



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EVERTON MORAES LOPES

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL LIVRE E COMPLEXADO COM
 β -CICLODEXTRINA NA DOR NEUROPÁTICA**

TERESINA-PI

2018

EVERTON MORAES LOPES

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL LIVRE E COMPLEXADO COM
 β -CICLODEXTRINA NA DOR NEUROPÁTICA**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia submetido ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO – Ponto Focal Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

TERESINA-PI

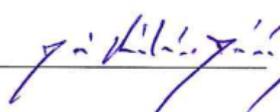
2018

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Everton Moraes Lopes

TÍTULO DO PROJETO: “ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL LIVRE E COMPLEXADO COM β -CICLODEXTRINA NA DOR NEUROPÁTICA.”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u></u>
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u></u>
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes – UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u></u>
Profa. Dra. Flávia Almeida Santos - UFC (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u></u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 01 de novembro de 2018.

HORÁRIO: 08h30

LOCAL: Auditório do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais - Bloco 15

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

L864a Lopes, Everton Moraes.
 Atividade antinociceptiva do estragol livre e
 complexado com β -ciclodextrina na dor neuropática /
 Everton Moraes Lopes. – 2018.
 138 f.

 Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade
 Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia,
 Teresina, 2018.
 “Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Fernanda Regina de Castro
 Almeida”.

1. Estragol. 2. Monoterpeno. 3. β -ciclodextrina.
4. Complexo de inclusão. 5. Neuropatia. I. Título.

CDD 615

*À minha família, pelo amor incondicional
e pelas inúmeras lições de vida!!!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com sua infinita bondade e sabedoria, iluminou meus caminhos, me guiando e impulsionando na realização dos meus ideais;

À Universidade Federal do Piauí por me proporcionar um imensurável crescimento profissional e pessoal ao longo desses 11 anos;

À minha orientadora, professora Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida, por ter acreditado no meu potencial, por toda a confiança depositada, pelo conhecimento repassado, pela motivação, por me ensinar que a formação de um Doutor vai além da confecção de uma tese, e principalmente pelo amor e carinho que transcende a relação profissional e torna a caminhada menos árdua;

À todos os professores do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais em especial a Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira, Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, Profa. Dra. Salete Maria Cipriano Brito e ao Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira pelos inúmeros ensinamentos, sugestões, apoio, motivação, disponibilidade no esclarecimento de dúvidas;

Ao Professor Dr. Sidney Gonçalo e toda a equipe do Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) pela contribuição impar no desenvolvimento do complexo de inclusão e por todo conhecimento repassado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante o período de realização deste doutorado;

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM), Gleice, Seu Carlos, Kaline, Patrícia e o Josy pela ajuda prestada;

Ao meu pai, Severiano (*in memoriam*), pelas inúmeras lições de vida, pelo amor infinito, por ser um exemplo de ser humano que todo dia busco alcançar, que mesmo não estando aqui sinto sua presença diária na minha vida e por hoje ser meu anjo da guarda;

À minha mãe, Creusa, pelo seu amor incondicional, por ter dedicado toda sua vida aos filhos, apoio, compreensão, por não medir esforços, por fazer o possível e o impossível para ver o sonho de seus filhos realizados;

Aos meus irmãos e melhores amigos, Wanut, Wagner e Stanley por estarem ao meu lado dando forças para superar os obstáculos, pelo ótimo humor e por jamais deixarem de torcer pela minha vitória, em especial a minha irmã Wanessa por dar todo o suporte que precisei, pelos inúmeros cuidados, carinho e convivência;

À Celyane pela grande amiga que é, pela disponibilidade sempre que precisei, pela ajuda desde mestrado, pelo conhecimento técnico-científico, pela dedicação e pelo incentivo, tudo teria sido muito mais difícil sem Cely;

A Marluce, companheira de batalha, pela constante colaboração, pelo entusiasmo, pelas discussões, pelo crescimento conjunto nos inúmeros e intermináveis experimentos;

À toda a família do Laboratório de Farmacologia da Dor (LAFDor), Ana Rita, Carlos, Flaviano, Lúcio, George, Yara, Laércio, Matheus, Boris e Willian pela ajuda e tornar o ambiente bem mais agradável, em especial a Flávia Francely e ao Jonas primeiros companheiros do LAFDor, que se tornaram grandes amigos desde o mestrado, agradeço pela contribuição, pelas palavras de incentivo e trocas de experiências;

Ao Bruno e a Alyne, pessoas fantásticas, meus amigos-irmãos, agradeço pelo companheirismo, pela amizade que levarei para toda a vida e pela alegria capaz de abrandar as dificuldades.

Aos demais amigos do núcleo pela convivência sempre agradável, em especial ao Benedito Neto, Valmor, Pedro Simão, Rodrigo, Daniel e Railsom, pelas brincadeiras e companheirismo;

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

LOPES, E. M. **ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL LIVRE E COMPLEXADO COM β -CICLODEXTRINA NA DOR NEUROPÁTICA.** 2018, 138p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, 2018.

RESUMO

A dor neuropática é uma condição dolorosa crônica, que surge quando há alguma injúria no sistema somatossensorial de percepção da dor, gerando sintomas como: hiperalgesia, alodinia, dor espontânea, entre outros. Atualmente existem diversos fármacos utilizados na sua terapêutica, como: anti-inflamatórios, antidepressivos, anticonvulsivante, analgésicos opióides, entre outros, entretanto a maioria deles possuem diversos efeitos colaterais, como sedação, letargia, irritação gástrica, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Nesse contexto, os produtos naturais surgem como uma alternativa viável para o problema, visto que, plantas aromáticas produzem óleos essenciais, ricos em monoterpenos, com potencial atividade antinociceptiva. Assim, a presente pesquisa busca investigar a ação antinociceptiva do estragol em modelos de neuropatia por constrição do ciático, bem como comparar a efetividade do monoterpeno livre ou complexado com β -ciclodextrina por co-precipitação e *spray dryer*. Os resultados apresentados demonstram que o estragol (3, 6 e 60 mg/mL) não provoca danos celulares, significativos, compatíveis com efeitos tóxicos. Na investigação da toxicidade aguda com a administração oral de 2000 mg/kg, o monoterpeno não demonstrou alterações em massa de órgãos, parâmetros bioquímicos e testes comportamentais. Na avaliação antinociceptiva a administração aguda do estragol (200 e 400 mg/kg, v.o.) aumenta o limiar nociceptivo mecânico e reduz a sensibilidade térmica, sintomas da dor neuropática, caracterizando assim a ação antinociceptiva aguda do monoterpeno. Entretanto considerando a baixa hidrosolubilidade, estabilidade e relatos de toxicidade do monoterpeno esse foi complexado com β -ciclodextrina por dois diferentes métodos. Ambas as complexações apresentaram bom rendimento e incorporação com 0,6 e 2,9 mg do estragol para cada 100 mg do complexo de inclusão (CI) para as técnicas de *spray dryer* e co-precipitação, respectivamente. Os dois CIs (200 e 400 mg/kg, v.o.) também mostraram atividade antinociceptiva, sobretudo a complexação por co-precipitação prolongou o efeito do estragol no teste térmico. Desse modo, os ensaios farmacológicos prosseguiram comparando a ação do estragol livre com o estragol complexado por co-precipitação, e os resultados mostraram a efetividade do estragol complexado nos tratamentos subagudos onde a ação antinociceptiva pode ser mediada pelo efeito antioxidante, visto que, o monoterpeno reduziu a peroxidação lipídica. O estragol livre e complexado, nas doses utilizadas, não provocou alterações gástricas, bem como, alteração nas atividades locomotora e exploratória dos animais. Contudo, o estragol apresenta atividade antinociceptiva, a complexação a β -ciclodextrina por co-precipitação apresenta bom rendimento e grau de incorporação, aumenta a potência do monoterpeno, considerando que o efeito foi mantido utilizando menor quantidade do estragol, assim a complexação garante maior segurança a utilização deste, visto que é possível obter efeito semelhante com menor quantidade do monoterpeno incorporado a β ciclodextrina.

Palavras-chave: Estragol. Monoterpeno. β -ciclodextrina. complexo de inclusão. Neuropatia. Dor crônica.

LOPES, E.M. **ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF FREE AND COMPLEX ESTRAGOL WITH β -CYCLODEXTRIN IN NEUROPATHIC PAIN.** 2018, 138p. Doctoral thesis. Postgraduate Program in Biotechnology by the Northeast Network of Biotechnology - RENORBIO, Focal Point Federal University of Piauí - UFPI, Teresina, 2018.

ABSTRACT

Neuropathic pain is a chronic pain condition that arises when there is some injury in the somatosensory system of pain perception, generating symptoms such as: hyperalgesia, allodynia, spontaneous pain, among others. Currently there are several drugs used in its therapy, such as: anti-inflammatories, antidepressants, anticonvulsants, opioid analgesics, among others, however most of them have several side effects, such as sedation, lethargy, gastric irritation, nephrotoxicity and hepatotoxicity. In this context, natural products appear as a viable alternative to the problem, since aromatic plants produce essential oils, rich in monoterpenes, with potential antinociceptive activity. Thus, the present research seeks to investigate the antinociceptive action of estragol in the neuropathic models of sciatic constriction, as well as to compare the effectiveness of the free monoterpene to the complexed with β -cyclodextrin by co-precipitation and spray dryer. The results presented demonstrate that the estragol (3, 6 and 60 mg/mL) does not cause significant cellular damages, compatible with toxic effects. In investigating acute toxicity with orally administration of 2000 mg/kg, monoterpene did not demonstrate changes in organ mass, biochemical parameters and behavioral tests. In the antinociceptive evaluation the acute administration of estragol (200 and 400 mg/kg, p.o.) increases the mechanical nociceptive threshold and reduces the thermal sensitivity, symptoms of neuropathic pain, thus characterizing the acute antinociceptive action of monoterpene. However, considering the low water solubility, stability and toxicity reports of monoterpene, this was complexed with β -cyclodextrin by two different methods. Both complexes presented good yield and incorporation, with 0.6 and 2.9 mg of the estragol for each 100 mg of the inclusion complex (IC) for the spray dryer and co-precipitation techniques, respectively. The two ICs (200 and 400 mg/kg, p.o.) also showed antinociceptive activity, especially the complexation by co-precipitation prolonged the effect of the estragol in the thermal test. Thus, pharmacological tests continued to compare the action of free estragol with complexed estragol by co-precipitation, and the results showed the effectiveness of complexed estragol in subacute treatments where the antinociceptive action can be mediated by the antioxidant effect, since the monoterpene reduced lipid peroxidation. The free and complexed estragol, in the doses used, did not provoke gastric alterations, as well as, alteration in the locomotor and exploratory activities of the animals. However, the estragol presents antinociceptive activity, the complexation β -cyclodextrin by co-precipitation presents good yield and degree of incorporation, increases the potency of the monoterpene, considering that the effect was maintained using less amount of the estragol, thus the complexation guarantees greater security the use of this, since it is possible to obtain similar effect with less amount of the monoterpene incorporated to β cyclodextrina.

Keywords: Estragole. Monoterpene. β -cyclodextrin. inclusion complex. Neuropathy. Chronic pain.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1	Organização do trabalho de tese.....	20
----------	--------------------------------------	----

Revisão de literatura

Figura 1	Representação esquemática do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da neuropatia.....	29
Figura 2	Estrutura química do estragol.....	35
Figura 3	Estrutura esquemática das ciclodextrinas.....	37

Capítulo 1

Figura 1	Fluxograma de busca, seleção e análise das patentes com estragol...	48
----------	---	----

Capítulo 2

Figura 1	Estrutura química do estragol.....	60
Figura 2	Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com <i>S. cerevisiae</i>	64
Figura 3	Perfil de proteção do estragol frente aos danos oxidativos em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
Figura 4	Perfil antioxidante do estragol frente aos danos oxidativos em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
Figura 5	Perfil das ações de reparo do estragol frente aos danos oxidativos em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71

Capítulo 3

Figura 1	Esquema demonstrativo do protocolo de avaliação antinociceptiva.....	87
Figura 2	Curva analítica obtida a partir de sete diferentes soluções do Estragol variando entre 5 a 400 mg/L.....	89
Figura 3	Perfil cromatográfico do estragol extraído do complexo de inclusão por co-precipitação e spray drying, respectivamente.....	90
Figura 4	Efeito da administração aguda do estragol livre e complexado sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.....	92

Figura 5	Efeito da administração aguda do estragol livre e complexado sobre a sensibilidade térmica em modelo de a neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.....	94
----------	--	----

Capítulo 4

Figura 1	Estrutura química do estragol.....	104
Figura 2	Esquema demonstrativo dos tratamentos subagudos.....	108
Figura 3	Efeito do co-tratamento subagudo com estragol livre e complexado sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.....	112
Figura 4	Efeito do co-tratamento subagudo com estragol livre e complexado sobre a sensibilidade térmica em modelo de a neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.....	114
Figura 5	Efeito do pós-tratamento subagudo com estragol livre e complexado sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.....	116
Figura 6	Efeito do pós-tratamento subagudo com estragol livre e complexado sobre a sensibilidade térmica em modelo de a neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.....	118
Figura 7	Efeito antioxidante do estragol livre e complexado em soro sanguíneo de camundongos com neuropatia induzida por ligadura parcial do nervo ciático.....	119
Figura 8	Avaliação histopatológica do nervo ciático de camundongos com neuropatia por injuria nervosa tratados por via oral por 8 dias com estragol livre e complexado.....	120
Figura 9	Avaliação macroscópica da mucosa gástrica de camundongos com neuropatia por injuria nervosa tratados por via oral por 8 dias com estragol livre e complexado.....	122
Figura 10	Efeito do estragol livre e complexado sobre a atividade locomotora e relaxante muscular.....	123

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1	Descrição das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas no estudo.....	62
Tabela 2	Protocolo experimental em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	63
Tabela 3	Parâmetros clínicos-comportamentais da análise da toxicidade aguda do estragol (2000 mg/kg, v.o.).....	72
Tabela 4	Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos tratados com o estragol (2000 mg/kg, v.o.).....	73
Tabela 5	Avaliação do peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com o estragol (2000 mg/kg, vo.).....	73

Capítulo 3

Tabela 1	Relação de quantidade de estragol livre e na forma complexada.....	90
----------	--	----

Capítulo 4

Tabela 1	Relação de quantidades de estragol livre e na forma complexada.....	111
Tabela 2.	Avaliação de danos gástricos em camundongos com neuropatia por injúria nervosa tratados por via oral por 8 dias com estragol livre e complexo.....	121

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
CAT	Catalase
CD	Ciclodextrina
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CI	Complexo de inclusão
CN	China
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Cicloxigenase
CPNC	Compressão parcial do nervo ciático
EC	Eficiência de complexação
EPM	Erro padrão da média
EPO	European Patent Office
EROs	Especies Reativas de Oxigênio
Est	Estragol
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	Interleucina
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
KR	Republica da Coréia
LMN	Limiar nociceptivo mecânico
MPE	Máximo efeito possível
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Oxido nítrico
NPPM	Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais
OE	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde

PG	Prostaglandina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Supeóxido dismutase
TBARS	Espécies reativas de ácido tiobarbitúrico
USPTO	United States Patent and Trademark Office
WIPO	World Intellectual Property Organization
β-CD	Beta ciclodextrina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos.....	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 DOR.....	26
3.1.1 Fisiopatologia da dor.....	26
3.1.2 Classificação da dor.....	27
3.1.3 Dor neuropática	28
3.1.4 Tratamento da dor neuropática	31
3.2 Produtos naturais	33
3.3 Monoterpenos	34
3.4 Ciclodextrinas.....	36
CAPÍTULO 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ESTRAGOL: UMA REVISÃO DE PATENTES	43
1 INTRODUÇÃO	45
2 MÉTODOS	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 Extração, preparação ou conversão do estragol.....	49
3.2 Preparações que contenham o estragol como adjuvante	50
3.3 Preparações com o estragol entre os principais componentes	52
4 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO MONOTERPENO ESTRAGOL	58
1 INTRODUÇÃO	60
2 METODOLOGIA	62
2.1 Obtenção do estragol.....	62
2.2 Avaliação oxidativa, antioxidante, de prevenção e reparo de danos oxidativos ao DNA nuclear e mitocondrial em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
2.3 Determinação da toxicidade aguda em modelos animais	64
2.4 Análise Estatística.....	66
3 RESULTADOS	66

3.1 Avaliação oxidativa, antioxidante, de prevenção e reparo de danos oxidativos ao DNA nuclear e mitocondrial em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
3.2 Avaliação da toxicidade aguda em camundongos	72
4 DISCUSSÃO	74
5 CONCLUSÃO	76
REFERENCIAS.....	76
CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE PREPARO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO NA EFICIÊNCIA DE COMPLEXAÇÃO E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL	79
1 INTRODUÇÃO	81
2 METODOLOGIA	83
2.1 Desenvolvimento das duas formulações.....	83
2.1.1 Preparo do complexo inclusão do estragol com β -ciclodextrina	83
2.1.2 Quantificação do estragol	84
2.1.3 Condições cromatográficas.....	84
2.1.4 Caracterização dos complexos de inclusão	84
2.2 Avaliação da ação antinociceptiva	85
3 RESULTADOS E DISCUSSAO	87
4 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS.....	97
CAPÍTULO 4: AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL LIVRE E COMPLEXADO EM MODELO DE CONSTRIÇÃO PARCIAL DO CIÁTICO.....	101
1 INTRODUÇÃO	103
2 METODOLOGIA	105
2.1 Obtenção do estragol livre e complexado	105
2.2 Animais	106
2.3 Avaliação antinociceptiva	106
2.3.1 Constrição parcial do nervo ciático (CPNC).....	106
2.3.2 Testes comportamentais de avaliação da nocicepção.....	107
2.3.3 Esquemas de tratamento	108
2.4 Avaliação antioxidante	108
2.5 Avaliação histopatológica.....	109
2.6 Avaliação das lesões gástricas após administração subaguda	109
2.7 Atividade locomotora e relaxante muscular	109

2.8 Análise Estatística.....	110
3 RESULTADOS.....	111
3.1 Incorporação do estragol a formulação.....	111
3.2 Avaliação antinociceptiva.....	111
3.3 Avaliação antioxidante.....	119
3.4 Avaliação histopatológica.....	119
3.5 Avaliação de lesões gástricas após o tratamento subagudo.....	121
3.6 Rota rod e campo aberto.....	123
4 DISCUSSÃO.....	124
5 CONCLUSÃO.....	126
REFERENCIAS.....	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
PERSPECTIVAS.....	136

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Associação Internacional de Estudos da Dor (IASP-*International Association for Study of Pain*) define que a dor é uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Reitera ainda, que a dor é sempre subjetiva e que cada indivíduo aprende a aplicação da palavra através de experiências relacionadas a lesões no início da vida. Consequentemente, a dor é aquela experiência desagradável que associamos com dano tecidual real ou potencial (IASP, 2017).

A dor recebe diferentes classificações: quanto à duração ela pode ser aguda ou crônica (VOSCOPOULOS; LEMA, 2010). Dor aguda é de curta duração, geralmente persiste apenas no período de duração do dano tecidual e representa uma reação fisiológica natural do organismo. A crônica foi definida como dor persistente ou recorrente com duração superior a três meses, e recebe ainda subclassificações podendo ser: dor crônica primária, oncológica, pós-cirúrgica o pós-traumática, orofacial, visceral, musculoesquelética e dor neuropática (TREEDE et al., 2015). E essa última é definida como a dor causada por uma lesão ou dano no sistema nervoso somatossensorial (IASP, 2017). É caracterizada pelo aparecimento de dor espontânea, hiperalgesia ou alodinia (CORAGGIO et al., 2018).

Os dados de incidência e/ou prevalência da dor crônica com característica neuropática são muito diversos, apesar desse tipo de dor ser bastante estudado atualmente, os estudos epidemiológicos são relativamente escassos e a metodologia usada é muito variada, além do fato de que são inúmeras as condições dolorosas crônicas classificadas como dor neuropática, que têm múltiplas etiologias e diferentes modos de manifestar-se, uma vez que a lesão ou doença pode atingir qualquer nível do sistema nervoso (POSSO; PALMEIRA; VIEIRA, 2016).

Em 2014 a IASP divulgou um documento o qual destaca que em estudos com a população em geral usando instrumentos validados de triagem observaram que 7-8% dos adultos têm dor crônica com características neuropáticas. O documento reúne, ainda, alguns desses dados bem variados em todo o mundo, destacando a epidemiologia e etiologia bem variada. Mostra que em um estudo holandês a incidência de dor neuropática foi de cerca de 8 casos por 1.000 pessoas/ano, já no Reino Unido, 26% das pessoas com diabetes têm dor neuropática periférica. Um estudo norueguês observou que 40% das pessoas têm dor pós-operatória

persistente, das quais um quarto têm características neuropáticas. E por fim expõem que aproximadamente 20% (18,7-21,4%) das pessoas com câncer têm dor neuropática de origem oncológica, como resultado da doença ou de seu tratamento (IASP, 2014).

A dor neuropática, atualmente, ainda carece de um tratamento realmente efetivo. No mercado existem diversas opções terapêuticas, incluindo anticonvulsivantes, antidepressivos tricíclicos, opióides, etc. Entretanto, as que agem em diferentes alvos geralmente são carregadas de inúmeros efeitos colaterais e os agentes altamente específicos dificilmente progridem para ensaios clínicos. Apesar de todas as opções de tratamento disponíveis e avanços no campo da medicina o tratamento da dor neuropática continua a ser um desafio, visto que, muitas vezes a terapêutica é apenas sintomática e acaba por não contemplar a etiologia da neuropatia (ALLES; SMITH, 2018; HATCH et al., 2018).

Assim, a busca de novos fármacos aumenta as perspectivas de tratamento da dor neuropática. Neste contexto, vários compostos de origem natural têm sido estudados, e os terpenos de muitos óleos essenciais possuem um alto potencial para o tratamento de doenças crônicas (MISHRA; TIWARI, 2011). As plantas medicinais aromáticas possuem óleos essenciais, que são misturas de metabólitos complexas e voláteis, bastante utilizadas na indústria farmacêutica. Os terpenóides são os constituintes mais abundantes dos óleos essenciais, estão presentes como hemiterpenos, monoterpenos, ou sesquiterpenos e como seus derivados (BAKKALI, et. al. 2008).

Os monoterpenos tem se destacado como novas opções para o tratamento da dor aguda e crônica. O carvacrol, limoleno, α -felandreno, terpineol e o pineno estão nesse grupo de monoterpenos que apresentam atividade antinociceptiva, além de muitos outros constituintes dessa superfamília que apresentam efeito promissor (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013; GOUVEIA et al., 2017).

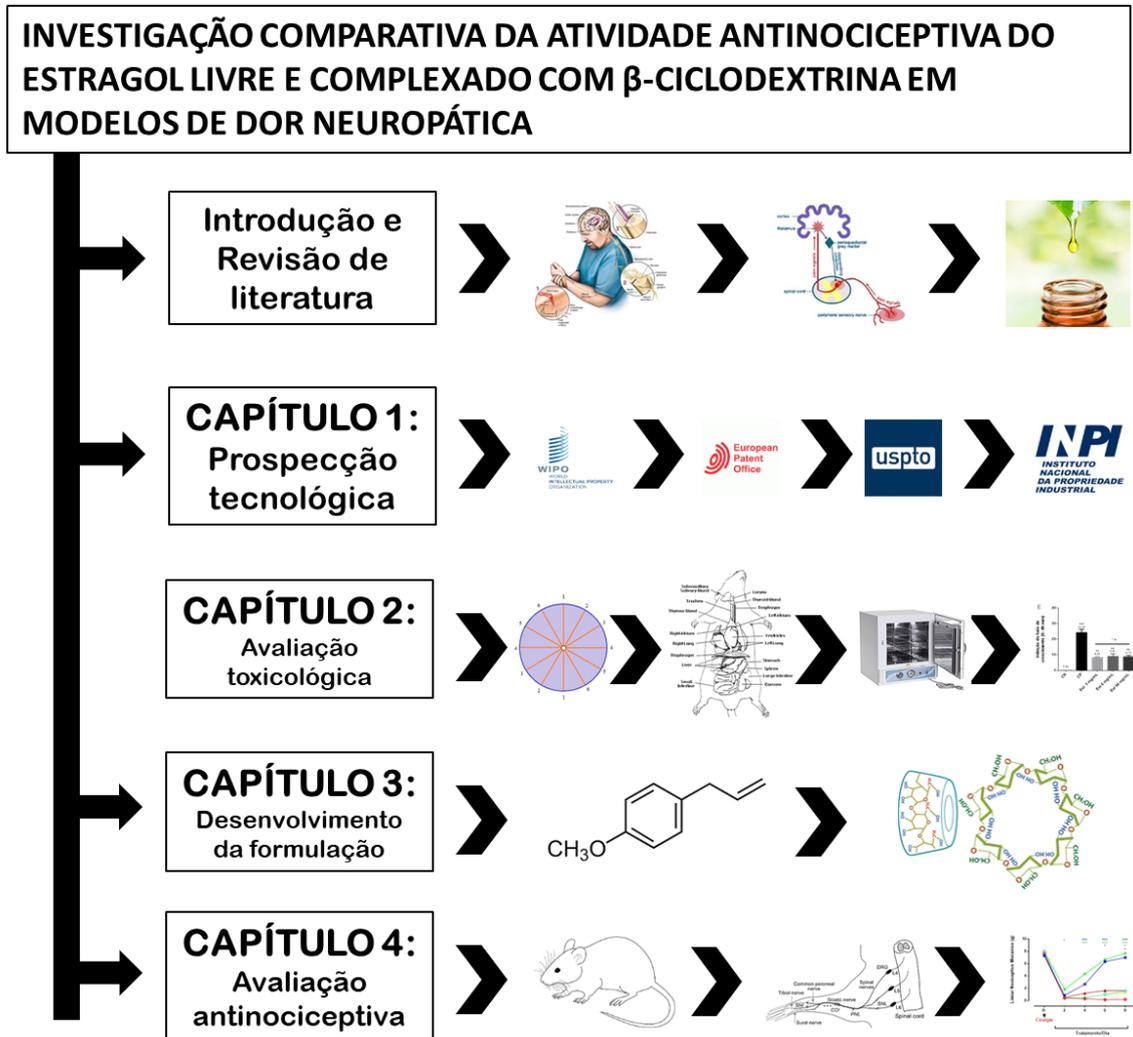
O estragol, também conhecido como: metilchavicol, chavicolmetileter ou *p*-allilanol, é um monoterpeno éter que possui ocorrência natural e é utilizado em produtos alimentares como agente aromatizante (VINCENZI et al., 2000). Entretanto, essa classe apresenta instabilidade e baixa solubilidade em água, limitando suas aplicações biológicas (WU et al., 2007). Como tentativa de solucionar esse problema, várias tecnologias, como o desenvolvimento de sistemas microemulsionados, nanopartículas, e complexações têm sido empregadas a fim de

melhorar suas características. A complexação com as ciclodextrinas é uma importante ferramenta para modificar as características físico-químicas dessas moléculas (MUANKAEW; LOFTSSON, 2018), assim, as ciclodextrinas podem ser usadas como portadores moleculares viáveis para novos fármacos com baixa solubilidade (URIA-CANSECO; PEREZ-CASAS; NAVARRETE-VÁZQUEZ, 2019).

Assim, considerando o potencial promissor dos monoterpenos, a presente pesquisa objetiva o desenvolvimento de uma complexação do estragol com β -ciclodextrina, a fim de se obter uma formulação efetiva e segura para o tratamento destas condições dolorosas crônicas.

Desse modo, a presente tese de doutorado foi dividida em capítulos, como mostra a figura 1, baseados em artigos científicos submetidos a revistas de caráter nacional e internacional com o objetivo de fornecer uma maior abrangência dos resultados encontrados e torná-los disponíveis a comunidade científica.

Figura 1 - Organização do trabalho de tese.



Inicialmente há um apanhado geral apresentando a situação da terapêutica da dor crônica seguida de uma revisão narrativa da literatura científica para expor conceitos importantes e discutir aspectos relevantes para a compreensão do desenvolvimento da pesquisa. Nessa sessão está apresentada a fisiopatologia da dor neuropática, tratamentos farmacológicos, a utilização de produtos naturais e o potencial promissor do uso dos monoterpenos na dor neuropática.

No primeiro capítulo buscou-se revisar as bases tecnológicas a fim de verificar a existência de patentes sobre o desenvolvimento de bioprodutos ou de aplicações do estragol. Desse modo, nesse capítulo estão descritas as aplicações biológicas do estragol registradas nas bases de proteção intelectual de desenvolvimento de processos e produtos.

O segundo capítulo destaca a avaliação toxicológica do monoterpeno a fim de contribuir para a compreensão da segurança terapêutica nas fases iniciais do desenvolvimento, visto que, esses resultados antecipam possíveis riscos e, portanto, minimizam a probabilidade da investigação de uma nova substância promissora falhar em etapas mais avançadas e dispendiosas, bem como colocar em risco a saúde do ser humano.

O terceiro capítulo trata-se do desenvolvimento dos complexos de inclusão com β -ciclodextrina por dois métodos diferentes de secagem, por *spray dryer* e co-precipitação. Além do desenvolvimento dos complexos, esse capítulo mostra a comparação da atividade antinociceptiva entre o estragol livre e complexado pelos métodos citados anteriormente, a fim de destacar qual formulação seria mais indicada a terapêutica da dor neuropática.

O quarto capítulo apresenta com mais detalhes a ação farmacológica do estragol, destacando o tratamento subagudo (co e pós-tratamento), ação antioxidante, efeito sobre o reparo tecidual e a interferência do monoterpeno sobre o sistema nervoso central e sobre a mobilidade dos animais, bem como a descrição do efeito farmacológico do complexo de inclusão que demonstrou maior eficácia terapêutica.

REFERÊNCIAS

ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, 2018.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

CORAGGIO, V. et al. Neuroimmune-driven neuropathic pain establishment: A focus on gender differences. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.

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, L. J. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. **Phytotherapy Research : PTR**, v. 27, n. 1, p. 1–15, jan. 2013.

HATCH, M. N. et al. Neuropathic pain and SCI: Identification and treatment strategies in the 21st century. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 384, p. 75–83, 2018.

IASP. **Epidemiologia da dor neuropática: Qual é a Prevalência da dor neuropática e qual é seu impacto?** 2014. Disponível em: <<https://s3.amazonaws.com/rdcms-iasp/files/production/public/AM/Images/GYAP/Neuropathic/003 -Epidemiologia da Dor Neuropatica-Portugues.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

IASP. **IASP Terminology - IASP**. 2017. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Neuropathicpain>>. Acesso em: 2 fev. 2018.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–807, out. 2011.

MUANKAEW, C.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin-Based Formulations: A Non-Invasive Platform for Targeted Drug Delivery. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 122, n. 1, p. 46–55, 2018.

POSSO, I. DE P.; PALMEIRA, C. C. DE A.; VIEIRA, É. B. DE M. Epidemiology of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, n. Suppl 1, p. 11–14, 2016.

TREEDE, R.D. et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. 156, n. 6, p. 1, 2015.

URIA-CANSECO, E.; PEREZ-CASAS, S.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G. Thermodynamic characterization of the inclusion complexes formation between antidiabetic new drugs and cyclodextrins. **The Journal of Chemical Thermodynamics**. v. 129, p. 55-60, 2019.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, n. April, p. i69–i85, 2010.

VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 725–9, dez. 2000.

WU, S.H. et al. Monoterpene glycosides from *Paeonia delavayi*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 1, p. 76–8, jan. 2007.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o potencial antinociceptivo e toxicológico do estragol livre e complexado com β -ciclodextrina em modelo de neuropatia, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito farmacológico observado.

