 x 17 cm) com piso de grade de arame por 45 minutos antes de iniciar o teste. Esse método consistiu em avaliar o reflexo da flexão da pata traseira com um analgesímetro digital (modelo EFF 301, Insight®, Ribeirão Preto-SP, Brasil) adaptado com ponta de polipropileno, conforme padronizado em trabalhos anteriores (NASCIMENTO et al., 2014; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016). O pesquisador foi treinado para aplicar a ponta perpendicularmente à área central da pata traseira com um aumento gradual da pressão. O ponto final foi caracterizado pela retirada da pata seguido por movimentos de pestanejar claros. A intensidade do estímulo (g) foi obtida pela média de cinco medidas realizadas com intervalos mínimos de três minutos.

Após a confirmação da hiperalgesia mecânica, os camundongos (n = 7, por grupo) foram previamente tratados com óleo essencial de *E. fruticosa* (EplEO; 50 mg/kg; v.o.), EplEO

complexado com  $\beta$ -ciclodextrina (EplEO- $\beta$ CD; 50 mg/kg; v.o.), veículo (solução salina; v.o.) ou Tramadol (TRAM 4 mg/kg; i.p.) e 60 minutos após tratamento, foram submetidos ao teste de hiperalgesia mecânica (digital von Frey) durante 7 dias consecutivos (Figura 7). Durante este período, os camundongos receberam tratamento todos os dias, começando no dia 1 (às 9 da manhã). Anteriormente, foi produzido uma curva tempo-efeito para verificar se EplEO- $\beta$ CD produz um efeito mais longo que EplEO livre, usando as mesmas doses, semelhante a outros estudos utilizando o modelo animal semelhante a FM (Figura 8) (NASCIMENTO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2016).



**Figura 7:** Resumo esquemático da avaliação do tempo de resposta.

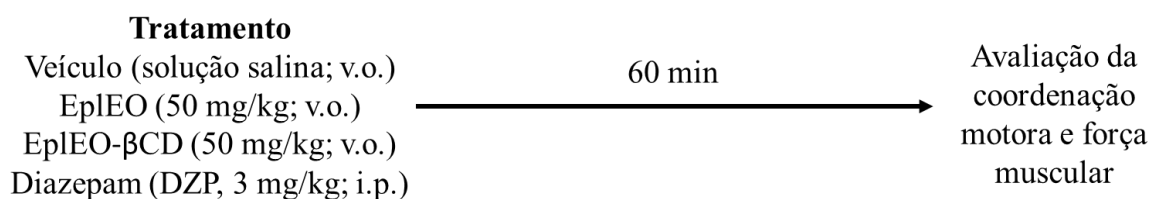


**Figura 8:** Resumo esquemático da avaliação da curva tempo-efeito.

#### 4.7.4. Avaliação da força muscular e coordenação motora

A fim de avaliar se possíveis efeitos relacionados a coordenação motora ou um efeitos miorrelaxantes poderiam interferir nos resultados, foram realizados o teste do rota-rod (aparelho de rota-vara, AVS<sup>®</sup>, São Paulo-SP, Brasil) e o medidor de força muscular (Insight<sup>®</sup>, Ribeirão Preto-SP, Brasil), ambos realizados 60 minutos após o tratamento com uso de

Diazepam (DZP, 3 mg/kg; i.p.), como medicamento padrão (Figura 9) (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010, 2016).



**Figura 9:** Resumo esquemático da avaliação da força muscular e coordenação motora.

#### 4.7.5. Imunofluorescência para Fos

Os animais com dores crônicas musculares foram tratados com EplEO (50 mg/kg, v.o.) ou veículo (solução salina a 0,9%). Noventa minutos após o tratamento, todos os camundongos foram submetidos a perfusão intracárdica com solução tampão fosfato salino (PBS), seguido por paraformaldeído a 4% em PBS 0,1 M, pH 7,4. Após a perfusão, a medula espinhal foi removida, fixada na mesma solução fixadora por duas horas e crioprotetida por imersão em solução de sacarose a 30% em PBS a 4°C. Cortes transversais seriais (20 μm) de todas as medulas espinhais foram coletadas em lâminas de vidro gelatinizadas. Os cortes de tecido foram armazenados a -80 °C até serem utilizados. Os cortes foram lavados com solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM) 5 vezes durante 5 min e incubadas com glicina a 0,01 M em PBS durante 10 min. A ligação proteica não específica foi bloqueada pela incubação dos cortes durante 30 min em uma solução contendo 2% de BSA. A imunofluorescência para Fos foi realizada após uma incubação de dois dias a 4°C com os seguintes anticorpos: anticorpo primário policlonal produzido em coelho, diluído 1:2000 em BSA e 1%/PBS-Triton X-100 0,2%. Os controles negativos foram realizados omitindo os anticorpos primários. Após várias lavagens em PBS, os cortes do tecido foram incubados com Alexa Fluor 555 diluído na razão de 1:2000 em PBS-Triton X-100 a 0,2% durante 2 horas à temperatura ambiente. Após 5 lavagens em PBS, as lâminas foram montada com solução de glicerol (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016).

#### 4.7.6. Aquisição e análise das imagens

Foram tiradas 20 fotomicrografias das áreas positivas para Fos da medula espinhal (região lombar), para cada animal, utilizando uma Olympus IX2-ICB (Tokyo, Japan). As regiões da lombar da medula espinhal foram classificadas de acordo com o Atlas Paxinos e Franklin (PAXINOS; FRANKLIN, 2012; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016). De cada animal,

foram selecionadas as 10 melhores fotomicrografias e foi aberta todas as fotos no software livre Image J (disponibilizado gratuitamente pelo *National Institute of Health*, EUA). Foi contado o número de neurônios Fos positivos e calculada uma média aritmética das 10 imagens selecionadas de cada animal.

#### **4.8. Análise estatística**

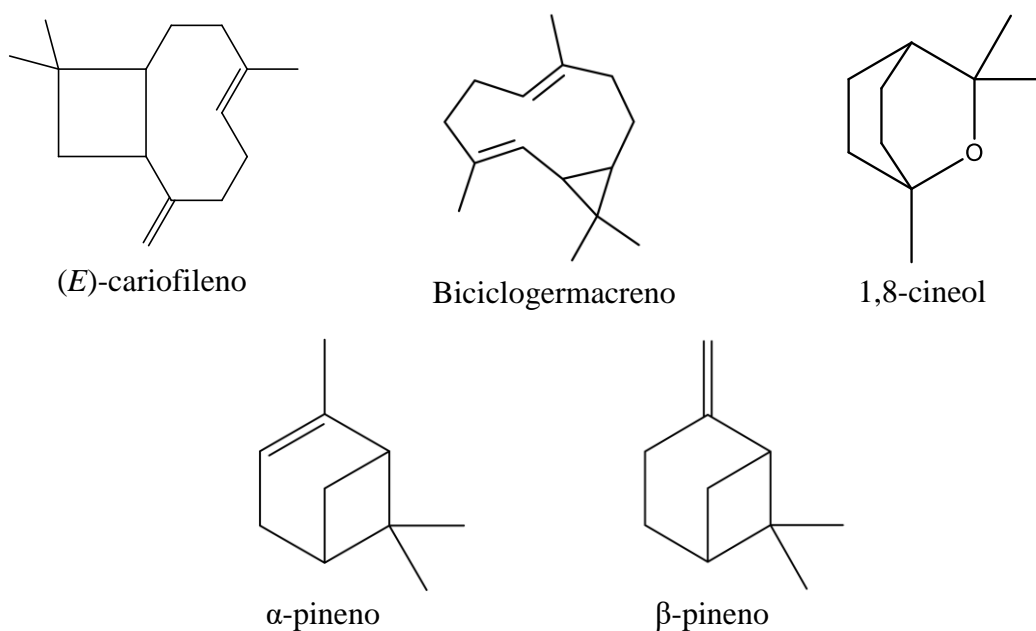
Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  E.M.P. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio da análise de variância (ANOVA), uma e duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey ( $P < 0,05$  foi considerado significativo). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup> (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação da composição química do EplEO

O EplEO (7,19 g) apresentou um rendimento de 0,741% (m/m) em relação a massa do material fresco utilizado (970 g). Esse resultado corrobora com os rendimentos encontrados por FRANCO et al. (2011b) em OE extraído das folhas de *E. fruticosa* coletadas no Sítio Tujubeba localizado no município de São Cristóvão - SE (rendimento: 0,46% m/m) e no Parque Nacional Serra de Itabaiana em Areia Branca - SE (0,75% m/m). Além disso, aproxima-se do rendimento de 1,09% (m/m) encontrado por MENEZES et al. (2007).

A análise por CG-EM/DIC (Anexo 1) identificou 27 compostos ao total, sendo a maior parte constituída por monoterpenos (33,23%) e sesquiterpenos (65,7%). Os principais compostos identificados foram (*E*)-cariofileno (14,16%), biciclogermacreno (12,68%), 1,8-cineol (11,03%),  $\alpha$ -pineno (6,79%) e  $\beta$ -pineno (5,10%) (Figura 10). Esses e outros compostos em menores concentrações estão listados na Tabela 3, página 36.



**Figura 10:** Estruturas dos compostos majoritários do EplEO

Em outros estudos com EplEO, os resultados mostraram diferenças consideráveis entre as concentrações dos compostos, como 1,8-cineol, espatulenol,  $\beta$ -cariofileno, biciclogermacreno e cânfora (FRANCO et al., 2011b; MENEZES et al., 2007; SILVA et al., 2008). Entretanto, FRANCO et al., (2011a) investigaram a variabilidade do EplEO e demonstraram que a composição química e a concentração dos constituintes ativos podem

variar de acordo com os parâmetros geográficos (solo, umidade, temperatura), fases de crescimento e partes utilizadas da planta (folhas, flores e sementes).

**Tabela 3:** Compostos químicos presentes no EplEO.

Pico	TR (min) <sup>a</sup>	Composto	(%) CG-DIC <sup>b</sup>	IRR exp. <sup>c</sup>
1	10,895	$\alpha$ -Pineno	6,79	934
2	11,471	Canfeno	1,63	950
3	12,373	Sabineno	0,37	974
4	12,533	$\beta$ -Pineno	5,10	979
5	14,521	Limoneno	1,68	1031
6	14,643	1,8-Cineol	11,06	1035
7	19,232	Cânfora	4,32	1151
8	20,051	Borneol	2,28	1171
9	26,437	$\delta$ -Elemeno	1,74	1343
10	26,868	$\alpha$ - Cubebeno	1,95	1355
11	27,889	$\alpha$ - Ylangeno	3,45	1384
12	28,370	$\beta$ -Elemeno	1,68	1398
13	29,515	( <i>E</i> )-cariofileno	14,16	1432
14	30,172	<i>trans</i> - Muuroala-3,5-dieno	1,81	1462
15	30,511	$\alpha$ -Humuleno	2,36	1452
16	30,669	<i>cis</i> -Muuroala-4(14),5-dieno	0,93	1475
17	30,943	<i>trans</i> -Muuroala-4(14),5-dieno	4,13	1493
18	31,571	Biciclogermacreno	12,68	1510
19	32,102	<i>cis</i> -Calameneno	3,65	1535
20	32,863	<i>trans</i> -Cadina-1,4-dieno	1,33	1545
21	33,179	$\alpha$ -Cadineno	3,16	1550
22	33,351	NI <sup>d</sup>	1,04	1590
23	34,561	Espatuleno	3,64	1590
24	34,764	Oxido de cariofileno	2,98	1595
25	34,990	Globulol	1,66	1611
26	35,259	<i>Epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	2,18	1638
27	36,626	$\alpha$ -Cadinol	2,21	1669

<sup>a</sup>Tempo de retenção.

<sup>b</sup>Porcentagem baseada na normalização da área do pico gerado pelo DIC (%).

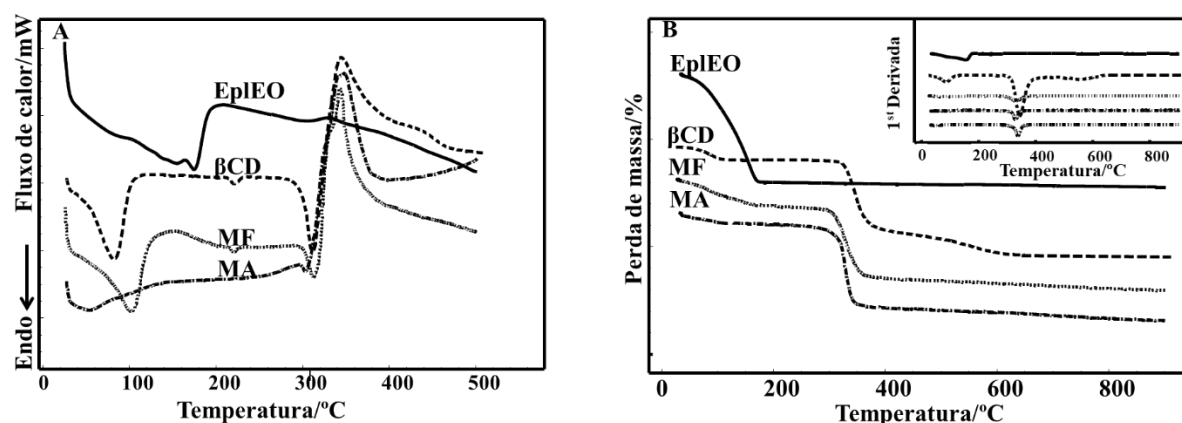
<sup>c</sup>Índice de retenção relativa, calculado utilizando a equação de VAN DEN DOOL; KRATZ, (1963).

<sup>d</sup>Não identificado.