2.2 Específicos

- Investigar a anterioridade tecnológica sobre o depósito de patentes relacionadas às atividades biológicas do estragol fundamentando o desenvolvimento de produto biotecnológico com aplicação terapêutica;
- Avaliar o efeito antioxidante e de prevenção e reparo celular pelo estragol sobre o DNA nuclear e mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*;
- Investigar o potencial toxicológico do estragol através da investigação de alterações do peso corporal dos animais, peso dos órgãos, como: coração, pulmões, fígado, rins e baço, parâmetros bioquímicos: renais e hepáticos;
- Desenvolver um complexo de inclusão do estragol com β -ciclodextrina pelos métodos de *spray dryer* e co-precipitação;
- Comparar a possível atividade antinociceptiva dos dois complexos de inclusão do estragol com β -ciclodextrina;
- Avaliar o efeito agudo e subagudo do estragol livre e complexado no modelo de neuropatia por compressão parcial do ciático;
- Investigar a ação antioxidante do estragol livre e complexado sobre modelos de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático;
- Investigar a irritação gástrica pelo estragol através da avaliação macroscópica dos estômagos após tratamento subagudo com o monoterpeno;
- Pesquisar o efeito de reparo tecidual do estragol livre e complexado através de avaliação histopatológica do nervo ciático de animais com neuropatia;
- Determinar o efeito do estragol livre e complexado sobre a atividade locomotora e coordenação motora em camundongos.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOR

3.1.1 Fisiopatologia da dor

A dor é uma sensação desagradável, presente ao longo de toda a vida, desde o nascimento até a morte. É associada a diversos processos inflamatórios, trauma tecidual e várias doenças. Embora seja uma sensação desagradável, a dor é essencial para a sobrevivência humana, exercendo função de alerta e proteção para o organismo, protegendo-o de uma lesão ou ameaça iminente. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como “uma sensação desagradável com sofrimento emocional associada com lesão tecidual real ou potencial, ou delineada em termos de tal lesão” (IASP, 2017).

Fisiologicamente a dor é chamada de nocicepção, que é o processo doloroso dissociado do envolvimento emocional. Esse processo se inicia com a *transdução*, que é a transformação dos estímulos nocivos em potenciais de ação, seguida pela *transmissão*, que é o movimento da atividade elétrica, e por último, a *modulação*, que é caracterizada pelas alterações que ocorrem no sistema nervoso em resposta a estímulos nócicos e permitem que os sinais recebidos no corno dorsal da medula espinhal sejam seletivamente inibidos, modificando assim a transmissão de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo para centros superiores (JULIUS; BASBAUM, 2001; WOOLF, 2011; KUMAR et al. 2014).

A dor apresenta dois componentes distintos: o componente subjetivo e o fisiológico. Este por sua vez envolve várias estruturas neurais sendo conhecido como nocicepção. Este processo inicia-se com o estímulo de receptores periféricos, que por sua vez realizam a transdução do estímulo em um potencial de ação ou impulso nociceptivo que é conduzido até o corno dorsal da medula espinhal pelos neurônios aferentes primários (fibras A δ e C). Estas fibras primárias possuem seu corpo neuronal localizado no gânglio da raiz dorsal. Na medula, estas fibras realizam sinapse nas lâminas I, II, III e IV do corno dorsal. Esta sinapse é uma das mais importantes envolvidas no processo de percepção e modulação (SCHAIBLE; RITHER, 2004; COUTAUX et al., 2005).

As sensações de dor agem protegendo o organismo de danos em potencial, levando a uma ação defensiva pela transmissão de sinais sobre um possível evento nocivo à percepção consciente. As alterações na via de dor levam a hipersensibilidade de um modo que supera sua utilidade como um sistema de alerta agudo, tornando-o um sistema crônico e debilitante. Isso pode ser observado, em algum momento, como uma extensão do processo de cicatrização normal no qual o nervo provoca hiperatividade, resguardando a área lesionada (BASBAUM et al., 2009; SUKHOTINSKY; DEVOR, 2014).

3.1.2 Classificação da dor

A dor pode ser classificada de acordo com a duração, seu mecanismo, sua localização e sua intensidade. Quanto à duração, ela pode ser aguda ou crônica. A dor aguda é de curta duração, geralmente persiste apenas o período de duração do dano tecidual e representa uma reação fisiológica natural do organismo. A dor crônica é aquela que persiste além do tempo para a cura de uma lesão. É também descrita como aquela associada a processos patológicos crônicos, que causam dor contínua ou recorrente em intervalos de meses ou anos (TSANG et al., 2008; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Outra classificação da dor refere-se a sua fisiopatologia, dividindo-se em dor nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação. Os estímulos ativam as fibras C e A δ e geram os processos de transdução, transmissão e modulação dos sinais neuronais (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008). A dor inflamatória é caracterizada por um aumento da sensibilidade do tecido lesionado, pois uma resposta inflamatória é gerada pelos macrófagos locais e isso é ainda mais amplificado por migração de glóbulos, havendo liberação de mediadores inflamatórios, que mantêm o desenvolvimento da dor (TENORIO, ASHWINI KULKARNI, KERR, 2013).

A dor neuropática ou neurogênica é resultado de um dano ao tecido nervoso, nos mecanismos de transmissão ou interpretação da dor, caracterizada por uma mudança no processamento somatossensorial, tendo como consequência a hiperalgesia (aumento da sensibilidade e capacidade de resposta a estímulos

dolorosos), dor espontânea, parestesia e alodinia (sensibilidade e capacidade de resposta a estímulos não dolorosos) mecânica e térmica. Esse quadro está presente em inúmeras doenças, como por exemplo, doenças autoimunes, metabólicas, vasculares, infecciosas, traumas e câncer (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008; TENORIO, ASHWINI KULKARNI, KERR, 2013).

3.1.3 Dor neuropática

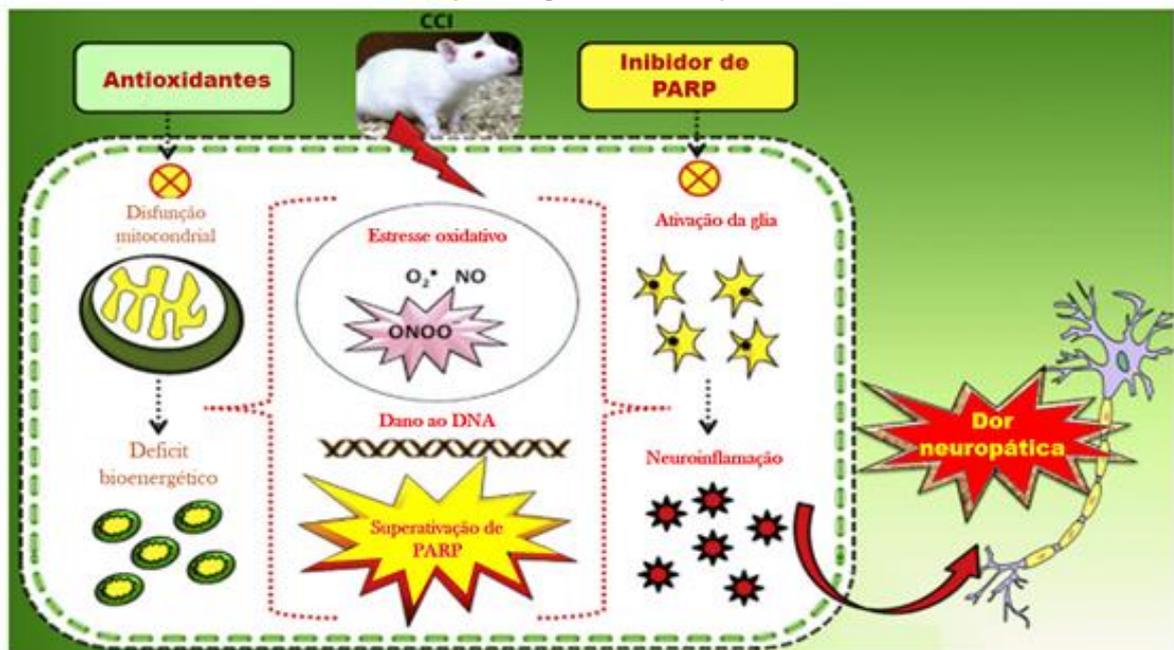
A neuropatia é uma síndrome complexa, com diversos mecanismos envolvidos. Teorias inflamatórias e imunes estão entre os principais, mas há ainda o envolvimento do estresse oxidativo e da degeneração nervosa. Esses fatores somados interferem na condução normal dos impulsos dolorosos, distorcendo a interpretação e a resposta ao estímulo. Modelos experimentais para o estudo da dor neuropática geralmente desenvolvem a alodinia ou hiperalgesia a partir de lesões periféricas traumáticas, metabólicas ou causadas por substâncias tóxicas (KRAYCHETE et al., 2008; LIM et al., 2014).

A lesão no sistema nervoso pode provocar a dor neuropática crônica que é às vezes intratável. Muitos processos paralelos, interdependentes e dependentes acontecem de forma simultânea, incluindo interações neuroimunes nos níveis periférico, supraespinal e espinal, fatores estimulante, processos excitatórios exacerbados e os processos inibitórios atenuados no corno dorsal da medula espinal e por todo o sistema somatossensorial contribuem para a gênese e manutenção dessa condição. Isso leva à sensibilização central e ao processamento anormal de tal forma que a informação térmica tátil e inócua é percebida como dor (alodinia) (ALLES; SMITH, 2018).

Durante a instalação do processo da neuropatia dolorosa há uma série de alterações no sistema nervoso e no microambiente onde ocorre a lesão ou dano. Inicialmente há uma desordem neuroimune, com liberação de mediadores inflamatórios (IL-1 β , TNF, IL-6, IL-15, IL-17, IL-18 e IFN- γ) com ativação de células de Schwann, células satélites, astrócitos e micróglia que controlam a degeneração *walleriana* e a regeneração. Ao passo que o estresse oxidativo surge contribuindo para todo esse desequilíbrio, responsável pela transformação da dor fisiológica em dor patológica (HASSLER et al., 2011; JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013; LIOU; LEE; DAY, 2013; MIKA et al., 2013; LIM et al., 2014).

A gênese da neuropatia é bastante complexa, como mostra a figura 1, e envolve a participação do estresse oxidativo, onde radicais livres podem provocar alterações no microambiente da lesão e gerar uma neuroinflamação local. Desse modo, substâncias antioxidante contribuem para ação neuroprotetiva (KOMIRISHETTY et al., 2017).

Figura 1 – Representação esquemática do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da neuropatia



Fonte: Adaptado de Komirishetty et al., (2017)

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes em favor da geração de oxidantes provoca o estresse oxidativo (TONON et al., 2012). As EROs são resultado do metabolismo celular normal dos organismos vivos. Em concentrações de baixas a moderadas funcionam em processos celulares fisiológicos, mas o excesso de EROs, como ocorre em processos inflamatórios, pode provocar danos aos componentes celulares, tais como lipídios, proteínas e o ácido desoxirribonucléico (DNA) (BINDOLI; RIGOBELLO, 2013).

As principais EROs com importância fisiológica são: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), durante condições de estresse oxidativo e processos inflamatórios, esse ânion é gerado a partir da óxido nítrico sintase (eNOS) desacoplada; o radical hidroxila ($OH\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e intermediários reativos do oxigênio, cujo

principal representante é o óxido nítrico (NO), que é degradado rapidamente por oxidases produzidas durante o estresse oxidativo (BINDOLI; RIGOBELLO, 2013; LUNDBERG, et al., 2015).

A lesão através da compressão do nervo ciático altera a transmissão dos impulsos dolorosos, provoca a ocorrência de uma sucessão de eventos resultantes do processo reparador que causam modificações estruturais e funcionais no nervo, e modifica a condução nervosa, promovendo sensibilização periférica e central (VAN-DAM et al., 2013).

Além da neuropatia por lesões, aquela provocada por alterações metabólicas figura entre as mais comuns. No diabetes mellitus, a hiperglicemia crônica descontrolada promove diversas complicações, incluindo as neuropatias, retinopatias e disfunções autonômicas (NARENJKAR et al., 2011). As alterações metabólicas do diabetes interferem no tecido nervoso, alteram a velocidade de condução nervosa e reduzem o limiar de dor, pelo excesso de metabólitos das reações com carboidratos, estresse oxidativo, lipoxidação, alterações pró-inflamatórias e redução do suprimento vascular para os tecidos nervosos (VAN-DAM et al., 2013).

Outro tipo de neuropatia que afeta muitos pacientes é a provocada pela toxicidade de algumas drogas, como os quimioterápicos. Algumas terapias com quimioterápicos possuem um esquema de dose limitado, visto que, o uso prolongado provoca polineuropatia periférica como efeito adverso. Entre essas drogas, a oxaliplatina se destaca por causar neurotoxicidade aguda e exacerbar a parestesia e a sensibilidade ao frio (STUBBLEFIELD et al., 2009).

A epidemiologia é uma ferramenta clínica importante na concepção e avaliação de estratégias de controle e prevenção, e é particularmente relevante para a dor neuropática. No entanto, há uma relativa falta de informações precisas disponíveis. Em certo sentido, a dor neuropática descreve um sintoma ou um mecanismo, em vez de uma doença específica, por outro lado, existem semelhanças suficientes nos efeitos e resposta ao tratamento entre diferentes causas para compensar a dor neuropática como uma condição distinta (SMITH, TORRANCE, 2012).

O gerenciamento da dor crônica é uma tarefa clinicamente complexa e desafiadora para os clínicos. Uma estratégia para o tratamento da dor crônica começa com uma compreensão completa da fisiopatologia de diferentes tipos de

dor. Uma avaliação cuidadosa do paciente com história e exame físico é essencial para diferenciar o tipo de dor, identificar o agente etiológico, fatores biopsicossociais, avaliar a carga funcional da dor, elaborar um plano de tratamento e desenvolver metas de terapia (DOHMEIER et al., 2018).

A dor neuropática é uma descrição clínica (e não um diagnóstico) que requer uma lesão demonstrável ou uma doença que satisfaz os critérios diagnósticos neurológicos estabelecidos. O termo lesão é comumente usado quando investigações diagnósticas (por exemplo, exames de imagem, neurofisiologia, biópsias, exames laboratoriais) revelam uma anormalidade ou quando houve trauma evidente. O termo doença é comumente usado quando a causa subjacente da lesão é conhecida (por exemplo, acidente vascular cerebral, vasculite, diabetes mellitus, anormalidade genética). Somatossensorial refere-se a informações sobre o corpo per se, incluindo órgãos viscerais, em vez de informações sobre o mundo externo (por exemplo, visão, audição ou olfato). A presença de sintomas ou sinais (por exemplo, dor evocada pelo toque) por si só não justifica o uso do termo neuropático. Algumas entidades da doença, como a neuralgia do trigêmeo, são atualmente definidas por sua apresentação clínica, e não por testes de diagnóstico objetivos (IASP, 2017).

3.1.4 Tratamento da dor neuropática

Atualmente, existem diversas substâncias usadas clinicamente para tratar as neuropatias, incluindo anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, antidepressivos, opióides, entre outros, porém, ainda não existe unanimidade entre as terapêuticas adotadas, visto que, as substâncias hoje disponíveis possuem características que dificultam o seu uso crônico.

Existem diversos estudos que destacam o tratamento de neuropatias com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), como o ibuprofeno (CASTRO; NAVARRO, 2014) e a nimesulida (ZANJANI et al., 2010), entre outros. Os AINEs inibem as ciclooxigenases (COXs) e bloqueiam a produção de prostaglandinas (PG), controlando os danos inflamatórios (VO; RICE; DWORKIN, 2009).

Outra classe bastante utilizada são os antidepressivos que estão entre as drogas de primeira escolha, porém não apresentam efeito antinociceptivo imediato. Por exemplo, o tratamento agudo com a imipramina ou amitriptilina carece de efeitos

analgésicos, mas a administração diária repetida é capaz de reduzir progressivamente a hipersensibilidade da neuropatia dolorosa (MAO et al., 2009; KUSUDA et al., 2013). Essa classe de fármacos exerce sua ação antialodínica através da modulação dos canais de sódio voltagem dependentes e inibição da recaptação de noradrenalina e serotonina (TRIVEDI; SILVESTRI; WOLFE, 2013).

Os antidepressivos são associados a efeitos colaterais como retenção urinária, boca seca, sedação, constipação e alterações cardíacas, provocando ainda, letargia, sonolência, tonturas e hipotonia, desse modo, seu uso crônico se torna bastante oneroso (KATZ; BARKIN, 2010).

Drogas anticonvulsivantes também são utilizadas no tratamento da dor neuropática. O ácido valpróico possui efeito antialodínico, no entanto seu uso clínico é limitado por dois efeitos secundários graves, a teratogenicidade e a hepatotoxicidade. Análogos dessa substância, como a gabapentina e a pregabalina, apresentam atividade antialodínica e maior segurança terapêutica (WINKLER et al., 2005; GUSTAFSSON; SANDIN, 2009; O-ARCINIEGA et al., 2009).

Outras substâncias também tem seu potencial antialodínico direcionado para o tratamento das neuropatias, como o tramadol (ABASS et al., 2014; KANEKO et al., 2014), lidocaína (KIRILLOVA et al., 2011), agonistas de receptores canabinóides (IKEDA et al., 2013; KLAUKE et al., 2014), antagonistas dos receptores NMDA (N-metil-D-Aspartato) (KIM et al., 2012) e toxina botulínica (XIAO et al., 2013), entre outras.

Muitas dessas terapias têm uma relevância clínica questionável. Os antidepressivos não são efetivos para todos os tipos de neuropatias, e as altas doses geram preocupação. Muitos dos anticonvulsivantes não conseguem produzir respostas analgésicas, apenas alguns fármacos dessa classe produzem alívio da sensação dolorosa. Os AINEs possuem o uso limitado pelos seus diversos efeitos colaterais. Outras drogas como anestésicos locais, canabinóides, antagonistas NMDA, toxina botulínica, não contemplam todos os tipos de neuropatias, possuem efeito passageiro ou ainda, apresentam efeitos adversos que inviabilizam seu uso. Os fármacos disponíveis não têm como alvo os vários mecanismos subjacentes à dor, uma vez que muitos desses medicamentos atuam, principalmente, através da redução da hiperexcitabilidade neuronal (FINNERUP; SINDRUP; JENSEN, 2010; JONGEN et al., 2013).

A pesquisa pré-clínica, em grande parte usando modelos murinos, está focada na compreensão de como o sistema nervoso muda durante a dor neuropática em um esforço para identificar novos alvos para analgesia e assim produzir novas terapêuticas. Avanços rápidos na tecnologia resultaram no desenvolvimento de muitas ferramentas inovadoras, como quimio e optogenética, que serão aplicadas para avançar ainda mais na patogênese da dor neuropática usando modelos animais, bem como ter o potencial de ser desenvolvido clinicamente (SMITH et al., 2017).

Diante dos efeitos colaterais expostos nas classes de fármacos supracitados, se fazem necessários estudos que visem à elucidação de substâncias com potencial antinociceptivo e com baixo risco de toxicidade que os grupos ora empregados detêm, sendo os produtos naturais, recursos terapêuticos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial analgésico.

3.2 Produtos naturais

Assim, a busca de novos fármacos aumenta as perspectivas de prevenção e tratamento da dor neuropática. Neste contexto, vários compostos de origem natural têm sido estudados, e os terpenos de muitos óleos essenciais possuem um alto potencial para o tratamento de doenças crônicas, fato que tem motivado a comunidade científica a realizar ensaios farmacológicos a fim de identificar novos agentes terapêuticos para o tratamento de condições neuropáticas, com maior ou igual eficácia que os empregados atualmente, mas, sobretudo, que sejam mais seguros (MISHRA; TIWARI, 2011).

Para manter-se competitiva com outros métodos de descoberta de medicamentos, a pesquisa de produtos naturais precisa melhorar continuamente a velocidade dos processos de triagem, isolamento e estruturação, bem como abordar a adequação de padrões de componentes para extratos de produtos naturais e lidar com questões envolvidas em produção de grandes dimensões com fornecimento dos princípios ativos em largas escalas de produção (LAHLOU, 2013).

Tem emergido a quantidade de plantas medicinais e aromáticas cultivadas para usos industriais, entretanto a maioria da produção ainda é silvestre. A necessidade de fontes renováveis de produtos industriais, bem como a necessidade de proteger a biodiversidade vegetal cria uma oportunidade para os agricultores

produzirem tais culturas. A matéria-prima para produtos químicos finos é diferente do cultivo de culturas ornamentais ou alimentícias. Desse modo, esse cultivo necessita de uma série de exigências especiais (LUBBE; VERPOORTE, 2011).

É importante que os programas de cultivo das plantas medicinais sejam realizados utilizando métodos científicos controlados, de modo que estes garantam materiais vegetais de qualidade desejada e também ajudem a gerenciar efetivamente os recursos. No entanto, a crescente demanda por plantas medicinais também está ameaçando sua existência, portanto para atender as necessidades futuras, o cultivo de plantas medicinais deve ser encorajado (LAHLOU, 2013).

Organismos na natureza produzem diversos metabólitos secundários com o propósito específico de ganhar vantagens evolutivas competitivas, como por exemplo, se manter vivos no ambiente e reduzir a competitividade com outros organismos na busca por nutrientes. Desse modo, durante a evolução, diferentes mecanismos enzimáticos foram desenvolvidos, os quais direcionaram a biossíntese de diferentes estruturas moleculares de metabólitos secundários (BOHLIN et al., 2010).

As plantas medicinais aromáticas possuem óleos essenciais, que são misturas complexas de metabólitos voláteis, bastante utilizadas na indústria farmacêutica. Os terpenóides são os constituintes mais abundantes dos óleos essenciais, estão presentes como hemiterpenos, monoterpenos, ou sesquiterpenos e como seus derivados. Os monoterpenos são os constituintes mais representativos dos óleos essenciais, constituindo 90% dos mesmos, e possuem várias atividades farmacológicas descritas, como analgésica, anti-inflamatória, antidepressiva e anticonvulsivante, dentre outras (BAKKALI, et. al. 2008).

3.3 Monoterpenos

Os terpenos encontrados em óleos essenciais são moléculas simples estruturalmente, mas estudos relatam suas atividades farmacológicas mostrando seu uso como fármacos analgésicos. São substâncias de baixo peso molecular, geralmente com elevada solubilidade lipídica, que podem penetrar na barreira hematoencefálica atuando no SNC (DE-SOUSA, 2011). Dentre os componentes dessa classe, estão os monoterpenos, sesquiterpenóides, diterpenóides,

triterpenóides e carotenóides, derivados sem exceção, de um mesmo precursor biossintético, o pirofosfato de isopentila (BRUNETON, 2001).

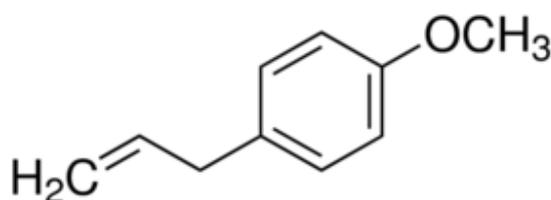
Os terpenóides são formados por sequências de cinco carbonos, chamadas de unidades de isopreno (C_5H_8) isolados ou o acoplamento de duas, três ou quatro unidades, constituem os hemiterpenos (C_5), monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (C_{20}), respectivamente. Monoterpenóides (C_{10}) e sesquiterpenóides (C_{15}) possuem uma ampla distribuição no reino vegetal, por isso são os constituintes voláteis mais comuns em flores, frutos, caules e folhas, onde desempenham importante papel nas interações planta-ambiente. Muitos possuem grande valor comercial e alguns são utilizados na indústria farmacêutica (HARVEY et al, 2015; LEI et al, 2016).

Entretanto, os monoterpenos, na natureza, são facilmente oxidados na atmosfera, e o processo de oxidação sofre influência da estação do ano, horário do dia, concentrações atmosféricas de oxidantes e a capacidade de oxidação desses componentes dos óleos essenciais (PERÄKYLÄ et al., 2014).

O potencial analgésico de monoterpenos tem sido estudado a fim de caracterizar os seus mecanismos de ação, fato que tem destacado, nessa classe, novas opções para o tratamento da dor. O carvacrol, o limoleno, o α -felandreno, o terpineol e o pineno estão nesse grupo de monoterpenos que apresentam atividade antinociceptiva, além de muitos outros constituintes dessa classe que apresentam efeito promissor (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013).

O estragol (Figura 2) é um monoterpeno de ocorrência natural, constituinte de óleos essenciais de plantas aromáticas, como *Ocimum basilicum* L. e *Artemisia dracunculus* L., localizadas principalmente em regiões quentes, a exemplo: o Mediterrâneo ou países tropicais, (BAKKALI et al., 2008). O estragol ($C_{10}H_{12}O$) caracteriza-se por ser um éter, possui a nomenclatura de 4-2-(propenil)metoxibenzeno, e possui alguns sinônimos como metil chavicol, p-alilanol, chavicol metiléter e 4-metoxialilbenzeno (VINZENCI et al., 2000).

Figura 2 - Estrutura química do estragol



O estragol apresenta efeitos tóxicos visto que sua metabolização pode vir a gerar produtos com elevado potencial genotóxico, dependendo da via metabólica que irá seguir no organismo (MARTINS et al., 2012). Além disso, os monoterpenos, de maneira geral, apresentam instabilidade no processo de preparação e armazenamento, devido à sua baixa solubilidade em água, podem ainda se oxidar, decompor ou evaporar quando expostos ao ar, luz ou calor, o que tem limitado suas aplicações biológicas (WU et al., 2006).

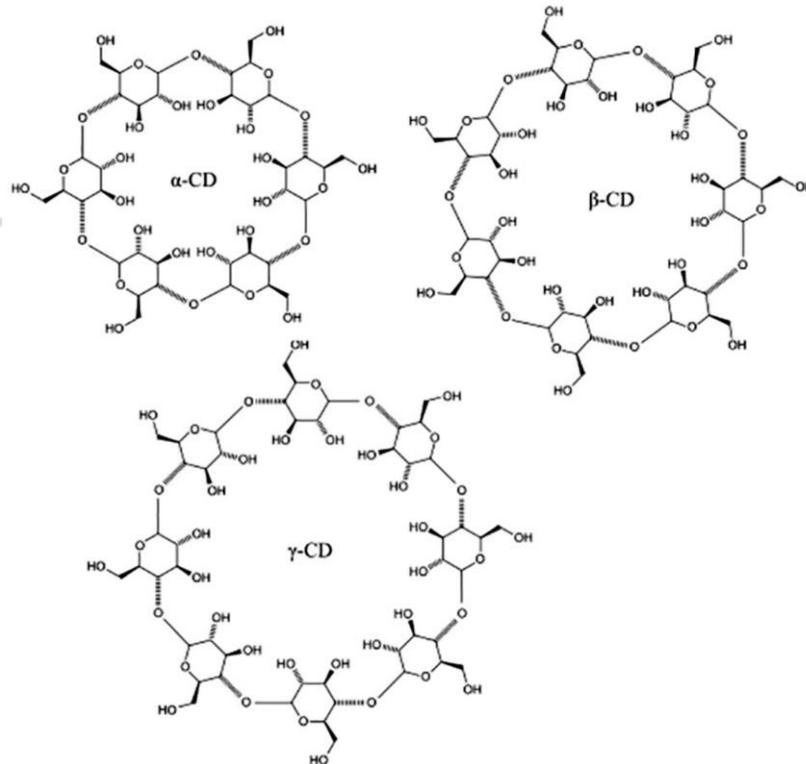
Uma forma de estabilização e uso desses óleos ou substâncias derivadas deles é pela sua inclusão em moléculas hospedeiras adequadas. Tem sido demonstrado que além de melhorar a solubilidade, a inclusão com ciclodextrinas (CDs) também reduz a volatilidade, oxidação e decomposição térmica, de modo que os seus campos de aplicação podem ser ampliados consideravelmente (AMANN; DRESSNANDT, 1993; WU; HUANG; QI, 2006).

3.4 Ciclodextrinas

A complexação com as ciclodextrinas melhora características farmacocinéticas de muitos bioprodutos. A propriedade mais notável das CD é a sua capacidade para modificar as características físico-químicas de moléculas que são acomodadas dentro de sua cavidade interna, formando um complexo de inclusão, aumentando a solubilidade da formulação, visto que, a incorporação permite que substâncias lipossolúveis sejam veiculadas em soluções aquosas. A complexação também é capaz de alterar a reatividade química e reduzindo a oxidação, sem alterar a capacidade da substância de atravessar as membranas biológicas (MENEZES et al., 2012).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos não tóxicos derivados da degradação enzimática do amido e constituídas por seis, sete ou oito unidades de glicoses unidas por ligações α 1,4 e chamadas de α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD) como mostra a figura 3. O encapsulamento em CDs é uma das tecnologias mais aplicadas nos sistemas de proteção e liberação controlada de substâncias e uma das principais estratégias para manter a integridade estrutural e atividades biológicas de moléculas ativas (CIOBANU et al., 2013; KURKOV; LOFTSSON, 2013; HĂDĂRUGĂ et al., 2014; REINECCIUS; YAN, 2016).

Figura 3 – Estrutura esquemática das ciclodextrinas



Fonte: Porte; Porte; Oliveira (2014)

Esses oligossacarídeos possuem forma estrutural semelhante a um cone truncado com uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interior hidrofóbica, permitindo que eles encapsulem substâncias e formem complexos de inclusão em solução e estado sólidos. A liberação desses componentes complexados pode ser influenciada por fatores ambientais específicos, como temperatura e umidade relativa (REINECCIUS; YAMAMOTO et al., 2012; YANG; XIAO; JI, 2015).

Dentre essas moléculas hospedeiras, beta-ciclodextrina (β -CD) é amplamente utilizada para melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de fármacos (SERAFINI et al., 2012).

A complexação com a β -CD é capaz de atenuar efeitos tóxicos, diminuir a citotoxicidade e elevar a DL50. Esses trabalhos também relatam que a formação do complexo de inclusão pode prolongar a duração e a potência das drogas e viabilizar o uso de doses menores, o que também contribui para a redução da toxicidade do complexo (KEMELBEKOV et al., 2010; LIMA et al., 2012).

Considerando o potencial promissor dos monoterpênicos, sobretudo do estragol, a justificativa desta proposta parte da dificuldade terapêutica da neuropatia, buscando descrever uma importante opção para o tratamento dessa condição

crônica, investigação da eficácia do estragol livre e complexado, tendo em vista o desenvolvimento efetivo e seguro de um fármaco para o tratamento dessas condições dolorosas.

REFERÊNCIAS

- ABASS, M. et al. Synergistic efficacy of tramadol and meloxicam on alleviation of pain and selected immunological variables after sciatic nerve ligation in rats. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 2, p. 14-0, 2014.
- ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, 2018.
- AMANN, M.; DRESSNANDT, G. Solving problems with cyclodextrins in cosmetics. **Cosmet Toilet**. v. 108, p. 90Y95, 1993.
- BAKKALI, F. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 446-75, 2008.
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009
- BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, p. 1557–93, 2013.
- BOHLIN, L. et al., Natural products in modern life science. **Phytochemistry Reviews**. v. 9, n.2, p. 279-301, 2010.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales**. Editora Acribia, Espanha. 2ª. ed. Parte 2,. p. 227-400, 2001.
- CASTRO, E. R.; NAVARRO, X. Chronic ibuprofen administration reduces neuropathic pain but does not exert neuroprotection after spinal cord injury in adult rats. **Exp Neurol**, v. 252, p. 95–03, 2014.
- CIOBANU, A. et al. Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers. **Food Chemistry**. v. 138, n. 1, p. 291-297, 2013.
- COSTIGAN, M., SCHOLZ, J., WOOLF, C.J. A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci Neuropathic pain**, v.32, p.1-32, 2009.
- COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.
- DE-SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233–2252, 2011.
- DOHMEIER, K. et al., Management Strategies for Chronic Pain. **Neuromodulation**. p: 575-585, 2018.

FINNERUP, N. B.; ATTAL, N.; HAROUTOUNIAN, S.; MCNICOL, S.; BARON, R.; et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 129-130, 2015.

GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.; QUINTANS JR, L.J. Monoterpenes with analgesic activity-a systematic review. **Phytother Res**, v. 27, p. 1–15, 2013.

GUSTAFSSON, H.; SANDIN, J. Oral pregabalin reverses cold allodynia in two distinct models of peripheral neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 605, p. 103–08, 2009.

HĂDĂRUGĂ, D. I.; HĂDĂRUGĂ, N. G.; COSTESCU, C. I.; DAVID, I.; GRUIA, A.T. Thermal and oxidative stability of the *Ocimum basilicum* L. Essential oil/ β -cyclodextrin supramolecular system. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, n.1, p. 2809–2820, 2014.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug Discovery in the genomics era. **Natural Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HASSLER, S. et al. Lipid peroxidation and protein oxidation products are key factors in central neuropathic pain after spinal cord injury. **J Pain**, v. 12, p. P34, 2011.

IASP. **IASP Terminology - IASP**.2017. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Neuropathicpain>>. Acesso em: 2 fev. 2018.