## 5.2. Caracterização dos complexos obtidos pelos métodos MF e MA

As curvas do DSC estão representadas na Figura 11A. A curva EplEO apresentou um evento térmico na faixa de temperatura 37-202°C, relacionado ao processo de volatilização. A  $\beta$ CD apresentou três eventos endotérmicos, o primeiro na faixa de 30-116°C, relacionado à desidratação, o segundo entre 210 e 230°C, relacionado à transição de fase e o terceiro na faixa de 278-345°C, característica do ponto de fusão seguido pela degradação da  $\beta$ CD. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos (SERAFINI et al., 2012; YANG et al., 2016). A MF mostrou um perfil térmico semelhante a  $\beta$ CD, indicando que uma baixa quantidade de óleo foi complexada. No entanto, o complexo obtido pelo método MA apresentou redução na temperatura do evento de desidratação (30-116°C) e fusão (278-345°C) quando comparado com a  $\beta$ CD. Além disso, o evento de transição de fase (210 e 230°C) não foi observado na curva MA, evento semelhante é observado quando a molécula hóspede foi complexada dentro da cavidade da  $\beta$ CD no estudo de KAYACI; UYAR, (2011) referente a complexação da vanilina e  $\beta$ CD. Recentemente, MENEZES et al., (2015) estudaram a complexação de *Hyptis pectinata* em  $\beta$ CD e também observaram que, durante o processo de complexação, as temperaturas dos eventos térmicos característicos encontrados em  $\beta$ CD, como transição de fase e ponto de fusão, são reduzidas.



**Figura 11:** Análise térmica do óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* (EplEO),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e malaxagem (MA). A) Curvas DSC: fluxo de calor (mW) em função da temperatura (°C). B) Curvas TG/DTG: perda de massa (%)

Os resultados do TG/DTG são apresentados na Figura 11B e Tabela 4. O EplEO apresentou perda de massa ( $\Delta m = 100\%$ ) na faixa de 34-171°C, e este evento foi relacionado ao processo de decomposição, que corresponde ao evento de volatilização (37-202°C) apresentado pelo DSC. A  $\beta$ CD mostrou quatro etapas de perda de massa. O primeiro relacionou-se a uma desidratação ( $\Delta m = 13\%$ , 34-171°C confirmada por titulação de Karl Fischer: 13,7%,

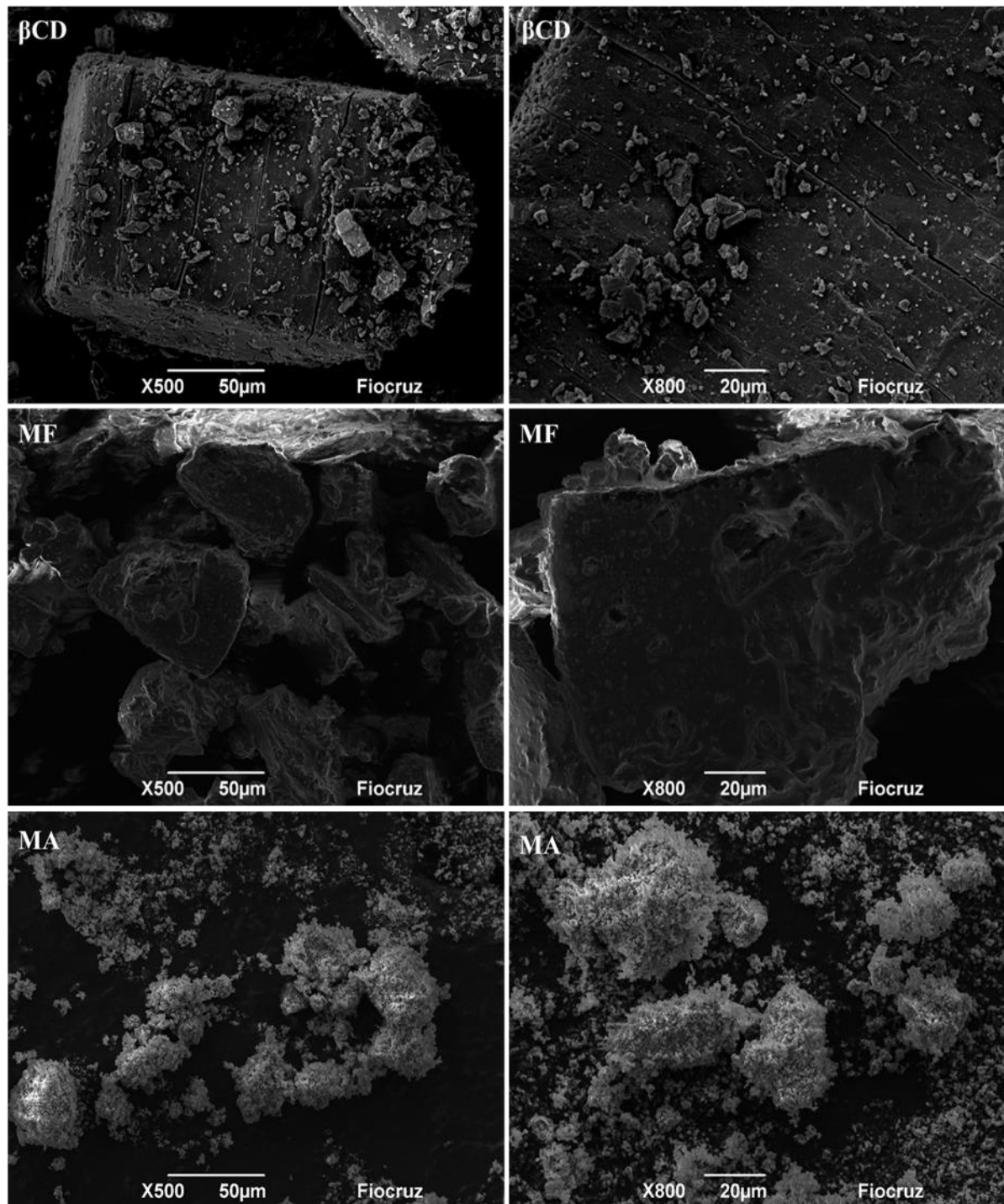
descrita na Tabela 4), evento previamente demonstrado pelo DSC. O segundo evento não mostrou uma perda de massa significativa, porque se refere ao evento da fase de transição mostrado pelo DSC, o qual corresponde à reorganização estrutural da molécula. Os demais eventos de perda de massa foram relacionados à decomposição ( $\Delta m = 78,8\%$ , 307-500°C) seguida de degradação da matéria orgânica ( $\Delta m = 5,9\%$ , 500-900°C). Para as perdas de massa por MF, observou-se uma maior porcentagem no primeiro passo (12,2%) correspondente ao óleo na superfície da  $\beta$ CD, uma vez que 11,6% corresponderam à perda de água determinada pelo método de Karl Fischer. Na segunda etapa (171-300°C) a perda de massa de 4,2% está relacionada a uma baixa quantidade de óleo complexado, provavelmente qualquer monoterpreno com alta afinidade com a cavidade da  $\beta$ CD. O método MA mostrou uma redução na porcentagem de água e óleo da superfície, sugerindo que a complexação substituiu a água na cavidade da  $\beta$ CD por EplEO (HĂDĂRUGĂ; HĂDĂRUGĂ; ISENGARD, 2012). Na segunda etapa, observamos um aumento da perda de massa relacionada ao óleo complexado (MA: 6,2% na faixa de 171-300°C). Após a liberação do óleo complexado, a  $\beta$ CD nas amostras iniciaram o processo de degradação (300°C).