IKEDA, H. et al. Activation of spinal cannabinoid CB2 receptors inhibits neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetic mice. **Neuroscience**. v. 250, p. 446-454, 2013.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?, **PAIN**, v. 154, p. S10-S28, 2013.

JONGEN, J. L. M. et al. The Evidence for Pharmacologic Treatment of Neuropathic Cancer Pain: Beneficial and Adverse Effects. **J Pain Symptom Manage**, v. 46, p. 581–0, 2013.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KANEKO, K. et al. The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. **Neurosci Lett**, v. 562, p. 28-3, 2014.

KATZ, W.A.; BARKIN, R.L. Dilemmas in Chronic/persistent pain management. **Disease-a-Month**. v. 56, p. 233-241. 2010.

KEMELBEKOV, U. S. et al. Pharmacology and structures of the free base of the anaesthetic kazcaine and its complex with β -cyclodextrin. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, v. 68, p. 323–0, 2010.

KIM, Y. et al. Effect of NMDA NR2B antagonist on neuropathic pain in two spinal cord injury models. **PAIN**, v. 153, p. 1022-9, 2012.

KIRILLOVA, I. et al. Effect of local and intravenous lidocaine on ongoing activity in injured afferent nerve fibers. **PAIN**, v. 152, p. 1562-1, 2011

KLAUKE, A. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**. v. 24, n. 4, p. 608-620, 2014.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.1-12, 2008.

KOMIRISHETTY, P.; et al. Combination strategy of PARP inhibitor with antioxidant prevent bioenergetic deficits and inflammatory changes in CCI-induced neuropathy. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 137-147, 2017.

KRAYCHETE, D.C.; GOZZANI, J.L.; KRAYCHETE, A.C. Dor Neuropática – Aspectos Neuroquímicos. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 58, p. 492-05, 2008.

KUMAR, S. et al. Mitigation of pain and anaesthetic drugs. **OA Anaesthetics**, v. 2, p. 1-14, 2014.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n.1, p. 167–180, 2013.

KUSUDA, R. et al. Long-Term Antidepressant Treatment Inhibits Neuropathic Pain-Induced CREB and PLC γ -1 Phosphorylation in the Mouse Spinal Cord Dorsal Horn. **J Pain**, v. 14, p. 1162–72, 2013.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**. v. 4, p. 17-31, 2013.

LIM, T. K. et al. Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief. **PAIN**, v. 155, p. 954-67, 2014.

LIM, T. K. et al. Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief. **PAIN**, v. 155, p. 954-67, 2014.

LIMA, R.A.F. et al. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. **J Drug Target**, v. 20, p. 85–96, 2012.

LIOU, J. T.; LEE, C. M.; DAY, Y. J. The immune aspect in neuropathic pain: Role of chemokines. **Acta Anaesthesiol Taiwan**, v. 51, p. 127-32, 2013.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants for Specialty Industrial Materials. **Industrial Crops and Products**,v. 34, p. 785-801, 2011.

LUNDBERG, et al. Strategies to increase nitric oxide signaling in cardiovascular disease. **Nature Reviews**. v.14, p. 623-641, 2015.

MAO, Y. F.; et al. Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. **Brain Research**, v. 1248, p. 68-5, 2009.

MARTINS, C. et al. Estragole: A weak direct-acting food-borne genotoxin and potential carcinogen. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 747, p. 86-2, 2012.

MENEZES, P.P. et al. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochim Acta**, v. 548, p. 45-0, 2012.

MIKA, J. et al. Importance of glial activation in neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 716, p. 106-19, 2013.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur J Med Chem**, v. 46, p. 4769-07, 2011.

NARENJKAR, J. et al. The effect of the flavonoid quercetin on pain sensation in diabetic rats. **BCN**, v. 2, p. 51-7, 2011.

O-ARCINIEGA, M. et al. Anti-nociceptive synergism of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 92, p. 457-64, 2009.

PERÄKYLÄ, O., et al. Monoterpenes' oxidation capacity and rate over a boreal forest: temporal variation and connection to growth of newly formed particles. **Boreal Environment Research**. v.19, (suppl. B), p. 293-310. 2014.

PORTE, A.; PORTE, L.H.M.; OLIVEIRA, L.M. Chiral gas chromatography in the resolution of enantiomers involved in fruit flavours. **Química Nova** [online]. v. 37, n.10, p.1670-1679, 2014.

REINECCIUS, G. A.; YAN, C. Factors controlling the deterioration of spray dried flavourings and unsaturated lipids. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n.1, p. 5-21, 2016.

SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie**, v. 389, p. 237-243, 2004.

SERAFINI, M.R. et al. Interaction of p-cymene with cyclodextrin. **J Therm Anal Calorim**, v. 109, p. 951-5, 2012.

SMITH, B.H.; TORRANCE, N. Epidemiology of Neuropathic Pain and Its Impact on Quality of Life. **Current Pain and Headache Reports**. v. 16, n. 3, p: 191-198, 2012.

SMITH, M. et al. Preclinical Comparison of Mechanistically Different Antiseizure, Antinociceptive, and/or Antidepressant Drugs in a Battery of Rodent Models of Nociceptive and Neuropathic Pain. **Neurochemical Research**. v. 42, n. 7, p. 1995-2010, 2017.

STUBBLEFIELD, M. D. et al. NCCN task force report: management of neuropathy in cancer. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 7, p. S1-S28, 2009.

SUKHOTINSKY, I.; DEVOR, M. Chapter 23 – Networks for the Modulation of Acute and Chronic Pain. In: FAINGOLD, C., BLUMENFELD, H. **Neuronal Networks in Brain Function, CNS Disorders, and Therapeutics**, p. 311-326, 2014.

TENORIO, G.; KULKARNI, A.; KERR, B. J. Resident glial cell activation in response to perispinal inflammation leads to acute changes in nociceptive sensitivity: Implications for the generation of neuropathic pain. **Pain**, v. 154, n. 1, p. 71–81, 2013

TONON, J. et al. Anemia associated with extraerythrocytic oxidative stress damage mediated by neutrophil superoxide anion production in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis. **Pathophysiology**, v. 19, p. 261–268, 2012.

TRIVEDI, J. R.; SILVESTRI, N. J.; WOLFE, G. L. Treatment of Painful Peripheral Neuropathy. **Neurol Clin**, v. 31, p. 377–03, 2013.

TSANG, A. et al. Common chronic pain conditions in developed and developing countries: Gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders. **J Pain**, v. 9, p. 883-91, 2008.

VAN DAM, P. S. et al. Pathogenesis of diabetic neuropathy: Focus on neurovascular mechanisms. **Eur J Pharmacol**, p. 1-7, 2013.

VINCENZI M, D.E. et al. Constituents of aromatic plants: II Estragole. **Fitoterapia**, v. 71, p. 725-9, 2000.

VO, T.; RICE, A. S. C.; DWORKIN, R. H. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for neuropathic pain: How do we explain continued widespread use? **PAIN**, v. 143, p.169–71, 2009.

WINKLER, I, et al. Efficacy of antiepileptic tetramethylcyclopropyl analogues of valproic acid amides in a rat model of neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 1110–20, 2005.

WOOLF, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain, **PAIN**, v. 152, p. S2-S15, 2011.

WU C.J., et al. Promoting effect of natural borneol on the permeability of puerarin eye drops and timolol maleate eye drops through the cornea in vitro. **Pharmazie**, v. 61, p. 783–8, 2006.

WU, C. J.; HUANG, Q. W.; QI, H. Y. Promoting effect of natural borneol on the permeability of puerarin eye drops and timolol maleate eye drops through the cornea in vitro. **Die Pharmazie**, v. 61, p. 783–8, 2006.

XIAO, L. et al. Botulinum toxin type A reduces hyperalgesia and TRPV1 expression in rats with neuropathic pain. **Pain Med**, v. 14, p. 276-86, 2013.

ZANJANI, T. M. et al. The attenuation of pain behaviour and serum interleukin-6 concentration by nimesulide in a rat model of neuropathic pain. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 1, p. 229–34, 2010.

CAPÍTULO 1

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ESTRAGOL: UMA REVISÃO DE PATENTES

Periódico: *Expert Opinion on Therapeutic Patents*

Qualis A1 em biotecnologia

Fator de impacto: 3.041

Artigo submetido

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ESTRAGOL: UMA REVISÃO DE PATENTES

RESUMO

Os produtos naturais têm sido usados desde tempos antigos para o tratamento de muitas doenças. E dentre esses os óleos essenciais, que possuem os monoterpenos como principais componentes, têm sido amplamente utilizados por seus efeitos bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitários, inseticidas, medicinais e cosméticos. O estragol é um monoterpeneo constituinte natural de uma série de plantas aromáticas, ele têm sido utilizado em produtos alimentares como agentes aromatizantes. Na presente revisão, foram analisadas patentes utilizando o descritor “Estragol” a fim de relatar suas atividades biológicas. Com essas atividades descritas foram encontradas apenas 04 patentes na WIPO, 01 na EPO e nenhuma na USPTO e no INPI. Muitas patentes detalhavam propriedades onde o estragol era apenas um dos componentes do produto ou discutiam métodos de obtenção. Existem poucas patentes que descrevam a aplicação de atividades biológicas desse monoterpeneo, visto que muitas o trazem apenas como um componente secundário ou descrevem apenas seu processo de obtenção. Mas, entre as atividades apresentadas houve uma predominância do uso no combate a insetos, destacando sua ação repelente. Contudo, o monoterpeneo apresenta um potencial farmacológico promissor, mas existem poucas patentes a cerca da proteção do uso de suas atividades biológicas.

Palavras-chave: Estragol. Monoterpeneo. Repelente. Atividades biológicas.

DESTAQUES DO ARTIGO

- Existe uma escassez de proteções intelectuais que descrevam atividades biológicas do estragol.
- As patentes relacionadas ao estragol o descrevem apenas como um componente secundário ou enfatizam o processo de obtenção
- Os principais produtos que apresentam o estragol como componente principal buscam repelir insetos.

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, os produtos naturais têm sido usados desde tempos antigos para o tratamento de muitas doenças. As metodologias clássicas de química de produtos naturais permitiram descobrir metabólitos secundários bioativos de fontes terrestres e marinhas. Os avanços nas pesquisas com esses metabólitos contribuem para identificar potenciais novos fármacos que poderão vir a ajudar na manutenção da saúde e na luta contra diversas doenças (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Desde tempos imemoriais, os produtos naturais têm sido a espinha dorsal do sistema terapêutico tradicional em todo o globo terrestre. Embora o uso de produtos naturais bioativos como preparações de drogas à base de plantas remonta a centenas, mesmo milhares de anos atrás, mas sua aplicação como compostos isolados e caracterizados para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos modernos começou apenas no século XIX. Tem sido bem documentado que os produtos naturais desempenharam papéis críticos no desenvolvimento moderno de medicamentos (VEERESHAM, 2012).

Atualmente, o mecanismo de descoberta de fármacos opera em um ritmo acelerado. Os avanços essenciais nas tecnologias de separação e determinação de estrutura reduziram os obstáculos inerentes ao rastreamento de misturas estruturalmente complexas. A confluência dessas tecnologias com os avanços em genômica, engenharia metabólica e síntese química oferece ferramentas para explorar a notável diversidade química das "pequenas moléculas" da natureza na busca por novos medicamentos (SIDDIQUI et al., 2014).

Dentre esses produtos naturais os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados por seus efeitos bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitários, inseticidas, medicinais e cosméticos. Devido ao modo de extração, principalmente por destilação a partir de plantas aromáticas, eles contêm uma variedade de moléculas voláteis como terpenos e terpenóides, componentes aromáticos derivados de fenol e componentes alifáticos (BAKKALI et al., 2008).

Os monoterpenos são os principais componentes dos óleos essenciais, pertencem ao grupo dos isoprenóides contendo dez átomos de carbono. Sendo amplamente distribuídos no reino vegetal (KOZIOŁ et al., 2014).

O estragol é um constituinte natural de uma série de plantas e seus óleos essenciais têm sido amplamente utilizados em produtos alimentares como agentes aromatizantes (DE VINCENZI et al., 2000). É encontrado em diversas plantas aromáticas, incluindo *Pinus ponderosa* Lawson & C. Lawson (KEEFOVER-RING et al., 2016; RADWAN et al., 1982), *Artemisa dracunculus* L. (FROUSHANI et al., 2016; OBOLSKIY et al., 2011), *Ocimum basilicum* L. (MURÁRIKOVÁ et al., 2017), *Foeniculum vulgare* Mill. (GROSS et al., 2002; RATHER et al., 2016), *Agastache foeniculum* L. (EBADOLLAHI, 2011) e *Croton zehntneri* Pax et Hoffm (ANDRADE et al., 2015).

Os ensaios experimentais demonstraram que estragol possui atividades antioxidantes (MUNOZ-ACEVEDO; KOUZNETSOV; STASHENKO, 2009), anti-inflamatória (DE SOUZA SILVA-COMAR et al., 2014; PONTE et al., 2012; WIIRZLER et al., 2016), antimicrobiana (ANDRADE et al., 2015; SHAHAT et al., 2011) e antifúngica (FONTENELLE et al., 2011).

Considerando que o estragol é encontrado em muitas espécies de plantas que são utilizadas em produtos cosméticos e preparações farmacêuticas, bem como na indústria de alimentos, é importante revisar as aplicações biológicas desse monoterpeno. Assim, esta revisão de patentes busca analisar as aplicações comerciais e industriais do potencial profilático e terapêutico do estragol.

2 MÉTODOS

A presente revisão focaliza principalmente as patentes publicadas sobre as atividades biológicas do estragol e elas foram pesquisadas na Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO - *World Intellectual Property Organization*), no

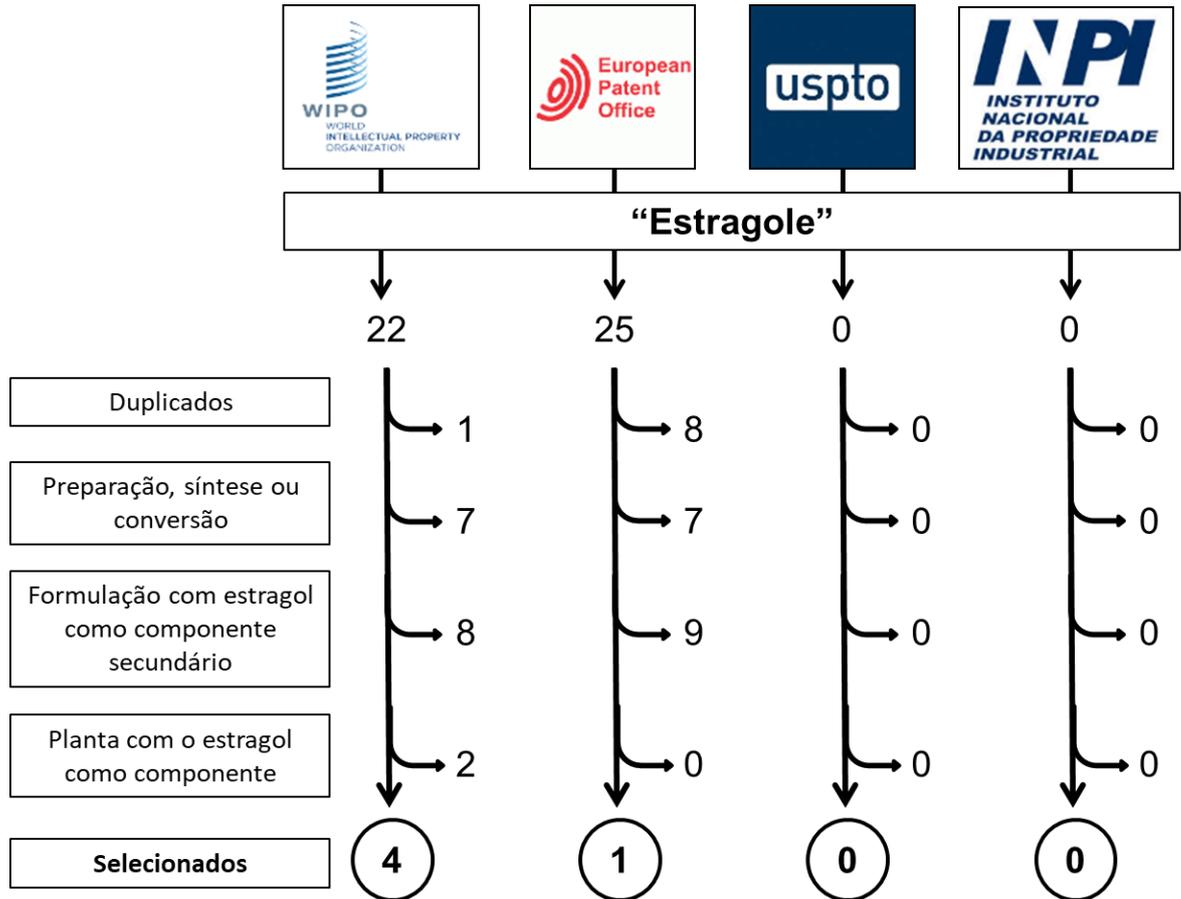
Escritório Europeu de Patentes (EPO - *European Patent Office*), no Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos (USPTO - *United States Patent and Trademark Office*) e na base brasileira do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). A pesquisa de patentes foi feita usando apenas a palavra-chave "estragole", visto que, quando essa foi associada às palavras-chave que faziam referência a atividades biológicas a quantidade de documentos encontrados reduziu drasticamente. Nas bases WIPO, EPO e USPTO o descritor de busca foi utilizado em inglês e apenas na base brasileira esse foi utilizado em português.

A seleção das patentes foi baseada nos seguintes critérios de inclusão: patentes publicadas contendo estragol no título ou resumo, estas foram analisadas a fim de verificar o uso do estragol. Não foram aplicados filtros de limite temporal em virtude da escassez de material.

Assim, na WIPO foram encontradas 22 patentes para avaliação preliminar, destas apenas 4 descreviam a proteção intelectual de alguma atividade biológica do monoterpeno, uma patente estava duplicada na própria base, 7 descreviam processos de preparação, síntese ou conversão, em 8 o estragol era apenas um coadjuvante de alguma formulação e em 2 havia a descrição do uso da atividade biológica de uma planta onde o estragol era apenas um componente da referida espécie, os demais foram excluídos por não descrever aplicabilidade do estragol.

A busca também foi realizada na EPO, onde foram encontradas 25 patentes para avaliação preliminar, dessas 8 estavam duplicadas em relação as patentes buscadas na base anterior, 7 descreviam processos de preparação, síntese ou conversão, em 9 o estragol era apenas um coadjuvante de alguma formulação e em apenas uma patente havia a descrição da alguma atividade biológica do estragol como componente principal. Na base americana e na brasileira não foram encontradas patentes com o estragol (figura 1).

Figura 1 – Fluxograma de busca, seleção e análise das patentes com estragol.



O fluxograma destaca a escassez de patentes com o monoterpeno, sobretudo quando se busca a descrição das proteções das suas atividades biológicas, desse modo, na discussão do trabalho foi dada uma ênfase especial às cinco patentes que descrevem essas atividades, entretanto considerando a relevância dos processos de obtenção e a importância do estragol como componentes de alguns produtos as principais patentes desses grupos também foram analisadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das patentes foi realizada a partir da observação das diferentes finalidades, onde inicialmente estão discutidas as patentes que descrevem a importância dos processos de obtenção do monoterpeno, e depois foram analisadas as patentes que descrevem a utilização do estragol com alguma aplicação biológica.

3.1 Extração, preparação ou conversão do estragol

A busca realizada mostrou que muitas patentes não descrevem as aplicações biológicas do estragol, mas buscam descrever métodos de obtenção do monoterpeno.

A patente (CN107098797) desenvolvida por Shaofan et al. descreve um método de extração do estragol a partir da Estrela-de-anis, *Illicium verum* Hook. F., destacando a simplicidade de obtenção, redução dos desgastes aos equipamentos utilizados e melhoria ambiental, devido à redução de aditivos utilizados que possam ser liberados na natureza, destacando assim a sustentabilidade do processo.

A *Illicium verum* Hook. F. (estrela de Anis chinesa ou anis estrelado) é uma árvore aromática da família *Illiciaceae* que tem sido usado há muito tempo na indústria chinesa de alimentos e medicamentos, possui entre seus constituintes numerosos compostos, incluindo sesquiterpenos, fenilpropanóides, lignanos, flavonoides, entre outros. Estudos farmacológicos demonstraram que seus extratos e compostos ativos possuem ações farmacológicas amplas, especialmente em atividades antimicrobianas, antioxidantes, inseticidas, analgésicas, sedativas e anticonvulsivantes (WANG et al., 2011). A patente (CN106350223) de Li Guojin também descreve um processo de extração do estragol.

Os terpenos compreendem um grande grupo de metabolitos naturais com muitas diferenças entre si. Os terpenos descobertos e isolados de plantas têm sido amplamente utilizados em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e em várias aplicações biotecnológicas. A capacidade de isolar e purificar essas moléculas das plantas é fundamental para elucidar suas possíveis aplicações. A extração de um terpenóide de forma eficiente e econômica geralmente requer um método mais detalhado e otimizado, visto a variedade da classe (JIANG; KEMPINSKI; CHAPPELL, 2017).

Além da extração, algumas invenções mostram a utilização do estragol como matéria-prima para a produção de outras substâncias, como as patentes (CN104311399 e CN103755533) que descrevem a transformação do estragol em trans-anetol e anetol, respectivamente. Segundo (APROTOSOAIE; COSTACHE; MIRON, 2016) o anetol é amplamente utilizado como agente de saborizante, e na indústria farmacêutica relatam ações tais como: anti-inflamatórios, anticancerígenos, antidiabéticos, imunomoduladores, neuroprotetores e antitrombóticos.

Os monoterpenos podem ser transformados em reações puramente químicas em poucas horas, as transformações iniciais envolvem a introdução de grupos funcionais, reações de oxidação e rearranjos moleculares catalisados por várias enzimas. Podem ocorrer fotólise, reações com oxigênio, ozônio, radicais hidroxila, átomos de cloro, biotransformações por microrganismos, entre outras, gerando diversos derivados (FU et al., 2009; MARMULLA; HARDER, 2014).

3.2 Preparações que contenham o estragol como adjuvante

A indústria alimentar também apresenta algumas invenções que possuem o estragol como um de seus componentes. Shinichi, Masahiro e Crianra, buscaram com sua invenção (10042826) obter uma pasta com sabor semelhante ao do Wasabi, um tempero utilizado na culinária japonesa, feito da planta *wasabia japônica*. Assim, os autores criaram uma pasta com diversos componentes onde o estragol e o anetol são um dos adjuvantes que contribuem na mimetização do sabor pleiteado.

Ainda na indústria alimentar, a Nestle possui a invenção (NZ523838) de 2004 de um alimento funcional a bases de óleo essencial para prevenção ou tratamento de infecção por microrganismos semelhantes ao *Helicobacter*, esse alimento funcional possui diversos componentes e o estragol é uma dessas substâncias em meio a dezenas do outros.

Alimentos funcionais são definidos como alimentos que têm efeitos fisiológicos positivos além da função nutricional. Muitos desses alimentos funcionais utilizam produtos naturais, como plantas, como matéria-prima pelo potencial terapêutico, trazendo proteção, principalmente, contra doenças crônicas ou infecciosas (LAJOLO, 2002; RIVERA; BOCANEGRA-GARCÍA; MONGE, 2010).

A patente (CN105362440) de Yanlei descreve uma formulação farmacêutica com baixos custos e fabricação simples utilizada para tratar infecções no couro cabeludo. Essa formulação apresenta agentes aromatizantes, tensoativos e antioxidantes, apresentando ação bactericida, desintoxicante, anti-inflamatória, capaz de melhorar a circulação, reduzir edema e secreções purulentas, combatendo as infecções. Nessa invenção o estragol também não faz parte dos componentes

principais da formulação, o monoterpeno aparece apenas como um dentre dezenas de componentes.

Já as invenções 2014136685, 2013126960, 1020020005393, WO/2002/001959 e CN105152877 descrevem o desenvolvimento de tecnologias utilizadas no controle e combate a insetos. Sobretudo, as patentes (2014136685 e 201312660) de Ayaka e colaboradores e Wang Qun descrevem invenções usadas como repelentes de traça de roupas e formigas, respectivamente, e em ambas o estragol aparece apenas como um componente da formulação.

A maioria das doenças infecciosas emergentes hoje é transmitida por insetos, assim os repelentes funcionam como importantes ferramentas de proteção a essas doenças (DIAZ, 2016), e existe uma gama bem variada de plantas com propriedades repelentes de insetos, a maioria delas são nativas dos trópicos. E os óleos essenciais extraídos dessas plantas demonstram atividade repelente de insetos, bem como, seus componentes ativos. Destacando, assim, o potencial promissor para o desenvolvimento de formulações que podem servir como possíveis biopesticidas naturais (TISGRATOG et al., 2016).

As duas patentes descritas a seguir apresentam a proteção intelectual do uso de algumas atividades biológicas das plantas *Agastache rugosa* F., *Foeniculum vulgare* M., *Humulus lupulus* L. e *Melissa officinalis* L. que possuem o estragol como um dos componentes dos óleos essenciais.

A tecnologia descrita pela patente (1020050094578) de Won refere-se a formulação de um agente antifúngico desenvolvido a partir do óleo de *Agastache rugosa* e cetoconazol como ingredientes ativos. Esse insumo farmacêutico apresenta uma excelente potência contra os fungos da família *Trichophyton*, podendo ser utilizado no tratamento de dermatites. O agente compreende compostos de óleo essencial de *Agastache rugosa* e cetoconazol em uma proporção de combinação em peso de 2000: 1 a 50: 1, e um dos principais componentes desse óleo é o estragol, que possui efeito sinérgico ao cetoconazol, destacando que a associação do cetoconazol ao óleo essencial melhora a eficácia da substância.

A invenção (1020060118201) de Byeong et al. também descreve o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica utilizada em afecções da pele. Os autores descrevem um cosmético capaz de reduzir a dilatação dos poros, feito a partir de extrato de *Foeniculum vulgare* Mill., *Humulus lupulus* L. e de *Melissa officinalis* L., em que a quantidade de três extratos de plantas é de 0,1-20,0% em

peso com base no peso total da composição. O estragol aparece na formulação no extrato de *Foeniculum vulgare* Mill., que contém, ainda, anetol e fenhone como componentes principais. Os autores destacam, ainda que a invenção é isenta de efeitos colaterais.

3.3 Preparações com o estragol entre os principais componentes

O quadro 1 sumariza as patentes selecionadas que possuem o estragol como um dos principais componentes da atividade biológica protegida. Os documentos estão organizados por ordem cronológica, o país e atividade biológica são apresentados.

Quadro 1: Patentes sobre atividades biológicas do estragol como um dos principais componentes.

Patente	Título	País	Atividade Biológica	Ano
1020020005393	Pesticide composition	KR – Republica da Coréia	Pesticida para traça de farinha indiana	2002
WO/2002/001959	Pesticide composition	WO - Mundial	Inseticida	2002
100701222	Cosmetic composition having itchness removal effect and skin moisturizing effect by comprising phytochemical such as maltol, beta-pinene, dl-menthone, 1-pulegone and d-limonene	KR – Republica da Coréia	Redução de caspas	2007
CN105152877	Preparation method for estragole and application of estragole	CN - China	Repelente de insetos	2015
1020150057762	Cosmetic composition containing estragole, oriental herb fragrance active ingredient, as ingredient effective for skin	KR – Republica da Coréia	Formulação cosmética para regeneração da pele, redução de rugas, antioxidante, anti-inflamatório e clareamento da pele.	2015

Os dados mostram um predomínio asiático nas patentes sobre as atividades biológicas do estragol, com destaque para a República da Coréia. Em relação às

atividades, o combate aos insetos é o principal uso dos produtos desenvolvidos e protegidos.

A patente (1020150057762) de Byun e colaboradores descrevem a utilização do estragol como componente principal de uma formulação cosmética que melhora as características da pele, estimulando a regeneração, redução das rugas e clareamento da pele, além da sua ação antioxidante e anti-inflamatória. A patente destaca que o estragol aumenta a quantidade total de colágeno de fibroblastos na pele, inibe a geração de óxido de nitrogênio (NO), inibindo a geração de radicais livres e reduz a quantidade total de melanina para proporcionar um efeito de clareamento da pele.

Os autores da invenção 100701222* descrevem o desenvolvimento de produto que combate as caspas, reduzindo sua formação e removendo as já formadas, além de possuir ação hidratante e ótima estabilidade que favorece seu armazenamento e comercialização. A composição cosmética possui maltol, beta-pineno, dl-menthone, 1-pulegone e d-limoneno como ingredientes principais, mas o produto possui, ainda, anetol, estragol ou fenchone.

Já as patentes 1020020005393 e WO/2002/001959 objetivam o combate aos insetos, e apresentam o estragol como um dos componentes ativos principais. A primeira invenção (1020020005393) contém ao menos uma das substâncias, como estragol, anetol e fenchone que são extraídos de *Foeniculi fructus*, eles têm um efeito de pesticida na traça de farinha indiana, *Lasioderma serricorne* (Fabricius), *Sitophilus oryzae* (L.) e *Callosobruchus chinensis* (L.) e são inofensivas para um corpo humano. Já a segunda (WO/2002/001959) também apresenta o estragol, anetol e fenchone como ativos principais, entretanto nesta invenção eles foram obtidos das sementes de erva-doce.

A invenção (CN105152877) de Wu Yan e colaboradores também descreve a utilização do estragol no combate aos insetos, entretanto nessa invenção o monoterpeno é o principal componente do produto descrito. O estragol é obtido do óleo verde de *Zanthoxylum*. A matéria-prima para o método é abundante e o processo de produção é simples e de baixo custo.

Os terpenos representam a classe mais diversificada de produtos naturais encontrados em plantas, com dezenas de milhares de estruturas relatadas. Além disso, possuem uma infinidade de aplicações farmacêuticas e industriais, mas os recursos naturais para sua extração são muitas vezes limitados e, em muitos casos,

as rotas sintéticas não são comercialmente viáveis. Entretanto algumas tecnologias buscam otimizar esses processos de obtenção (MARKUS LANGE; AHKAMI, 2013). A extração de um terpeno de forma eficiente e econômica geralmente requer um método mais específico e otimizado, que leve em consideração suas propriedades específicas (JIANG; KEMPINSKI; CHAPPELL, 2017).

O desenvolvimento de novas tecnologias revolucionou a triagem de produtos naturais na descoberta de novos medicamentos. A aplicação dessas tecnologias compensa as limitações inerentes aos produtos naturais e oferece uma oportunidade única para restabelecer os produtos naturais como fonte importante de descoberta de drogas (LAHLOU, 2013).

A característica mais marcante dos produtos naturais em sua relação com a descoberta de drogas é a sua diversidade estrutural que ainda está amplamente inexplorada. A revitalização dos produtos naturais está trazendo novos desafios em relação ao controle de qualidade e padronização, juntamente com a relação custo-eficácia. O interesse renovado no desenvolvimento de produtos naturais se deve, também, ao surgimento de técnicas modernas (VEERESHAM, 2012).

As patentes CN105152877, 1020020005393 e WO/2002/001959 destacam o uso dos monoterpeno no combate aos insetos, destacando o potencial desses grupos aromático como repelentes e mostrando uma importante ferramenta no controle desses problemas.

Os produtos naturais têm sido usados como pesticidas, fungicidas, herbicidas e inseticidas, entretanto devido à necessidade ainda presente, os produtos naturais continuam sendo fonte de inspiração para novas ferramentas para combater uma série de pragas de fungos, ervas daninhas e insetos. Esses desenvolvimentos representam uma oportunidade para a indústria farmacêutica e cosmeceutica (GERWICK; SPARKS, 2014).

Assim, poucas invenções especificamente com o estragol que descrevam suas atividades biológicas, das inúmeras patentes analisadas apenas cinco descreviam algum uso biológico, o que contrasta com a literatura que remete a diversas aplicações do monoterpeno. Portanto, a exploração do estragol ainda é um campo bastante vasto, que sugere que novos estudos ainda são necessários a fim de produzir tecnologia que possam aproximar o uso desse produto natural às necessidades da população.

4 CONCLUSÃO

Com essa análise observamos a escassez de produtos protegidos que possuem o estragol como componente bioativo principal, visto que a maioria das publicações destaca os processos de obtenção, síntese e extração do monoterpene. Algumas patentes descrevem as atividades biológicas de algumas plantas que possuem o estragol como componente, mas não imputam tal atividade diretamente ao monoterpene.

A investigação também destacou que entre as atividades biológicas apresentadas o combate aos insetos é o que tem gerado maior interesse dos pesquisadores. Contudo, essa prospecção evidencia que o campo de produção de tecnologia com o estragol ainda é bastante amplo, visto que a literatura descreve muitas atividades que podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de inúmeros produtos patenteáveis.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, T. C. B. et al. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *croton zehntneri* (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 173–182, 2015.
- APROTOSOAIE, A. C.; COSTACHE, I.-I.; MIRON, A. Anethole and Its Role in Chronic Diseases. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 929, p. 247–267, 2016.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- DE SOUZA SILVA-COMAR, F. M. et al. Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- DE VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 725–9, dez. 2000.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.
- DIAZ, J. H. Chemical and plant-based insect repellents: Efficacy, safety, and toxicity. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 27, n. 1, p. 153–163, 2016.

EBADOLLAHI, A. Chemical constituents and toxicity of. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. June, p. 212–217, 2011.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Alkylphenol activity against candida spp. and microsporum canis: A focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and o-methyl derivatives. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6422–6431, 2011.

FROUSHANI, S. M. A. et al. Estragole and methyl-eugenol-free extract of Artemisia dracunculus possesses immunomodulatory effects. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 6, n. 5, p. 526–534, 2016.

FU, P. et al. Isoprene, monoterpene, and sesquiterpene oxidation products in the high Arctic aerosols during late winter to early summer. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 11, p. 4022–8, 1 jun. 2009.

GERWICK, B. C.; SPARKS, T. C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. **Pest management science**, v. 70, n. 8, p. 1169–85, ago. 2014.

GROSS, M. et al. Biosynthesis of estragole and t-anethole in bitter fennel (Foeniculum vulgare Mill. var. vulgare) chemotypes. Changes in SAM:phenylpropene O-methyltransferase activities during development. **Plant Science**, v. 163, n. 5, p. 1047–1053, 2002.

JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. HHS Public Access. p. 345–358, 2017.

KEEFOVER-RING, K. et al. Rapid Induction of Multiple Terpenoid Groups by Ponderosa Pine in Response to Bark Beetle-Associated Fungi. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 1, p. 1–12, 2016.

KOZIOŁ, A. et al. An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1156–68, 2014.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 04, n. 03, p. 17–31, 2013.

LAJOLO, F. M. Functional foods: Latin American perspectives. **The British journal of nutrition**, v. 88 Suppl 2, p. S145-50, nov. 2002.

MARKUS LANGE, B.; AHKAMI, A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 2, p. 169–196, 2013.

MARMULLA, R.; HARDER, J. Microbial monoterpene transformations-a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JULY, p. 1–14, 2014.

MUNOZ-ACEVEDO, A.; KOUZNETSOV, V. V.; STASHENKO, E. E. Artículos Originales Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en. v. 41, n. 3, p. 287–294, 2009.

MURÁRIKOVÁ, A. et al. Characterization of Essential Oil Composition in Different

Basil Species and Pot Cultures by a GC-MS Method. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1221, 2017.

OBOLSKIY, D. et al. *Artemisia dracunculus* L.(tarragon): a critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11367–11384, 2011.

PONTE, E. L. et al. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 4, p. 984–990, 2012.

RADWAN, M. A. et al. Terpenes of ponderosa pine and feeding preferences by pocket gophers. **Journal of chemical ecology**, v. 8, n. 1, p. 241–53, jan. 1982.

RATHER, M. A. et al. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1574–S1583, 2016.

RIVERA, G.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; MONGE, A. Traditional plants as source of functional foods: A review. **CYTA - Journal of Food**, v. 8, n. 2, p. 159–167, 2010.

SHAHAT, A. A. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1366–1377, 2011.

SIDDIQUI, A. A. et al. Role of natural products in drug discovery process. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 6, n. 2, p. 172–204, 2014.

TISGRATOG, R. et al. Plants traditionally used as mosquito repellents and the implication for their use in vector control. **Acta Tropica**, v. 157, p. 136–144, 2016.

VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 4, p. 200, 2012.

WANG, G. W. et al. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 10–20, 2011.

WIIRZLER, L. A. M. et al. Evaluation of Anti-inflammatory Activity of Estragole by Modulation of Eicosanoids Production. **International Journal of Pharma And Chemical Research**, v. 2, n. 1, p. 7–13, 2016.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO MONOTERPENO ESTRAGOL

Artigo a ser submetido

AValiação Toxicológica do Monoterpeno Estragol

RESUMO

O estragol é utilizado pela indústria alimentícia como agente aromatizante, e apresenta, ainda, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica e antioxidante. Os produtos naturais se destacam como importante fonte de substâncias com potencial farmacológico. No entanto, alguns produtos podem ser tóxicos para seres humanos. Nesse sentido, destaca-se a importância de compreender a toxicidade do estragol, visto que, a literatura ainda carece de estudos com evidências suficientes sobre o perfil de segurança da administração do monoterpeno. Assim, o presente trabalho buscou investigar a toxicidade pré-clínica do estragol em um sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo e em modelos animais. Desse modo, foi realizada a avaliação oxidativa, antioxidante, de prevenção e reparo de danos ao DNA nuclear e mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae* e o teste de toxicidade aguda em modelos animais. Os resultados mostraram que o estragol (3, 6 e 60 mg/mL) não provoca danos celulares, significativos, compatíveis com efeitos tóxicos, destacando assim a segurança terapêutica no uso agudo do monoterpeno. A investigação da toxicidade aguda com a administração oral de 2000 mg/kg não demonstrou alterações em massa de órgãos, parâmetros bioquímicos e testes comportamentais. Sugerindo assim, que o uso agudo do monoterpeno nas doses e concentrações investigadas não provocam danos celulares significativos, compatíveis com toxicidade.

Palavras-chave: Monoterpeno. Estragol. Toxicidade.

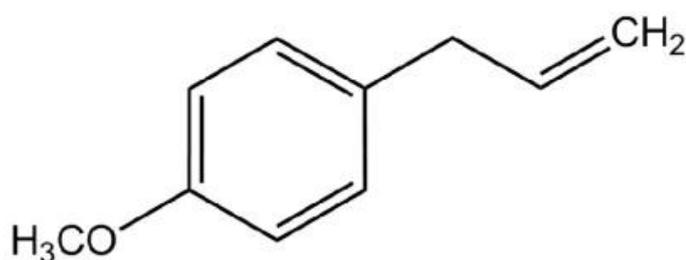
1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais comprovaram historicamente seu valor como fonte de moléculas com potencial terapêutico e, hoje em dia, ainda representam importante fonte para a identificação de novos fitoconstituintes com potencial farmacológico. Nas últimas décadas, a indústria farmacêutica tem direcionado muitos esforços a descoberta de medicamentos. No entanto, ao mesmo tempo, tem havido uma tendência decrescente no número de novos fármacos drogas que chegam ao mercado, gerando uma renovação do interesse científico nas fontes naturais (ATANASOV et al., 2015).

As plantas medicinais aromáticas possuem óleos essenciais, que são misturas complexas de metabólitos com elevada volatilidade, bastante utilizadas pela indústria farmacêutica. Os terpenóides são os constituintes mais abundantes dos óleos essenciais, estão presentes como hemiterpenos, monoterpenos, ou sesquiterpenos e como seus derivados. Os monoterpenos são os constituintes mais representativos dos óleos essenciais, e possuem várias atividades farmacológicas descritas, como anti-inflamatória, antidepressiva e anticonvulsivante, dentre outras (BAKKALI et al., 2008).

O Estragol (figura 1) é um monoterpeno encontrado em diversas plantas aromáticas, incluindo o pinheiro ponderosa (*Pinus ponderosa* L. e C.) (KEEFOVER-RING et al., 2016; RADWAN et al., 1982), estragão (*Artemisa dracuncululus* L.) (FROUSHANI et al., 2016; OBOLSKIY et al., 2011), manjerição doce (*Ocimum basilicum* L.) (MURÁRIKOVÁ et al., 2017), funcho doce (*Foeniculum vulgare* M.) (GROSS et al., 2002; RATHER et al., 2016), Hissopo aniz (*Agastache foeniculum* M.) (EBADOLLAHI, 2011) e canelinha (*Croton zehntneri* P. e H.) (ANDRADE et al., 2015).

Figura 1 – estrutura química do estragol



Esse monoterpene é utilizado pela indústria alimentícia como agente aromatizante (VINCENZI et al., 2000). Como atividades farmacológicas apresenta ação anti-inflamatória (PONTE et al., 2012; SILVA-COMAR et al., 2014; WIIRZLER et al., 2016), antimicrobiana (SHAHAT et al., 2011; ANDRADE et al., 2015) antifúngica (FONTENELLE et al., 2011) e antioxidante (MUÑOZ-ACEVEDO; KOUZNETSOV; STASHENKO, 2009).

As plantas apresentam diferentes mecanismos de proteção sob condições desfavoráveis, como ataque de uma variedade de microrganismos patogênicos e herbívoros, bem como diferentes estresses abióticos na natureza, o principal desses mecanismos é a produção de metabólitos secundários (SAHEBI et al., 2017). Entre esses metabólitos destacam-se os monoterpenos possuem características individuais que os diferem em sua toxicidade contra diferentes herbívoros e patógenos, de tal forma que esses funcionam como agentes repelentes ou danosos contra os estressores, como: insetos, patógenos, entre outros (REID; SEKHON; LAFRAMBOISE, 2017; WHITEHEAD; BOWERS, 2014).

Produtos naturais geralmente apresentam atividade farmacológica ou biológica. No entanto, alguns produtos podem ser tóxicos para seres humanos, insetos, etc. Assim, os produtos naturais podem mostrar papéis duplos, dependendo dos alvos aos quais são direcionados. A toxicidade dos produtos naturais contra células neoplásicas, vírus, ou bactérias são pretendidas, entretanto, nas demais situações terapêuticas essa citotoxicidade deve ser minimizada (MARTINEZ-MAYORGA et al., 2017).

Nesse sentido, destaca-se a importância de compreender a toxicidade do estragol, visto que, a literatura ainda carece de estudos com evidências suficientes sobre o perfil de segurança da administração desse monoterpene. Contudo o presente trabalho busca investigar a toxicidade pré-clínica do estragol em um sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo e em modelos animais

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção do estragol

O estragol foi fornecido pelo Prof. Dr. Sydney Gonçalo de Lima do Laboratório de Geoquímica Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

2.2 Avaliação oxidativa, antioxidante, de prevenção e reparo de danos oxidativos ao DNA nuclear e mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*

Foram utilizadas seis linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes para as enzimas superóxido dismutase nuclear e mitocondrial e catalase.

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no ensaio de atividade antioxidante com seus genótipos relevantes estão apresentadas na tabela 1. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene *SOD1*), enquanto a EG110 apresenta mutação na *SOD* mitocondrial (MnSOD - produto do gene *SOD2*); EG133 é o duplo mutante defectivo para *SOD1* e *SOD2*; a linhagem EG223 é defectiva na enzima catalase (*CAT1*); a EG é o duplo mutante defectivo para *SOD1* e *CAT1*; e EG103 corresponde à linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas.

Tabela 1. Descrição das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (SOD1 Δ)	sod1::URA3 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (SOD2 Δ)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (SOD1 Δ SOD2 Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1 Δ)	EG103, except cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (SOD1 Δ Cat1 Δ)	EG103, except sod1:: URA3 and cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

Essas culturas de *S. cerevisiae* foram submetidas a diferentes tratamentos e concentrações para verificar a toxicidade a nível celular e contribuir com a compreensão de mecanismos moleculares do estragol. Os diferentes esquemas de tratamento estão apresentados na tabela 2, nesse ensaio utilizou-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como controle positivo e solução salina (NaCl 0,9%) como controle negativo.

Tabela 2. Protocolo experimental em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

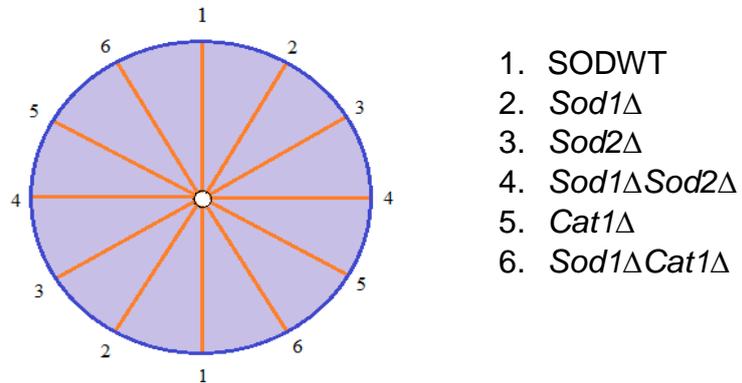
Tratamento	Possível mecanismo	Procedimento
Pré-tratamento	Reação intracelular	Adição de 10 μ L de estragol a 3, 6, 60 mg/mL com exposição por 3 horas e logo após adição de 10 μ L H_2O_2 a 10 mMol por mais 2 horas e incubação em estufa por 72h.
Co-tratamento	Reação Extracelular	Adição central de 10 μ L de estragol a 3, 6, 60 mg/mL + adição de 10 μ L H_2O_2 a 10 mMol por 3 horas seguidos de incubação em estufa por 72h.
Pós-Tratamento	Atividade de reparo	Exposição por 3 horas em 10 μ L de H_2O_2 a 10 mMol seguida de exposição por 3 horas com 10 μ L de estragol a 3, 6, 60 mg/mL e incubação por 72 h
Controle Positivo	H_2O_2 (10mMol)	10 μ L de H_2O_2 a 10 mMol no disco central e incubação em estufa por 72 h.
Controle Negativo	Solução salina 0,9%	10 μ L de solução salina a 0,9% no disco centra e incubação em estufa por 72 h.

Legenda: Est - Estragol

As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glicose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária (OLIVEIRA et al., 2014).

Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um ciclo contínuo, como mostra a figura 2, para ambos os lados da placa, contendo no centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foi adicionado 100 μ L das concentrações do monoterpeno.

Figura 2. Posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae*.



Após 48h de incubação em estufa à 30°C, os halos de inibição de crescimento das linhagens foram mensurados, sendo estes resultados tabelados e submetidos a tratamento estatístico. A inibição do crescimento leveduriforme foi medida em milímetros desde a margem do disco de papel-filtro até o início do crescimento celular. Os valores podem variar de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), que corresponde à medida do raio da placa de Petri. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

2.3 Determinação da toxicidade aguda em modelos animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos, fêmeas, da linhagem *Swiss*, pesando 25-35 g (n=5), obtidos do Biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí e os experimentos foram conduzidos no mesmo núcleo, onde foram mantidos à temperatura de 24 ± 1 °C e ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum* e foram colocados em jejum de 12h antes da administração oral do estragol.

Os procedimentos referentes à eutanásia foram realizados por overdose de anestésico geral (tiopental sódico, 100 mg/kg, por via intraperitoneal) em conformidade com o parágrafo 1º. do Art. 14 da Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, atualizada por RN 37 de 22/02/2018 do CONCEA. Os procedimentos foram realizados sob a responsabilidade técnica da médica veterinária da equipe, Adeline de Andrade Carvalho, CRMV-PI Nº 866.

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais como modelo experimental foram realizados segundo as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais – CEEA/UFPI sob o protocolo Nº 082/14.

A avaliação toxicológica do estragol foi realizada pelo método de dose fixa, recomendado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), nº 420 (OECD, 2001). Os animais foram distribuídos em dois grupos de cinco animais cada; um grupo teste foi tratado oralmente com estragol na dose de 2000 mg/kg e um grupo controle tratado oralmente com solução de água destilada e Tween 80 a 2% (grupo veículo). Imediatamente após a administração, alguns parâmetros comportamentais foram avaliados durante as primeiras quatro horas, como recomendado pelo protocolo de reconhecimento e de avaliação de sinais clínicos da OECD. Após isso as avaliações foram realizadas, diariamente, por mais 14 dias e ao final foram eutanasiados para mensuração do peso relativo dos órgãos internos e dosagem de parâmetros bioquímicos.

Os parâmetros analisados foram atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, contorção, reflexo ao endireitamento, tônus muscular, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimejamento, ptose palpebral, micção, evacuações, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte. A intensidade, duração e a progressão dos mesmos foram registrados, tabulando-as numa escala de 0 a 4 (ausente - 0, raro - 1, pouco - 2, moderado - 3, intenso - 4), para posterior análise.

O peso de cada animal foi determinado no primeiro, sétimo e décimo quarto dia. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e o sangue foi coletado para análise bioquímica (Alanina transferase; aspartato aminotransferase; ureia; creatinina) e a retirada de órgãos para a observação e mensuração do peso relativo.

O sangue foi acondicionado em tubo sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 RPM durante 5 minutos e, em seguida, realizada as dosagens. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 400 com kits comerciais da LABTEST®.

2.4 Análise Estatística

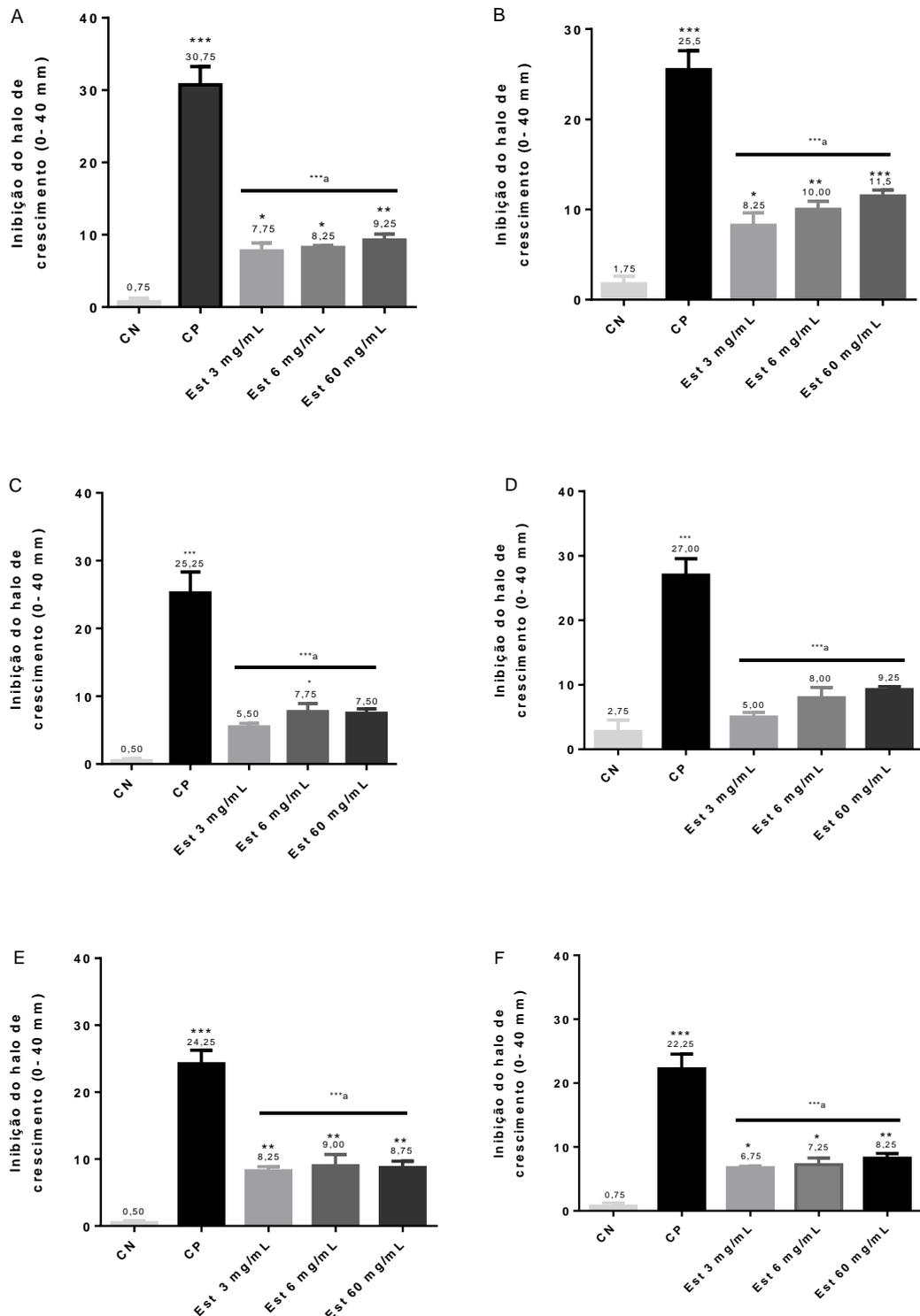
Foram utilizados, quando necessário, os testes “*t* de *Student*”, para as análises entre dois grupos, e análise de variância uma via (ANOVA) seguida do Teste de Tukey ou Bonferroni para avaliar a significância das diferenças entre as médias. Os valores foram considerados significativamente diferentes para o valor de $p < 0,05$. Em todos estes procedimentos, foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* versão 6.0.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação oxidativa, antioxidante, de prevenção e reparo de danos oxidativos ao DNA nuclear e mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*

A figura 3 apresenta o efeito protetor do estragol em diferentes concentrações (3, 6 e 60 mg/mL) frente a danos oxidativos. Essas concentrações foram escolhidas por serem compatíveis às utilizadas em testes *in vivo* (3 e 6 mg/mL) de avaliação da atividade biológicas e uma concentração maior (60 mg/mL), que é a relativa a dose de investigação da toxicidade aguda em roedores.

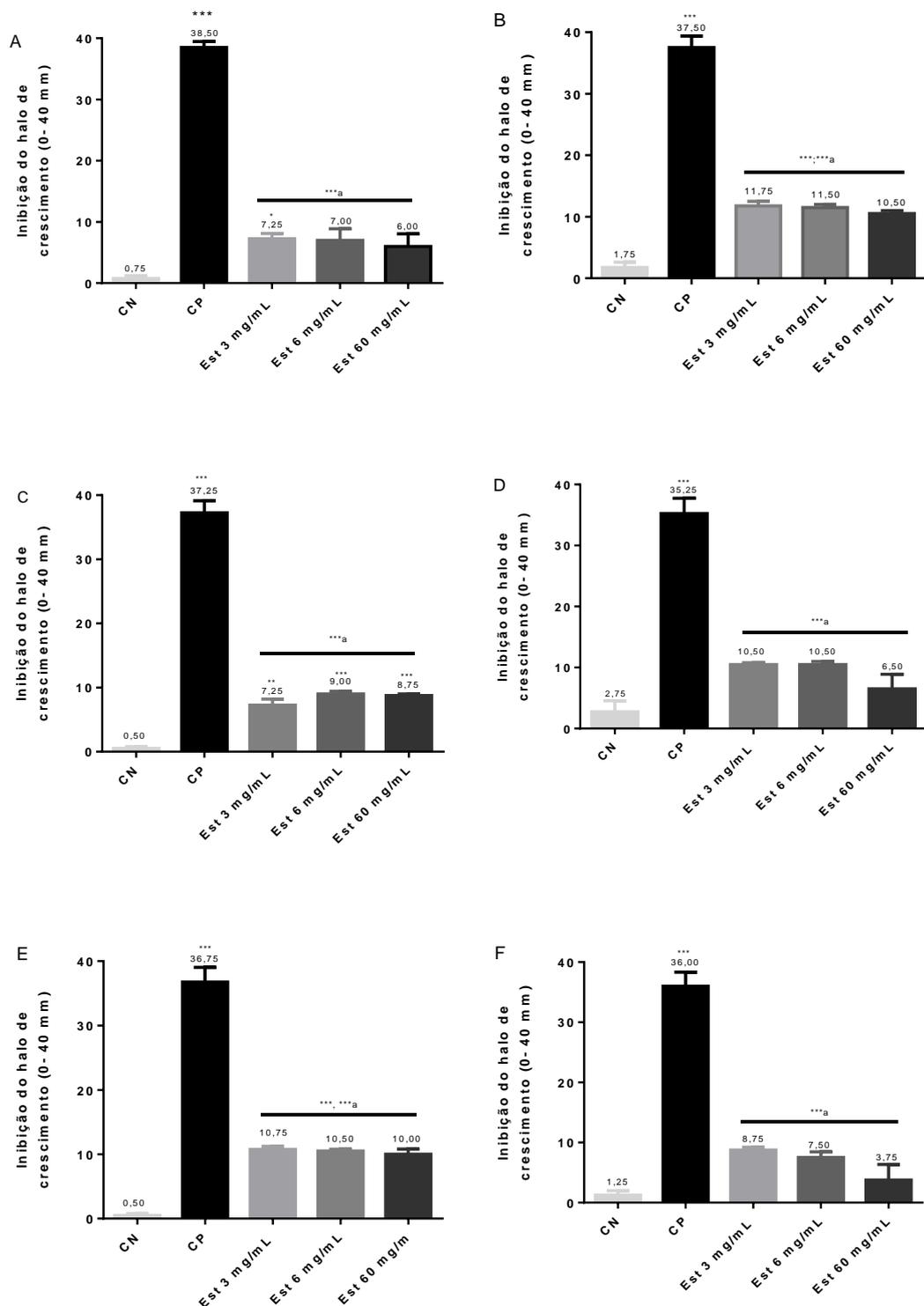
Figura 3 Perfil de proteção do estragol frente aos danos oxidativos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*



Os dados apresentam média e erro padrão da média da inibição do halo de crescimento (0 – 40 mm) do pré-tratamento com estragol (Est) frente aos danos oxidativos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: SODWT (A); SOD1Δ (B); SOD2Δ (C); SOD1ΔSOD2Δ (D); Cat1Δ (E); SOD1ΔCat1Δ (F). CN (controle negativo-solução salina 0,9% e CP- H₂O₂ (10 mM). ANOVA uma via com pôs teste de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 significância em relação ao CN. ***a p<0,001 significância em relação ao CP.

O pré-tratamento com estragol nas concentrações testadas protegeu a linhagens SOWT, Δ SOD1, SOD2 Δ , SOD1 Δ SOD2 Δ , Cat1 Δ e SOD1 Δ Cat1 Δ da oxidação do DNA das linhagens pelo H₂O₂. Assim, os dados indicam que o monoterpeno possui ação protetora contra danos oxidativos. A figura 4 apresenta o efeito antioxidante do estragol no co-tratamento.

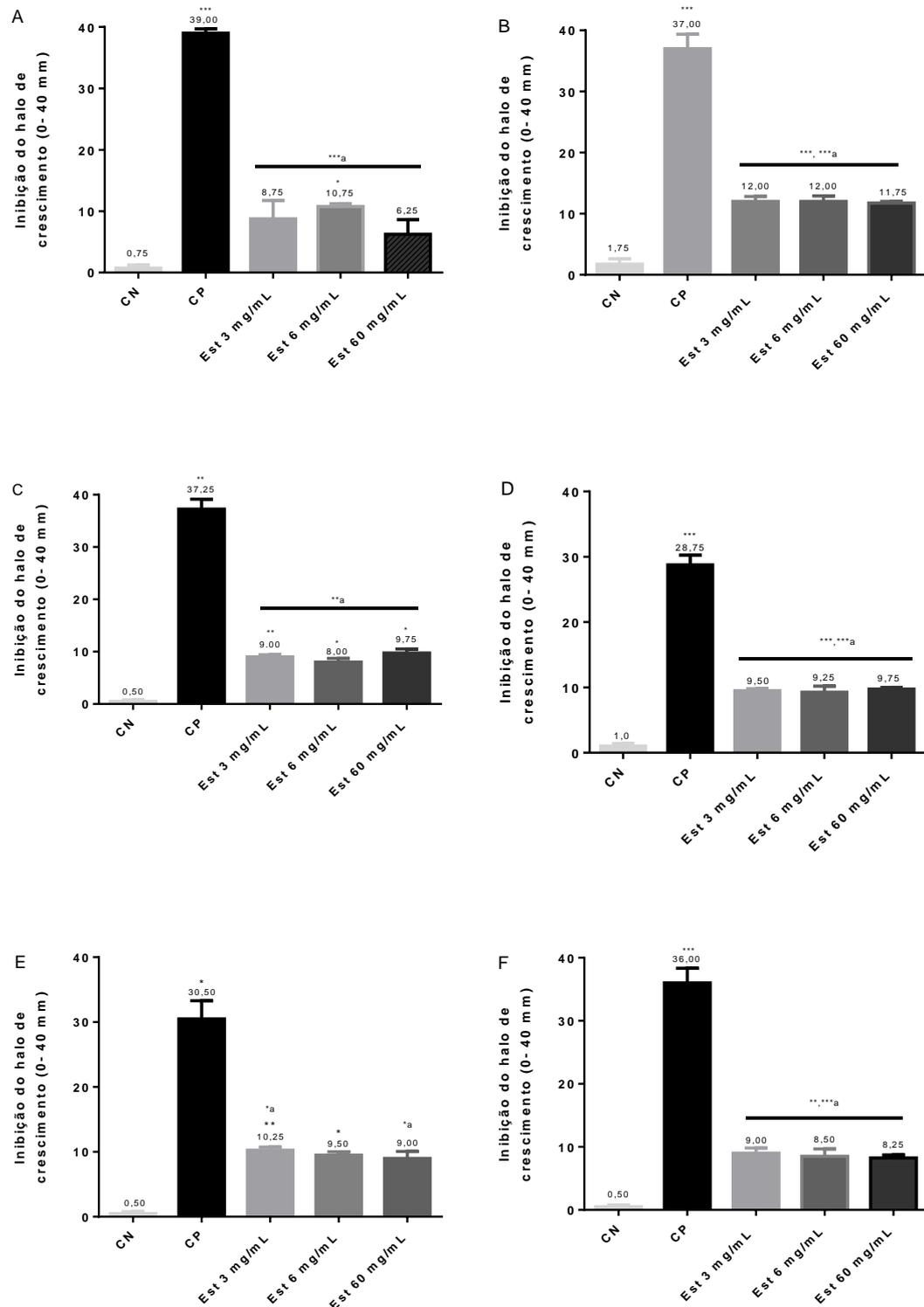
Figura 4 Perfil antioxidante do estragol frente aos danos oxidativos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*



Os dados apresentam media e erro padrão da média da inibição do halo de crescimento (0 – 40 mm) do co-tratamento com estragol (Est) frente aos danos oxidativos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: SODWT (**A**); SOD1Δ (**B**); SOD2Δ (**C**); SOD1ΔSOD2Δ (**D**); Cat1Δ (**E**); SOD1ΔCat1Δ (**F**). CN (controle negativo-solução salina 0,9% e CP- H₂O₂ (10 mM). ANOVA uma via com pós teste de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 significância em relação ao CN. ***a p<0,001 significância em relação ao CP.

O co-tratamento com estragol evidencia sua ação antioxidante diante dos danos provocados pelo H_2O_2 nas linhagens SOWT, $\Delta SOD1$, $SOD2\Delta$, $SOD1\Delta SOD2\Delta$, $Cat1\Delta$ e $SOD1\Delta Cat1\Delta$. Assim, os dados indicam que o monoterpene possui ação protetora contra danos oxidativos. A figura 5 apresenta o efeito antioxidante do estragol no co-tratamento. A figura 5 apresenta a avaliação das ações de reparo do estragol.

Figura 5 Perfil das ações de reparo do estragol frente aos danos oxidativos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*



Os dados apresentam media e erro padrão da média da inibição do halo de crescimento (0 – 40 mm) do pós-tratamento com estragol (Est) frente aos danos oxidativos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: SODWT (A); SOD1Δ (B); SOD2Δ (C); SOD1ΔSOD2Δ (D); Cat1Δ (E); SOD1ΔCat1Δ (F). CN (controle negativo-solução salina 0,9% e CP- H₂O₂ (10 mMol). ANOVA uma via com pós teste de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 significância em relação ao CN. ***a p<0,001 significância em relação ao CP.

O pós-tratamento destaca que o monoterpeno também apresenta ação de reparo frente a danos já causados por agentes oxidantes, visto que reduziu significativamente o halo de inibição das linhagens investigadas.

3.2 Avaliação da toxicidade aguda em camundongos

A avaliação dos potenciais efeitos tóxicos também foi realizada em modelos animais com uma dose única (2000 mg/kg, v.o.) como mostra a tabela 3

Tabela 3: Parâmetros clínicos-comportamentais da análise da toxicidade aguda do estragol (2000 mg/kg, v.o).