**Tabela 4:** Porcentagem de perda de massa demonstrada pelas curvas de termogravimetria/ termogravimetria derivada (TG/DTG) e teor de água (% H<sub>2</sub>O) do óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* (EplEO),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e malaxagem (MA) obtidas pelo método de Karl Fischer.

Amostras	1 <sup>st</sup> etapa/%	2 <sup>st</sup> etapa/%	3 <sup>st</sup> etapa/%	4 <sup>st</sup> etapa/%	% H <sub>2</sub> O
	34-171°C	171-300°C	307-500°C	500-900°C	
<b>EplEO</b>	100,0	-	-	-	0,5 ± 0,1
<b><math>\beta</math>CD</b>	13,0	1,5	78,8	6,7	13,7 ± 0,4
<b>MF</b>	23,8	4,2	66,1	5,9	11,6 ± 0,3
<b>MA</b>	10,8	6,2	74,2	8,8	9,5 ± 0,1

As imagens morfológicas da superfície da  $\beta$ CD, MF e MA foram obtidas por MEV em ampliações de 500 e 800x e apresentadas na Figura 12, página 39. Os estudos da  $\beta$ CD no MEV revelaram cristais poliédricos em forma e de tamanho maior. Em relação a MF, foi possível observar claramente o óleo que cobre a superfície cristalina da  $\beta$ CD, e esta observação corrobora com o valor mais alto do óleo superficial reportado na curva TG. Esse resultado também foi relatado por MENEZES et al. (2015) em um estudo realizado com o óleo essencial de *Hyptis pectinata* utilizando os mesmos métodos de complexação. As fotomicrografias das amostras preparadas por MA mostrou uma forte redução no tamanho das partículas e alterações morfológicas devido aos métodos de processamento empregados, o que provocou um alto grau

de aglomeração de partículas, embora a molhabilidade do EplEO tenha aumentado conforme descrito anteriormente por (AZEVEDO; TASIC, 2011). Portanto, baseado nas evidências descritas anteriormente, o método MA é sugerido com o melhor perfil para a formação do complexo EplEO- $\beta$ CD, sendo essa a formulação utilizada nos estudos farmacológicos descritos previamente.



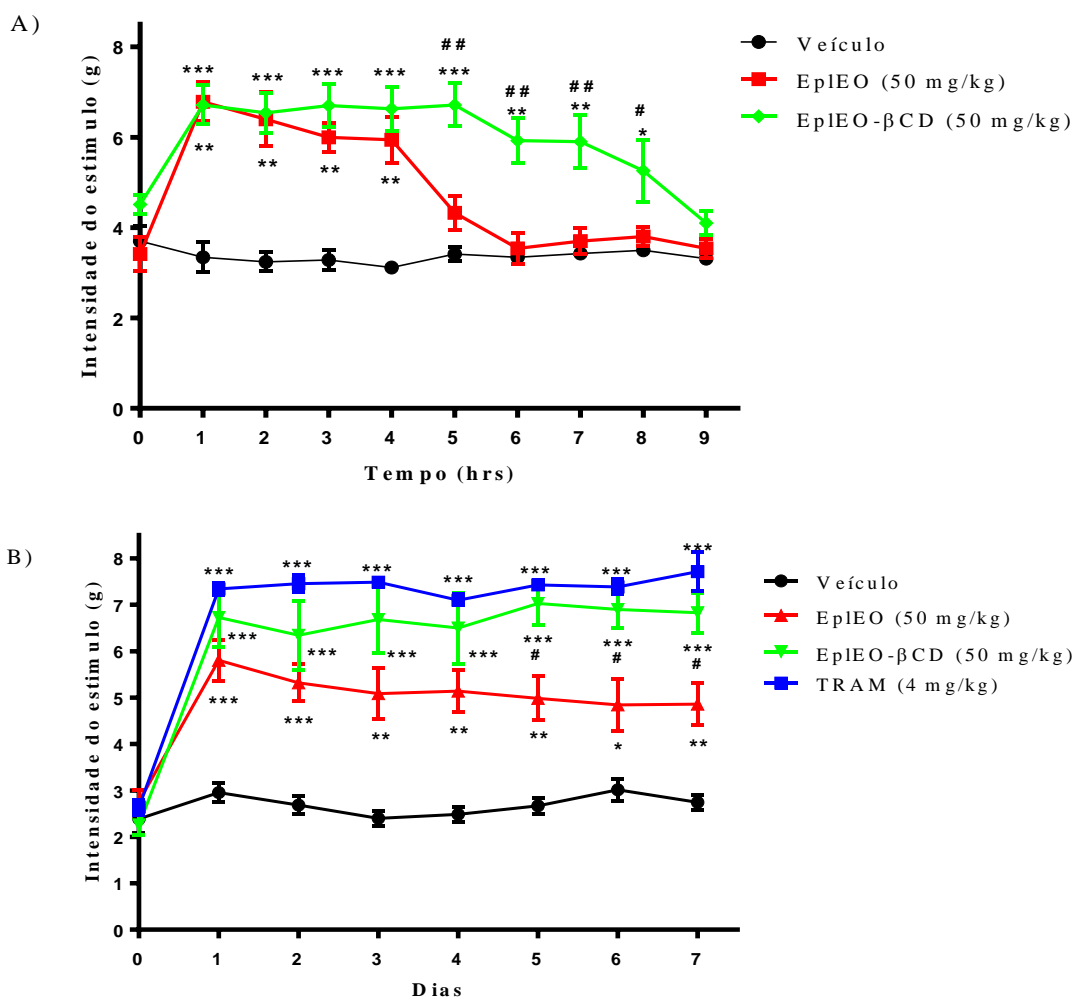
**Figura 12:** Microfotografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e malaxagem com ampliações de 500 e 800x.

### 5.3. Efeito anti-hiperalgésico do EplEO e do EplEO-βCD

EplEO-βCD e EplEO produziram um efeito anti-hiperalgésico significativo ( $p < 0,001$  ou  $p < 0,01$ ) em um modelo de animal semelhante a FM. EplEO-βCD apresentou um efeito anti-hiperalgésico significativamente mais duradouro (8 horas) em comparação com EplEO não complexado (4 horas) após o tratamento ( $p < 0,01$ ) (Figura 13A, página 41). Além disso, EplEO e EplEO-βCD produziram uma redução significativa ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ) no comportamento hiperalgésico durante os 7 dias consecutivos de tratamento. No entanto, o EplEO-βCD foi significativamente ( $p < 0,05$ ) mais eficaz na redução do comportamento hiperalgésico do que o EplEO (Figura 13B, página 41). Vários estudos mostram que os fármacos analgésicos e anti-inflamatórios podem ser farmacologicamente melhorados após complexação com CDs, o que pode melhorar a biodisponibilidade, reduzir as doses efetivas utilizadas, reduzindo a possível toxicidade ou minimizando os efeitos colaterais e otimizar a eficácia (BRITO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2017a). Portanto, essas características da CDs podem contribuir para o prolongamento da atividade do EplEO-βCD e sua atividade analgésica mais intensa.