Atividade farmacológica	Tempo (min.)				
	30	60	120	180	240
ESTIMULANTE					
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
DEPRESSOR					
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Perda do reflexo palpebral	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO					
Diarreia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Lacrimajamento	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
OUTROS COMPORTAMENTOS					
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	0	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0

Os resultados evidenciam que não houve nenhum sinal de toxicidade clínica-comportamental nas primeiras horas de observação, bem como nos 14 dias seguintes de observação (dados não mostrados), além disso, nenhuma morte foi observada durante os 14 dias de avaliação. Ao final desse período foram mensurados alguns parâmetros bioquímicos, onde também não foram observadas alterações, significativas, provocadas pela administração do monoterpeno em relação ao grupo veículo (água destilada + tween 80 a 2%) (tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos tratados com o estragol (2000 mg/kg, v.o.).

Parâmetros bioquímicos	Veículo			Estragol		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
ALT (U/L)	44,00	4,19	5	48,98	4,21	5
AST (U/L)	96,33	8,61	5	99,42	7,02	5
Creatinina (mg/dL)	0,21	0,04	5	0,18	0,02	5
Ureia (mg/dL)	47,33	6,85	5	55,18	5,32	5

Os números representam a média e o erro padrão da média. A análise estatística foi determinada pelo teste *t* de *student* não-paramétrico. EPM: erro padrão da média. n: número de animais. ALT- alanina transferase; AST- aspartato aminotransferase; mg/dL: miligrama por decilitro, UI/L: Unidades internacionais por litro.

Esses dados mostram que o estragol, na dose utilizada, não alterou parâmetros de danos hepáticos (AST e ALT) ou renais (creatinina e ureia). A tabela 5 apresenta o peso relativo dos órgãos dos animais, onde o estragol não provocou alterações significativas em relação ao controle.

Tabela 5: Avaliação do peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com o estragol (2000 mg/kg, vo.).

Órgãos Internos (mg/10g)	Veículo			Estragol		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
Fígado	364,39	14,45	5	343,39	7,86	5
Baço	29,50	3,02	5	31,69	3,91	5
Coração	40,26	1,54	5	36,52	1,33	5
Rins	102,38	3,66	5	103,06	2,54	5
Pulmões	60,81	3,04	5	53,34	5,75	5

Os números representam a média e o erro padrão da média do peso relativo em miligramas para cada 10 g de peso corporal do animal. EPM: erro padrão da média. n: número de animais.

4 DISCUSSÃO

O interesse público em terapias naturais aumentou significativamente nas últimas décadas. Produtos à base de plantas são amplamente consumidos em todo o mundo e geralmente são considerados seguros. No entanto, isso nem sempre é verdade, pois muitos danos, como casos de lesão hepática induzida por produtos naturais são relatados a cada ano (ZÁRYBNICKÝ et al., 2018).

A natureza química e a dose de um determinado medicamento não são os únicos fatores determinantes da lesão celular. Outros fatores, como o perfil de expressão gênica de um indivíduo, o status antioxidante e a capacidade de regeneração também são cruciais. Vários mecanismos estão envolvidos no início dos danos às células e agravam os processos de lesão em curso. A disfunção de organelas celulares vitais resulta em comprometimento do equilíbrio dinâmico na condição homeostática, resultando em estresse oxidativo intracelular com formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SINGH; CHO; UPADHYAY, 2016).

Espécies reativas de oxigênio são um subproduto do metabolismo normal e têm papel fundamental na sinalização celular e homeostase. Existem mecanismos que regulam os níveis celulares das EROs, visto que , o excesso pode causar danos aos principais componentes celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios. Quando a capacidade antioxidante celular é excedida, pode ocorrer estresse oxidativo. Efeitos deletérios pleiotrópicos do estresse oxidativo são observados em diversas patologias e também, estão implicados em uma variedade de toxicidades induzidas por fármacos. A contribuição da compreensão do estresse oxidativo para delineamento do perfil de segurança emergente das novas substâncias é imprescindível (DEAVALL et al., 2012).

Um dos modelos fundamentais para a avaliação e caracterização da morte celular e danos oxidativos é através dos testes com *Saccharomyces cerevisiae*, que se mostra como um sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativos que o destaca como um dos mais utilizados em testes biológicos (CASTRO et al., 2011). A maquinaria apoptótica nuclear é bastante conservada neste organismo e o metabolismo é similar ao dos eucariotos superiores, com mecanismos apropriados de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias. A avaliação da capacidade

antioxidante pode ser realizada pela medida da sobrevivência de células tratadas com antioxidantes e agentes estressores (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

Nesse modelo, os resultados sugerem que o estragol, nas concentrações utilizadas, não provocou danos oxidativos ao DNA citoplasmático ou mitocondrial, visto que, as três concentrações investigadas reduziram significativamente os danos quando comparadas ao peróxido de hidrogênio. Assim, nem a dose mais elevada provocou dano toxicogenético nesse modelo.

A maioria dos terpenos entra facilmente no corpo humano por absorção oral, penetração através da pele ou inalação, levando a concentrações sanguíneas mensuráveis. Estudos mostraram que alguns monoterpenos (pulegona, mentofurano, cânfora e limoneno) e sesquiterpenos (zederone, germacrone) apresentaram toxicidade hepática, baseada principalmente na formação de metabólitos reativos, aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio e defesa antioxidante prejudicada (ZÁRYBNICKÝ et al., 2018).

O estudo de Caldas et al., (2016) investigou a toxicidade pré-clínica do monoterpeno 1,8-cineol, em doses repetidas (100, 500 ou 1000 mg/kg) durante 50 dias e verificou que o monoterpeno não provocou mortes, mas afetou o ganho de peso corporal durante a primeira semana de tratamento e alterações discretas nos perfis hematológicos e bioquímicos, elevando o número de plaquetas e ureia, reduzindo a concentração de hemoglobina corpuscular média e fosfatase alcalina. A análise histopatológica mostrou alterações discretas nos pulmões, fígado, rins e útero, contudo os autores destacam que o tratamento crônico mostrou alterações ocasionais em ratos de ambos os sexos.

Em relação a toxicidade aguda do estragol a administração única na dose de 2000 mg/kg por via oral não provocou alterações comportamentais, bem como alterações no peso dos órgãos internos ou dos parâmetros bioquímicos analisados.

Entretanto, na literatura há relatos da toxicidade desse monoterpeno. A administração oral, em ratos transgênicos (*delta gtp*), de 300 mg/kg de por quatro semanas induziu a proliferação celular e mutações genéticas (ISHII et al., 2017), toda via, Ding et al., (2015) sugerem que o estragol provoque danos ao DNA de células hepáticas apenas em doses maiores (600 e 1000 mg/kg) (DING et al., 2015). Dessa forma, o estragol tem sido associado a efeitos carcinogênicos, entretanto não possui ação carcinogênica direta. O metabolismo do estragol forma algumas moléculas instáveis com potencial para danificar o DNA (efeito genotóxico) e induzir

a formação de tumores. Os resultados de um estudo *in vitro* mostram que é pequena a probabilidade da formação dos metabólitos ativos do estragol que danificam diretamente o DNA em humanos e, conseqüentemente, o risco de alguma ação como carcinógeno é baixa (OBOLSKIY et al., 2011; PUNT et al., 2009).

Compreender os efeitos tóxicos é de suma importância para o estudo de substâncias com potencial terapêutico, visto que, a viabilidade do uso da substância depende da compreensão dos efeitos danosos que esta poderia vir a provocar no organismo.

5 CONCLUSÃO

Os dados apresentados mostram que o estragol nas concentrações avaliadas (3, 6 e 60 mg/mL) não provoca danos celulares significativos compatíveis com efeitos tóxicos, destacando assim a segurança terapêutica no uso agudo do monoterpeno. Nos modelos animais também não demonstrou alterações em massa de órgãos, parâmetros bioquímicos e testes comportamentais com a dose de 2000 mg/kg por via oral, dose equivalente a concentração de 60 mg/mL, reforçando a segurança do uso agudo.

Não obstante, estudos futuros ainda são necessários para avaliar a toxicidade do monoterpeno em doses elevadas e repetidas, visto que, existem relatos na literatura sobre uma possível toxicidade do estragol mediante o uso crônico.

REFERENCIAS

- ANDRADE, T. C. B. et al. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *croton zehntneri* (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 173–182, 2015.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- CALDAS, G. F. R. et al. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpeno 1,8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. **Food and Chemical**

Toxicology, v. 97, p. 297–306, nov. 2016.

CASTRO, P. A. et al. Molecular Characterization of Propolis-Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 398–411, mar. 2011.

DEAVALL, D. G. et al. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of toxicology**, v. 2012, p. 645460, 2012.

DING, W. et al. In vivo genotoxicity of estragole in male F344 rats. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 4, p. 356–65, maio 2015.

EBADOLLAHI, A. Chemical constituents and toxicity of. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. June, p. 212–217, 2011.

FROUSHANI, S. M. A. et al. Estragole and methyl-eugenol-free extract of *Artemisia dracunculus* possesses immunomodulatory effects. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, 2016.

GROSS, M. et al. Biosynthesis of estragole and t-anethole in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) chemotypes. Changes in SAM:phenylpropene O-methyltransferase activities during development. **Plant Science**, v. 163, n. 5, p. 1047–1053, 2002.

ISHII, Y. et al. Phosphorylation of protein phosphatase 2A facilitated an early stage of chemical carcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 336, p. 75–83, 2017.

KEEFOVER-RING, K. et al. Rapid Induction of Multiple Terpenoid Groups by Ponderosa Pine in Response to Bark Beetle-Associated Fungi. **Journal of Chemical Ecology**, 2016.

MARTINEZ-MAYORGA, K. et al. **Revista de la Sociedad Química de México**. [s.l.] Sociedad Química de México, 2017. v. 61

MURÁRIKOVÁ, A. et al. Characterization of Essential Oil Composition in Different Basil Species and Pot Cultures by a GC-MS Method. **Molecules**, 2017.

OBOLSKIY, D. et al. *Artemisia dracunculus* L.(tarragon): a critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11367–11384, 2011.

OECD. **OECD/OCDE 423 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method INTRODUCTION**. [s.l.: s.n.].

Disponível em:

<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocus/oecd/oecd_gl423.pdf>. Acesso em: 27 set. 2018.

OLIVEIRA, G. L. DA S. et al. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 30, p. 136–147, 8 fev. 2014.

PUNT, A. et al. Use of physiologically based biokinetic (PBBK) modeling to study estragole bioactivation and detoxification in humans as compared with male rats.

Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, v. 110, n. 2, p. 255–69, ago. 2009.

RADWAN, M. A. et al. Terpenes of ponderosa pine and feeding preferences by pocket gophers. **Journal of Chemical Ecology**, 1982.

RATHER, M. A. et al. Foeniculum vulgare: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1574–S1583, 2016.

REID, M. L.; SEKHON, J. K.; LAFRAMBOISE, L. M. Toxicity of Monoterpene Structure, Diversity and Concentration to Mountain Pine Beetles, *Dendroctonus ponderosae*: Beetle Traits Matter More. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 4, p. 351–361, 3 abr. 2017.

SAHEBI, M. et al. Profiling secondary metabolites of plant defence mechanisms and oil palm in response to *Ganoderma boninense* attack. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 122, p. 151–164, 1 ago. 2017.

SINGH, D.; CHO, W. C.; UPADHYAY, G. Drug-Induced Liver Toxicity and Prevention by Herbal Antioxidants: An Overview. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 363, 26 jan. 2016.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845–2857, set. 2010.

WHITEHEAD, S. R.; BOWERS, M. D. Chemical ecology of fruit defence: synergistic and antagonistic interactions among amides from *Piper*. **Functional Ecology**, v. 28, n. 5, p. 1094–1106, out. 2014.

ZÁRYBNICKÝ, T. et al. Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 1–13, 13 jan. 2018.

CAPÍTULO 3

Influência do método de preparo do complexo de inclusão na eficiência de complexação e atividade antinociceptiva do estragol

Periódico: *Carbohydrate Polymers*

Qualis A1 em biotecnologia

Fator de impacto: 4.811

Artigo submetido

INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE PREPARO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO NA EFICIÊNCIA DE COMPLEXAÇÃO E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL

RESUMO

O estragol ($C_{10}H_{12}O$) é um monoterpene de ocorrência natural, encontrado em diversas plantas aromáticas, que por apresentar atividade antioxidante e anti-inflamatória tem um potencial promissor no tratamento da dor crônica. Entretanto, possui baixa solubilidade em água, o que tem limitado suas aplicações biológicas. Desse modo, várias tecnologias têm sido empregadas a fim de melhorar essas características, entre elas está a complexação com as ciclodextrinas. Assim, a presente pesquisa busca investigar o potencial antinociceptivo do estragol livre e complexado com β -ciclodextrina pelas técnicas de *spray drying* e co-precipitação. Foi realizada a caracterização de ambos os complexos que mostraram bom rendimento ponderal, sobretudo o complexo obtido pela técnica de co-precipitação apresentou maior eficiência de complexação, cerca de 25%, enquanto que a técnica de *spray dryer* apenas 5%. Para a avaliação da atividade antinociceptiva utilizou-se o modelo de compressão parcial do nervo ciático. Os dados mostram que o estragol livre apresentou atividade antinociceptiva aguda ao aumentar o limiar nociceptivo mecânico e reduzir a sensibilidade térmica com as doses de 200 e 400 mg/kg nos tempos de 60 e 120 minutos, assim como suas formas complexadas, entretanto, ambas as complexações prolongaram a duração do efeito, sobretudo a complexação por co-precipitação que mostrou uma ação sobre a alodinia térmica permanecendo até o tempo de 180 minutos. Contudo, é evidente a ação antinociceptiva do estragol apresenta efeito potencializado pelas complexações, visto que, ação semelhante é obtida com menor quantidade do monoterpene, e a técnica de complexação por co-precipitação permitiu maior incorporação do monoterpene e prolongou a ação antinociceptiva desse.

Palavras-chave: Estragol. Complexo de inclusão. β -ciclodextrina. Dor crônica. Neuropatia.

1 INTRODUÇÃO

O estragol (Est) ($C_{10}H_{12}O$), também conhecido como: metilchavicol, chavicolmetileter ou *p*-allilanol, é um monoterpene de ocorrência natural amplamente utilizado em produtos alimentares como agente aromatizante (VINCENZI et al., 2000). Os monoterpenos são um grupo estruturalmente diversificado de fitoquímicos e um dos principais constituintes de óleos essenciais derivados de plantas. Monoterpenos são utilizados para fins terapêuticos e como aditivos alimentares. Nos últimos anos tem sido crescente o interesse em compreender as ações farmacológicas dessas moléculas (MURAT et al., 2015).

Esse monoterpene de ocorrência natural é encontrado em diversas plantas aromáticas, incluindo *Pinus ponderosa* Lawson & C. Lawson (KEEFOVER-RING et al., 2016; RADWAN et al., 1982), *Artemisa dracunculus* L. (FROUSHANI et al., 2016; OBOLSKIY et al., 2011), *Ocimum basilicum* L. (MURÁRIKOVÁ et al., 2017), *Foeniculum vulgare* Mill. (GROSS et al., 2002; RATHER et al., 2016), *Agastache foeniculum* L. (EBADOLLAHI, 2011) e *Croton zehntneri* Pax et Hoffm (ANDRADE et al., 2015).

O estragol é amplamente utilizado em produtos alimentares como agente aromatizante (VINCENZI et al., 2000) que apresenta, ainda, atividade anti-inflamatória (PONTE et al., 2012; SILVA-COMAR et al., 2014; WIIRZLER et al., 2016), antimicrobiana (SHAHAT et al., 2011; ANDRADE et al., 2015) antifúngica (FONTENELLE et al., 2011) e antioxidante (MUÑOZ-ACEVEDO; KOUZNETSOV; STASHENKO, 2009), despertando o interesse na compreensão das ações farmacológicas deste composto e dos monoterpenos em geral (MURAT et al., 2015). Além disso, os monoterpenos, em geral, apresentam um efeito promissor antinociceptivo (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013).

Com base nas ações farmacológicas, sobretudo, nos efeitos antioxidante e anti-inflamatório, o Est tem um potencial promissor na terapêutica da dor, principalmente na dor crônica. A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma sensação desagradável com sofrimento emocional associada com lesão tecidual real ou potencial, ou delineada em termos de tal lesão” (IASP, 2018).

Existem diversas classificações para a dor, uma delas é em relação à duração, podendo ser aguda ou crônica. A dor aguda é de curta duração,

geralmente persiste apenas durante o período do dano tecidual e representa uma reação fisiológica natural do organismo. A dor crônica é aquela que persiste além do tempo para a cura de uma lesão. É também descrita como aquela associada a processos patológicos crônicos, que causam dor contínua ou recorrente em intervalos de meses ou anos (TSANG et al., 2008; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Outra classificação da dor refere-se a sua fisiopatologia, dividindo-se em dor nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008). A dor inflamatória é caracterizada por um aumento da sensibilidade do tecido lesionado após a liberação de diversos mediadores inflamatórios (TENORIO, KULKARNI, KERR, 2013). Enquanto que a dor neuropática é resultado de um dano ao tecido nervoso, nos mecanismos de transmissão ou interpretação da dor, caracterizada por uma mudança no processamento somatossensorial, tendo como consequência a hiperalgesia (aumento da sensibilidade e capacidade de resposta a estímulos dolorosos), dor espontânea, parestesia e alodinia (sensibilidade e capacidade de resposta a estímulos não dolorosos) mecânica e térmica. Esse quadro está presente em inúmeras doenças, como por exemplo, doenças autoimunes, metabólicas, vasculares, infecciosas, traumas e câncer (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008; TENORIO, KULKARNI, KERR, 2013; COLLOCA et al., 2017).

Existe uma variedade de tratamentos farmacológicos e não farmacológicos disponíveis para pacientes com dor neuropática, entretanto cada um desses possui diferentes perfis de custo/benefício, devido à complexa natureza das neuropatias. Isso significa que não existe uma abordagem terapêutica padrão, visto que, os medicamentos são bem tolerados, mas também apresentam efeitos colaterais prejudiciais ou desconfortáveis que podem ser exacerbados pelo uso crônico (HATCH et al., 2017). Assim, a utilização de produtos naturais, como o estragol, surge como uma possibilidade minimizar tais efeitos.

Todavia, os monoterpenos de maneira geral apresentam instabilidade térmica, à luz e à presença de oxigênio, além de apresentarem baixa solubilidade aquosa, o que limita suas aplicações tecnológicas (ROCHA et al., 2018). Como tentativa de solucionar esse problema, várias tecnologias têm sido empregadas a fim de aumentar a hidrosolubilidade de substâncias lipofílicas, dentre elas temos os complexos de inclusão. A complexação dos monoterpenos no interior da cavidade

das ciclodextrinas (CDs) melhora suas características físico-químicas, aumentando a solubilidade aquosa, a reatividade química e reduzindo a oxidação, sem alterar a capacidade da substância de atravessar as membranas biológicas. Dentre essas moléculas hospedeiras, a beta-ciclodextrina (β -CD) é amplamente utilizada para melhorar a solubilidade aquosa, estabilidade e biodisponibilidade de compostos lipossolúveis (MENEZES et al., 2012; SERAFINI et al., 2012).

Nesse sentido, o presente trabalho busca investigar o potencial antinociceptivo do estragol livre e complexado com β -CD. Além de analisar qual o método de complexação (co-precipitação ou *spray drying*) é o mais efetivo para a terapêutica da dor neuropática por injúria nervosa.

2 METODOLOGIA

2.1 Desenvolvimento das duas formulações

2.1.1 Preparo do complexo inclusão do estragol com β -ciclodextrina

Foi utilizado Hexano grau HPLC, sulfato de sódio anidro, β -ciclodextrina e estragol foram adquiridos da Sigma Aldrich do Brasil, água ultrapura (18,2 M Ω) obtidas num sistema de purificação, modelo Master All (GEHAKA) e demais solventes utilizados grau P.A.

O estragol foi complexado com β -CD pelos métodos de co-precipitação e por secagem por aspersão (*Spray dryer*). Foi definida a relação estequiométrica 1:1 para o preparo do complexo, de acordo com o obtido por Aguiar e colaboradores (2014) para o óleo essencial de *Croton zehntneri* P. e H. que apresentava cerca de 90% de estragol em sua composição.

Para preparar o complexo de inclusão (CI) pelo método de co-precipitação (Est/ β -CD Co-precipitação), 1,0 g de estragol e 7,6 g de β -CD foram solubilizadas em etanol PA e água ultrapura aquecida a 55 °C, respectivamente. Adicionou-se a solução etanólica à solução aquosa e retirou-se do aquecimento, homogeneizando-se à temperatura ambiente com auxílio de uma mesa agitadora a 150 rpm durante quatro horas. Após este período, a suspensão foi resfriada a 4,0 °C por 12 horas. O precipitado foi recolhido, seco por liofilização por 12 h (liofilizador Liobras L101), pesado e armazenado em frasco âmbar.

Para o preparo do complexo de inclusão pelo método de secagem por aspersão (*Est/β-CD spray drying*), a suspensão formada pelo estragol e a β-CD foi homogeneizada, conforme descrito anteriormente, seguida de secagem por *spray drying* (BUCHI B-290), sob as seguintes condições: temperatura de entrada 105 °C, pressão 0,9 bar e fluxo da amostra de 3 mL min⁻¹. Calculou-se o rendimento e armazenou-se em dessecador até a realização das análises.

2.1.2 Quantificação do estragol

Para determinar a concentração do estragol presente no complexo de inclusão, foram preparadas diluições seriadas de estragol em hexano, obtendo-se sete diluições com variação entre 5 a 500 mg L⁻¹ que foram analisados por CG-EM. Os valores das áreas sob as curvas de cada diluição foram utilizadas para a determinação da curva analítica.

2.1.3 Condições cromatográficas

Os padrões de Est e os CI foram analisados em um cromatógrafo em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) modelo GCMS-QP2010-SE da Shimadzu, usando coluna Rxi-5HT (Restek), com as seguintes dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm. O procedimento foi realizado em triplicata. As condições cromatográficas foram definidas da seguinte forma: gás hélio (99,999% White Martins) foi utilizado como gás de arraste, sob fluxo constante de 1 mL e a razão Split foi de 1:100. A temperatura do forno foi mantida a 60 °C durante 1 min, seguido de uma taxa de aquecimento de 3 °C por minuto até atingir a temperatura de 246 °C permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. Para a injeção foi utilizado um Auto-injetor AOC-5000, e o volume da injeção foi de 1 μL.

2.1.4 Caracterização dos complexos de inclusão

A eficiência de complexação e a quantificação do estragol presente no complexo de inclusão foram determinadas pelo método de extração com solvente proposto por Harangi e Nánási (1984). Amostra equivalente a 10 mg do estragol nos complexos de inclusão foram solubilizados com 4,0 mL de água ultrapura em um

frasco fechado com tampa rosqueada de alumínio e septo de teflon e extraídas com 4,0 mL de n-hexano aquecido em banho-maria à temperatura de $80 \pm 2,0$ °C por 15 minutos, com agitação intermitente. Após o resfriamento, a fase n-hexânica contendo o estragol dos dois complexos foi recolhida com auxílio de uma pipeta e a fase aquosa foi submetida a duas novas extrações sucessivas com n-hexano (2,0 x 4 mL). Os extratos combinados, foram adequadamente diluídos a uma concentração aproximada de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e analisados por CG-EM para determinação da eficiência de complexação (EC) através da equação 1. A quantificação do conteúdo de Est nos CI se deu através da determinação da área sob a curva dos Est extraído e seu valor plotado na curva de calibração. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

$$\text{Equação 1: } EC = \frac{Al}{Ac} \times 100$$

Onde:

EC = eficiência de complexação

Al = área sob a curva determinada para o constituinte livre;

Ac = área sob a curva determinada para o constituinte complexado com β -CD.

2.2 Avaliação da ação antinociceptiva

Na investigação da atividade antinociceptiva foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (25-30 g), provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura de 22 ± 1 °C, obedecendo aos ciclos de claro/escuro com 12 h de duração e água e ração *ad libitum*.

A neuropatia foi induzida pelo procedimento cirúrgico de compressão parcial do ciático, desse modo, sob a ação anestésica de cloridrato de xilazina (15 mg/kg, i.m.) associado a cloridrato de cetamina (80 mg/kg, i.m.) foi realizada antissepsia e tricotomia da região posterior da pata traseira direita, onde foi feita uma incisão na região do músculo bíceps femoral. O nervo ciático foi exposto, liberado do tecido conjuntivo circundante e foi envolvido por um fio de sutura de seda (3-0 Shalon®). Todas as ligaduras foram realizadas pelo mesmo pesquisador a fim de garantir homogeneidade do procedimento. No pós-operatório os animais foram tratados com

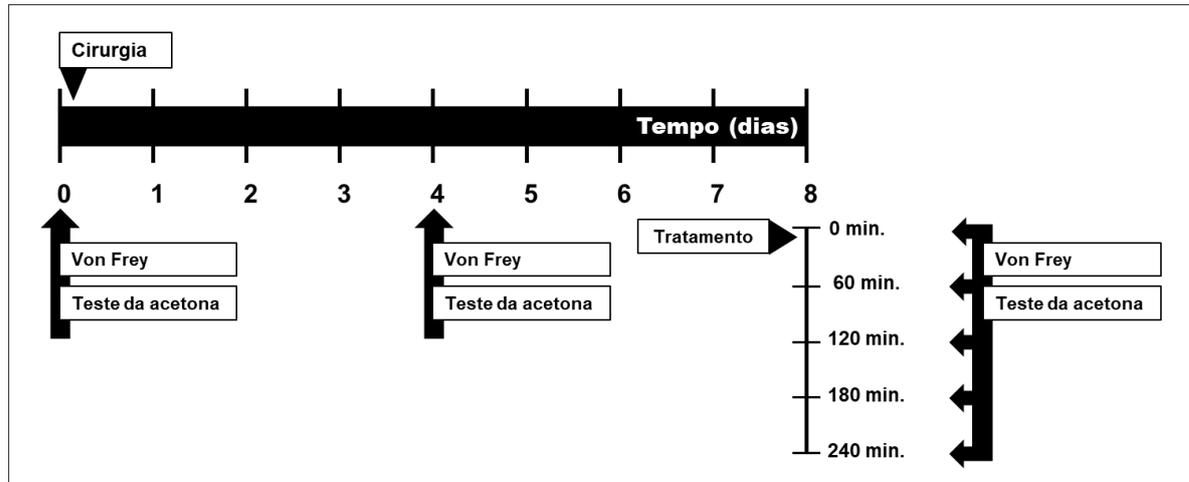
solução tópica de clorexidina (2%) e colocados em gaiolas metabólicas com antissepsia diária. Em um grupo (Sham) o procedimento foi apenas simulado (SELTZER et al., 1990).

Os animais foram submetidos à avaliação nociceptiva mecânica pelos filamentos de von Frey, onde foram aclimatizados por pelo menos 15 minutos antes dos testes comportamentais e foi mensurado o Limiar Nociceptivo Mecânico (LNM) na superfície plantar da pata traseira direita, que foi tocada com três repetições, por diferentes filamentos partindo das menores concentrações, em gramas, para as maiores. Todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação prévia (basal) e novamente reavaliados em diferentes tempos após a cirurgia (CHAPLAN et al., 1994).

Para verificação de alodinia térmica ao frio (10°C, teste da acetona) uma alíquota de 0,05 mL de acetona foi lançada sob a superfície ventral da pata do animal através do piso fenestrado. Se a pata do animal estivesse corretamente molhada pela acetona, iniciava-se um período de observação inicial de 20 s, no qual o animal poderia ou não apresentar comportamentos relacionados à dor. Os comportamentos foram avaliados em uma escala de 4 pontos assim apresentada: escore “0” para a ausência de qualquer comportamento doloroso; escore “1” para uma retirada rápida da pata e/ou com tremor ou batimento desta no chão (o tremor característico, ou *flicking*, era importante para determinar se a retirada da pata se deu por dor ou por espanto do animal); escore “2” para um retirada com sustentação prolongada da pata com ou sem repetido *flicking* desta, e escore “3” para a situação onde o animal lambe a face ventral da pata após *flicking* repetido da pata (FLATTERS; BENNET, 2004).

Essas avaliações foram realizadas antes do procedimento cirúrgico (dia 0) e quatro dias após (dia 4) e no oitavo dia a avaliação foi realizada os tempos 0, 60, 120, 180 e 240 minutos após os tratamentos com o estragol (Est 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), estragol complexado com β -ciclodextrina por *spray dryer* (Est/ β -CD *spray dryer* 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), estragol complexado com β -ciclodextrina por coprecipitação (Est/ β -CD co-precipitação 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), veículo (água destilada e Tween 80 a 2%, v.o.), morfina (5 mg/kg, i.p.) ou β -ciclodextrina como mostra a figura 1.

Figura 1 – Esquema demonstrativo do protocolo de avaliação antinociceptiva



Após as avaliações os animais foram eutanasiados com superdosagem de tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.) de acordo com o estabelecido pela Resolução Nº 1.000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV. Todos os protocolos experimentais foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI 082/14).

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), que foram comparadas através da análise de variância (ANOVA duas vias), seguida pelo teste de Tukey. Foi calculado, ainda, o Efeito Percentual Máximo Possível (% MPE) através da diferença percentual entre a resposta medida e a resposta de linha de base, dividida pela diferença entre a resposta máxima e a resposta de linha de base, da menor dose efetiva para mensurar a efetividade da formulação. A análise de significância foi considerada quando $p < 0,05$. Para a análise foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* versão 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSAO

O estragol por ser um componente de óleos essenciais, apresenta como principais características a insolubilidade em água e elevada volatilidade. No entanto, a solubilidade limitada em água do estragol pode ser superada pela formação do complexo de inclusão com ciclodextrinas que pode ser obtido por diferentes técnicas de preparo. Avaliando-se o rendimento ponderal obtido para o CI preparado por co-precipitação e por *spray drying* que foi de 79% e 82%

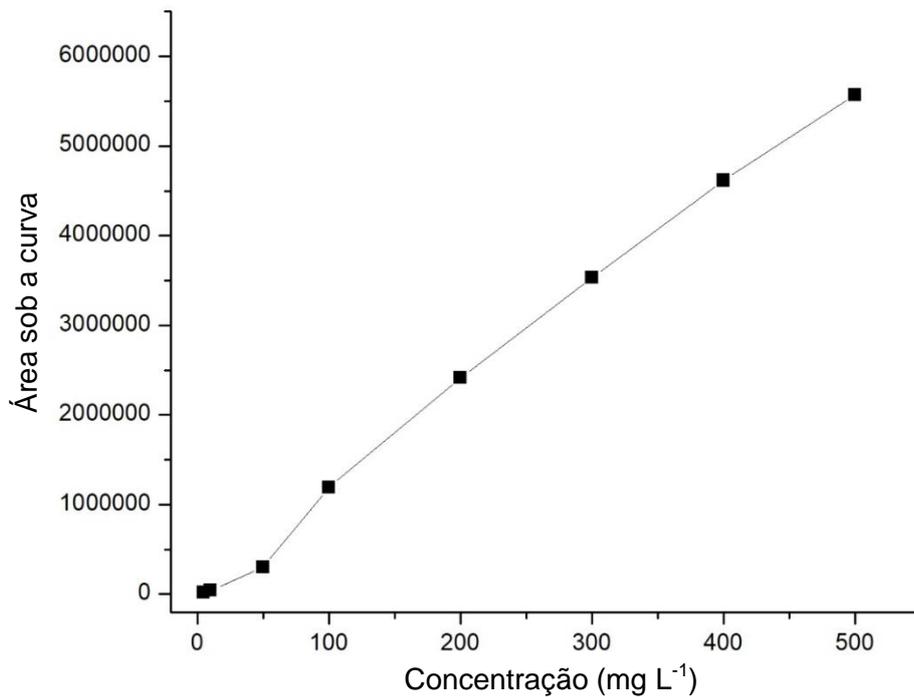
respectivamente, observou-se valores considerados elevados para ambas às técnicas (SANTOS et al., 2003), demonstrando que as mesmas podem ser utilizadas na obtenção de complexo de inclusão.

A complexação por diferentes técnicas apresentou diferentes níveis de incorporação do estragol na cavidade da ciclodextrina, no qual a técnica de co-precipitação apresentou maior eficiência de complexação em comparação com a técnica de *spray drying*, respectivamente 25 e 5%, provavelmente devido às condições de secagem da técnica de *spray drying* a qual requer o uso de temperatura durante o processo de secagem para a evaporação do solvente da mistura, ocasionando, provavelmente uma maior perda por volatilização do estragol durante o processo de secagem.

Além disso, existem vários fatores que podem influenciar no sucesso ou insucesso de um determinado método de complexação em relação a outro, deve-se levar em consideração a combinação de excipientes, a solubilidade, estabilidade e os parâmetros experimentais. Além disso, é sempre necessário relacionar as experiências *in vitro* com *in vivo* (VARGAS; RAFFIN; MOURA, 2012).

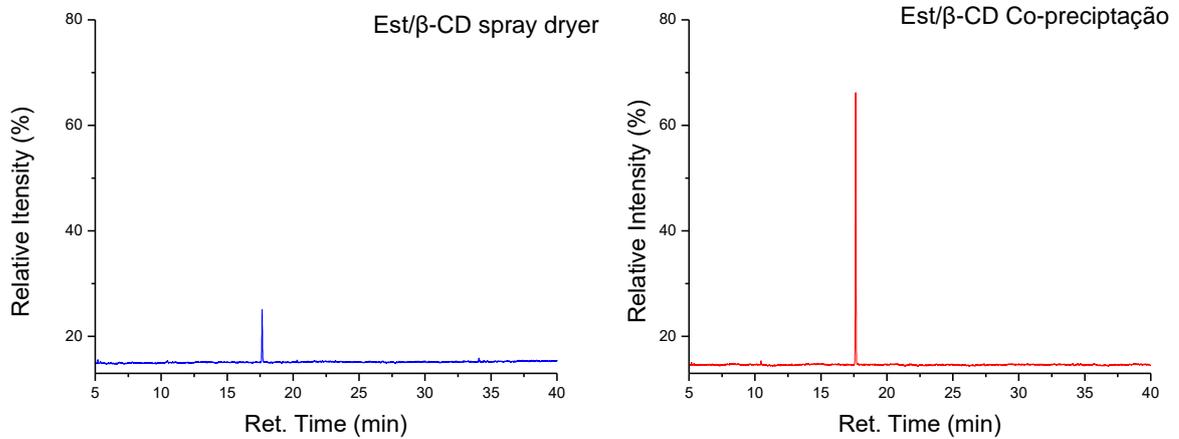
A determinação do teor de estragol nos complexos de inclusão obtido pelas diferentes técnicas foi determinado a partir da curva analítica (Figura 2), que foi preparada com sete concentrações diferentes (5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm), sendo que cada concentração foi preparada em triplicata. Através da equação da reta, $y = 11555x - 50619$; $R^2 = 0,9964$, determinou-se o teor de estragol nos complexos preparados por co-precipitação e por *spray drying*, como sendo de 2,9 e 0,6 mg de estragol por 100 mg de CI, respectivamente, demonstrando que a técnica de preparo de complexo de inclusão por co-precipitação permitiu uma maior retenção do estragol quando comparado com a técnica de preparo por *spray drying*, provavelmente pela maior perda do estragol, ocasionada pela sua volatilização durante a obtenção deste CI.

Figura 2 - Curva analítica obtida a partir de sete diferentes soluções do Estragol variando entre 5 a 400 mg L⁻¹.



Pode-se observar na figura 3, a partir dos cromatogramas dos constituintes extraídos dos complexos de inclusão, que foi possível determinar a presença do estragol nos dois métodos de preparo. De acordo com Aguiar e colaboradores (2014), a massa molecular do estragol (148 Da) é compatível com a dimensão da cavidade interna da β -CD que é capaz de complexar substância na faixa de massa molecular de 100 a 400 Da, entretanto, a técnica de preparo por co-precipitação apresenta maior capacidade de complexação do estragol, sendo possível determinar uma taxa de complexação cinco vezes superior à técnica de *spray drying* através da análise das áreas do estragol obtido pelas duas técnicas.

Figura 3 - Perfil cromatográfico do estragol extraído do complexo de inclusão por co-precipitação e *spray drying*, respectivamente.



Ainda utilizando a curva analítica, determinou-se a quantificação do estragol nos complexos de inclusão e ajustou-se a concentração do estragol nas diferentes doses dos tratamentos. A tabela 1 apresenta as proporções de estragol presente em cada um dos complexos de inclusão correspondente as doses utilizadas nos protocolos experimentais.

Tabela 1 – Quantidade equivalente de estragol nas doses de 100, 200 e 400 mg de complexo de inclusão preparado co-precipitação ou por *spray drying*.

Dose (mg)	Est/β-CD <i>spray drying</i> (mg)	Est/β-CD co-precipitação (mg)
100	0,6	2,9
200	1,2	5,7
400	2,3	11,4

Est: Estragol. Est/β-CD *spray dryer*: estragol complexado com β-ciclodextrina por *spray dryer*. Est/β-CD co-precipitação: estragol complexado com β-ciclodextrina por co-precipitação.

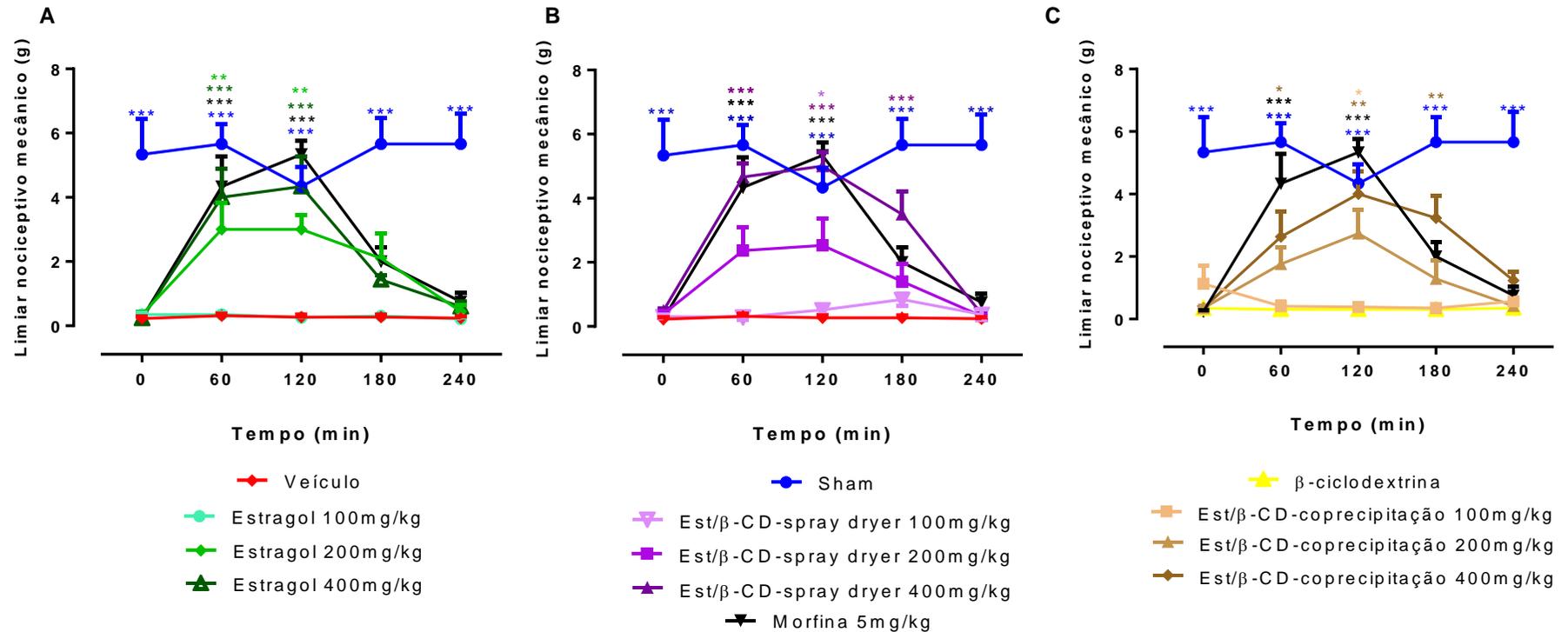
Os dados da tabela 1 mostram que na complexação por co-precipitação houve incorporação de cerca de cinco vezes mais estragol que no método por *spray dryer*, destacando a eficiência desse método.

O limiar nociceptivo mecânico e os escores de sensibilidade térmica foram avaliados antes do procedimento cirúrgico a fim de mensurar os parâmetros comportamentais dos animais antes da indução da neuropatia. Essas avaliações foram repetidas no 4º dia para acompanhar a instalação da neuropatia, onde os

dados mostraram que todos os animais apresentavam alterações nesses parâmetros compatíveis com o processo doloroso instalado (dados não mostrados). No oitavo dia, antes dos tratamentos, os animais permaneciam com os limiares de retirada da pata reduzidos e a sensibilidade térmica aumentada, com exceção do grupo sham que não apresentava tais alterações.

Com a comprovação da neuropatia instalada o efeito antinociceptivo do estragol foi avaliado. Assim, os animais foram tratados por via oral com Est (100, 200 e 400 mg/kg), Est/ β -CD *spray dryer* (100, 200 e 400 mg/kg), Est/ β -CD co-precipitação (100, 200 e 400 mg/kg) ou veículo (água destilada + Tween 5%), e como controle positivo utilizou-se a morfina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. O limiar de retirada da pata antes e após os tratamentos estão apresentados na figura 4.

Figura 4 - Efeito da administração aguda do estragol livre e complexado sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.



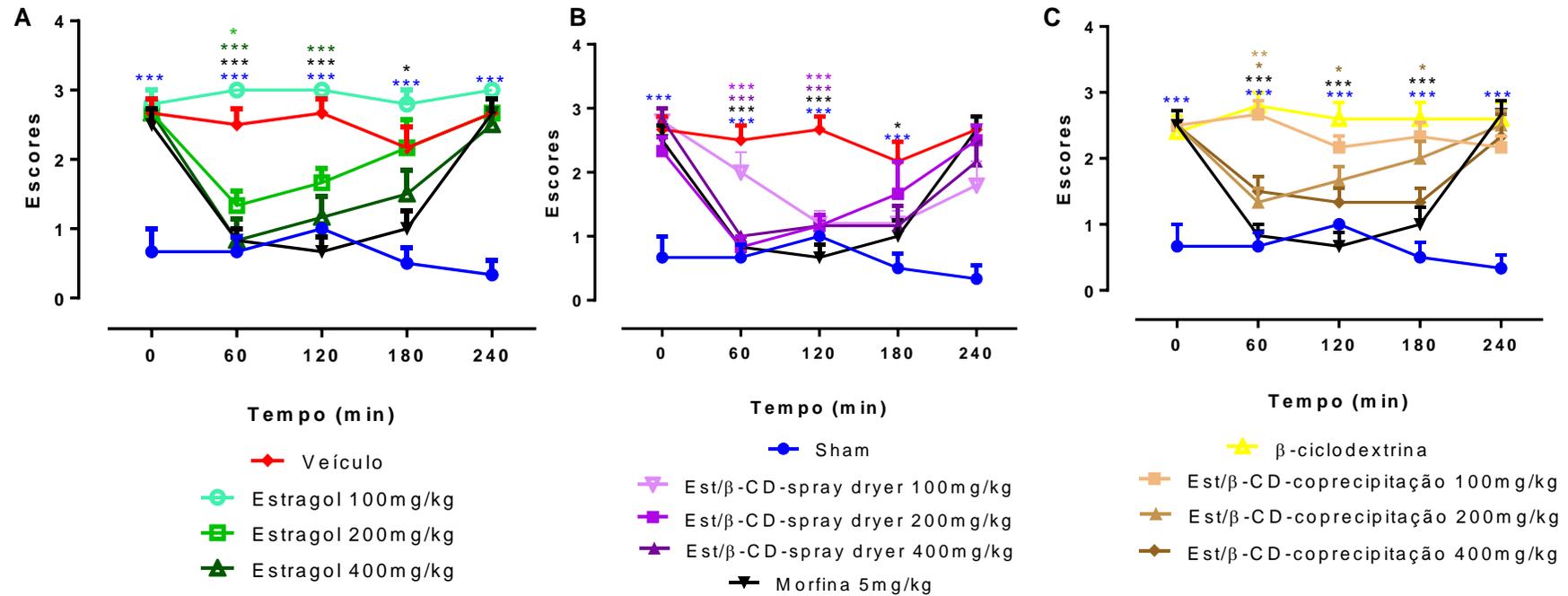
Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do limiar de retirada de pata de camundongos (25-30 g) submetidos ao teste com filamentos de von Frey, tratados com estragol (Est 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) (A), estragol complexado com β -ciclodextrina por *spray dryer* (Est/ β -CD spray dryer 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (B) ou estragol complexado por co-precipitação (Est/ β -CD 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) (C). Os grupos de animais (n = 5-7) também receberam veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.) ou morfina a (5 mg/kg, i.p.) (* p <0,05; ** p <0,01 e *** p <0,001 comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

O painel A da figura 4 mostra a ação antinociceptiva do estragol livre que apresentou aumento significativo no limiar de retirada da pata nas doses de 200 ($p < 0,01$) e 400 mg/kg ($p < 0,001$) nos tempos de 60 e 120 minutos de forma semelhante a ação da morfina ($p < 0,001$). A dose de 100 mg/kg não foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo mecânico no teste de von Frey. Já os painéis B e C mostram a ação do estragol complexado com β -ciclodextrina, o painel B apresenta o efeito antinociceptivo do estragol complexado por *spray dryer*, onde os dados mostram efeito antinociceptivo, através do aumento do limiar de retirada da pata, do complexo de inclusão na dose de 200 mg/kg do complexo (1,2 mg de est) nos tempos de 60 e 120 minutos, enquanto que a dose de 400 mg/kg (2,3 mg de est) apresentou esse efeito perdurando até o tempo de 180 min. No painel C o estragol complexado por co-precipitação apresentou resposta semelhante ao complexo anteriormente citado. O grupo de animais tratados apenas com a β -ciclodextrina não apresentou aumento do limiar nociceptivo mecânico durante o tempo de avaliação, evidenciando que a ação antinociceptiva demonstrada é do monoterpeno.

Apartir desses dados foi calculado a porcentagem do Máximo Efeito Possível (% MPE – *Maximum Possible Effect*) para a menor dose efetiva (200 mg/kg), no tempo onde o monoterpeno apresentou o pico de sua ação (120 minutos). Esses resultados mostraram que o Est 200 mg/kg produziu 35% do MPE, o Est/ β -CD *spray dryer* 200 mg/kg mostrou 28,1% e o Est/ β -CD co-precipitação 200 mg/kg apresentou 31,1% do MPE.

Na avaliação por estímulo mecânico foi realizada a investigação da ação antinociceptiva do estragol livre e complexado sobre os escores de sensibilidade térmica através do teste da acetona, como mostra a figura 5.

Figura 5 - Efeito da administração aguda do estragol livre e complexado sobre a sensibilidade térmica em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.



Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do escore de sensibilidade térmica ao frio por acetona nos animais (25-30 g) tratados com estragol (Est 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (A), estragol complexado com β -ciclodextrina por *spray dryer* (Est/β-CD spray dryer 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (B) ou estragol complexado por co-precipitação (Est/β-CD 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (C). Os grupos de animais (n = 6) também receberam veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.) ou morfina a (5 mg/kg, i.p.) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

Os dados mostram que o estragol livre (painel A) na dose de 200 mg/kg reduziu, significativamente ($p < 0,05$), a sensibilidade ao estímulo térmico após 60 minutos da administração do estragol livre. Já a dose de 400 mg/kg apresentou ação antinociceptiva nos tempos de 60 e 120 minutos. A dose de 100 mg/kg não foi capaz de alterar, significativamente, a sensibilidade térmica ao frio no teste da acetona. Já o painel B mostra a ação do estragol complexado com β -ciclodextrina por *spray dryer*, onde as doses de 200 (1,2 mg de est) e 400 mg/kg (2,3 mg de est) reduziram a resposta de sensibilidade térmica nos tempos de 60 e 120 minutos. Enquanto que o estragol complexado por co-precipitação (painel C) na dose de 400 mg/kg (11,4 mg de est) apresentou ação antinociceptiva até 180 minutos após a administração. E em ambos os complexos a dose de 100 mg/kg não apresentou alteração significativa na sensibilidade térmica dos animais. O grupo de animais tratados apenas com a β -ciclodextrina não apresentou redução dos escores de sensibilidade térmica.

Desta forma, os dados demonstram que o estragol apresentou efeito antinociceptivo nas doses de 200 e 400 mg/kg na sua forma livre e nos complexos de inclusão, entretanto nos CIs as doses de 200 e 400 mg/kg apresentam respectivamente 1,2 e 2,3 mg de estragol no complexo preparado por *spray drying* e 5,7 e 11,4 mg de estragol no complexo preparado por co-precipitação, sugerindo que a complexação aumenta a potência do monoterpeno, pois se obtém efeito semelhante ao estragol livre com menor quantidade do monoterpeno quando este está complexado por ambas as técnicas. Na comparação entre os CIs a complexação por co-precipitação mostrou uma ação antinociceptiva sobre a alodinia térmica mais duradoura. Assim, esses resultados destacam o potencial terapêutico promissor da complexação do estragol, visto que, a utilização de doses menores promove maior segurança ao paciente e a ação prolongada é benéfica à terapêutica da dor crônica.

O estragol complexado pode vir a ser uma alternativa viável para o tratamento da dor, visto que a complexação da substância mostrou ação antinociceptiva com menores quantidades do monoterpeno, sobretudo na complexação por co-precipitação, o que aumentaria a segurança do CI no uso continuado.

Nos últimos anos, os consumidores desenvolveram um interesse cada vez maior em produtos naturais como alternativas para aditivos artificiais ou agentes farmacologicamente relevantes. Entre eles, os óleos essenciais ganharam grande popularidade nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. Constituindo uma

série de muitos componentes lipofílicos e altamente voláteis derivados de uma grande variedade de diferentes classes químicas, os óleos essenciais são conhecidos por ser suscetíveis a reações de conversão e degradação. Os processos oxidativos e de polimerização podem resultar em perda de qualidade e propriedades farmacológicas (TUREK; STINTZING, 2013).

Uma grande variedade de moléculas com elevado potencial para atividades farmacológicas tem sido descobertas. No entanto, a grande maioria destas moléculas tem baixa biodisponibilidade, principalmente associada à sua baixa solubilidade em água. Assim, algumas estratégias têm sido utilizadas para melhorar essas características, e entre elas temos os sistemas de inclusão de ciclodextrina (VARGAS; RAFFIN; MOURA, 2012).

As ciclodextrinas são excipientes funcionais que podem ser usadas para melhorar a administração de fármacos, elas não são apenas solubilizantes bem conhecidos, mas constituem uma ferramenta muito poderosa como potencializadores de permeação. Na indústria farmacêutica, as ciclodextrinas têm sido principalmente utilizadas como agentes complexantes para aumentar a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis e para aumentar a sua biodisponibilidade e estabilidade (KUMAR et al., 2013).

Fármacos antinociceptivos, incluindo opióides, anti-inflamatórios esteroidais e não-esteróides, antiepilépticos e inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, são substâncias comumente usados para tratar muitas formas de dor. No entanto, todos esses agentes apresentam efeitos colaterais significativos que não podem ser isolados dos efeitos desejados. Esses efeitos colaterais são, frequentemente, dependentes da dose e do tempo de uso (CARTER et al., 2014).

Para cada um desses tratamentos deve-se avaliar o custo/benefício, devido à natureza complexa da neuropatia, isso significa que não existe uma abordagem padrão em virtude dos efeitos colaterais prejudiciais ou desconfortáveis, que são exacerbados pela necessidade de uso crônico que essa condição dolorosa requer (HATCH et al., 2018).

Existe uma necessidade urgente de desenvolver novos agentes farmacêuticos para o tratamento da dor neuropática. Extensa investigação da etiologia da dor neuropática identificou vários alvos potenciais de drogas, e alguns novos compostos promissores estão em desenvolvimento. Mas os resultados

mostram que ainda há um caminho longo a ser percorrido, pois muitas dessas ferramentas não progridem com eficácia para a clínica (ALLES; SMITH, 2018).

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que ambas as técnicas apresentam bom rendimento, entretanto o método de co-precipitação apresentou uma eficiência de complexação do estragol na cavidade da β -ciclodextrina cinco vezes aquela determinada para o método de *spray drying*. Na avaliação do efeito antinociceptivo os resultados destacam a ação de 200 e 400 mg/kg do estragol sobre a dor neuropática induzida pela constrição parcial do ciático, onde a formação dos complexos de inclusão aumentou a potência do monoterpeno, visto que passou a se obter efeito semelhante com uma dose equivalente variando de 1,2 a 11,4 mg/kg de estragol no CI. Além disso, a complexação por co-precipitação prolongou o efeito antinociceptivo do monoterpeno. Entretanto, estudos futuros ainda são necessários para avaliar a eficácia do monoterpeno em outros modelos de neuropatia, bem como compreender os mecanismos de ação envolvidos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de croton zehntneri com β -ciclodextrina. **Quimica Nova**, v. 37, n. 1, p. 50–55, 2014.
- ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, 2018.
- ANDRADE, T. C. B. et al. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of croton zehntneri (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 173–182, 2015.
- CARTER, G. T. et al. Side effects of commonly prescribed analgesic medications. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 457–470, 2014.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, n. doi:10.1038/nrdp.2017.2, p. 17002, 16 fev. 2017.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 1–32, 2009.

DE SOUZA SILVA-COMAR, F. M. et al. Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

DE VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 725–9, dez. 2000.

EBADOLLAHI, A. Chemical constituents and toxicity of. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. June, p. 212–217, 2011.

FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 109, n. 1–2, p. 150–161, 2004.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Alkylphenol activity against candida spp. and microsporum canis: A focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and o-methyl derivatives. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6422–6431, 2011.

FROUSHANI, S. M. A. et al. Estragole and methyl-eugenol-free extract of Artemisia dracunculus possesses immunomodulatory effects. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 6, n. 5, p. 526–534, 2016.

GROSS, M. et al. Biosynthesis of estragole and t-anethole in bitter fennel (Foeniculum vulgare Mill. var. vulgare) chemotypes. Changes in SAM:phenylpropene O-methyltransferase activities during development. **Plant Science**, v. 163, n. 5, p. 1047–1053, 2002.

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

HATCH, M. N. et al. Neuropathic pain and SCI: Identification and treatment strategies in the 21st century. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 384, p. 75–83, 2018.

IASP. **IASP Terminology - IASP**. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Neuropathicpain>>. Acesso em: 2 fev. 2018.

KEEFOVER-RING, K. et al. Rapid Induction of Multiple Terpenoid Groups by Ponderosa Pine in Response to Bark Beetle-Associated Fungi. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 1, p. 1–12, 2016.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2008.

KUMAR, A. R. et al. The Cyclodextrins : A Review. **Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2012.

MENEZES, P. P. et al. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45–50, 2012.

MUNOZ-ACEVEDO, A.; KOUZNETSOV, V. V; STASHENKO, E. E. Artículos Originales Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en. v. 41, n. 3, p. 287–294, 2009.

MURÁRIKOVÁ, A. et al. Characterization of Essential Oil Composition in Different Basil Species and Pot Cultures by a GC-MS Method. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1221, 2017.

OBOLSKIY, D. et al. Artemisia dracunculus L.(tarragon): a critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11367–11384, 2011.

OZ, M. et al. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 152, p. 83–97, 2015.

PONTE, E. L. et al. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 4, p. 984–990, 2012.

RADWAN, M. A. et al. Terpenes of ponderosa pine and feeding preferences by pocket gophers. **Journal of chemical ecology**, v. 8, n. 1, p. 241–53, jan. 1982.

RATHER, M. A. et al. Foeniculum vulgare: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1574–S1583, 2016.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205–18, nov. 1990.

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

SHAHAT, A. A. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1366–1377, 2011.

TENORIO, G.; KULKARNI, A.; KERR, B. J. Resident glial cell activation in response to perispinal inflammation leads to acute changes in nociceptive sensitivity: Implications for the generation of neuropathic pain. **Pain**, v. 154, n. 1, p. 71–81, 2013.

TSANG, A. et al. Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 9, n. 10, p. 883–91, out. 2008.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013.

VARGAS, M. R. W. DE; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. DE L. E. Strategies used for to improve aqueous solubility of simvastatin: a systematic review. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 33, n. 4, p. 497–507, 2012.

WIIRZLER, L. A. M. et al. Evaluation of Anti-inflammatory Activity of Estragole by Modulation of Eicosanoids Production. **International Journal of Pharma And Chemical Research**, v. 2, n. 1, p. 7–13, 2016.

WU, S.-H. et al. Monoterpene glycosides from *Paeonia delavayi*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 1, p. 76–8, jan. 2007.

CAPÍTULO 4

**AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL LIVRE E COMPLEXADO EM
MODELO DE CONSTRIÇÃO PARCIAL DO CIÁTICO**

Periódico: à definir

Artigo a ser submetido

AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO ESTRAGOL LIVRE E COMPLEXADO EM MODELO DE CONSTRIÇÃO PARCIAL DO CIÁTICO

RESUMO

A dor neuropática é uma condição crônica que afeta diversos pacientes pelo mundo. Esse tipo de dor crônica surge quando há alguma alteração no sistema somatossensorial gerando falsas interpretações de estímulos sensoriais. Atualmente a terapêutica da neuropatia é baseada em anticonvulsivantes, antidepressivos tricíclicos, opióides, anti-inflamatórios, etc. Entretanto, geralmente são carregadas de inúmeros efeitos colaterais, como sedação, irritação gástrica, hepato e nefrotoxicidade, entre outras. Nesse contexto, os produtos naturais, sobretudo os monoterpenos, surgem como uma alternativa viável para o problema. Assim, a presente pesquisa busca investigar a ação antinociceptiva do estragol diante dos modelos de neuropatia por constrição do ciático, bem como comparar a efetividade do monoterpeno livre frente ao complexado com β -ciclodextrina por co-precipitação. Os resultados apresentados demonstram que o co-tratamento subagudo com o estragol por oito dias aumenta o limiar nociceptivo mecânico e reduz a sensibilidade térmica, sintomas da dor neuropática, com as doses de 100, 200 e 400 mg/kg do monoterpeno livre e complexado, de forma semelhante no pós-tratamento, iniciado após a instalação da neuropatia, o monoterpeno também apresentou aumento no limiar nociceptivo mecânico e redução da sensibilidade térmica, caracterizando assim a ação antinociceptiva. Essa ação pode ser mediada pelo efeito antioxidante, visto que, o estragol reduz a preoxidação lipídica. Na análise do reparo tecidual o monoterpeno não provocou alterações significativas, bem como não provocou nenhum dano a mucosa gástrica no tratamento subagudo. Em suma, devido o potencial tóxico relatado na literatura e a baixa solubilidade, o monoterpeno foi complexado a β -ciclodextrina, e mostrou ação antinociceptiva nos tratamentos subagudos, evidenciando que a complexação melhora a potência farmacológica do estragol, pois a complexação permite produzir resultados semelhantes com doses menores do princípio ativo.

Palavras-chave: Estragol. Monoterpenos. β -ciclodextrina. Dor neuropática.

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso detecta e interpreta uma variedade de estímulos químicos, mecânicos e térmicos gerando uma mensagem complexa de nocicepção aos centros superiores, que podem ser interpretadas como dor (WOLLER et al., 2017). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como “uma sensação desagradável com sofrimento emocional associada com lesão tecidual real ou potencial, ou delineada em termos de tal lesão” (IASP, 2017).

A dor é um mecanismo de detecção e proteção do corpo que resulta da ativação de um subconjunto de neurônios sensoriais. No entanto, lesões ou doenças no sistema sensorial podem resultar em dor neuropática, que não exerce função protetora (SMITH, 2017). A transição da dor aguda para a crônica pode ocorrer por diversos mecanismos (VOSCOPOULOS; LEMA, 2010; MIFFLIN; KERR, 2014; FEIZERFAN; SHEH, 2015). A natureza complexa da dor crônica envolve uma interação entre fatores psicológicos e físicos, muitas vezes resultando em aumento do sofrimento emocional e redução da qualidade de vida (MILLER, KAISER, 2018). O limiar e a tolerância à dor dos pacientes são subjetivos e influenciam a percepção da dor, que sofre influência de fatores genéticos, culturais, sociais, gênero, idade, saúde física e mental e episódios anteriores de dor (ELLISON, 2017).

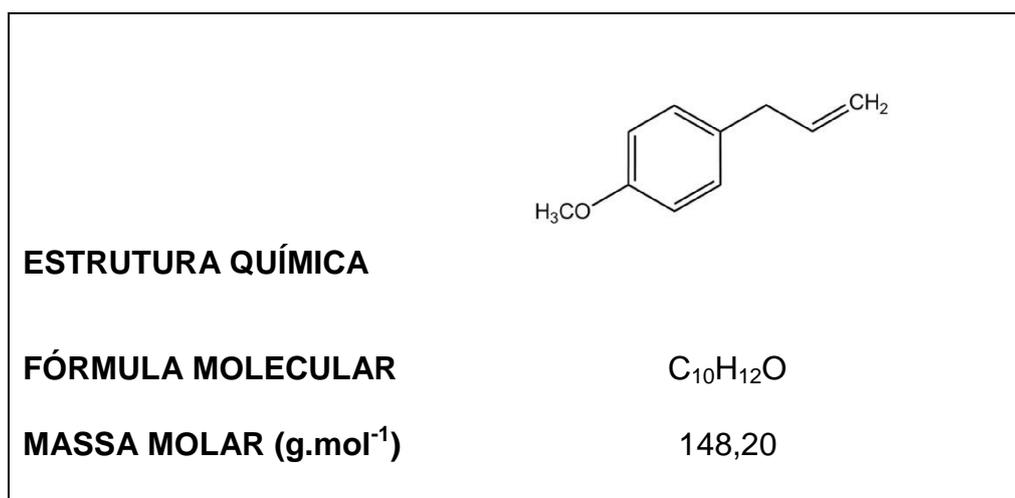
Atualmente, existem diversas substâncias usadas clinicamente para tratar a dor neuropática (NISHIKAWA; NOMOTO, 2017; HATCH et al., 2018), como anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) (RASMUSSEN-BARR et al., 2017; KAPLAN et al., 2018), antidepressivos (CHEN et al., 2017; HIROKI et al., 2017; OBATA, 2017), anticonvulsivantes (OGAWA et al., 2016; WIFFEN et al., 2017), agonistas de receptores canabinóides (KLAUKE et al., 2013), antagonistas dos receptores NMDA (N-metil-D-Aspartato) (KIM et al., 2012), toxina botulínica (PARK; PARK et al., 2017; SAFARPOUR; JABBARI, 2018) entre outras. Apesar de todas as opções de tratamento disponíveis e avanços o tratamento adequado da dor neuropática continua a ser um desafio (CRUCCU; TRUINI, 2017; FORNASARI, 2017; BOUHASSIRA; ATTAL, 2018).

Fármacos convencionais têm efeitos colaterais como ataxia, alterações de humor, tremores, visão dupla, fala arrastada, perda de peso, etc., o que limita a sua utilização no tratamento da dor neuropática. Desse modo, as plantas medicinais e seus constituintes isolados podem ser uma importante ferramenta terapêutica

(SINGH et al., 2017). As plantas medicinais aromáticas possuem óleos essenciais, que são misturas complexas e voláteis de metabólitos, bastante utilizadas na indústria farmacêutica. Os terpenóides são os constituintes mais abundantes dos óleos essenciais e estão presentes como hemiterpenos, monoterpenos, ou sesquiterpenos e como seus derivados. Os monoterpenos são os constituintes mais representativos dos óleos essenciais, e possuem várias atividades farmacológicas descritas, como anti-inflamatória, antidepressiva e anticonvulsivante, dentre outras (BAKKALI, et. al. 2008), além do destaque no tratamento da dor. O carvacrol, o limoleno, o α -felandreno, o terpineol e o pineno estão nesse grupo de monoterpenos que apresentam atividade antinociceptiva (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013).

O Estragol (figura 1) é um monoterpeno encontrado em diversas plantas aromáticas, incluindo o pinheiro ponderosa (*Pinus ponderosa* Lawson & C. Lawson) (RADWAN et al., 1982; KEEFOVER-RING et al., 2015), estragão (*Artemisa dracunculus* L.) (OBOLSKIY et al., 2011; FROUSHANI et al., 2016), manjerição doce (*Ocimum basilicum* L.) (MURÁRIKOVÁ et al., 2017), funcho doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) (GORSS et al., 2002; RATHER et al. 2016), Hissopo aniz (*Agastache foeniculum* L.) (EBADOLLAHI, 2011) e canelinha (*Croton zehntneri* Pax et Hoffm) (ANDRADE et al., 2015).