Estudos tem demonstrado que os OEs em complexos de inclusão apresentam maior solubilidade e estabilidade, sendo essas as prováveis características responsáveis pelos efeitos mais prolongados dos complexos de inclusão (BRITO et al., 2015; LIMA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013; SANTOS et al., 2017a). Tem sido sugerido que a complexação dos OEs com CDs são favorecidos por suas propriedades químicas, como baixa solubilidade em água, tamanho das moléculas (especialmente para monoterpenos) e a facilidade com que formam ligações de hidrogênio (para alguns terpenos com grupos fenólicos) ou forças de Van der Waals com os grupos hidroxilas dentro das cavidades das CDs (LIMA et al., 2016; PINHO et al., 2014).

O modelo animal de dor muscular não inflamatória generalizado e crônico utilizado no presente estudo é caracterizado por uma hiperalgesia bilateral de longa duração induzida por duas injeções de solução salina ácida em um músculo gastrocnêmio em roedores e é um modelo animal bem estabelecido para FM (SLUKA et al., 2002; SLUKA; CLAUW, 2016; SLUKA; KALRA; MOORE, 2001). As duas injeções de solução salina ácida em um músculo gastrocnêmio com 2 a 5 dias de intervalo produzem uma hiperalgesia bilateral de longa duração sem danos teciduais e sem estímulo aferente primário contínuo (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001). Assim, este modelo produz uma hiperalgesia mecânica primária e secundária dependente de alterações no SNC.



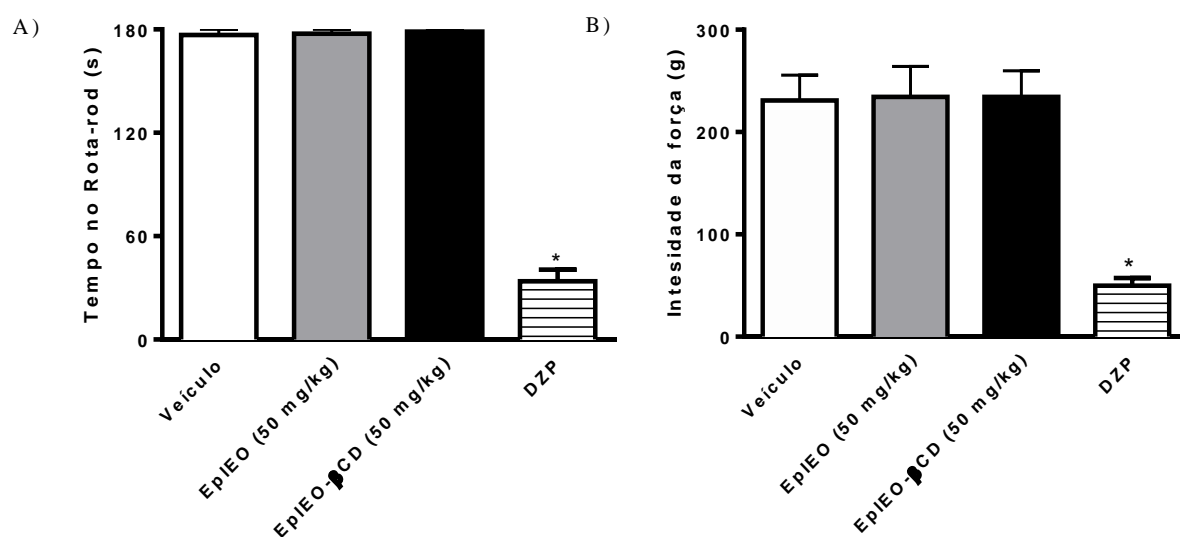
**Figura 13:** A) Curva tempo-efeito da administração do veículo, óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* (EplEO) e EplEO complexado com  $\beta$ -ciclodextrina (EplEO- $\beta$ CD), ambos 50 mg/kg (v.o). B) Efeito da administração crônica de veículo, EplEO, EplEO- $\beta$ CD (50 mg/kg, v.o.) e Tramadol (TRAM, 4 mg/kg, i.p). Cada ponto representa a média  $\pm$  S.E.M. (n = 7, por grupo) do limiar de retirada da pata (em gramas) para estimulação tátil da pata traseira ipsilateral. \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 vs. grupo vehicle; #p < 0,05 e ## p < 0,01 vs. grupo EplEO (ANOVA duas vias seguido do pós-teste de Tukey).

Além disso, a dor produzida neste modelo animal é mediada por aferências musculares e mecanismos centrais para a indução e manutenção da hiperalgesia (SLUKA; CLAUW, 2016). Recentemente, vários estudos relataram o papel dos PNs (como óleos essenciais e terpenos) na redução da hiperalgesia secundária nesse modelo animal de FM, por meio da ativação da via descendente inibitória da dor, principalmente pelo envolvimento dos sistemas opioide, serotoninérgico e noradrenérgico (NASCIMENTO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016; SANTOS et al., 2016). Essa relação com a via de controle descendente da dor é sugerida por alterações na expressão da proteína Fos nas regiões do SNC relacionadas ao controle da dor, combinadas com parâmetros comportamentais e moleculares (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2017; SANTOS et al., 2017b).

*E. fruticosa* é uma espécie de planta medicinal muito utilizada na medicina popular do nordeste do Brasil, pois acredita-se que tenha atividades cardiovasculares, analgésicas e anti-inflamatórias (FRANCO et al., 2011b; MENEZES et al., 2007; SANTOS et al., 2007). O EplEO é rico terpenos, tais como: *E*-cariofileno, biciclogermacreno, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno. Deste modo, os efeitos farmacológicos do EplEO estão relacionados aos seus principais compostos (FRANCO et al., 2011b; MENEZES et al., 2007; SANTOS et al., 2007). Em estudos recentes, o tratamento diário com  $\beta$ -cariofileno complexado com  $\beta$ -CD reduziu a hiperalgesia primária e secundária produzida em um modelo animal de dor musculoesquelética, que está relacionado à inibição da atividade neuronal no corno dorsal na lâmina I da medula espinhal, gerando mais evidências para o envolvimento do mecanismo descendente da dor inibitória através dos efeitos sobre os sistemas opioide e serotoninérgico (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016).

Resultado semelhante foi encontrado no óleo essencial de *H. pectinata* nanoestruturado em hidrogel termorreversível, cujos componentes majoritários foram  $\beta$ -cariofileno e o biciclogermacreno, que reduziu o comportamento hiperalgésico pela ativação das vias inibitórias do tronco encefálico (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2017). Além disso, o 1,8-cineol (eucaliptol), um agonista do TRPM8 e antagonista do TRPA1 produziu efeitos analgésicos e anti-inflamatórios devido à sua inibição do TRPA1 (TAKAISHI et al., 2012). Canais TRP estão intimamente relacionados com o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica muscular e dor musculoesquelética, deste modo, o efeito do 1,8-cineol nos receptores TRPA1 pode estar contribuindo para este efeito anti-hiperalgésico. Sugere-se hipoteticamente que os efeitos anti-hiperalgésicos produzidos por EplEO ou EplEO- $\beta$ CD estão relacionados aos seus principais terpenos, especialmente  $\beta$ -cariofileno, biciclogermacreno e 1,8-cineol, que podem estar atuando sinergicamente.

Para avaliar se o tratamento com EplEO e EplEO- $\beta$ CD poderiam causar incoordenação motora ou um efeito miorrelexantes, os quais podem prejudicar a interpretação dos resultados da hiperalgesia, foram realizados testes de coordenação motora e força muscular (Figuras 14A e 14B, página 43), com a finalidade de demonstrar que o pré-tratamento não causou as alterações citadas. A depressão do SNC e os efeitos de relaxamento muscular não específico podem reduzir a resposta da coordenação motora e desfocar os testes comportamentais (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; RABOISSON; DALLEL, 2004). Entretanto, a atividade anti-hiperalgésica do EplEO e EplEO- $\beta$ CD com as doses utilizadas não parece estar relacionada a qualquer possível efeito inibitório no SNC ou relaxamento muscular.



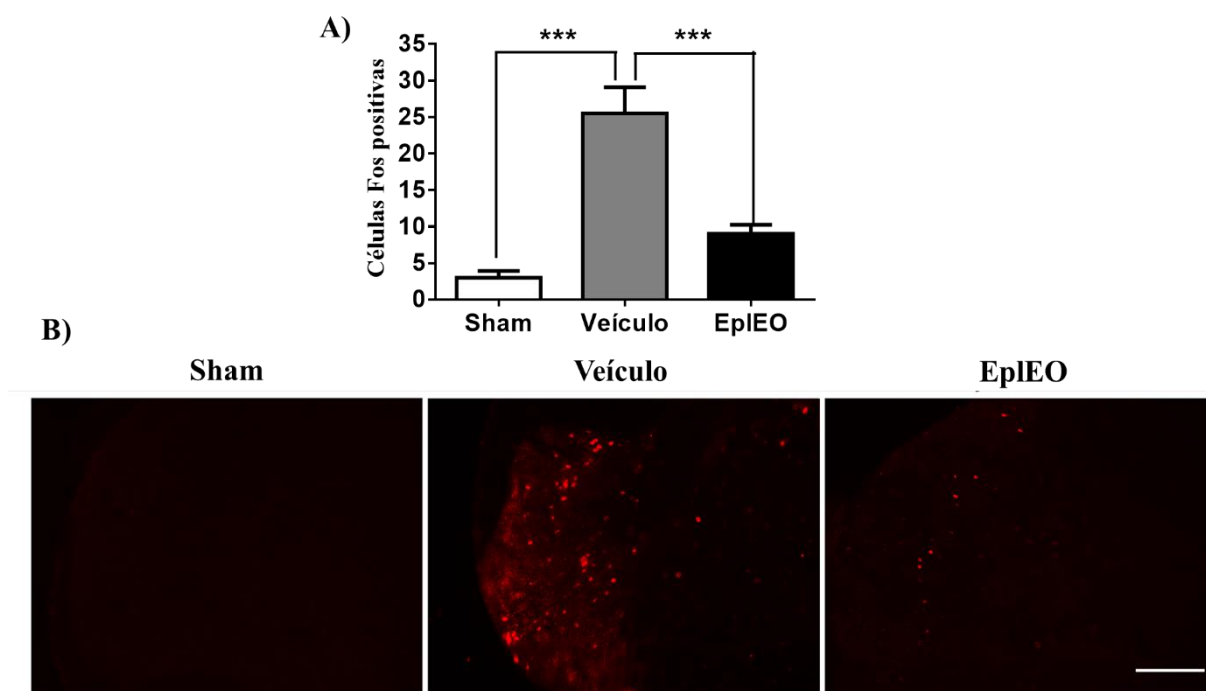
**Figura 14:** A) Efeito da coordenação motora no grupo veículo, óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* (EplEO) e EplEO complexado com  $\beta$ -ciclodextrina (EplEO- $\beta$ CD), ambos 50 mg / kg (v.o.), diazepam (DZP, 3 mg / kg; i.p.) e veículo (vehicle, v.o) nos testes de rota-rod e (B) de força muscular em camundongos. Os valores são expressos como média  $\pm$  S.E.M. (n = 7, por grupo). \* $p < 0,001$  e vs. Grupo veículo (ANOVA uma via seguido do pós-teste de Tukey).

#### 5.4. Expressão da proteína Fos na medula espinhal

Para confirmar se a resposta anti-hiperalgésica da EplEO envolve as vias clássicas centrais de inibição da dor, avaliamos a ativação da proteína Fos nas lâminas I-IV da medula espinhal. Assim, a Figura 15 (página 44) representa a imunofluorescência da medula espinhal lombar para a proteína Fos. Animais com dor muscular crônica (grupo veículo) mostram um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) no número de células Fos positivas quando comparado ao grupo sham, demonstrando que a indução de dor crônica é capaz de ativar o corno dorsal. No entanto, os animais tratados com EplEO apresentam uma redução significativa na expressão de Fos quando comparados ao veículo ( $p < 0,001$ ). Não há diferenças estatísticas entre os grupos sham e EplEO, portanto, o tratamento levou a níveis normais de expressão de Fos na medula espinhal. Proteínas Fos são expressas em processos de dor e podem ser usadas como indicadores de dor ou ausência de dor (SANTOS et al., 2017b).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o tratamento com EplEO diminuiu a expressão da proteína Fos no corno dorsal da medula espinhal (lombar). A ativação da proteína Fos ocorre por vários estímulos, como estresse, epilepsia, despolarização de neurônios e estímulos nociceptivos. Estudos experimentais sobre dor demonstraram que áreas ascendentes do SNC, como a medula espinhal e regiões hipotalâmicas, apresentam aumento da proteína Fos quando um estímulo algésico está presente (GAERTNER et al., 1999; HUNT;

PINI; EVAN, 1987; MORGAN; CURRAN, 1986; SANTOS et al., 2017b). O EplEO pode estar modulando a sensibilidade dolorosa, ocasionando uma diminuição na percepção da dor pelo SNC, uma evidencia comum para os terpenos e óleos essenciais quando avaliado neste modelo animal (NASCIMENTO et al., 2014; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016, 2017; SANTOS et al., 2017b).



**Figura 15:** Efeito da administração aguda de veículo (vehicle) ou óleo essencial de *Eplingiella fruticosa* (EplEO) (50 mg/kg, v.o.) em células positivas para Fos na medula espinhal. A) Gráfico de barras resumindo as células positivas para Fos na medula espinhal. B) Amostras representativas da medula espinhal lombar imunocorada para expressão de proteína nuclear Fos 1,5 h após tratamento com vehicle ou EplEO (50 mg/kg, v.o.). Os valores são expressos em média ± S.E.M. (n = 6, por grupo). \*\*\* p < 0,001 (ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey). 60 µm



## 6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, as análises físico-químicas realizadas mostraram que o complexo EplEO e  $\beta$ -ciclodextrina produzido pelo método de malaxagem apresentou melhor perfil de complexação na cavidade da  $\beta$ CD. Adicionalmente, EplEO- $\beta$ CD e EplEO produziram um perfil anti-hiperalgésico na dor muscular crônica não inflamatória generalizada em camundongos, sem produzir alterações na coordenação motora ou efeitos miorelaxantes. O efeito anti-hiperalgésico de EplEO- $\beta$ CD foi superior ao EplEO não complexado, mostrando que o uso de CDs pode melhorar o perfil farmacológico dos OEs, quando relacionados à dor crônica. Além disso, foi demonstrado uma diminuição na expressão da proteína Fos na medula espinhal, caracterizando um envolvimento da via clássica de inibição central da dor.

## 7. PERSPECTIVAS

Conforme o trabalho desenvolvido, estes resultados sustentam a hipótese de que *E. fruticosa* pode ser uma ferramenta promissora para o tratamento de “dores disfuncionais”, como FM, o que torna necessário buscar novas evidências que caracterizem o perfil de complexação entre os compostos químicos presentes no EplEO e as CDs, investigar possíveis mecanismos de ação do EplEO, como também, examinar a segurança deste tratamento a partir de uma perspectiva translacional. Além disso, o presente estudo incentiva futuras pesquisas em produtos naturais, criando alternativas para o desenvolvimento de novas formulações terapêuticas para o tratamento de outras enfermidades.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407–426, 1 nov. 2010.
- ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. DA. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 37, n. 4, p. 85–91, dez. 2003.
- ANDRADE, A. M. et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 962–968, dez. 2010.
- ANDRADE, T. A. et al. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 201–207, maio 2017.
- ARAUJO, M. C. M. et al. Antimicrobial substances of higher plants. Communication XLV. Primary observations on two new quinonoids isolated from *Hyptis fruticosa* Salzm ex Benth.(Labiatae). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 14, n. 1–2, p. 101–104, 1974.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, p. 334–339, 2008.
- ASTM. **Annual Book of ASTM Standards**. 14th. ed. Philadelphia: Astm Intl, 1993.
- AZEVEDO, M. DE B. M.; TASIC, L. New formulation of an old drug in hypertension treatment: the sustained release of captopril from cyclodextrin nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1005, maio 2011.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, fev. 2008.
- BARBOSA, P. P. P.; RAMOS, C. P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 2, p. 114–115, 1 mar. 1992.
- BELLATO, E. et al. Fibromyalgia Syndrome: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **Pain Research and Treatment**, v. 2012, p. 1–17, 2012.
- BENDTSEN, L. et al. Evidence of qualitatively altered nociception in patients with fibromyalgia. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, n. 1, p. 98–102, 1 jan. 1997.
- BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3643–3653, dez. 2013.
- BRITO, R. G. et al. Enhanced analgesic activity by cyclodextrins – a systematic review and meta-analysis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 10, p. 1677–1688, 3 out. 2015.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, ago. 2004.

- CALDAS, G. F. R. et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 886–892, 1 set. 2011.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 131–134, ago. 2005.
- CLAUW, D. J. et al. The science of fibromyalgia. **Mayo Clinic proceedings**, v. 86, n. 9, p. 907–11, set. 2011.
- CLAUW, D. J. Fibromyalgia. **JAMA**, v. 311, n. 15, p. 1547, 16 abr. 2014.
- COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546–555, 1 jan. 2009.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–95, jun. 2013.
- DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1023–1035, 1 dez. 2004.
- DE ANDRADE, T. et al. Cardiovascular Activity of the Chemical Constituents of Essential Oils. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1539, 17 set. 2017.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, maio 2004.
- DELLE-MONACHE, F. et al. Diterpenoids of *Hyptis fruticosa* (Labiatae). II. **Hyptol. Gazzetta Chimica Italiana**, v. 107, n. 5–6, p. 319–321, 1977.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, n. 112, p. 4–29, 2016.
- FERNANDES, L. P. et al. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia sidoides* essential oil obtained by spray drying. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 855–863, 11 mar. 2009.
- FRANCO, C. R. P. et al. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 24–32, fev. 2011a.
- FRANCO, C. R. P. et al. Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 11, p. 1693–1699, 1 nov. 2011b.
- GAERTNER, M. et al. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. **Phytomedicine**, v. 6, n. 1, p. 41–44, mar. 1999.
- GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–23, 9 jun. 2014.
- GOUVEIA, D. N. et al. Monoterpenes as Perspective to Chronic Pain Management: A Systematic Review. **Current drug targets**, 11 jul. 2017.
- GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with

Analgesic Activity-A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2013.

HĂDĂRUGĂ, N. G.; HĂDĂRUGĂ, D. I.; ISENGARD, H.-D. Water content of natural cyclodextrins and their essential oil complexes: A comparative study between Karl Fischer titration and thermal methods. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1741–1748, jun. 2012.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, n. 1, p. 1, 27 jun. 2012.

HÄUSER, W. et al. Treatment of fibromyalgia syndrome with gabapentin and pregabalin--a meta-analysis of randomized controlled trials. **Pain**, v. 145, n. 1–2, p. 69–81, 1 set. 2009.

HEDGES, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035–2044, jul. 1998.

HEIDARI, F.; AFSHARI, M.; MOOSAZADEH, M. Prevalence of fibromyalgia in general population and patients, a systematic review and meta-analysis. **Rheumatology International**, v. 37, n. 9, p. 1527–1539, 26 set. 2017.

HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 350–354, 1 jun. 2011.

HUNT, S. P.; PINI, A.; EVAN, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, v. 328, n. 6131, p. 632–4, 13 ago. 1987.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 363–368, 2016.

KAYACI, F.; UYAR, T. Solid inclusion complexes of vanillin with cyclodextrins: their formation, characterization, and high-temperature stability. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11772–11778, 9 nov. 2011.

LAZA-KNOERR, A. L.; GREF, R.; COUVREUR, P. Cyclodextrins for drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 9, p. 645–656, 25 nov. 2010.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, dez. 2001.

LENARDÃO, E. J. et al. Antinociceptive Effect of Essential Oils and Their Constituents: an Update Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 3, p. 435–474, 2015.

LIMA, A. C. B. DE et al. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* salmz ex Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 192–197, 7 mar. 2013.

LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965–987, out. 2016.

MARCUS, D. A. Fibromyalgia: Diagnosis and treatment options. **Gender Medicine**, v. 6, p. 139–151, 1 jan. 2009.

MARLETTI, F. et al. Diterpenoid quinones of *Hyptis fruticosa* (Labiatae). **Gazzetta Chimica**

**Italiana**, v. 106, n. 1–2, p. 119–126, 1976.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313–326, set. 2010.

MARRETO, R. N. et al. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**, v. 475, n. 1–2, p. 53–58, set. 2008.

MARTÍN, Á. et al. Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 5, n. 1, p. 31–41, 30 maio 2014.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391–397, 16 jun. 2010.

MENEZES, I. A. C. et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 192–195, abr. 2007.

MENEZES, P. DOS P. et al. Physicochemical characterization and analgesic effect of inclusion complexes of essential oil from *Hyptis pectinata* L. Poit leaves with  $\beta$ -cyclodextrin. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 440–50, 2015.

MENNINI, N. et al. Physico-chemical characterization in solution and in the solid state of clonazepam complexes with native and chemically-modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, p. 142–149, 15 fev. 2014.

MOREIRA, Í. J. A. et al. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 762–765, nov. 2010.

MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. **Nature**, v. 322, n. 6079, p. 552–5, 7 ago. 1986.

MOURA, A. P. G. et al. Essential oil from fruit of *Xylopia langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3093–3102, 25 dez. 2016.

NAGAKURA, Y. Challenges in drug discovery for overcoming ‘dysfunctional pain’: an emerging category of chronic pain. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 10, p. 1043–1045, 3 out. 2015.

NASCIMENTO, S. S. et al. Linalool and linalool complexed in  $\beta$ -cyclodextrin produce anti-hyperalgesic activity and increase Fos protein expression in animal model for fibromyalgia. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 10, p. 935–942, 24 out. 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.

NÖLLER, V.; SPOTT, H. Prospective epidemiological observations on the course of the disease in fibromyalgia patients. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 2, p. 4, 23 ago. 2003.

OKIFUJI, A.; HARE, B. D. Management of Fibromyalgia Syndrome: Review of Evidence.

**Pain and Therapy**, v. 2, n. 2, p. 87–104, 21 dez. 2013.

OLIVEIRA, M. A. et al. **New drugs or alternative therapy to blurring the symptoms of fibromyalgia—a patent review**. [s.l.] Taylor & Francis, 2017. v. 27

OLIVEIRA, M. G. et al. Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 8, p. 897–907, 3 ago. 2015.

OLIVEIRA, M. G. B. et al.  $\alpha$ -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with  $\beta$ -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 254, p. 54–62, 25 jul. 2016.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. **Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates**. 4th. ed. [s.l.] Imprint: Academic Press (Elsevier), 2012.

PETRALITO, S. et al. Spectroscopic characterization of both aqueous and solid-state diacerein/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 127, p. 355–60, 5 jun. 2014.

PINA, L. T. S. et al. New perspectives for chronic pain treatment: a patent review (2010-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 7, p. 787–796, 3 jul. 2017.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121–135, jan. 2014.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of orofacial pain**, v. 24, n. 3, p. 305–312, 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al.  $\beta$ -Cyclodextrin-complexed (–)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (–)-linalool in experimental pain protocols. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, n. 3, p. 167–172, set. 2013.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al.  $\beta$ -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with  $\beta$ -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life Sciences**, v. 149, p. 34–41, 15 mar. 2016.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Nanoemulsion Thermoreversible Pluronic F127-Based Hydrogel Containing Hyptis pectinata (Lamiaceae) Leaf Essential Oil Produced a Lasting Anti-hyperalgesic Effect in Chronic Noninflammatory Widespread Pain in Mice. **Molecular neurobiology**, 13 fev. 2017.

QUINTANS, J. DE S. S. et al. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 436–440, mar. 2013.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219–226, abr. 2004.

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

RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the Hyptis pectinata (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.

134, p. 725–732, 2011a.

RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 725–732, 12 abr. 2011b.

REHMAN, R. et al. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 2, p. 117–160, 2 abr. 2016.

RIEKES, M. K. et al. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin through different methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 7, p. 1008–1013, 30 ago. 2010.

SANDKÜHLER, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 707–758, abr. 2009.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 186–191, abr. 2007.

SANTOS, P. L. et al. Docking, characterization and investigation of  $\beta$ -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene 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, ago. 2016.

SANTOS, P. L. et al. Cyclodextrins as Complexation Agents to Improve the Anti-inflammatory Drugs Profile: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 14, p. 2096–2107, 30 maio 2017a.

SANTOS, P. L. et al. Fos Protein as a Marker of Neuronal Activity: a Useful Tool in the Study of the Mechanism of Action of Natural Products with Analgesic Activity. **Molecular Neurobiology**, 10 jul. 2017b.

SERAFINI, M. R. et al. Interaction of p-cymene with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 109, n. 2, p. 951–955, 17 ago. 2012.

SILVA, D. C. et al. Assessment of genetic diversity of a native population of *Eplingiella fruticosa*: a plant with therapeutic potential. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 17 ago. 2017.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3251–3255, 2008.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. Anti-hyperalgesic effect of *Lippia grata* leaf essential oil complexed with  $\beta$ -cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: Complemented with a molecular docking and antioxidant screening. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 739–747, jul. 2017.

SLUKA, K. A. et al. Chronic muscle pain induced by repeated acid Injection is reversed by spinally administered mu- and delta-, but not kappa-, opioid receptor agonists. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 1146–50, 1 set. 2002.

SLUKA, K. A. Pain syndromes: myofascial pain and fibromyalgia. In: SLUKA, K. A. (Ed.). . **Mechanisms and management of pain for the physical therapist**. 1. ed. Seattle: IASP Press, 2009. p. 279–297.



SLUKA, K. A.; CLAUW, D. J. Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. **Neuroscience**, v. 338, p. 114–129, dez. 2016.

SLUKA, K. A.; KALRA, A.; MOORE, S. A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. **Muscle & Nerve**, v. 24, n. 1, p. 37–46, 1 jan. 2001.

SRINIVASAN, K. et al. Study of inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and diphenylamine: Photophysical and electrochemical behaviors. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 1, p. 169–178, jun. 2011.

STAUD, R. Pharmacological Treatment of Fibromyalgia Syndrome. **Drugs**, v. 70, n. 1, p. 1–14, jan. 2010.

TAKAISHI, M. et al. 1,8-Cineole, a TRPM8 Agonist, is a Novel Natural Antagonist of Human TRPA1. **Molecular Pain**, v. 8, p. 1744–8069-8–86, 10 set. 2012.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. DE L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115–121, mar. 2006.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463–471, jan. 1963.

VENTURINI, C. DE G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

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

VIEIRA, L. .; SOUSA, R. S.; LEMOS, J. R. Plantas medicinais conhecidas por especialistas locais de uma comunidade rural maranhense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1061–1068, 2015.

WILLIAMS, D. A.; SCHILLING, S. Advances in the Assessment of Fibromyalgia. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 339–357, maio 2009.

YANG, Z. et al. Preparation and release behaviour of the inclusion complexes of phenylethanol with  $\beta$ -cyclodextrin. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 3, p. 206–216, 1 maio 2016.

YAO, Y. et al. Development of a myricetin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization, and evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 329–337, set. 2014.

## 9. ANEXO(S)

9.1. Anexo 1 – Registros cromatográficos do EpIEO representados pelo tempo de retenção em função da intensidade dos picos. A) CG-EM. B) CG-DIC