Figura 1 – estrutura química do estragol



Entretanto os monoterpeno possuem alta volatilidade, assim, são propensos à rápida evaporação e fácil degradação, podendo sofrer várias reações como a

oxidação ou a fotofragmentação, que limitam suas aplicações terapêuticas. Desse modo, sistemas farmacêuticos têm sido estudados por sua capacidade de diminuir a volatilidade, melhorando a estabilidade, a solubilidade em água e a eficácia das formulações, contribuindo assim para a efetividade terapêutica (LAI et al., 2006; OUÉDRAOGO et al., 2013; BILIA et al., 2014)

Como tentativa de solucionar esse problema, a complexação de fitoquímicos fracamente solúveis em água com ciclodextrinas emergiu como uma abordagem promissora para melhorar essas características (SUVARNA; GUJAR; MURAHARI, 2017). A propriedade mais notável das ciclodextrinas é a sua capacidade para modificar as características físico-químicas de moléculas que são acomodadas dentro de sua cavidade interna, formando um complexo de inclusão, aumentando a solubilidade aquosa, a reatividade química e reduzindo a oxidação, sem alterar a capacidade da substância de atravessar as membranas (MENEZES et al., 2012; SERAFINI et al., 2012).

Considerando a dificuldade terapêutica diante das neuropatias e o potencial promissor dos monoterpenos, a presente pesquisa busca investigar a ação antinociceptiva do estragol diante dos modelos de neuropatia por constrição do ciático, bem como comparar a efetividade do monoterpeno livre frente ao complexado com β -ciclodextrina.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção do estragol livre e complexado

O estragol foi fornecido pelo Prof. Dr. Sydney Gonçalo de Lima do Laboratório de Geoquímica Orgânica/Departamento de Química/UFPI, do qual foi preparado o complexo de inclusão com β -ciclodextrina por co-precipitação. E foi definida a relação estequiométrica 1:1 para o preparo do complexo, de acordo com o obtido por Aguiar e colaboradores (2014) para o óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm que apresentava cerca de 90% de estragol em sua composição.

A complexação foi feita com 1,0 g de estragol e 7,6 g de β -CD solubilizadas em etanol PA e água ultrapura aquecida a 55 °C, respectivamente. Adicionou-se a solução etanólica à solução aquosa e retirou-se do aquecimento, homogeneizando-se à temperatura ambiente com auxílio de uma mesa agitadora a 150 rpm durante

quatro horas. Após este período, a suspensão foi resfriada a 4,0 °C por 12 horas. O precipitado foi recolhido, seco por liofilização por 12h (liofilizador Liobras L101), pesado e armazenado em frasco âmbar.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos fêmeas, da linhagem *Swiss*, pesando 25-35 g (n=5-7), obtidos do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí e os experimentos foram conduzidos no mesmo núcleo, onde foram mantidos à temperatura de 24 ± 1°C e ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum* e foram colocados em jejum de 12h antes dos experimentos.

Os procedimentos referentes à eutanásia foram realizados por overdose de anestésico geral (tiopental sódico, 100 mg/kg, por via intraperitoneal) em conformidade com o parágrafo 1º. do Art. 14 da Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, atualizada por RN 37 de 22/02/2018 do CONCEA. Os procedimentos foram realizados sob a responsabilidade técnica da médica veterinária da equipe, Adeline de Andrade Carvalho, CRMV-PI Nº 866.

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais como modelo experimental foram realizados segundo as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais – CEEA/UFPI sob o protocolo Nº 082/14.

2.3 Avaliação antinociceptiva

2.3.1 Constrição parcial do nervo ciático (CPNC)

Sob anestesia profunda com cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg) intramuscular, os animais foram submetidos à compressão parcial do nervo ciático, que foi exposto através da separação do músculo bíceps femoral com pinça romba e, em seguida, liberado do tecido conjuntivo circundante. Usando uma pinça para localizar o nervo, este foi circundado por um fio de seda (3-0 Shalon®) de forma a circundar levemente todo o diâmetro do nervo ciático. Todas as

ligaduras foram realizadas pelo mesmo pesquisador, a fim de garantir a homogeneidade no procedimento. Após a ligadura a pele foi suturada, o animal tratado com solução tópica de clorexidina (2%) e colocado em gaiola metabólica com antissepsia prévia. Em um grupo (Sham) o procedimento foi apenas simulado (SELTZER et al., 1990).

2.3.2 Testes comportamentais de avaliação da nocicepção

Para avaliação do limiar nociceptivo mecânico foi utilizado o teste de Von Frey. Assim, os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno sob uma plataforma fenestrada de arame elevada para permitir o acesso à superfície plantar das patas traseiras. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 30 min antes dos testes comportamentais. O Limiar Nociceptivo Mecânico foi mensurado na superfície plantar, que foi tocada com três repetições, por diferentes filamentos partindo das menores concentrações, em gramas, para as maiores (0,16g – 15g). Todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação prévia (basal) e novamente reavaliados em diferentes tempos após a cirurgia (CHAPLAN et al., 1994).

Para avaliação da sensibilidade térmica ao frio (10°C) foi utilizado o teste da acetona, onde uma alíquota de 0,05 mL de acetona foi lançada sob a superfície ventral da pata do animal através do piso fenestrado. Se a pata do animal estivesse corretamente molhada pela acetona, iniciava-se um período de observação inicial de 20 s, no qual o animal poderia ou não apresentar comportamentos relacionados à dor. Os comportamentos foram avaliados em uma escala de 4 pontos assim apresentada:

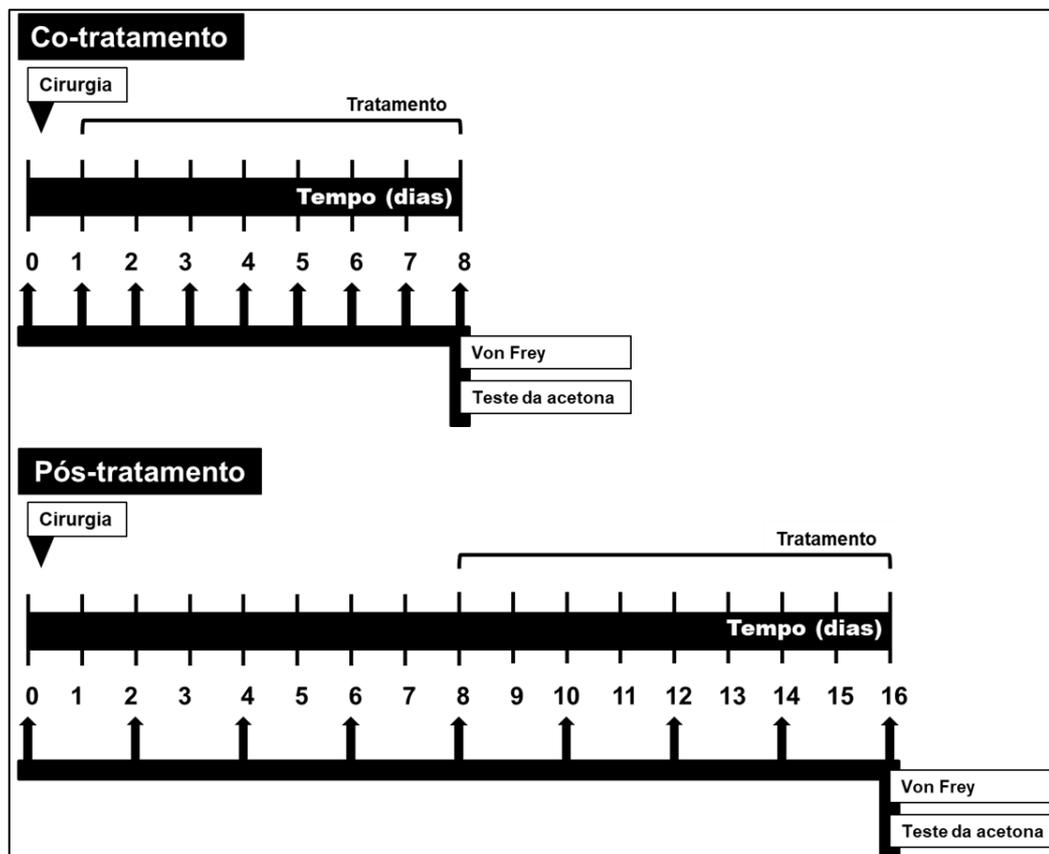
- Escore “0” para a ausência de qualquer comportamento doloroso;
- Escore “1” para uma retirada rápida da pata e/ou com tremor ou batimento desta no chão (o tremor característico, ou *flicking*, era importante para determinar se a retirada da pata se deu por dor ou por espanto do animal);
- Escore “2” para uma retirada com sustentação prolongada da pata com ou sem repetido *flicking* desta,
- E escore “3” para a situação onde o animal lambe a face ventral da pata após *flicking* repetido da pata (FLATTERS; BENNET, 2004).

Todas as avaliações foram realizadas as cegas e sempre pelo mesmo pesquisador que iniciou as observações.

2.3.3 Esquemas de tratamento

Para avaliar o efeito subagudo das substâncias foram realizados dois esquemas de tratamento: co-tratamento e pós-tratamento (figura 2). No primeiro, as administrações de Estragol livre (Est 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) e Estragol complexado (Est-CD 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), pregabalina (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (agua destilada e Tween 80 a 2%, v.o.) foram realizadas a partir do primeiro dia após a cirurgia e permaneceram por mais oito dias. No pós-tratamento, as administrações só iniciam após oito dias do procedimento cirúrgico. Como a finalidade do protocolo foi verificar o efeito subagudo da substância, as administrações só eram realizadas após os testes comportamentais, a fim de evitar uma falsa interpretação do efeito agudo.

Figura 2 – Esquema demonstrativo dos tratamentos subagudos.



2.4 Avaliação antioxidante

Os testes da atividade antioxidante foram realizados após o protocolo de pós-tratamento subagudo, onde foi mensurado os níveis de Malondialdeído (MDA), Glutathiona Reduzida (GSH) e Superóxido Dismutase (SOD) no plasma dos animais com neuropatia, por meio de espectrofotometria. As concentrações de MDA no soro foram mensuradas de acordo com metodologia descrita por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), as concentrações de MDA foram expressas como mmol/mL de soro. A análise das concentrações de GSH foram lidas a 412 nm em espectrofotômetro de acordo com o protocolo adaptado de Ellman (1959). As concentrações de GSH, também, foram expressas em mmol/L de soro. E a determinação da atividade da SOD foi realizada em acordo a metodologia de Green et al., (1982). As análises foram feitas por espectrofotometria em leitor de placas (BioTek EL800).

2.5 Avaliação histopatológica

No 16º dia os animais foram eutanasiados e o nervo ciático foi removido e isolado para avaliação histológica. O tecido foi imediatamente colocado em solução de formalina a 10%, processado e parafinado. O tecido for cortado com um micrótomo, em seções de 3–4 µm para posterior preparação de laminas e avaliação por um patologista.

2.6 Avaliação das lesões gástricas após administração subaguda

Após a administração subaguda do estragol no pós-tratamento no modelo de CPNC os animais foram eutanasiados e o estômago foi removido para avaliação macroscópica de lesões gástricas (SZABO et al., 1985). A escala para a avaliação das lesões utilizou escores de até 10 petéquias: 2 pontos; acima de 10 petéquias: 3 pontos; úlceras de até 1 mm: *n x 2 (*n=número de lesões encontradas); úlceras maiores que 1 mm: *n x 3 (*n=número de lesões encontradas); úlceras perfuradas: *n x 4 (*n=número de lesões encontradas); hemorragia: 1 ponto; edema: 1 ponto; perda de pregas: 1 ponto; perda da coloração: 1 ponto.

2.7 Atividade locomotora e relaxante muscular

Para avaliação da atividade relaxante muscular foi utilizado o Teste do Rota rod. Os animais (n=6) foram selecionados 24h antes através de uma triagem em sessões de 2 minutos de duração, onde o animal reconduzido à barra por 3 vezes e foram descartados os animais que não permaneciam na barra giratória nesse intervalo de tempo. Após a triagem os animais foram tratados com Est (400 mg/kg, v.o.), Est-CD (400 mg/kg, v.o.) ou veículo (água destilada + 2% de tween 80, v.o.) por via oral 60 minutos antes do experimento. A dose de 400 mg/kg foi selecionada por ser a maior dose utilizada nos testes comportamentais. Como controle positivo utilizado foi o diazepam (4 mg/kg, i.p). O método permite detectar a ocorrência de incoordenação motora e ação relaxante muscular, permitindo uma interpretação mais precisa dos testes de antinocicepção (DUNHAM; MIYA, 1957).

Para avaliar a capacidade exploratória dos animais foi utilizado o teste do campo aberto (ARCHER, 1973). Os camundongos foram distribuídos em grupos (n=6) e tratados com Est (400 mg/kg, v.o.), Est-CD (400 mg/kg, v.o.) ou veículo (NaCl 0,9% + 2% de tween 80) e o controle positivo utilizado foi o diazepam (4 mg/kg, i.p). Após 60 ou 30 minutos, os animais foram levados individualmente ao campo aberto, que consiste em uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm), confeccionada em acrílico, com piso preto dividido em nove partes iguais com paredes transparentes.

O animal foi colocado no quadrante central da arena e deixado para explorar o ambiente por cinco minutos, foi mensurado o número de quadrantes atravessados com as quatro patas pelo animal. A arena foi limpa com álcool a 70% após cada animal ser retirado, sendo então realizada a comparação entre os grupos (BROADHURST, 1957; ARCHER, 1973).

2.8 Análise Estatística

Foram utilizados as análise de variância uma ou duas vias (ANOVA) seguida do Teste de Tukey para avaliar a significância das diferenças entre as médias. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando o valor for $p < 0,05$. Em todos estes procedimentos, foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* versão 6.0.

3 RESULTADOS

3.1 Incorporação do estragol a formulação

A formação do complexo de inclusão do estragol com β -ciclodextrina por co-precipitação permitiu a incorporação de diferentes quantidades do monoterpene à formulação, essas quantidades estão apresentadas na tabela 1, de acordo com as doses utilizadas no estudo *in vivo*.

Tabela 1 – Relação de quantidades de estragol livre e na forma complexada

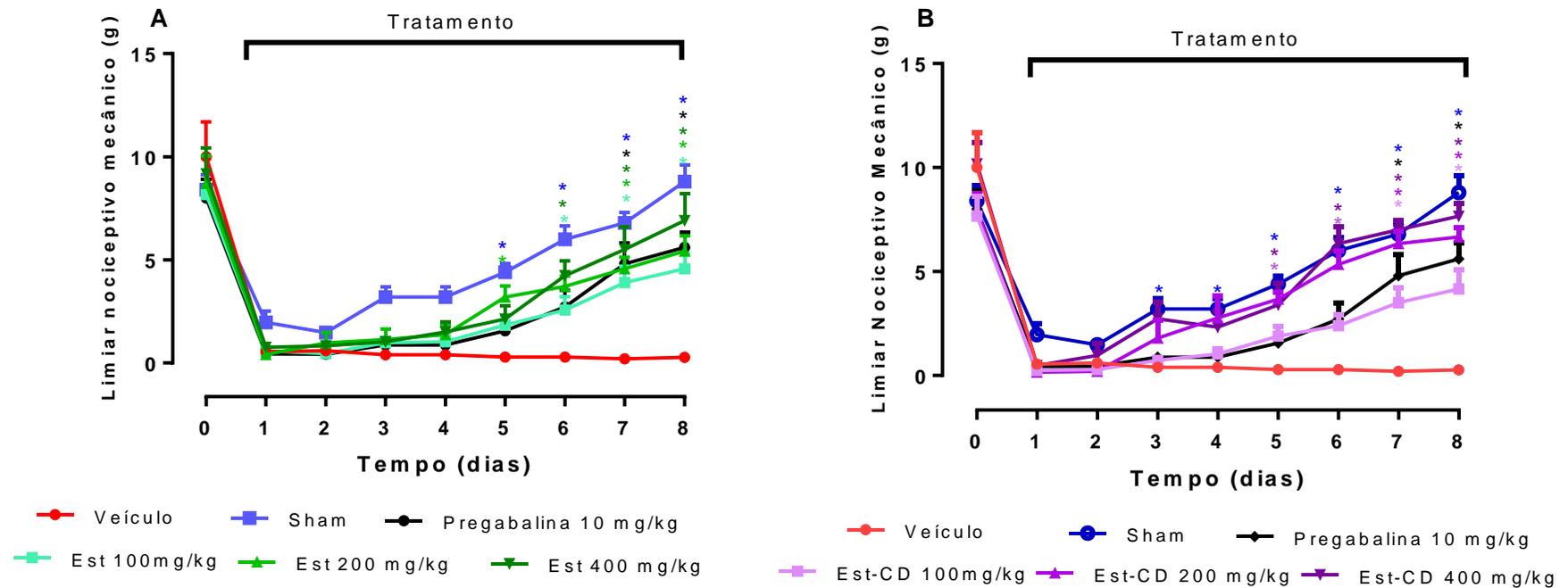
Est (mg)	CI-Est/ β -CD (mg)
100	2,8516
200	5,7031
400	11,4062

Est: Estragol. CI-Est/ β -CD: Complexo de inclusão de estragol complexado com β -ciclodextrina

3.2 Avaliação antinociceptiva

Os dados da figura 3 mostram o efeito do estragol livre e complexado sobre a instalação da neuropatia por injúria nervosa, a fim de verificar se o monoterpene provoca algum tipo de interferência no desenvolvimento da neuropatia.

Figura 3 - Efeito do cotratamento subagudo com estragol livre e complexado sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.

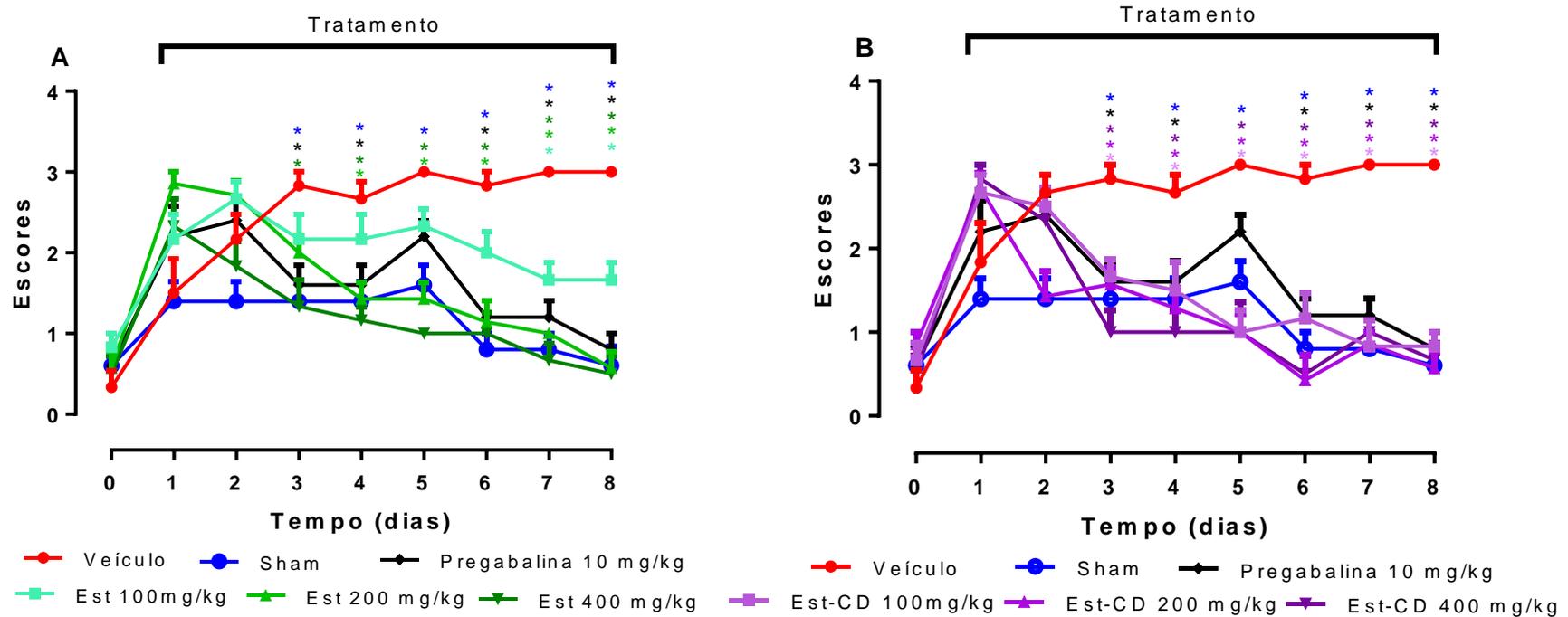


Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do limiar de retirada de pata de camundongos (25-30 g) submetidos ao teste com filamentos de von Frey, tratados com Estragol (Est 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (A) ou Estragol complexado com β -Ciclodextrina (Est-CD 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (B). Os grupos de animais (n = 5-7) também receberam veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.) ou pregabalina (10 mg/kg, v.o.) (* $p < 0,05$ comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

O painel A da figura 3 mostra a ação antinociceptiva do estragol livre que apresentou aumento significativo ($p < 0,01$) no limiar de retirada da pata nas três doses testadas nos dias 7 e 8, entretanto a dose de 400 mg/kg provocou esse aumento já no 6º dia de observação. No painel B as três testadas do complexo também foram efetivas no aumento do limiar no 7º e 8º dias, contudo a complexação antecipou essa ação antinociceptiva que pode ser observada já no 5º dia de tratamento com as doses de 200 e 400 mg/kg. O grupo de animais tratados com o veículo não apresentou aumento do limiar durante o tempo de avaliação, no grupo falso operado (sham) há uma redução temporária do limiar que vai, gradativamente, aumentando a medida que o processo de cicatrização vai acontecendo.

Além da avaliação por estímulo mecânico foi realizada a investigação da ação antinociceptiva do estragol livre e complexado sobre os escores de sensibilidade térmica através do teste da acetona, como mostra a figura 4.

Figura 4 - Efeito do co-tratamento subagudo com estragol livre e complexado sobre a sensibilidade térmica em modelo de neuropatia induzida por Compressão parcial do ciático.

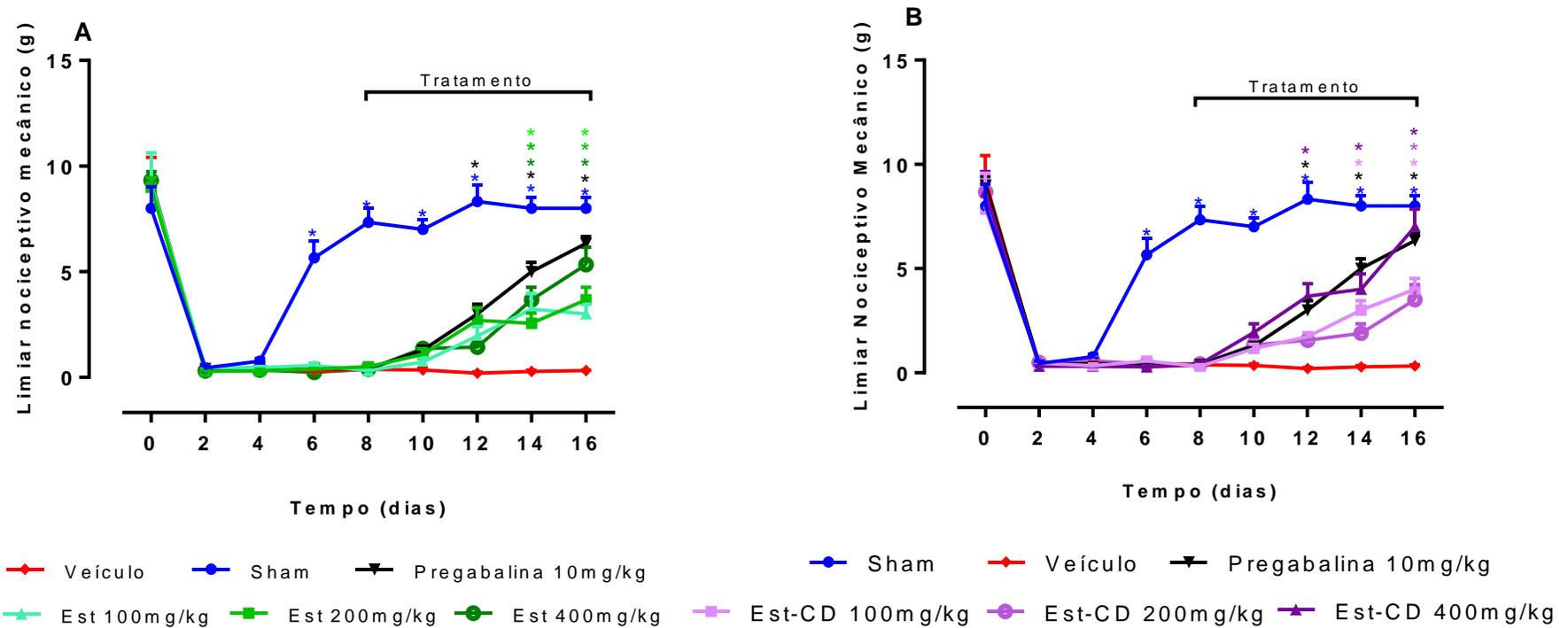


Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do escore de sensibilidade térmica ao frio por acetona nos animais (25-30 g) tratados com Estragol (Est 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (A) ou Estragol complexado com β -Ciclodextrina (Est-CD 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (B). Os grupos de animais (n = 6) também receberam veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.) ou pregabalina (10 mg/kg, v.o.) (* $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

Os dados mostram que o estragol livre (painel A) reduz, significativamente ($p < 0,05$), a sensibilidade ao estímulo térmico após o 3º dia do procedimento cirúrgico com a dose de 400 mg/kg, a dose de 200 mg/kg foi efetiva a partir do 4º dia e a dose de 100 mg/kg no 7º e 8º dia. Entretanto, a complexação (painel B) foi efetiva em reduzir, significativamente ($p < 0,05$), a sensibilidade térmica, a partir do 3º dia com as três doses testadas.

Na figura 5 estão apresentados os dados do pós-tratamento do estragol livre e complexado, nesta avaliação o tratamento só é iniciado após a neuropatia estar completamente instalada nos animais, a fim de verificar se o monoterpeno apresenta atividade antinociceptiva frente à neuropatia já instalada.

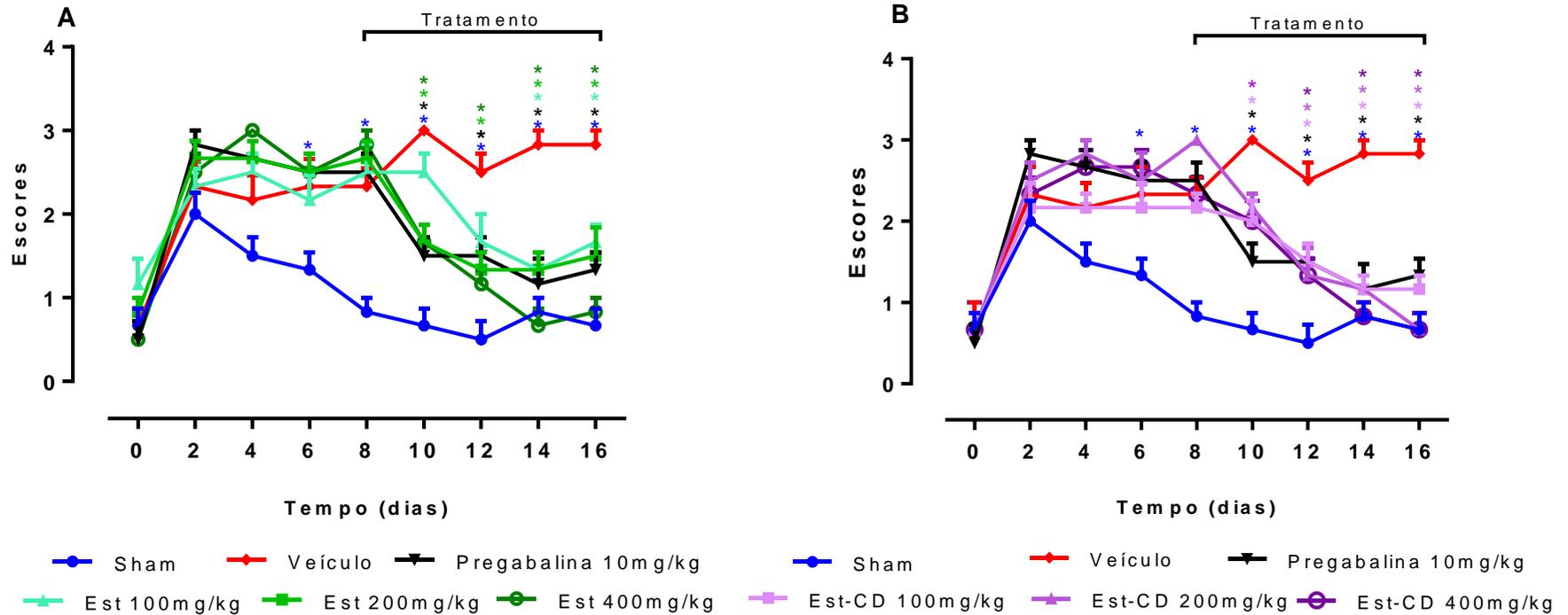
Figura 5 - Efeito do pós-tratamento subagudo com estragol livre e complexado sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.



Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do limiar de retirada de pata de camundongos (25-30 g) submetidos ao teste com filamentos de von Frey, tratados com Estragol (Est 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) (A) ou Estragol complexado com β -Ciclodextrina (Est-CD 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) (B). Os grupos de animais (n = 5-7) também receberam veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.) ou pregabalina (10 mg/kg, v.o.) (* $p < 0,05$ comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

A figura 5 destaca o efeito antinociceptivo do estragol livre (painel A) nos pós-tratamento ao aumentar, significativamente ($p < 0,01$), o limiar de retirada da pata nas três doses testadas nos dias 14 e 16. No painel B o efeito do estragol complexado surge a partir do 12º dia com a dose de 400 mg/kg, no 14º a dose de 200 mg/kg também aumenta o limiar e no 16º dia as três doses são efetivas. Para elucidar a ação do monoterpeno na nocicepção térmica os animais foram, também, submetidos ao teste da acetona que mostra os escores de sensibilidade térmica (figura 6).

Figura 6 - Efeito do pós-tratamento subagudo com estragol livre e complexado sobre a sensibilidade térmica em modelo de neuropatia induzida por Compressão parcial do ciático.



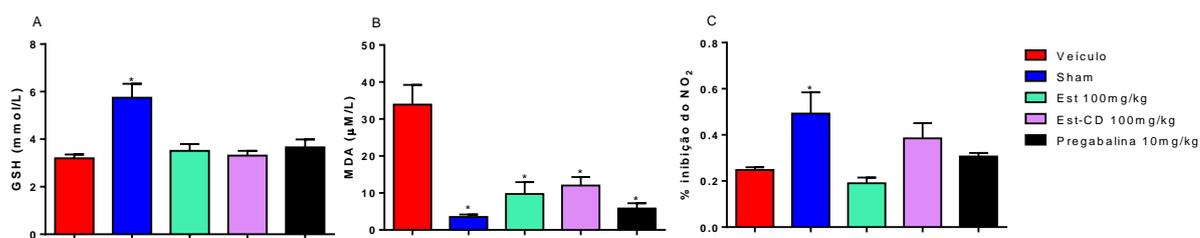
Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do escore de sensibilidade térmica ao frio por acetona nos animais (25-30 g) tratados com Estragol (Est 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (A) ou Estragol complexado com β -Ciclodextrina (Est-CD 100, 200 e 400 mg/kg v.o.) (B). Os grupos de animais (n = 5-6) também receberam veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.) ou pregabalina (10 mg/kg, v.o.) (* $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

Os dados mostram que o estragol livre (painel A) foi efetivo a partir do 10º dia com as doses de 200 e 400 mg/kg, reduzindo a sensibilidade ao estímulo térmico, o efeito da dose de 100 mg/kg surgiu no 12º e 14º dia. Enquanto que com o estragol complexado (painel B) a dose de 100 mg/kg mostrou ação antinociceptiva já no 10 dia, as demais doses apresentaram efeito semelhante.

3.3 Avaliação antioxidante

A avaliação antioxidante foi realizada no protocolo de pós-tratamento com a menor dose efetiva do estragol livre e complexado, como mostra a figura 7.

Figura 7. Efeito antioxidante do estragol livre e complexado em soro sanguíneo de camundongos com neuropatia induzida por ligadura parcial do nervo ciático



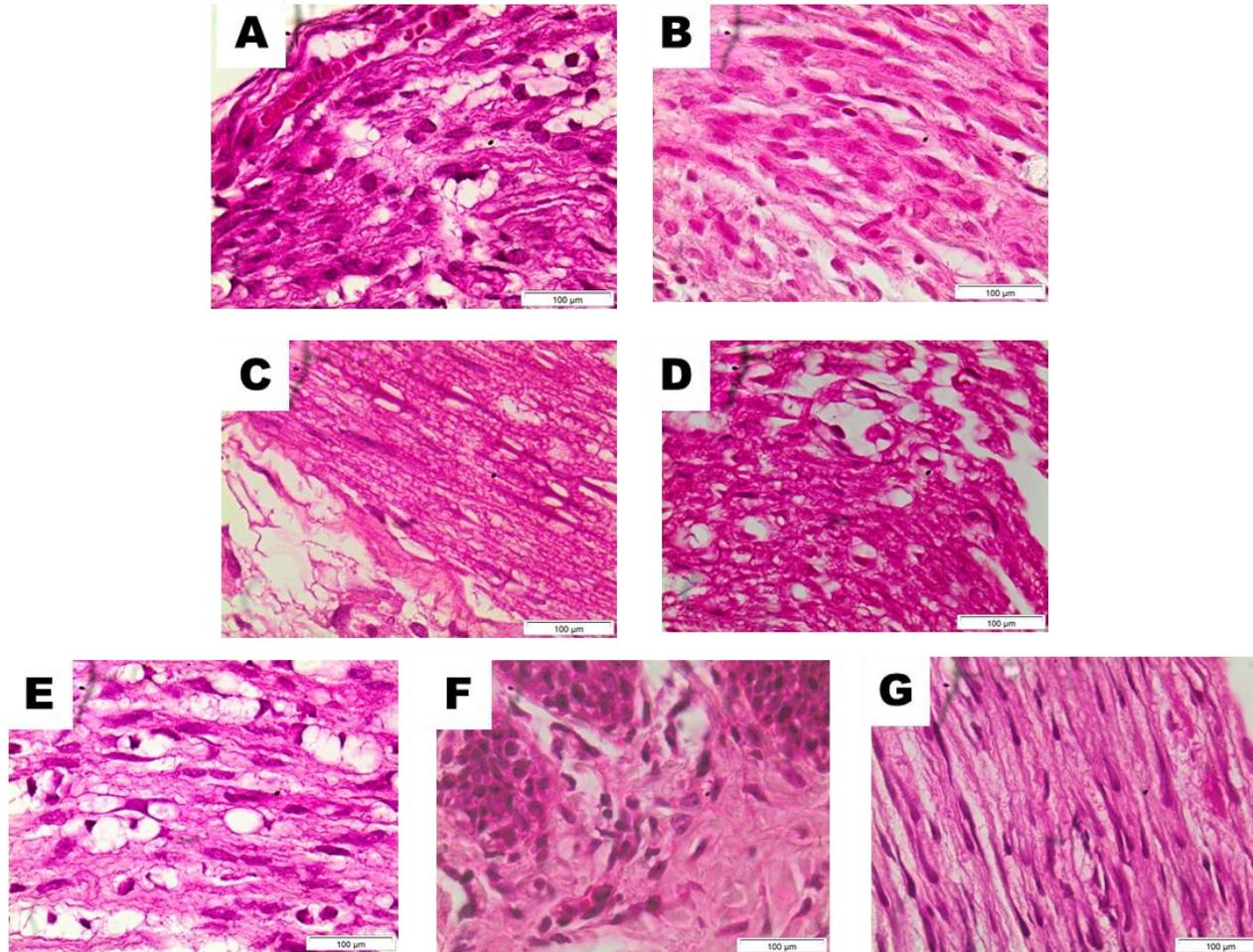
Os grupos de animais (n = 6) receberam Estragol (Est 100mg/kg, v.o.), estragol complexado (Est-CD 100 mg/kg, v.o.), veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.) ou pregabalina (10mg/kg v.o.). (A) níveis de superóxido dismutase (SOD), (B) concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e (C) concentração de glutathiona reduzida (GSH). Cada barra representa média ± EPM (*p<0,05 comparado com grupo veículo; ANOVA uma via, Teste de Tukey).

Os dados mostram a ação antioxidante do monoterpeno na dose de 100 mg/kg ao reduzirem as concentrações das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) verificada através dos níveis de malondialdeído. Entretanto, o estragol não provocou alterações significativas nas concentrações de GSH e SOD. Desse modo, novas investigações são necessárias com a finalidade de verificar se em doses maiores o monoterpeno é capaz de interferir na ação de GSH e SOD.

3.4 Avaliação histopatológica

A figura 9 destaca o efeito do estragol livre e complexado sobre o reparo tecidual sobre o nervo ciático de animais com neuropatia por injúria nervosa.

Figura 8: Avaliação histopatológica do nervo ciático de camundongos com neuropatia por injúria nervosa tratados por via oral por 8 dias com estragol livre e complexado.



A - Estragol (100 mg/kg), B - Estragol (200 mg/kg), C - Estragol complexado com β -Ciclodextrina (Est-CD 100 mg/kg), D - Est-CD 200 mg/kg, E - Veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.), F - Pregabalina (10 mg/kg), G - Sham.

A avaliação histológica mostra discreta presença de tecido conjuntivo e discreta infiltração de células inflamatórias nos grupos tratados com Estragol 100 mg/kg (A), Estragol 200 mg/kg (B), Estragol complexado com β -Ciclodextrina 100 mg/kg (C) e Est-CD 200 mg/kg (D), enquanto que o grupo veiculo mostra maior desorganização tecidual compatível com o dano causado pela injuria nervosa. Desse modo, o estragol apresenta discreto efeito sobre o reparo tecidual.

3.5 Avaliação de lesões gástricas após o tratamento subagudo

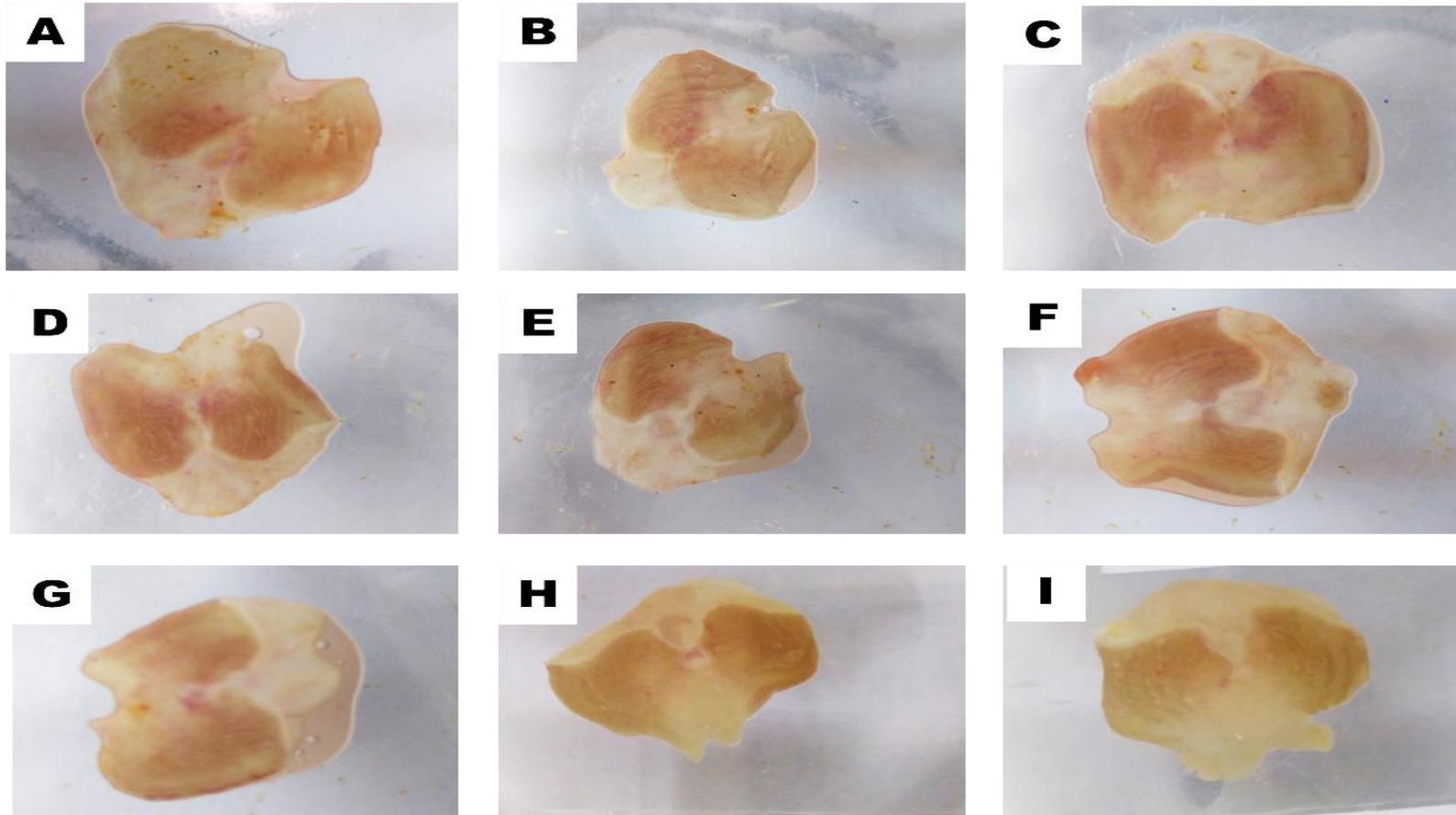
A tabela 2 e a figura 9 destacam a observação de um dos possíveis efeitos colaterais comuns às drogas utilizadas para o tratamento das dores, entretanto os dados destacam que o estragol livre e complexado, nas doses utilizadas, não provocaram lesões nesse intervalo de tempo.

Tabela 2. Avaliação de danos gástricos em camundongos com neuropatia por injuria nervosa tratados por via oral por 8 dias com estragol livre e complexado.

Tratamento	Doses	Escore de lesões	N
Est	100 mg/kg	1,66 (0-2)	6
	200 mg/kg	1,33 (0-2)	6
	400 mg/kg	1,16 (0-3)	6
Est-CD	100 mg/kg	1 (0-2)	5
	200 mg/kg	0,83 (0-2)	6
	400 mg/kg	1 (0-2)	6
Pregabalina	10 mg/kg	0,8 (0-2)	5
Sham		0,83 (0-2)	6
Veículo		1,5 (0-3)	6

Os valores são expressos em medianas dos escores de lesões gástricas, valores máximos e mínimos entre parênteses nos animais (25-30g) tratados com Estragol (Est 100, 200 e 400mg/kg v.o.) ou Estragol complexado com β -Ciclodextrina (Est-CD 100, 200 e 400 mg/kg v.o.). Os grupos de animais (n = 5-6) também receberam veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.) ou pregabalina (10mg/kg, v.o.).

Figura 9: Avaliação macroscópica da mucosa gástrica de camundongos com neuropatia por injúria nervosa tratados por via oral por 8 dias com estragol livre e complexado.

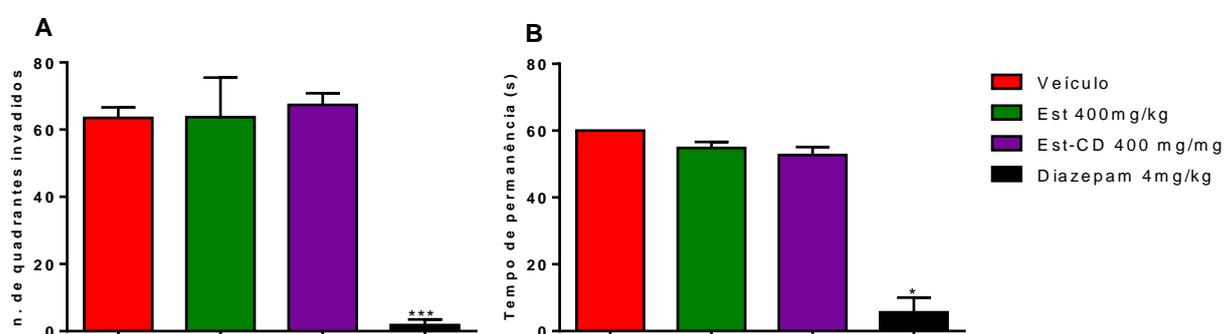


A - Estragol (100 mg/kg), B - Estragol (200 mg/kg), C - Estragol (400 mg/kg), D - Estragol complexado com β -Ciclodextrina (Est-CD 100 mg/kg), E - Est-CD 200 mg/kg, F - Est-CD 400 mg/kg. G - veículo (água destilada + Tween 2%, v.o.), H - Pregabalina (10 mg/kg), I - Sham.

3.6 Rota rod e campo aberto

Para a realização dos testes do campo aberto e rota rod, apresentados na figura 10, foi escolhida a maior dose do estragol testada nos ensaios comportamentais.

Figura 10 - Efeito do estragol livre e complexado sobre a atividade locomotora e relaxante muscular.



Os camundongos (25-30 g, n-6-7) foram tratados com estragol (Est 400 mg/kg, v.o.), estragol complexado com β -ciclodextrina (Est-CD 400 mg/kg, v.o.), diazepam (4 mg/kg, v.o.) ou veículo (água destilada + tween 80 a 2%). (A) Teste do campo aberto, cada barra apresenta a média \pm E.P.M. do número de quadrantes invadidos. (B) Teste do rota rod, cada barra representa \pm E.P.M. do tempo de permanência na barra giratória. (* $p < 0,05$ comparado com grupo veículo; ANOVA uma via, Teste de Tukey).

Os dados mostram que, na dose testada, o estragol livre e complexado não foram capazes de alterar a mobilidade dos animais, não apresentando atividade relaxante muscular, nem interferindo na atividade locomotora, visto que, a média de quadrantes invadidos pelos animais tratados com Est (400 mg/kg) ou Est-CD (400 mg/kg) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (veículo), de forma semelhante ao resultado de rota rod, onde o Est (400 mg/kg) ou Est-CD (400 mg/kg) também não alteraram significativamente o tempo de permanência dos animais na barra giratória. Em ambos os testes apenas o diazepam (4 mg/kg) alterou significativamente ($p < 0,05$), os parâmetros observados.

4 DISCUSSÃO

Existem diversos fitoquímicos com vários benefícios para a saúde, entretanto muitos deles têm sua aplicabilidade limitada devido à sua solubilidade em água e pouca estabilidade. A complexação de fitoquímicos fracamente solúveis em água com ciclodextrinas melhora sua solubilidade aquosa, estabilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade. As ciclodextrinas possuem uma estrutura com um cone truncado oco com cavidade hidrofóbica e exterior hidrofílico, sendo uma ótima alternativa para fármacos hidrofóbicos, instáveis e voláteis. Assim, as ciclodextrinas e seus derivados contribuem para a liberação de fitoquímicos no local alvo, o que pode vir a minimizar a toxicidade pela redução da quantidade utilizada (SUVARNA; GUJAR; MURAHARI, 2017).

O uso de complexos de inclusão melhora a biodisponibilidade, solubilidade, estabilidade. Além disso, reduz os efeitos colaterais e citotoxicidade e pode prolongar o tempo de efeito das substâncias prolongado no tempo, visto que a complexação melhora algumas características farmacocinéticas o que reduz a necessidade de usar grandes quantidades do princípio ativo (ZHANG; MA, 2013; LIMA et al., 2016).

Esses produtos naturais associados à tecnologia farmacêutica podem ser uma importante alternativa terapêutica para as patologias de difícil tratamento, como a dor neuropática. Existem algumas opções de tratamentos disponíveis, entretanto muitos possuem eficácia limitada, como os opióides que apenas 35% dos pacientes obtêm benefícios. Nos últimos 20 anos novos alvos terapêuticos promissores que surgiram, entretanto os gabapentinóides mantêm o status como tratamento de primeira escolha, mas esses também não apresentam efetividade em todos pacientes e também são carregados de diversos efeitos colaterais (ALLES; SMITH, 2018).

Os resultados mostraram que o estragol foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo mecânico e reduzir a sensibilidade térmica, contribuindo para a correção de alguns dos sintomas da dor neuropática, que apresenta como quadro clínico mais comum a hiperalgesia, alodinia, dor espontânea, aumento da sensibilidade mecânica e térmica (TRUINI, 2017; OSBORNE; ANASTAKIS; DAVIS, 2018).

O mecanismo de ação pelo qual o estragol contribui para a redução da sintomatologia da neuropatia ainda carece de investigação, todavia essa ação

terapêutica pode estar associada a seu efeito anti-inflamatório (PONTE et al., 2012; SILVA-COMAR et al., 2014; WIIRZLER et al., 2016) e antioxidante (MUÑOZ-ACEVEDO; KOUZNETSOV; STASHENKO, 2009). Esse último corroborando com nossos resultados que demonstraram que o monoterpene reduz a peroxidação lipídica.

O estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento de diversas patologias. Espécies reativas de oxigênio, que inclui o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O^{2-}), peróxidos lipídicos, entre outros, estão envolvidos no crescimento, diferenciação, progressão e morte celular. Eles podem reagir com moléculas endógenas, podendo provocar injúria celular. Participam da gênese de várias doenças, incluindo artrite, câncer, diabetes, aterosclerose, neuropatia, falhas na imunidade e funções endócrinas. Antioxidantes presumivelmente atuam como salvaguarda contra o acúmulo de EROS e sua eliminação do sistema (RAJENDRAN et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio promovem lesões em moléculas como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, alterando a integridade e metabolismo das membranas celulares (SMITH et al., 2009). As membranas biológicas que sofrem peroxidação lipídica têm suas funções como fluidez e seletividade iônica alteradas, causando a liberação de produtos nocivos como o malondialdeído, que por sua vez podem causar alterações nas atividades das enzimas e proteínas ligadas as membranas, oxidando-as e por fim prejudicando suas atividades transportadoras e receptoras (HALLIWELL, 2012).

A dor neuropática pode ser uma consequência do desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes endógenos, a suplementação com antioxidantes pode ser uma opção de tratamento. Esse tipo de terapia exerce sua ação benéfica por meio de funções antioxidantes e imunorreguladoras, otimizando a função mitocondrial e até aumentando a biogênese dessa organela vital. Nesse sentido, a suplementação antioxidante melhoraria a qualidade de vida do paciente (CARRASCO et al., 2018).

Além do envolvimento oxidativo existem mecanismos inflamatórios envolvidos. A inflamação no sistema nervoso tem a função de eliminar patógenos, fagocitar tecidos necróticos, mediar mecanismos de reparo de alguns tipos de tecidos danificados e recrutar leucócitos. Além disso, fatores neurotróficos liberados por micróglia e astrócitos em resposta a fatores citotóxicos produzidos por células

danificadas mostraram ter alguns efeitos neuroprotetores. A resposta inflamatória, no entanto, também pode desempenhar um papel significativo no surgimento da sintomatologia da neuropatia, logo a redução do dano inflamatório também é uma importante ferramenta para o controle do desenvolvimento da dor neuropática (SCHOMBERG et al., 2012).

O aumento de citocinas, tais como IL-1 β e TNF- α contribuem para a sensibilização neuronal. A sensibilização periférica resulta em alterações das propriedades dos nervos periféricos que ocorrem como resultado dos danos teciduais ou por causa de alterações eletrofisiológicas de fibras primárias, resultando em condições de hipersensibilidade (BASBAUM et al., 2009).

O estragol apresenta ação anti-inflamatória através da inibição da permeabilidade vascular e migração de leucócitos (RODRIGUES et al., 2016), reduz níveis de PGE₂ e não inibe a enzima COX-1 e, conseqüentemente, não promove dano gástrico (WIIRZLER et al., 2016).

Em relação aos possíveis efeitos adversos comuns ao tratamento das neuropatias o estragol, nas doses utilizadas, não aumentou a incidência de lesões gástricas. Bem como não provocou efeito relaxante muscular ou sedativo. No estudo de Cosentino, Norte e Lazarini (2004), o estragol também foi avaliado no teste do campo aberto, e de forma semelhante aos dados aqui apresentados, o estragol não provocou alteração na atividade exploratória espontânea dos animais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstram evidências convincentes de que o tratamento com estragol reduz os sintomas da dor neuropática, caracterizando assim a ação antinociceptiva do monoterpeno, que pode estar sendo mediada pelo efeito antioxidante e reparo tecidual. Entretanto, devido o potencial tóxico relatado na literatura a complexação do estragol traz maior eficácia e segurança, visto que, o mesmo efeito farmacológico é obtido utilizando menor quantidade do princípio ativo.

O estragol também demonstrou não apresentar efeitos colaterais comuns a outras substâncias utilizadas para tratar a dor neuropática, como sedação e danos gástricos. Contudo, estudos ainda são necessários para compreender a ação farmacológica do monoterpeno, entretanto ele surge como um potencial promissor no tratamento dessa condição crônica de difícil tratamento.

REFERENCIAS

- ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, 2018.
- ANDRADE, T. C. B. et al. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of croton zehntneri (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 1, p. 173–182, 2015.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–35, maio 1973.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BILIA, A. R. et al. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- BOUHASSIRA, D.; ATTAL, N. Emerging therapies for neuropathic pain. **Pain**, p. 1, 2017.
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. **British journal of psychology (London, England : 1953)**, v. 48, n. 1, p. 1–12, fev. 1957.
- CARRASCO, C. et al. Neuropathic Pain: Delving into the Oxidative Origin and the Possible Implication of Transient Receptor Potential Channels. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 95, 2018.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.
- CHEN, M. et al. Spinal dopaminergic involvement in the antihyperalgesic effect of antidepressants in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 649, p. 116–123, 2017.
- COSENTINO, R. M.; NORTE, M. C. B.; LAZARINI, C. A. Estragole-induced behavioural changes in rats. **Phytotherapy research : PTR**, v. 18, n. 11, p. 921–4, nov. 2004.
- CRUCCU, G.; TRUINI, A. A review of Neuropathic Pain: From Guidelines to Clinical Practice. **Pain and Therapy**, v. 6, n. S1, p. 35–42, 2017.
- DE SOUZA SILVA-COMAR, F. M. et al. Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- DING, W. et al. In vivo genotoxicity of estragole in male F344 rats. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 4, p. 356–65, maio 2015.

- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–9, mar. 1957.
- EBADOLLAHI, A. Chemical constituents and toxicity of. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. June, p. 212–217, 2011.
- ELLISON, D. L. Physiology of Pain. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 397–406, 2017.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–7, maio 1959.
- FEIZERFAN, A.; SHEH, G. Transition from acute to chronic pain. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 15, n. 2, p. 98–102, 2015.
- FORNASARI, D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. **Pain and Therapy**, v. 6, n. S1, p. 25–33, 2017.
- FROUSHANI, S. M. A. et al. Estragole and methyl-eugenol-free extract of *Artemisia dracunculoides* possesses immunomodulatory effects. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 6, n. 5, p. 526–534, 2016.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–8, out. 1982.
- GROSS, M. et al. Biosynthesis of estragole and t-anethole in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) chemotypes. Changes in SAM:phenylpropene O-methyltransferase activities during development. **Plant Science**, v. 163, n. 5, p. 1047–1053, 2002.
- GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS, L. J. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. **Phytotherapy research : PTR**, v. 27, n. 1, p. 1–15, jan. 2013.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–65, maio 2012.
- HATCH, M. N. et al. Neuropathic pain and SCI: Identification and treatment strategies in the 21st century. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 384, p. 75–83, 2018.
- HIROKI, T. et al. Repeated Administration of Amitriptyline in Neuropathic Pain: Modulation of the Noradrenergic Descending Inhibitory System. **Anesthesia and Analgesia**, v. 125, n. 4, p. 1281–1288, 2017.
- IASP. **IASP Terminology - IASP**. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Neuropathicpain>>. Acesso em: 2 fev. 2018.
- ISHII, Y. et al. Phosphorylation of protein phosphatase 2A facilitated an early stage of chemical carcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 336, p. 75–83,

2017.

KAPLAN, A. A. et al. Peripheral nerve and diclofenac sodium: Molecular and clinical approaches. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 87, n. March, p. 2–11, 2018.

KEEFOVER-RING, K. et al. Rapid Induction of Multiple Terpenoid Groups by Ponderosa Pine in Response to Bark Beetle-Associated Fungi. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 1, p. 1–12, 2016.

KIM, Y. et al. Effect of NMDA NR2B antagonist on neuropathic pain in two spinal cord injury models. **Pain**, v. 153, n. 5, p. 1022–9, maio 2012.

KLAUKE, A.-L. et al. The cannabinoid CB₂ receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 608–20, abr. 2014.

LAI, F. et al. Artemisia arborescens L Essential Oil – Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Potential Agricultural Application : Preparation and Characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, p. E1–E9, 2006.

LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate polymers**, v. 151, p. 965–987, 20 out. 2016.

MENEZES, P. P. et al. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45–50, 2012.

MIFFLIN, K. A.; KERR, B. J. The transition from acute to chronic pain: Understanding how different biological systems interact. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 61, n. 2, p. 112–122, 2014.

MILLER, R. M.; KAISER, R. S.; KAISER, R. S. Psychological Characteristics of Chronic Pain : a Review of Current Evidence and Assessment Tools to Enhance Treatment. 2018.

MUNOZ-ACEVEDO, A.; KOUZNETSOV, V. V; STASHENKO, E. E. Artículos Originales Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en. v. 41, n. 3, p. 287–294, 2009.

MURÁRIKOVÁ, A. et al. Characterization of Essential Oil Composition in Different Basil Species and Pot Cultures by a GC-MS Method. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1221, 2017.

NISHIKAWA, N.; NOMOTO, M. Management of neuropathic pain. **Journal of General and Family Medicine**, v. 18, n. 2, p. 56–60, 2017.

OBATA, H. Analgesic mechanisms of antidepressants for neuropathic pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

OBOLSKIY, D. et al. Artemisia dracuncululus L.(tarragon): a critical review of its

traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11367–11384, 2011.

OGAWA, S. et al. Pregabalin for Neuropathic Pain: Why Benefits Could Be Expected for Multiple Pain Conditions. **Clinical Drug Investigation**, v. 36, n. 11, p. 877–888, 2016.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OSBORNE, N. R.; ANASTAKIS, D. J.; DAVIS, K. D. Peripheral nerve injuries, pain, and neuroplasticity. **Journal of hand therapy : official journal of the American Society of Hand Therapists**, v. 31, n. 2, p. 184–194, 2018.

OUÉDRAOGO, I. W. K. et al. Volatility profiles of monoterpenes loaded onto cellulosic-based materials. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 100–106, 2013.

PARK, J.; PARK, H. Botulinum Toxin for the Treatment of Neuropathic Pain. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 260, 2017.

PONTE, E. L. et al. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 4, p. 984–990, 2012.

PUNT, A. et al. Use of physiologically based biokinetic (PBBK) modeling to study estragole bioactivation and detoxification in humans as compared with male rats. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 255–69, ago. 2009.

RADWAN, M. A. et al. Terpenes of ponderosa pine and feeding preferences by pocket gophers. **Journal of chemical ecology**, v. 8, n. 1, p. 241–53, jan. 1982.

RASMUSSEN-BARR, E. et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs for Sciatica: An Updated Cochrane Review. **Spine**, v. 42, n. 8, p. 586–594, 15 abr. 2017.

RATHER, M. A. et al. Foeniculum vulgare: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1574–S1583, 2016.

SAFARPOUR, Y.; JABBARI, B. Botulinum toxin treatment of pain syndromes –an evidence based review. **Toxicon**, 2018.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205–18, nov. 1990.

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

SMITH, E. S. J. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **Journal of neurology**, v. 265, n. 2, p. 231–238, fev. 2018.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with

cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122–1144, 2017.

SZABO, S. et al. A quantitative method for assessing the extent of experimental gastric erosions and ulcers. **Journal of pharmacological methods**, v. 13, n. 1, p. 59–66, fev. 1985.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, n. April, p. i69–i85, 2010.

WIFFEN, P. et al. Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults. **Clinical Review and Education**, v. 319, n. 8, p. 818–819, 2017.

WIIRZLER, L. A. M. et al. Evaluation of Anti-inflammatory Activity of Estragole by Modulation of Eicosanoids Production. **International Journal of Pharma And Chemical Research**, v. 2, n. 1, p. 7–13, 2016.

WOLLER, S. A. et al. An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. S40–S46, 2017.

ZHANG, J.; MA, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 9, p. 1215–33, ago. 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estragol surge como uma nova ferramenta que poderá vir a ser utilizado na terapêutica da dor neuropática, visto que foi capaz de aumentar o limiar mecânico e reduzir a sensibilidade térmica tanto no tratamento agudo quanto no subagudo, e parte da sua ação pode estar sendo mediada pelo efeito antioxidante que o monoterpeno apresenta.

- O desenvolvimento de uma formulação com o estragol é bastante promissora visto que, até a presente data não existem produtos patenteados utilizando sua ação farmacológica na terapia da dor;
- O monoterpeno não provoca danos celulares significativos compatíveis com efeitos tóxicos sobre o DNA nuclear e mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*;
- O estragol na dose de 2000 mg/kg por via oral não provocou alterações do peso corporal dos animais, peso dos órgãos (coração, pulmões, fígado, rins e baço), parâmetros bioquímicos: renais e hepáticos;
- A complexação do estragol com β -ciclodextrina pelos métodos de *spray dryer* e co-precipitação apresenta bom rendimento e grau de incorporação com 0,6 e 2,9 mg do estragol para cada 100 mg do complexo de inclusão (CI) para as técnicas de *spray dryer* e co-precipitação, respectivamente.
- Na avaliação do efeito antinociceptivo os resultados destacam a ação aguda de 200 e 400 mg/kg do estragol sobre a dor neuropática induzida pela constrição parcial do ciático, onde a formação dos complexos de inclusão aumentou a potência do monoterpeno, visto que passou a se obter efeito semelhante com uma dose equivalente variando de 1,2 a 11,4 mg/kg de estragol no CI;
- A complexação por co-precipitação prolongou o efeito antinociceptivo do monoterpeno no teste de nocicepção térmica;
- Nas avaliações subagudas o monoterpeno livre e seus complexos de inclusão nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg produziram ação antinociceptiva no modelo de constrição do ciático, em ambos esquemas terapêuticos, co e pós-tratamento;

- O estragol na menor dose efetiva (100 mg/kg) no modelo subagudo reduziu significativamente a peroxidação lipídica nos animais com neuropatia;
- O tratamento subagudo por oito dias com o monoterpeno não induziu danos gástricos mensurados através da avaliação macroscópica dos estômagos;
- O estragol mostra discreta ação sobre o reparo tecidual nos nervos de animais com neuropatia por compressão do ciático;
- O monoterpeno livre e complexado na maior dose utilizada (400 mg/kg) nos modelos comportamentais não provocou alterações sobre a atividade locomotora e coordenação motora em camundongos.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados até o momento, têm-se como perspectivas a continuação da investigação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e neuropática do estragol livre e complexado com ciclodextrina:

- ✓ Verificar a ação antioxidante *in vivo* das doses do estragol que não foram mensuradas ;
- ✓ Avaliar os mecanismos de ação do estragol através da quantificação de interleucinas em tecidos alvos de animais com neuropatia dolorosa;
- ✓ Investigar os possíveis mecanismos de ação do monoterpeno através de marcadores de reparo ou dano tecidual ou de ativação celular com marcadores de ativação glial, IBA1 e Anti-GFAP;
- ✓ Avaliar o efeito do Estragol frente a outros modelos de neuropatia, como as induzidas por efeitos adversos de antineoplásicos e a neuropatia diabética.

APÊNDICE

Apêndice A – Patente em processo


 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
 PRO-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
 NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
 Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de EVERTON MORAES LOPES– Doutorando, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 08/10/2018, cujo título denomina-se “**COMPLEXO DE INCLUSÃO CONTENDO O MONOTERPENO ESTRAGOL E β -CICLODESTRINA E SEU USO NO TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA**”, do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

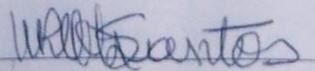
Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 08/10/2018.



Prof. Dr. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
 Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI