



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Victor Hugo Lopes de Andrade

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DE α -
TERPINEOL COM β -CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-
HIPERTENSIVA EM RATAS EM ESTRO PERMANENTE**

Teresina - Piauí

2016

Victor Hugo Lopes de Andrade

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DE α -
TERPINEOL COM β -CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-
HIPERTENSIVA EM RATAS EM ESTRO PERMANENTE**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

Teresina - Piauí

2016

Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde

A553p Andrade, Victor Hugo Lopes de.
Preparação e caracterização do complexo de inclusão de α -terpineol com β -ciclodextrina e avaliação da ação anti-hipertensiva em ratas em estro permanente / Victor Hugo Lopes de Andrade. -- Teresina, 2016.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

“Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva.”

Bibliografia

1. Ratas em estro permanente. 2. Síndrome dos ovários policísticos. 3. Hipertensão arterial. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.53

Victor Hugo Lopes de Andrade

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DE α -
TERPINEOL COM β -CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-
HIPERTENSIVA EM RATAS EM ESTRO PERMANENTE**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

Departamento Materno Infantil – CCS/UFPI

Examinador externo: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

Departamento Materno Infantil – CCS/UFPI

Examinador interno: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Departamento de Biofísica e Fisiologia – CCS/UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^ª. Dr^ª. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^ª. Dr^ª Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, **Valdenor Alves de Andrade** e **Ângela Maria Lopes de Andrade**, sei que tudo que eu falar aqui vai ser pouco diante de tudo que vocês fizeram por mim. Nesse caso, a homenagem não poderia ser mais justa, por todos os ensinamentos, incentivos e esforços para que eu continuasse buscando sempre o caminho dos livros.

Aos meus irmãos **Giuliano Lopes de Andrade** e **Vitória Maria Lopes de Andrade** pelo amor, carinho, paciência e dedicação que somente aquelas pessoas que realmente nos amam conseguem ter e dar em momentos tão difíceis.

A minha esposa e grande amiga **Jôsy Solangi Maranhão Santos Andrade**, sempre presente na minha vida, pelo apoio, respeito, amor, companheirismo e por seu carinho inabalável, sempre imprescindível nas horas de fraqueza e cansaço.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao exímio **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, marco em minha formação como pesquisador, pelo símbolo de profissionalismo e competência, por ter demonstrado tanto respeito, carinho, amizade, incentivo e confiança em meu trabalho. Mestre na verdadeira acepção da palavra, que me ensinou o valor e a importância da pesquisa e o seu retorno para a sociedade, a minha eterna gratidão.

Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde para encarar com serenidade as dificuldades do dia a dia.

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

Ao Co-Orientador **Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes** pela colaboração, paciência e seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho, além da grande amizade formada.

Aos laboratórios LAGO, LAPNEX, LIMAV, LAUREMN e LAPCOM da Universidade Federal do Piauí pelo apoio e auxílio na execução dos experimentos.

Ao Instituto Federal de Educação e Tecnologia do Piauí – IFPI pela parceria realizada.

Ao Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da UFPI, em especial a **Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira** e ao doutorando **Márcio Edivandro Pereira dos Santos**, que pelo apoio técnico e dedicação tornaram possível a realização deste trabalho.

A Coordenação do Programa em Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), em especial ao **Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira** pelo apoio e compreensão à minha participação no mestrado.

Em nome do Piauí, agradeço ao **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas** (*in memoriam*), pelo seu brilhantismo e comprometimento pela farmácia piauiense e pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI.

Aos professores Doutores **Stanley Juan Chavez Gutierrez**, **Alexandre Araújo de Souza** e **José Milton Elias de Matos** que destinaram parte de seu precioso tempo para participarem desta pesquisa.

À **Profa. Me. Mayara Ladeira Coelho** e ao **Prof. Me. Márcio dos Santos Rocha** pela colaboração para a construção desse estudo.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos colegas e amigos do PPGCF em especial ao **Oskar**, **Alexandre**, **Rian**, **Valéria** e **George**, mesmo nas horas difíceis, sempre estiveram dispostos a ajudar.

A **Dr^a Lécia Maria Freire**, pelas palavras de conforto e superação, que me fizeram repensar como a vida é grandiosa e bela mesmo diante de desafios encontrados pelo caminho.

A Farmácia de manipulação Galeno, em especial a farmacêutica **Me. Ana Carina**, pela imensa contribuição nos materiais utilizados na pesquisa.

Aos colegas do grupo de pesquisa do professor Dr. Benedito Borges, dentre eles **Danylo, Rodrigo, Conceição, Daniele e George**, agradeço não apenas pela enorme ajuda e compreensão no desenvolvimento deste trabalho, mas também pela amizade, união, força e superação desde o início desta caminhada.

A Fundação Hospitalar de Teresina, pela licença concedida para a realização desta pesquisa.

A diretoria da Maternidade Wall Ferraz, em especial a **Mércia Kassandra e Jesus Mousinho**, pela força e fé.

À minha família - aos tios, tias, primos e primas - pelo carinho recebido.

Aos colegas de trabalho do Hospital Universitário, entre eles **Giuliano Santos e Hilris Rocha**, no apoio e colaboração.

Aos funcionários do Mestrado em Ciências e Saúde, em especial às secretárias **Edilene e Anatália**, pelo acolhimento e apoio na realização deste estudo.

A todos os funcionários que prestam serviços no Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da UFPI, em especial aos senhores **Ari e Sena**, pelas descontrações e constante auxílio.

A todos os amigos e colegas que, de alguma forma, contribuíram e estiveram presentes nessa jornada.

1.	INTRODUÇÃO.....	24
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3.	OBJETIVOS.....	39
	Objetivo Geral.....	40
	Objetivos Específicos.....	40
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	MATERIAL.....	42
4.2	MÉTODOS.....	42
4.2.1	Preparação dos complexos de inclusão.....	42
4.2.2	Caracterização físico-química.....	43
	Espectroscopia no Infravermelho.....	43
	Difração de Raio X.....	43
	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	43
	Quantificação por cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa de Alta Resolução.....	44
4.2.3	Avaliação da atividade biológica.....	45
	Animais.....	45
	Tratamento.....	46
	Aferição da Pressão Arterial.....	46
	Análise estatística.....	48
	Aspectos éticos.....	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6.	CONCLUSÃO.....	63
7.	PERSPECTIVAS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXOS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
Θ	Teta
μm	Micrômetro
CD	Ciclodextrina
CG-EMAR	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa de Alta Resolução
CI	Complexo de Inclusão
cm ⁻¹	Centímetro recíproco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raios X
E.P.M	Erro padrão da média
eV	Elétron-Volt
G	Gramma
IMC	Índice de massa corporal
i.p	Intraperitoneal
IV	Infravermelho
H	Hidrogênio
KV	Kilovolt
LH	Hormônio Luteinizante
LapCom	Laboratório de Cosméticos e Medicamentos
M	Metro
Ma	Miliampére
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

MF	Mistura física
mg/kg	Miligrama por quilo
min	Minuto
mL min ⁻¹	Mililitro por minuto
NPPM	Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais
NTF	Núcleo de Tecnologia Farmacêutica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
PA	Pressão arterial
PE	Polietileno
PPM	Partes por milhão
RI	Resistência à insulina
UFPI	Universidade Federal do Piauí

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A influência da insulina na amplificação de LH e no aumento nos níveis de androgênios.....	31
Figura 2	Estrutura química do α -terpineol, 2-(4-metil-1-ciclohex-3-enil)propan-2-ol.....	34
Figura 3	Estrutura química de α , β , γ -ciclodextrina.....	35
Figura 4	Representação ilustrativa da formação do complexo de inclusão droga-ciclodextrina 1:1 (A) e 1:2 (B).....	36
Figura 5	Representação esquemática do fluxo básico de um spray dryer.....	37
Figura 6	Sistema de aquisição de dados para registro da pressão arterial em ratas.....	47
Figura 7	Espectro na região do infravermelho da β -CD em transmitância.....	51
Figura 8	Espectro na região do infravermelho do α -terpineol em transmitância.....	51
Figura 9	Espectros na região do infravermelho em transmitância: componentes puros β -CD (A), α -terpineol (B), MF (C) e CI por spray drying (D).....	53
Figura 10	Difratogramas obtidos para a β -ciclodextrina (a), mistura física (b) e complexo de inclusão por spray drying (c).....	54
Figura 11	Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para β -CD com ordem de magnificação de 1000x (A), mistura física com	

ordem de magnificação de 1000x (B), complexo de inclusão por spray drying com ordem de magnificação de 2000x (C)..... 56

Figura 12 Curva analítica para a quantificação do teor de α -terpineol em complexo de inclusão por spray drying obtida por CG-EMAR..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios diagnósticos da Síndrome dos Ovários Policísticos segundo Consenso de Rotterdam em 2003.....	29
Tabela 2	Grupos funcionais e estiramentos observados espectros de absorção na região do infravermelho da β -CD e do α -terpineol.....	52
Tabela 3	Sinais de ^1H RMN para a β -CD e complexo de inclusão α -terpineol- β -CD.....	57
Tabela 4	Estudos que relacionam o estado de estro permanente com hipertensão.....	60
Tabela 5	Registro do peso corporal e pressão arterial média (PAM) em ratas em estro permanente em comparação aos animais controle da mesma idade.....	61

Preparação e caracterização do complexo de inclusão de α -terpineol com β -ciclodextrina e avaliação da ação anti-hipertensiva em ratas em estro permanente. VICTOR HUGO LOPES DE ANDRADE. Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Piauí, 2016.

As mulheres com a síndrome dos ovários policísticos (SOP) parecem ter um maior risco de desenvolver distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares. Fato que pode explicar a predisposição para hipertensão arterial em mulheres com esta síndrome. Entretanto, o estudo da avaliação da pressão sanguínea em mulheres com ovários policísticos apresenta limitações de natureza ética, daí a busca de modelos experimentais, como o de ratas em anovulação em estro persistente, que mimetizam síndrome dos ovários policísticos e consoante alguns estudos, apresentam hipertensão arterial. Com relação ao tratamento anti-hipertensivo, uma substância que vem despertando grande interesse é o α -terpineol, no entanto, sua baixa hidrofiliabilidade dificulta a sua aplicabilidade tecnológica; necessitando do uso de estratégia para aumentar a sua solubilidade, como o emprego de ciclodextrinas (CD). Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo preparar o complexo de inclusão de α -terpineol com β -ciclodextrina, e caracterizar e avaliar sua ação anti-hipertensiva em modelo de ratas em estro permanente. Para tanto, foi preparado o complexo de inclusão do α -terpineol com β -ciclodextrina (α -terpineol/ β -CD) por spray drying, tendo sido realizada a sua caracterização por métodos espectroscópicos e cromatográficos. Os ratos Wistar-Hannover foram separados, em machos e fêmeas, baseado na distância ânus-genital. O estudo foi realizado em 18 ratas, divididas em 3 grupos: I (controle normal, veículo, n=6), II (estro permanente, veículo, n=6) e grupo III (estro permanente, experimental, n=6). A indução do estro permanente nos animais dos grupos II e III, foi realizada, através de uma injeção subcutânea de 1,25 mg de propionato de testosterona no segundo dia de vida. Os animais do grupo I e II receberam apenas propilenoglicol como veículo, enquanto o grupo III recebeu α -terpineol/ β -CD (100 mg/kg) diluído em propilenoglicol diariamente por gavagem durante 28 dias. Para verificação da pressão arterial, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para implantação de cânula na artéria femoral esquerda para aferição da pressão sanguínea 24 horas depois. Para análise estatística dos dados foi preconizado o teste de t de Student ($p < 0,05$). Os resultados do presente estudo mostraram que a pressão arterial dos animais em estro permanente, através implantação de cânula na artéria femoral esquerda, não apresentou elevação nos animais do grupo estudo em comparação ao grupo controle. Assim, devido a não constatação de elevação da pressão arterial em ratas em estro permanente por esse método de avaliação, o complexo de inclusão com α -terpineol não foi administrado aos animais do grupo experimental, embora estudos espectroscópicos e cromatográficos sugiram ter havido a formação do complexo de inclusão da β -ciclodextrina com α -terpineol, um componente viável para ser testado no tratamento da hipertensão arterial. Portanto, há necessidade de futuros estudos comparando os métodos de aferição da pressão arterial em ratas em estro permanente através da implantação de cânula na artéria femoral esquerda com outros métodos de avaliação como, por exemplo, a caudal, método que a literatura tem mostrado tratar-se de um modelo hipertenso.

Palavras-chave: Ratas em estro permanente, Síndrome dos Ovários Policísticos, Hipertensão Arterial, α -Terpineol, Complexo de Inclusão.

Preparation and characterization of inclusion complex of α -terpineol with β -cyclodextrin and evaluation of antihypertensive action in rats model of permanent estrus. VICTOR HUGO LOPES DE ANDRADE. Advisor: PhD. Benedito Borges da Silva. Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Federal University of Piauí, 2016.

Women with polycystic ovary syndrome (PCOS) appear to have a higher risk of developing metabolic disorders and cardiovascular diseases. Which may explain the predisposition to hypertension in women with this syndrome. However, the study of the evaluation of blood pressure in women with polycystic ovaries has limitations ethical, hence the search for experimental models, such as rats in anovulation in persistent estrus, mimicking polycystic ovary syndrome and according to some studies, have hypertension blood. With respect to antihypertensive treatment, a substance that is attracting great interest is the α -terpineol, however, its low hydrophilicity hinders their technological applicability; requiring the use strategy to increase its solubility, as the use of cyclodextrin (CD). In view of the above, the present study aimed to prepare the inclusion complex of α -terpineol with β -cyclodextrin, and to characterize and evaluate its antihypertensive action in a rat model in permanent estrus. To this end, was prepared inclusion complex with the α -terpineol, β -cyclodextrin (α -terpineol / β -CD) by spray drying, it has been carried out its characterization by spectroscopic and chromatographic methods. Hannover-Wistar rats were divided in males and females, based on the anus-genital distance. The study was conducted in 18 rats, divided into 3 groups: I (normal control, vehicle, n = 6), II (standing estrus vehicle, n = 6) Group III (standing estrus test, n = 6). The induction of persistent estrus in animals of groups II and III was performed by subcutaneous injection of 1.25 mg of testosterone propionate in the second day of life. The animals in groups I and II received only propylene glycol as the vehicle, while the third received α -terpineol/ β -CD (100 mg/ kg) diluted in propylene glycol by gavage daily for 28 days. To check blood pressure, the animals underwent surgery for implantation cannula into the left femoral artery for measurement of blood pressure 24 hours later. Statistical analysis was pressed for t Student test ($p < 0.05$). The results of this study showed that the blood pressure of animals in persistent estrus through cannula deployment in the left femoral artery, showed no increase in the animals in the study group compared to the control group. Thus, due to non-elevated blood pressure of finding in rats in persistent estrus by this method of evaluation, the inclusion complex with α -terpineol was not administered to animals in the experimental group, although spectroscopic and chromatographic studies suggest have been the formation of inclusion complex of β -cyclodextrin with α -terpineol, a viable component for the treatment of hypertension. Therefore, there is a need for future studies comparing methods of blood pressure measurement in rats in permanent estrus through the implantation of a cannula in the left femoral artery with other methods of evaluation, such as the flow rate, method that the literature has shown to be a hypertensive model.

Keywords: Persistent estrus rats, Polycystic Ovary Syndrome, Hyperandrogenism, Arterial Hypertension, α -Terpineol, Inclusion Complex.

1. INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma endocrinopatia ginecológica comum, com prevalência de 8,7 a 17,8 % em mulheres na idade reprodutiva (ZUEFF et al., 2012; MARCH et al., 2010). Apesar dos seus diversos fenótipos, mulheres com a síndrome são caracterizadas por ovários policísticos, anovulação crônica, hiperandrogenismo e anormalidades gonadotrópicas (DA SILVA et al., 2009; AZZIZ, 2016).

Além das características inerentes à SOP nessas mulheres, é comum a ocorrência de anormalidades metabólicas e hormonais, associada com obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia (CONNOLLY et al., 2015). Essa variedade de distúrbios metabólicos supracitados parece estar relacionada com o maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, fato que pode explicar a predisposição para hipertensão arterial em mulheres com a síndrome (CHEN et al., 2007; GONTIJO et al., 2010). Apesar da associação entre as alterações na pressão arterial e SOP ainda não tenha sido completamente esclarecida, o aumento do risco de estado hipertensivo pode ser explicado pela resistência à insulina e pelo hiperandrogenismo, mesmo quando ajustado para idade, índice de massa corporal e outros parâmetros antropométricos (PALOMBA et al., 2015).

Entretanto, o estudo da avaliação da pressão sanguínea de mulheres com ovários policísticos apresenta limitações de natureza ética, daí a busca de modelos experimentais capazes de mimetizar as características de interesse da doença (WALTERS, ALLAN, HANDELSMAN, 2012). Entre os inúmeros animais utilizados em testes *in vivo*, a rata é o modelo animal que apresenta morfologia e endocrinologia que se assemelham aos da espécie humana (RUSSO, RUSSO, 1987; DA SILVA, 1997). As ratas são animais do tipo poliestro, ou seja, apresentam ciclos estrais regulares e sucessivos, que se manifestam por mudanças morfológicas nos ovários, útero, vagina e glândulas mamárias (HEALD, O'GRAY, HOWIE, 1970; DA SILVA, 1997).

A propósito, a rata em estro permanente é um modelo biológico caracterizado por interrupção do ciclo estral, devido à ação estrogênica constante e mimetizando a síndrome dos ovários policísticos (BARRACLOUGH, 1961; DE SOUSA et al., 2015). Além disso, as ratas em estro permanente podem apresentar hipertensão, como evidenciado nos estudos realizado por Stener-Victorin et al. (2005) e Gontijo et al. (2010), que mostraram um aumento significativo da pressão arterial de ratas em estro permanente em comparação com as ratas do grupo controle. Portanto, o desaparecimento da característica cíclica da atividade sexual aliadas com as evidências de aumento na pressão arterial em ratas em estro permanente torna estes animais um modelo experimental interessante para o desenvolvimento de novas drogas

com ação anti-hipertensiva que podem ser extrapoladas para mulheres com síndrome dos ovários policísticos e hipertensão, mesmo sabendo das limitações, quanto à extrapolação de resultados (DA SILVA, 1997).

Apesar do grande número de anti-hipertensivos disponíveis no mercado, existem inúmeros obstáculos para a sua utilização, o que contribui para alto interesse do uso de plantas medicinais (KUNLE, EGHAREVBA, AHMADU, 2012). Aliás, uma substância oriunda de plantas medicinais, que vem despertando interesse é o monoterpeneo α -terpineol, demonstrando atividade farmacológica promissora no tratamento de doenças cardiovasculares (SABINO et al., 2013). No entanto, o α -terpineol apresenta uma baixa solubilidade em água, apresentando uma fraca absorção após administração oral, o que mostra a necessidade do uso de meios para aumentá-la (MAZZOBRE, SANTOS, BUERA, 2011). A complexação de drogas com a molécula de ciclodextrina tem sido utilizada para aumentar a taxa de dissolução e a biodisponibilidade de moléculas poucos solúveis em água, como é o caso do α -terpineol (MA, MOULTON, 2011; AIN, KUMAR, PATHAK, 2015).

Após o preparo do composto de inclusão (CI) é importante caracterizá-lo para conhecer o sistema obtido, uma vez que o produto pode ser simplesmente uma associação, uma mistura física do fármaco com ciclodextrina ou composto de inclusão (PIRES, 2011). Para isso, vários métodos de detecção e caracterização são usados para avaliar a formação de complexos de inclusão, os mais comumente utilizados são difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) (MURA, 2015).

Gontijo et al. (2010) mostraram que ratas em estro permanente possuem um aumento significativo da pressão arterial em relação aos animais controles. Todavia há escassez de estudos na literatura mostrando o desenvolvimento e ação de drogas anti-hipertensivas na pressão arterial de ratas em estro permanente, o que nos levou à concepção do presente estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Etiologia e Fisiopatologia

Síndrome dos ovários policísticos é uma doença crônica de etiologia não esclarecida que foi originalmente descrita por Stein e Leventhal em 1935, sendo uma desordem reprodutiva, heterogênea e metabólica, com uma prevalência variando entre 8,7 e 17,8 % em mulheres na idade reprodutiva (BENTLEY-LEWIS, SEELY, DUNAIF, 2011; ZUEFF et al., 2012). As primeiras manifestações clínicas da SOP têm início na adolescência, todavia há evidências de que a doença tenha suas origens no ambiente intrauterino, apontando um envolvimento genético (MELO et al., 2015). Estudos como de Sóter et al. (2015) demonstraram uma clara influência de polimorfismos nos genes interleucina 6 e 10, interferon-c e fator de transformação de crescimento-b1 no desenvolvimento da SOP, embora nenhum modo claro de herança tenha sido identificado. Outros fatores causais são as exposições epigenéticas, destacando a associação entre a exposição intrauterina a andrógenos maternos e fenótipos relacionados à síndrome (DEMISSIE et al., 2008). Outrossim, as variações étnicas na SOP podem estar associadas com fatores ambientais, como situação socioeconômica e estilo de vida (DUMESIC et al., 2015).

Embora tenham sido realizadas inúmeras pesquisas, ainda persistem pontos obscuros no que se refere à etiopatogenia (WITCHEL et al., 2012). Entretanto, alguns mecanismos fisiopatológicos são reconhecidos, tais como, as alterações na secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas, defeito na síntese de androgênios e desenvolvimento de resistência insulínica (KING, 2006). Dentre as inúmeras teorias propostas para explicar a patogênese, uma delas é a perturbação no eixo hipotálamo-hipófise, resultando em uma secreção desordenada de gonadotrofina pelo hipotálamo com consequente elevação dos níveis de hormônio luteinizante (LH) e níveis normais ou baixos de hormônio folículo estimulante (DUMESIC et al., 2015).

Inúmeros estudos também apontam a resistência insulínica como o elemento fisiopatogênico chave para o desenvolvimento da síndrome, pois a insulina age sinergicamente com o hormônio luteinizante para aumentar a produção de androgênios da célula teca do ovário (ERHMANN, 2005; HSU, 2013; BALDANI, SKRGATIC, OUGOUAG, 2015). Outro local de produção de androgênios é o córtex adrenal, devido às anormalidades na esteroidogênese cortical proporcionado pela estimulação do hormônio adrenocorticotrófico (DA SILVA et al., 2007). O excesso de androgênios, principalmente de testosterona, androstenediona e sulfato de dehidroepiandrosterona, causa a atresia prematura dos folículos

ovarianos, formando múltiplos cistos e anovulação (IKEDA et al., 2014; DUMITRESCU et al., 2015).

Manifestações Clínicas e Diagnóstico

O Consenso de Rotterdam (vide **Tabela 1**) definiu que pelo menos dois dos seguintes achados devem estar presentes: oligovulação ou anovulação crônica, hiperandrogenismo (clínico e/ou laboratorial) e ultrassonografia indicativa de ovários policísticos (BENTLEY-LEWIS, SEELY, DUNAIF, 2011; HOUTEN, VISSER, 2014). Estes critérios reconhecem que SOP é um diagnóstico de exclusão e, portanto, para confirmar essa síndrome, os distúrbios que mimetizam as características clínicas da SOP devem ser excluídos, como doença da tireóide, hiperprolactinemia e hiperplasia adrenal congênita não-clássica (AZZIZ, 2005; LEGRO et al., 2013).

Tabela 1: Critérios diagnósticos da Síndrome dos Ovários Policísticos segundo Consenso de Rotterdam em 2003.

Dois dos seguintes critérios e exclusão de outras patologias

Oligoovulação ou anovulação crônica

Sinais clínicos e/ou bioquímico de hiperandrogenismo

Presença de Ovários Policísticos

Fonte: MOURA et al. (2011).

Embora SOP seja tradicionalmente considerada um distúrbio que aflige mulheres em idade reprodutiva, as manifestações clínicas podem ser observadas a partir da menarca (TSIKOURAS et al., 2014). Essas complicações clínicas variam em diferentes fenótipos, idade, etnia e peso corporal, potencializando com o passar da idade (LENART-LIPIŃSKA et al., 2014; HSU, 2015). O hiperandrogenismo é considerado um dos elementos centrais para o diagnóstico dessa condição e definir uma paciente como hiperandrogênica pode ser de grande significado clínico (TOSI et al., 2015). A manifestação clínica do hiperandrogenismo nestas mulheres varia em diferentes grupos étnicos, com manifestações externas, como a pele oleosa, acne, hirsutismo, obesidade central, e até mesmo alopecia androgenética (AZZIZ, 2005; ESCOBAR-MORREALE et al., 2012).

SOP e Hipertensão

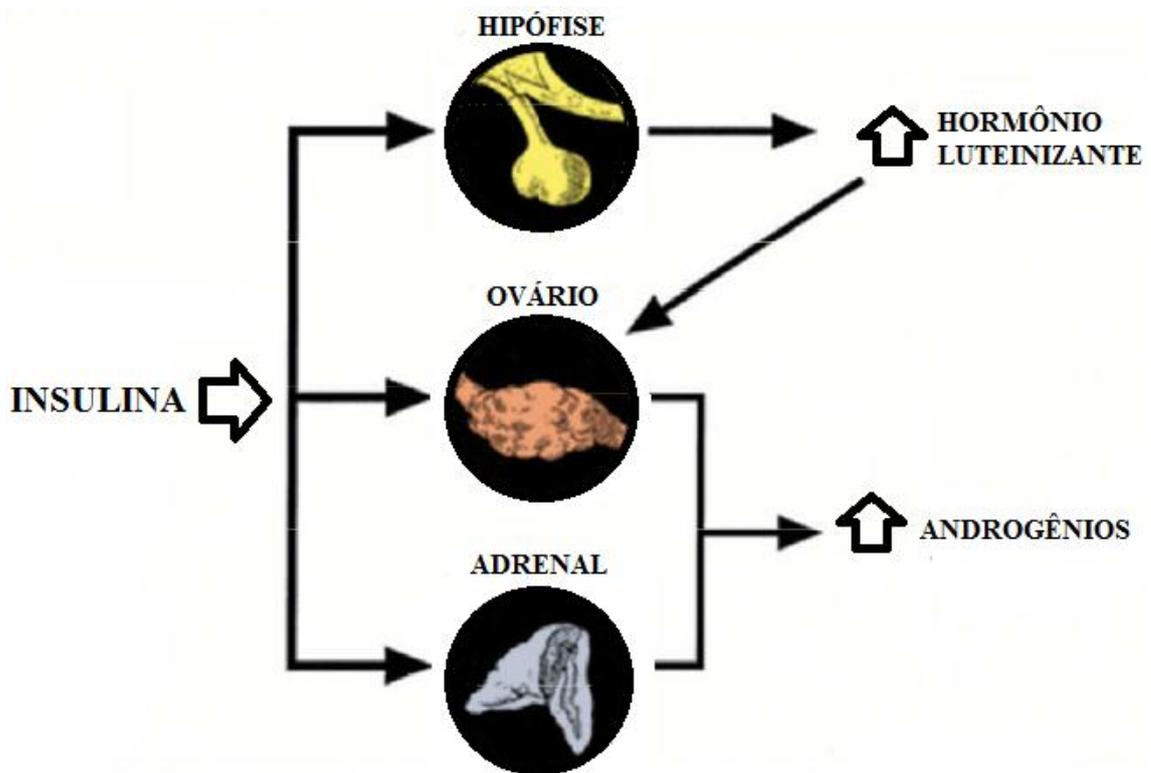
Mulheres com a síndrome dos ovários policísticos apresentam o perfil cardiovascular comprometido, independente da obesidade, devido à perturbação metabólica associada com a respectiva síndrome (STENER-VICTORIN et al., 2005). Fatores como dislipidemia, diabetes e obesidade são todos potentes fatores de risco cardiovascular, explicando a predisposição de mulheres com SOP à hipertensão (GONTIJO et al., 2010; LUQUE-RAMIREZ, ESCOBAR-MORREALE, 2014).

A hipertensão arterial sistêmica costuma ser mais frequente nas mulheres com SOP. Um estudo realizado por Sterner-Victorin et al. (2005) mostrou uma prevalência ao redor de 40% de hipertensão neste grupo de mulheres. Um possível determinante da associação entre a SOP e a hipertensão é a resistência à insulina, que desempenha um papel central não só no desenvolvimento da síndrome em estudo, mas também no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KARGILI et al., 2010).

Estudiosos investem em pesquisas para desvendar o que de fato está por trás da relação entre a hipertensão e a desordem endócrina. Uma das hipóteses mais bem aceitas é que tais alterações são estimuladas pela resistência à insulina, em que alguns autores demonstraram uma associação inversa entre a sensibilidade à insulina e a pressão arterial sistólica no grupo de mulheres com SOP (HOLTE et al., 1996; STENER-VICTORIN et al., 2005; BALDANI, SKRGATIC, OUGOUAG, 2015; MACUT et al., 2015).

A resistência à insulina conduz a uma hiperinsulinemia e amplificação da ação de LH em células da teca, com conseqüente aumento dos níveis de androgênio, como ilustrado na **(Figura 1)** (DUNAIF, 1997; DUMITRESCU et al., 2015). Alguns estudos também demonstraram por meio de modelos experimentais, que a glândula adrenal de ratas em estro permanente, mimetizando SOP, apresentou uma atividade proliferativa da zona reticular, produtora de andrógenos em humanos, maior que os controles (DA SILVA et al., 2007; DA SILVA et al., 2009). Os níveis de androgênios podem regular diretamente o sistema renina-angiotensina do túbulo proximal e aumentar o volume da taxa de reabsorção, elevando assim o volume extracelular e pressão sanguínea (CHEN et al., 2007).

Figura 1: A influência da insulina na amplificação de LH e no aumento nos níveis de androgênios.



Fonte: Adaptado de DUNAIF et al. (1997).

Um estudo de acompanhamento em longo prazo realizado por Wild et al. (2000) sugeriu um aumento da prevalência de hipertensão em pacientes com SOP, mas não avaliou a associação da síndrome com o aumento do risco de mortalidade e morbidade de doenças cardíacas coronarianas (GAMBINERI et al., 2002; CHO, RANDEVA, ATKIN, 2007). Todavia, estes dados sugerem que as mulheres com síndrome dos ovários policísticos devem ser rastreadas para a hipertensão em uma idade mais jovem (ABRANSOM, MELVIN, 2014).

Modelo Animal

Um estudo de mulheres com ovários policísticos apresenta limitações de natureza ética, daí a busca de modelos experimentais apropriados que mimetizam a totalidade ou a maioria das características da doença (WALTERS, ALLAN, HANDELSMAN, 2012;

CALDWELL et al., 2014). Durante as últimas décadas, os pesquisadores utilizaram diversos modelos animais, como ratos, camundongos, hamsters, cobaias e primatas para estudar o ciclo reprodutivo, a morfologia dos ovários e as mudanças hormonais (SINGH, 2005; TEHRANI et al., 2014). No entanto, o modelo animal que apresenta morfologia e endocrinologia com pontos que se assemelham aos da espécie humana é a rata (RUSSO, RUSSO, 1987).

As ratas são animais do tipo poliestro, ou seja, apresentam ciclos estrais regulares e sucessivos, que se manifestam por mudanças morfológicas nos ovários, útero, vagina e glândulas mamárias (HEALD, O'GRAY, HOWIE, 1970; DA SILVA et al., 1997). Esses ciclos duram de quatro a seis dias e são de fácil observação, incluindo proestro, estro, metaestro e anestro, com um período de gestação em média de 21 dias (BARRACLOUGH, 1961; WANG et al., 2012).

Todavia, a interrupção do ciclo estral da rata, caracterizada por queratinização vaginal persistente é, portanto, diferente do curto período de receptividade sexual denominado estro ou cio. Este modelo bem estudado por Barraclough (1961), que caracterizou o seu período de maior sensibilidade hipotalâmica, com apenas uma única injeção subcutânea de propionato de testosterona de 1,25 mg, aplicada do segundo ao quinto dia de vida, induziu estro permanente em todos os animais (LIMA, 1966; HEALD, O'GRAY, HOWIE, 1970).

Esses animais quando adultos apresentam anovulação e ovários policísticos, mimetizando, portanto, a mulher com a síndrome de ovários policísticos, além de comportamento agressivo quando em contato com os machos (DA SILVA et al., 2007; WANG et al., 2012). Além disso, as ratas em estro permanente podem apresentar hipertensão, como evidenciado nos estudos de Stener-Victorin et al. (2005) e de Gontijo et al. (2010), que mostraram um aumento significativo da pressão arterial de ratas em estro permanente em comparação aos demais grupos.

Tratamento

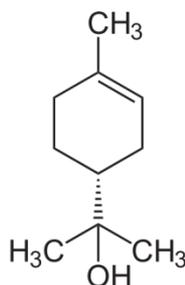
Com relação ao tratamento da SOP em humanos, a recomendação é começar com modificações de dieta/estilo de vida que levam à perda de peso, indiretamente, e consequentemente a redução da pressão arterial sistólica, quando presente (GAMBINERI et al., 2002). Se a perda de peso se mostra insuficiente para corrigir a anovulação, o tratamento farmacoterapêutico deve ser instituído. Embora não haja consenso nas orientações sobre o tratamento de doenças cardiovasculares, a terapia-alvo para hipertensão em mulheres com

síndrome dos ovários policísticos é semelhante ao das pacientes sem a doença (HSU, 2015). Por outro lado, a busca de produtos naturais com ação anti-hipertensiva vem despertando o interesse na literatura médica.

Produtos naturais: α -terpineol

Apesar do grande número de anti-hipertensivos disponíveis no mercado, existem obstáculos na sua utilização pelas mulheres com a síndrome dos ovários policísticos, que vão desde a adesão ao tratamento a um difícil acesso à assistência médica especializada, aliado ao alto custo dos medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para o alto interesse do uso das mesmas (BALDAUF et al., 2009; GONÇALVES et al., 2011; KUNLE, EGHAREVBA, AHMADU, 2012).

Muitas atividades biológicas atribuídas às plantas foram comprovadas, dentre elas a atuação no sistema cardiovascular para o tratamento de hipertensão. Várias classes de substâncias vêm sendo estudadas com este propósito, dentre elas temos os monoterpenos. Uma substância dessa classe que vem despertando grande interesse é o α -terpineol (vide **Figura 2**), um álcool monoterpenóide, componente dos óleos essenciais de muitas espécies de plantas de uso na culinária e fins medicinais como *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Ocimum canum* Sims (manjeriço) (MAZZOBRE, SANTOS, BUERA, 2011; SABINO et al., 2013). Com relação a este monoterpenóide, Sabino et al. (2013) mostraram que a administração oral de α -terpineol nas doses de 25, 50, e 100 mg/kg induziu uma hipotensão acentuada em ratos hipertensos induzidos por L-NAME (N-(G)-nitro-L-arginina metil ester) quando comparados com animais do grupo controle.

Figura 2: Estrutura química do α -terpineol, 2-(4-metil-1-ciclohex-3-enil)propan-2-ol.

Fonte: SABINO et al. (2013).

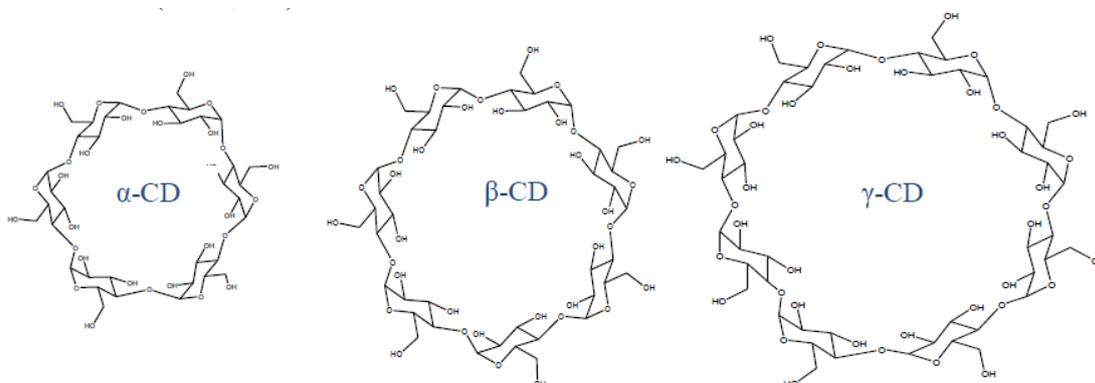
O α -terpineol é uma substância que apresenta baixa solubilidade em água e elevada volatilidade, portanto, fatores críticos que limita a sua aplicação terapêutica (MAZZOBRE, SANTOS, BUERA, 2011; GIDWANI, VYAS, 2015). Estas limitações motiva o desenvolvimento de diferentes estratégias com o objetivo de melhorar a sua dissolução e absorção, com conseqüente otimização da sua ação terapêutica. Muitas alternativas surgem de diferentes áreas das Ciências Farmacêuticas, com características que permitem transportar substâncias farmacologicamente ativas para sítios específicos do organismo, dentre elas podemos citar, complexo de inclusão com ciclodextrinas, micronização, formação de sais, solubilização com co-solventes, dispersões sólidas, extrusão por fusão, microemulsões e nanopartículas (HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011; GARCÍA, LEONARDI, LAMAS, 2016). Estes sistemas podem modificar o perfil de absorção do fármaco sem alterar a estrutura química da molécula transportada, o que pode ser uma ótima alternativa para compostos voláteis com solubilidade limitada (MERISKO-LIVERSIDGE, LIVERSIDGE, 2011).

Complexos de Inclusão

A formação do complexo de inclusão com ciclodextrinas foi estabelecida a mais de 100 anos por Villiers e Schardinger, sendo caracterizado em 1903 por Schardinger como oligossacarídeos cíclicos (JAMBHEKAR, BREEN, 2015). Até hoje, é uma técnica amplamente utilizada para aumentar a solubilidade, otimizar a dissolução, melhorar a estabilidade e/ou reduzir a toxicidade de fármacos nele associado (CAMARGO et al., 2013; AZZAM, MUHAMMAD, 2015; AIN, KUMAR, PATHAK, 2015).

As ciclodextrinas, também conhecidas por ciclomaltose, cicloamilose ou dextrinas de Schardinger, consistem numa família de oligosacarídeos cíclicos de unidades de α -D-glucopiranosose com ligações do tipo α -1,4 (BONNET et al., 2015), apresentando um grupo hidroxilo na sua superfície exterior hidrofílica e uma cavidade hidrofóbica no centro (RAMESH et al., 2014). As CDs naturais mais importantes e comercialmente fornecidos por diversos fabricantes são α -, β -, γ - CDs, cujas cavidades são formadas, respectivamente, por 6, 7 e 8 unidades de D-(+)-glucopiranosose, assumindo diâmetros internos de diferentes tamanhos, como verificado na **figura 3** (ANDREUS et al., 2010).

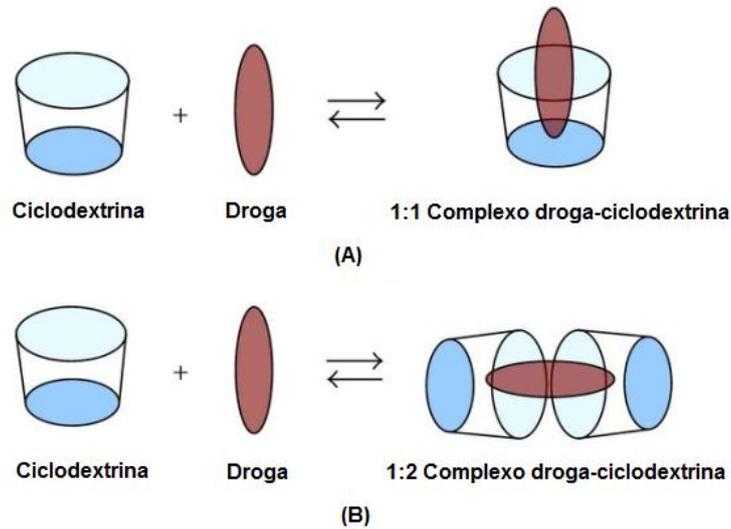
Figura 3: Estrutura química de α , β , γ -ciclodextrina.



Fonte: MAAZAOU, ABDERRAHIM (2015).

Como resultado da sua forma molecular e de características anfifílicas, as ciclodextrinas exibem a capacidade única de capturar moléculas hidrófobas ou porções hidrófobas de moléculas maiores em soluções aquosas através de ligações de Van der Waals, pontes de hidrogénio ou por transferência de carga dentro de sua cavidade e agir como um recipiente molecular (CARVALHO, 2013; JAMBHEKAR, BREEN, 2015). Portanto, diversas moléculas hóspedes de tamanho, forma e polaridade adequadas podem se encaixar em diferentes CDs, possibilitando a formação de complexo de inclusão 1:1 ou 1:2, tal como ilustrado na **figura 4** (GOPALAN, ANNASELVI, SUBRAMANIAM, 2012; HUANG, LONDON, 2013).

Figura 4: Representação ilustrativa da formação do complexo de inclusão droga-ciclodextrina 1:1 (A) e 1:2 (B).



Fonte: Adaptado de SAVJANI, GAJJAR, SAVJANI (2012).

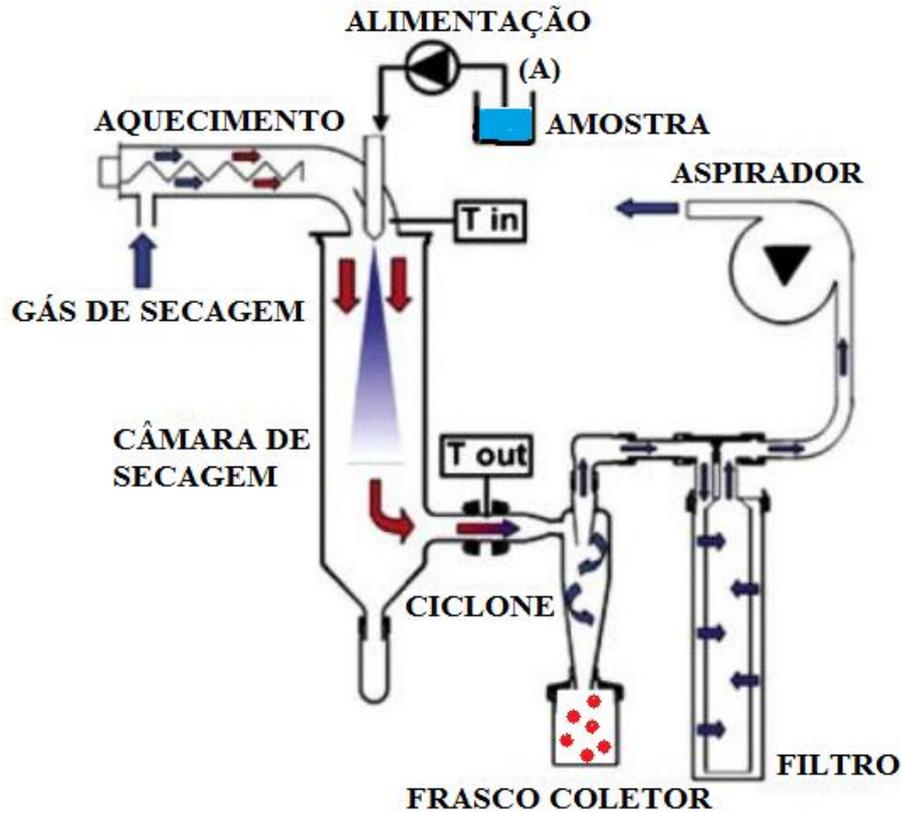
Para o α -terpineol, ainda não está claro qual o tipo de ciclodextrina seria a melhor escolha para se encaixar com a molécula monoterpênóide. Entretanto, alguns estudos anteriores têm usado frequentemente β -CD para preparar complexos de inclusão com o α -terpineol (DONZE, COLEMAN, 1993; SANTOS, BUERA, MAZZOBRE, 2011).

O método mais empregado para a encapsulação de componentes voláteis é o spray drying ou secagem por atomização. A microencapsulação por spray drying é utilizada nas indústrias farmacêuticas desde os anos 50 por ser um processo econômico e facilmente adaptável. Além de melhorar a solubilidade, essa técnica é bastante utilizada na encapsulação de componentes de óleos voláteis com a finalidade de proteger contra a volatilização e reações deteriorativas induzidas pela luz, prolongando a sua vida útil (COSTA et al, 2012; SHOFINITA, LANGRISH, 2014).

O esquema básico de um equipamento spray dryer está representado na **figura 5**. Nesse tipo de operação, a amostra em dispersão (A) é injetada em forma de gotículas (spray) através do bico atomizador concomitante ao ar aquecido. Na câmara de secagem acontece a formação das partículas sólidas quando em contato com o ar quente. Em seguida, o produto segue para o ciclone (separador) onde há a recuperação do produto em pó através de um recipiente coletor acoplado ao equipamento. Essa dinâmica permite a secagem de produtos

sensíveis ao calor, reduzindo as perdas na qualidade (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010; PHISUT, 2012).

Figura 5: Representação esquemática do fluxo básico de um spray dryer.



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

No entanto, mesmo após a formação do complexo de inclusão, é necessário realizar a caracterização com a finalidade de conhecer o sistema obtido. Isso se deve ao fato de que não é garantia de que o pó obtido seja um verdadeiro complexo de inclusão, podendo ser também uma simples mistura de ciclodextrina com moléculas hóspedes (PIRES, 2011). Para tanto, se faz necessário utilizar diferentes métodos de análises para avaliar a formação do complexo de inclusão, como calorimetria de varrimento diferencial (DSC), termogravimetria (TG), difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho (IR) e até ressonância magnética, para confirmar mudanças nas propriedades físico-químicas da droga após a complexação (FREITAS et al., 2012).

Os resultados provenientes das diferentes técnicas devem ser combinados e analisados em conjunto. Isso se deve ao fato do uso simultâneo de diferentes métodos de caracterização promover uma melhor compreensão das interações ciclodextrina-droga, pois cada método

explora uma característica particular do complexo, e se somadas podem realmente confirmar a formação do complexo de inclusão (MAAZAOUI, ABDERRAHIM, 2015).

Assim, diante da necessidade de se propor o desenvolvimento de um produto anti-hipertensivo na síndrome dos ovários policísticos associada a estado hipertensivo, além da escassez de estudos na literatura avaliando o efeito da preparação de complexo de inclusão α -terpineol/ β -ciclodextrina na pressão arterial de ratas em estro persistente, é o que presente estudo foi desenhado.

3. OBJETIVOS

Geral

- Preparar o complexo de inclusão de α -terpineol com β -ciclodextrina, e caracterizar e avaliar sua ação anti-hipertensiva em modelo de ratas em estro permanente.

Específicos

- Avaliar a alteração nos níveis pressóricos nos animais em estro persistente em comparação com os animais do grupo controle;
- Caracterizar o complexo de inclusão α -terpineol- β -Ciclodextrina;
- Avaliar a ação anti-hipertensiva do complexo de inclusão em ratas em estro permanente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental do presente trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos (LAPCOM) e no Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí.

4.1. MATERIAL

Matérias primas e reagentes

Para o desenvolvimento da presente dissertação foi utilizado o α -terpineol (Lote: MKBR7429V, SIGMA-ALDRICH) fornecido pelo Núcleo de Pesquisa de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí; β -ciclodextrina natural (Lote: B701118, ISP TECHNOLOGIES) fornecido pelo Laboratório de Cosméticos e Medicamentos; propilenoglicol (Lote: 112226, FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO GALENO) e propionato de testosterona diluído em óleo de milho (Lote: 098596, FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO GALENO). Para a preparação do complexo de inclusão, utilizou-se também água de grau para injetáveis e todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

4.2. MÉTODOS

4.2.1 Preparação dos complexos de inclusão

O complexo de inclusão de α -terpineol com β -ciclodextrina foi obtido pelo método de spray drying na razão molar 1:1. Por meio deste método, foi preparado uma dispersão de α -terpineol e β -CD em uma solução de etanol:água (2:8). A seguir, o complexo de inclusão foi obtido através da eliminação do solvente, pulverizando a dispersão em um *spray dry* (Mini Spray Dryer B290 – Büchi) com temperatura de entrada de 160 °C, temperatura de saída de 89 °C e pressão de ar de pulverização de 55 mmHg.

Para o controle da caracterização da formação do complexo da droga com a β -ciclodextrina, foi preparado também uma mistura física (MF) na proporção molar de 1:1 entre a β -ciclodextrina e α -terpineol com um auxílio de um gral e pistilo. A mistura física foi armazenada em frasco hermeticamente fechado.

As amostras resultantes da mistura física e do complexo obtido por spray drying foram submetidas à análise de infravermelho, difração de raios X, microscopia eletrônica de

arredução e ressonância magnética nuclear. Em seguida, a amostra de complexo de inclusão foi submetida à cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa a fim de quantificar o teor de α -terpineol para avaliação da atividade anti-hipertensiva no modelo animal.

4.2.2 Caracterização físico-química

- **Espectroscopia no infravermelho**

Os espectros de IV do α -terpineol, β -CD, MF e CI foram obtidos na região do IV médio ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$) por reflectância total atenuada, utilizando-se o Espectrômetro ThermoNicolet IS5 equipado com acessório ID5 e software de controle e aquisição OMNIC 9.0. As medidas das amostras foram antecedidas pelo *Background* de ar, isto é, sem material posicionado sobre o cristal, para redução do efeito do dióxido de carbono sobre as leituras das amostras. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmácia da Faculdade Integral Diferencial (FACID), Teresina. Enquanto, os dados foram analisados utilizando o software Omnic (versão 9.1).

- **Difração de Raios X**

As análises de Raios X do α -terpineol, β -CD, MF e CI foram realizados em difratômetro Shimadzu® (X-Ray Diffractometer, LabX XRD-6000), operando a 40 KV, 30 mA, com varredura angular 2θ de 2° min^{-1} , variando de $10 - 55^\circ$, utilizando-se radiação de cobre. A análise foi realizada em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente. Os ensaios foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí, Teresina. Enquanto, os dados foram analisados utilizando o software Origin Pro (versão 8.0).

- **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A avaliação da morfologia das amostras foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura utilizando-se um microscópio Shimadzu SSX-550 superscan

(Scanning Electron Microscope). As amostras foram fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min (Metalizador Baltec® SCD 050), de forma a tornar o material eletricamente condutor. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma atmosfera de plasma com os gases $N_2 - H_2$ com fluxos definidos e o controle da temperatura em torno de 300 °C por 1 hora. As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 KV. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Materiais (LABMAT) do Instituto Federal do Piauí, Teresina.

- **Ressonância Magnética Nuclear**

A formação do complexo de inclusão entre α -terpineol e β -CD foi ainda investigada através de análises espectroscópicas de RMN. Para isso, os experimentos de RMN de 1H e ^{13}C foram realizados a 30 °C em DMSO em um espectrômetro Varian® INOVA, modelo 400, utilizando uma sonda VT-CP/MAS, operando a 400 MHz com núcleo de hidrogênio – 1 (H^1). Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, em relação ao sinal do TMS-*d*4 em 0,00 ppm. Os ensaios foram realizados no Laboratório de RMN (LAUREMN) da Universidade Federal do Piauí, Teresina. Enquanto, os dados foram analisados utilizando o software MestReNova (versão 6.0.2).

- **Quantificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa de Alta Resolução**

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR), num cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a um espectrômetro Waters GCT Premier, equipado com uma coluna DB-5MS (30 m x 0,25 mm ID, espessura de filme 0,25 μ m). O volume de injeção foi de 1 μ L, no modo de divisão de 50:1, temperatura do forno foi programada em 60 °C permanecendo por 1 minuto, seguida de uma razão de aquecimento de 5 °C min^{-1} até 150 °C, seguida por uma outra rampa de aquecimento de 20 °C min^{-1} até 260 °C permanecendo 5 min. Hélio foi utilizado como gás de arraste num fluxo de 1 mL min^{-1} . A interface e o injetor foram programados em 260 °C.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, utilizando a fonte de ionização por impacto de elétrons (EI), com energia de ionização de 70 eV a voltagem do detector foi ajustada para 2.500 V. Aquisição foi realizada na faixa de massa de m/z 45-650. Hepatacosano foi utilizado como calibrante. A resolução de massa foi ajustada para cerca de 7000 FMWH para a massa m/z 218,9856 (*lock mass*). Os dados foram adquiridos utilizando software Waters Mass LynxTM versão 4.1 e processados usando o software gerenciador Chroma LynxTM, utilizando a biblioteca NIST 11.0. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

4.2.3 Avaliação da atividade biológica

- **Animais**

Com base nas diretrizes gerais estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e na Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, foram usados ratos *Wistar-Hannover*, oriundos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Estes animais foram utilizados para a obtenção de recém-nascidos, sendo acasalados na proporção de duas fêmeas para cada macho. Logo após o parto, os filhotes foram separados em machos e fêmeas, baseado na distância do orifício anogenital. Os machos foram devolvidos ao Biotério do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí para utilização em outras pesquisas. As ratas em número de 18 foram divididas em 3 grupos: I (controle normal, veículo, n=6), II (estro permanente, veículo, n=6) e grupo III (estro permanente, experimental, n=6). Com base no protocolo de Barraclough (1961), o estro permanente dos grupos II e III foi conseguido por meio da aplicação de uma injeção subcutânea de 1,25 mg de propionato de testosterona diluído em 0,1 ml de óleo de milho (veículo) no segundo dia de vida. A seguir, os animais foram transportados para o biotério do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) e mantidos em gaiolas plásticas com tampa gradeada de metal em condições controladas: ciclos claro/escuro de 12 horas, com luz de 7 h as 19 h, e temperatura mantida por ar-condicionados entre 20 e 25 °C. Os animais receberam livre acesso à água e ração para roedores.

Aos 90 dias de vida, após confirmação do estro permanente, baseada na obliteração do terço externo da vagina (HARRIS, LEVINE, 1965) e pela presença de queratinização da vagina e ovários policísticos, por ocasião da necrópsia (BARRACLOUGH, 1961; DE SOUSA, 2015), os animais do grupo I (controle, ratas normais) e grupo II (controle positivo, estro permanente) receberam apenas veículo (propilenoglicol), enquanto as ratas do grupo III (experimental) programadas para receber α -terpineol- β -CD por 28 dias.

- **Tratamento**

Portanto, os animais do grupo I (controle normotenso) e II (controle em estro permanente) receberam apenas 0,1 mL de propilenoglicol por gavagem por 28 dias (de 12 a 16 semanas de vida), enquanto os animais do grupo III (experimental) receberia α -terpineol complexado com β -ciclodextrina na concentração de 100 mg/kg diluído em 0,1 mL de propilenoglicol por gavagem no mesmo intervalo de dias. No 27º dia de tratamento, os animais foram submetidos à implantação da cânula para a aferição da pressão arterial no dia seguinte.

- **Aferição da Pressão Arterial**

Para a aferição da pressão arterial, foi utilizada a medida direta através da implantação de uma cânula na artéria femoral proposta por Santos (2014), como descrito a seguir.

Os animais foram anestesiados com cetamina (300 mg/kg, intraperitoneal – i.p.), e em seguida, foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Uma pequena incisão na região inguinal dos animais foi realizada separando a musculatura para localização do feixe de vasos e nervos, seguido da dissecação e exposição da artéria e veia femoral. Catéteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), foram implantados na artéria femoral esquerda. Após a inserção e fixação, os catéteres foram encapsulados por via subcutânea e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (scapulae) e foram mantidos com solução salina heparinizada (100 U/mL) imediatamente após a colocação e antes do registro do sinal da PA (SANTOS, 2014).

A PA foi medida 24 horas após a cirurgia pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (AVS projetos-SP/Brasil) conectado a um microcomputador equipado com placa conversora analógico-digital e com o programa AQCAD (AVS projetos-SP/Brasil) (**Figura 6**). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz, calculando a pressão arterial média para cada ciclo cardíaco.

Antes de iniciar a aferição da PA no 28º dia, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de, no mínimo, 60 min para estabilização do parâmetro cardiovascular. Após este período, as ratas foram eutanasiadas através da administração, por via i.p. de sobredosagem de cetamina 300 mg/kg + xilazina 30mg/kg, após confirmação da perda de consciência e morte. A escolha da xilazina se deve por ser um potente sedativo e relaxante muscular; e em associação com altas doses de cetamina causa depressão respiratória e redução dos batimentos cardíacos (MIRANDA et al., 2011a).

Figura 6: Sistema de aquisição de dados para registro da pressão arterial em ratas.



Fonte: SANTOS (2014).

- **Análise estatística**

Os dados resultantes da aferição da pressão foram apresentados sob a forma de média e erro padrão da média (E.P.M). Para análise estatística dos dados foi preconizado o teste t de Student para comparação dos níveis pressóricos dos animais experimentais com grupo controles, sendo o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software Origin Pro (versão 8.0).

- **Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI N° 089/14), e está em conformidade com as Normas do Regimento Interno do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação do complexo de inclusão α -terpineol- β -ciclodextrina

O α -terpineol por ser um componente de óleos essenciais, apresenta como característica a insolubilidade em água, além de sua elevada volatilidade. No entanto, a solubilidade limitada em água do α -terpineol pode ser superada pela formação do complexo de inclusão com ciclodextrinas. Por conseguinte, vários trabalhos têm demonstrado a possibilidade de complexação do α -terpineol com ciclodextrinas, como a pesquisa realizada por Donze e Coleman (1993), mostrando que o α -terpineol comparado com outros monoterpenos apresentou uma ótima seletividade quando complexado com β -ciclodextrina. Posteriormente, foi demonstrado por meio do diagrama de solubilidade de fases que a solubilidade do α -terpineol elevou linearmente com o aumento da concentração de β -CD ao longo do tempo, sugerindo que essa substância pode acomodar dentro da β -ciclodextrina através da razão estequiométrica 1:1, fato este evidenciado pelo valor negativo da entropia, comprovando assim o encapsulamento (SANTOS, BUERA, MAZZOBRE, 2011; MAZZOBRE, SANTOS, BUERA, 2011).

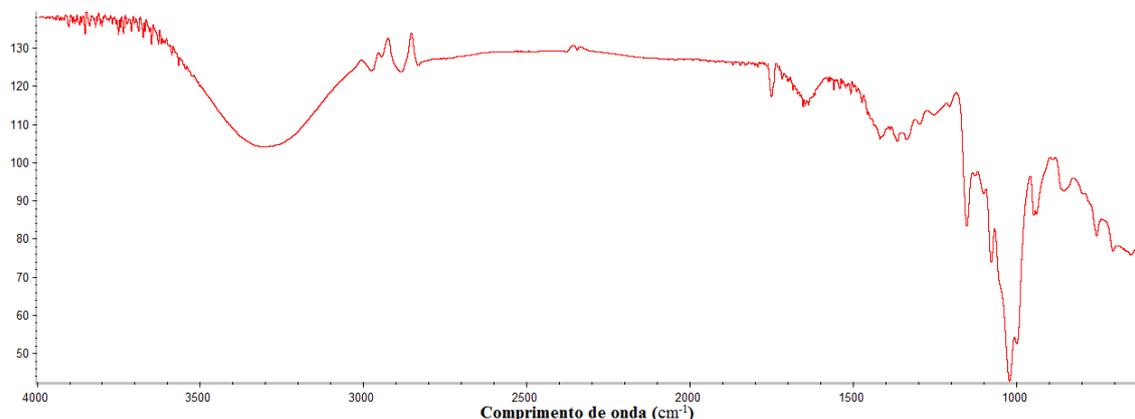
Devido à utilização em grande escala na obtenção de produtos tecnológicos intermediários destinados à produção de diversos tipos de formas farmacêuticas, a técnica de spray drying foi a escolhida para o preparo do complexo de inclusão α -terpineol/ β -CD na razão 1:1. Além disso, essa metodologia apresenta inúmeras vantagens como rapidez, controle da uniformidade e do tamanho das partículas (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

5.1.1 Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia no Infravermelho é uma técnica qualitativa empregada para se estimar a interação entre CDs e fármacos no estado sólido (CARVALHO, PINTO, 2012). Para isso, são verificadas interações em nível molecular, detectando as mudanças significativas na forma e na posição das faixas de absorbância, através das transições vibracionais e rotacionais dos diferentes grupos funcionais presentes nas moléculas de fármacos complexados ou livres (LYRA et al, 2010). Portanto, quando se forma o complexo, pequenos deslocamentos das bandas ou faixas de absorbância das ciclodextrinas poderão mascarar a da molécula hóspede.

As **Figuras 7 e 8** apresentam os espectros na região do infravermelho da β -ciclodextrina e do α -terpineol, respectivamente; e na **Tabela 2** estão correlacionadas as principais bandas de absorção dos compostos com suas prováveis atribuições.

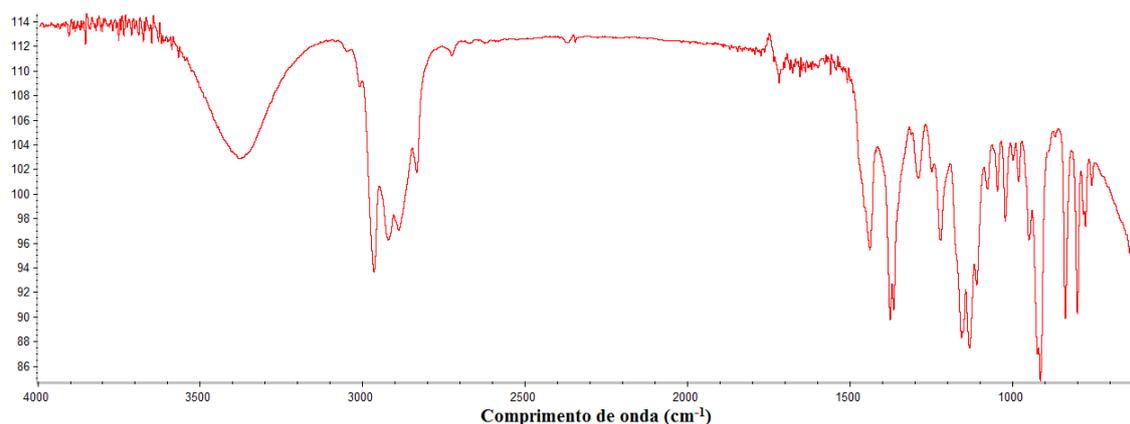
Figura 7: Espectro na região do infravermelho da β -CD em transmitância.



Fonte: Arquivo pessoal (2016).

O espectro de infravermelho da β -CD mostrou uma banda larga da ligação O-H referente ao álcool primário em 3310 cm^{-1} , estiramento C-O na região 1200-1000 cm^{-1} , o grupo éter cíclico é observado pelo estiramento C-O-C em 1028 cm^{-1} . O espectro de absorção na região do infravermelho do monoterpeneo α -terpineol está apresentado na **Figura 8**.

Figura 8: Espectro na região do infravermelho do α -terpineol em transmitância.



Fonte: Arquivo pessoal (2016).

No espectro obtido na região do infravermelho para o α -terpineol foi observada uma faixa larga em 3500-3200 cm^{-1} referente ao estiramento O - H. Também estavam presentes bandas de absorção em 3010-2900 cm^{-1} (estiramento = C-H), 2980-2850 cm^{-1} (estiramento – C-H), 1700-1620 cm^{-1} (estiramento C=C), 1250-1100 cm^{-1} (estiramento C-O).

A **Tabela 2** apresenta os grupos funcionais e os estiramentos observados nos espectros de absorção na região do infravermelho da β -CD e do α -terpineol. A partir destes dados podemos observar as modificações ocorridas nos espectros dos complexos e da mistura física.

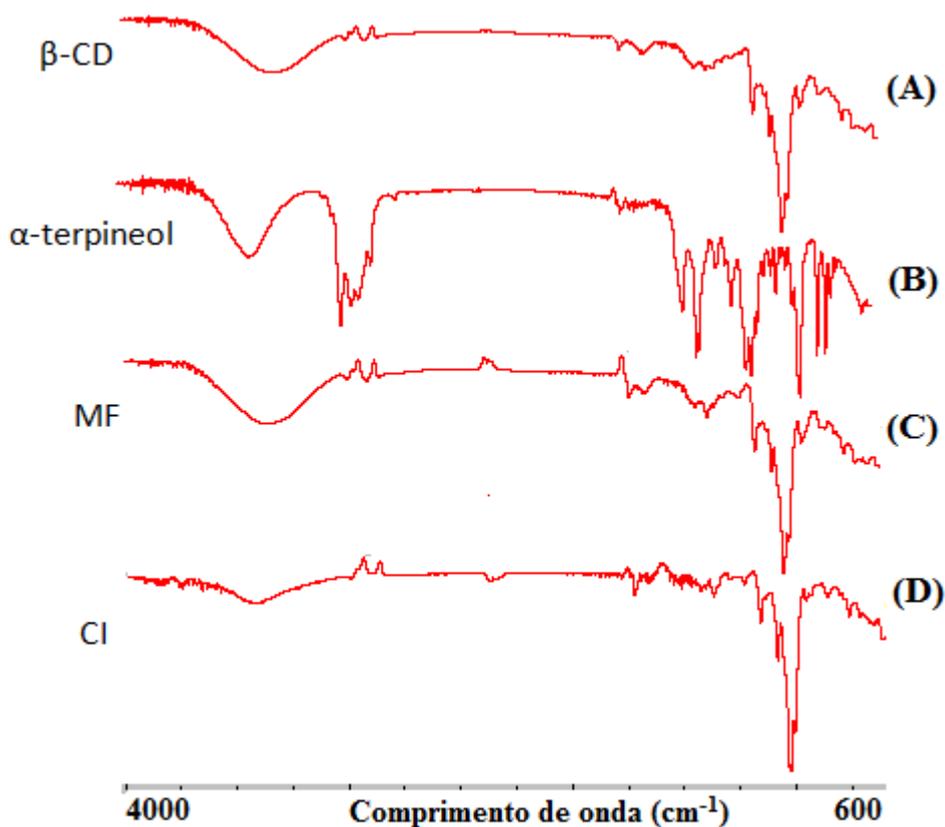
Tabela 2: Grupos funcionais e estiramentos observados espectros de absorção na região do infravermelho da β -CD e do α -terpineol.

Composto	Grupos funcionais	Região no IV
β-Ciclodextrina	Álcool primário	
	O – H	3500-3200 cm^{-1}
	C – O	1200-1000 cm^{-1}
	Etér etílico	
	C – O – C	1100-1020 cm^{-1}
α-terpineol	Álcool terciário	
	C – O	1250-1100 cm^{-1}
	O – H	3500-3200 cm^{-1}
	Cicloalceno	
	C = C	1700-1620 cm^{-1}

Fonte: PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, 2001.

Interações entre a molécula hóspede e a ciclodextrina no estado sólido causam alterações na absorção de energia, as quais podem ser detectadas na região do IV (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, 2001; SINGH et al., 2010). A **Figura 9** apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho do complexo binário, da mistura física, da β -CD e α -terpineol.

Figura 9: Espectros na região do infravermelho em transmitância: β -CD (A), α -terpineol (B), MF (C) e CI por spray drying (D).



Fonte: Arquivo pessoal (2016).

O espectro da MF foi semelhante ao da β -CD, indicando uma baixa capacidade de complexação. Entretanto, o espectro de absorção no infravermelho do complexo mostrou alterações em determinadas regiões quando comparado com os espectros do α -terpineol e β -ciclodextrina isolados. Dentre essas alterações, o espectro do complexo (**figura 9**) apresentou uma diminuição na banda correspondente ao álcool primário que é característica da β -CD (vide **tabela 2** e **figura 7**).

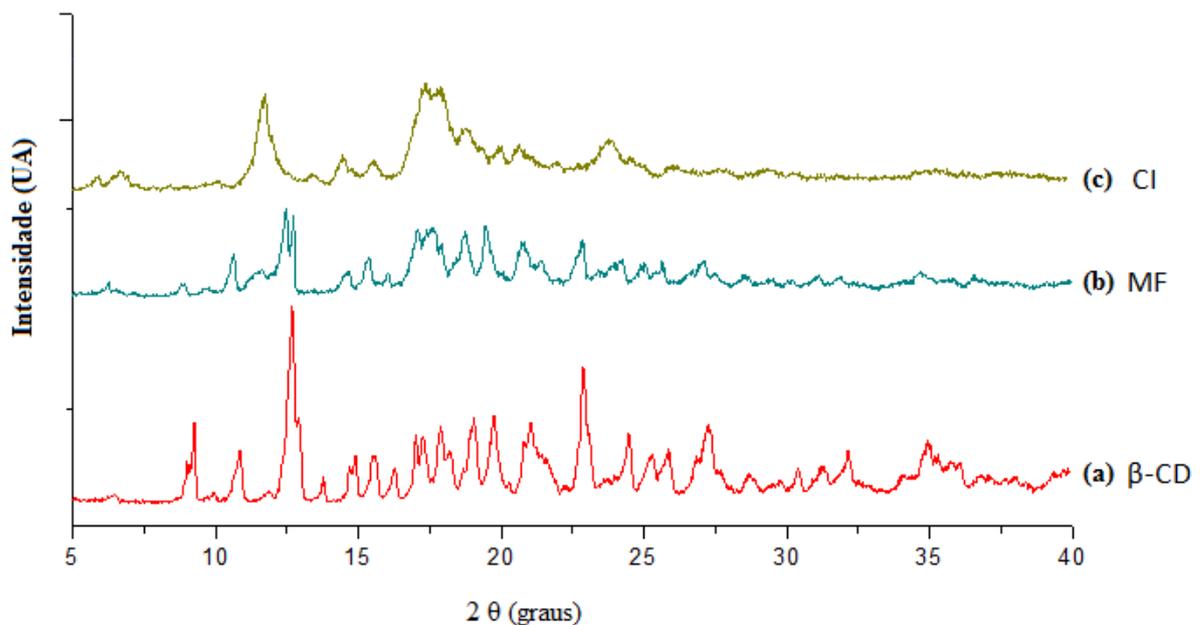
Além disso, as bandas características do estiramento – C-H e da ligação C=C do α -terpineol tiveram uma redução acentuada na sua intensidade, sugerindo que estas ligações possivelmente estão envolvidas na formação de complexos de inclusão, visto que a inserção de uma molécula-hóspede no interior da cavidade da ciclodextrina provoca uma mudança conformacional, reduzindo a livre movimentação das moléculas encapsuladas, diminuindo a intensidade do sinal (MIRANDA et al, 2011b). Portanto, as diferenças nas intensidades das bandas características do α -terpineol e β -ciclodextrina isolados em comparação com o

espectro do complexo de inclusão, indicam que pode haver uma interação da droga com β -CD tanto externamente quanto incluso na cavidade da β -ciclodextrina.

5.1.2 Caracterização por Difração de Raio X (DRX)

A difração de raios-X determina a natureza cristalina de sólidos, possibilitando uma análise da sua estrutura espacial e do grau de cristalinidade resultante do método de preparação da amostra. Dependendo da forma cristalina da molécula hóspede, haverá formação de picos característicos no difratograma, e a análise se baseia na comparação dos difratogramas das substâncias puras e mistura física com o do complexo, uma vez que os padrões de difração dos complexos de inclusão são distintos da superposição dos componentes separados. Assim, a obtenção de um difratograma com características de um material amorfo, ou seja, sem picos finos bem definidos, pode ser indicativo da ocorrência de complexação (SHAH, KAKUMANU, BANSAL, 2006; SAMI; PHILIP; PATHAK, 2010).

Figura 10: Difratogramas obtidos para a β -ciclodextrina (a), mistura física (b) e complexo de inclusão - CI por spray drying (c).



Fonte: Arquivo pessoal (2016).

A **Figura 10** mostra os padrões de difração de β -ciclodextrina, mistura física e complexo de inclusão por spray-drying. O padrão de difração da β -CD foi caracterizado pela

presença de muitas reflexões ou picos cristalinos em 9,1; 11,0; 12,5; 23; 27,2 e 34,9 (2θ), conferindo a molécula um caráter cristalino. Além disso, nos difratogramas que se referem à mistura física e aos CIs foram observadas reduções no tamanho das reflexões. No caso da mistura física 1:1, o difratograma revelou a presença de alguns picos cristalinos, porém com intensidade reduzida, possivelmente devido à sobreposição dos padrões gerados pelos compostos individuais.

Nos padrões de DRX referente ao complexo por spray-drying, observa-se uma redução mais acentuada em número e intensidade das reflexões, com desaparecimento de alguns picos característicos da β -CD, como 9,1; 11,0 e 29,2 (2θ), sinalizando uma maior natureza amorfa da amostra. Esses dados corroboram que o complexo de inclusão obtido por spray drying tem grande possibilidade de apresentar uma nova fase cristalina, indicativo de que o α -terpineol provavelmente esteja incluído na cavidade hidrofóbica da β -CD.

5.1.3 Caracterização por Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)

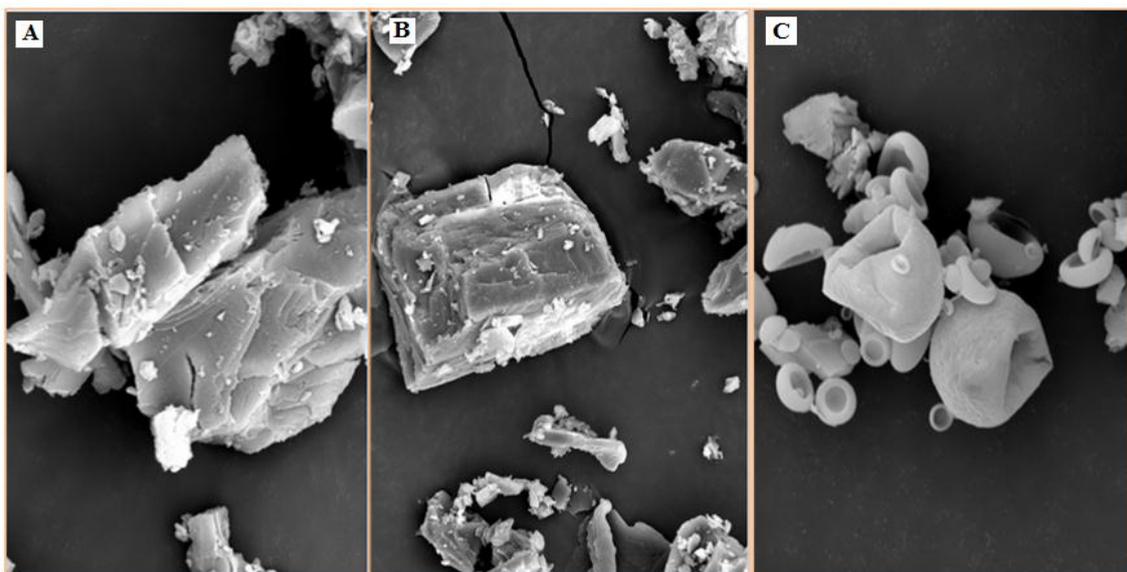
Outra técnica que se complementa a difração é a microscopia eletrônica de varredura, pois fornece informações visuais sobre os aspectos morfológicos da amostra (AALTONEN et al., 2009; YANG et al., 2011). O estudo de microestruturas possibilita a caracterização da morfologia do material, da composição química e da determinação da estrutura atômica, sendo bastante utilizado para analisar qualitativamente a formação de complexos de inclusão (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

Para comprovar a obtenção de CI, essa técnica avalia a diminuição da cristalinidade das partículas, à medida que permite a visualização e diferenciação das partículas de ciclodextrinas com o complexo obtido (LYRA et al., 2010). Normalmente, a mistura física apresenta os dois componentes distintos. Já no complexo de inclusão, aparece apenas um, diferente morfológicamente das formas livres (TAKAHASHI, VEIGA, FERRAZ, 2012). As análises da microestrutura da β -CD, da mistura física e do complexo de inclusão foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura e estão apresentadas na **figura 11**.

O que se pode observar é que as partículas de β -ciclodextrinas apresentaram-se como cristais de forma poliédrica larga e com superfície plana bem definida, com tamanho de partículas variando da ordem de 10 μm até 200 μm . A mistura física entre os componentes apresenta estruturas idênticas às obtidas para a β -ciclodextrina pura, indicando que a simples

mistura de α -terpineol com a β -ciclodextrina não é capaz de formar complexos de inclusão, concordando com os resultados anteriores.

Figura 11: Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para β -CD com ordem de magnificação de 1000x (A), mistura física com ordem de magnificação de 1000x (B), complexo de inclusão por spray drying com ordem de magnificação de 2000x (C).



Fonte: Arquivo pessoal (2016).

As micrografias referentes ao complexo de inclusão, observado em 13(c), demonstraram a formação de estruturas diferentes nas quais a morfologia original dos cristais foi perdida. As partículas do complexo se mostraram relativamente esféricas e de superfície lisa, porém muito pequenas de 1 a 180 μm , com capacidade de propiciar melhores características de fluxo para possível desenvolvimento de uma forma farmacêutica (SIVA, NAYAKI, RAJENDIRAN, 2015; RUDRANGI et al., 2015). As imagens das microestruturas permitiram também a observação da influência da técnica de formação de complexo de inclusão na morfologia do complexo obtido, revelando uma amostra com alto grau de amorfização, assim como observada na análise por DRX. Esse caráter amorfo é provavelmente devido à interação do α -terpineol com β -CD, mudando a estrutura cristalina.

Apesar dos estudos de MEV serem incompletas para confirmarem a presença de CI, as alterações na forma, no aspecto e no tamanho das partículas do complexo de inclusão são indicativos de formação de uma nova fase sólida com a provável formação do complexo de inclusão.

5.1.4 Ressonância Magnética Nuclear

Espectroscopia de RMN é uma técnica que possibilita a elucidação estrutural, portanto uma das mais importantes para a detecção da formação do complexo de inclusão (FRACETO, 2007). Estas informações podem ser obtidas usando-se a espectroscopia monodimensional (^1H RMN). Nessa ferramenta, alteração nos valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios (H3 e H5) da β -CD na ausência e presença do α -terpineol é o que proporcionam a informação sobre a formação do complexo de inclusão (ALI, SHAMIM, 2014).

A **tabela 3** apresenta as atribuições dos hidrogênios da β -CD e as alterações nos deslocamentos químicos devido à formação do complexo de inclusão. O hidrogênio H3, na molécula de β -CD pura, apresenta sinal em 3,630, e mostra-se deslocado para 3,640 no complexo por spray drying, e o hidrogênio H5 sofre modificação de 3,520 para 3,529 ppm. Enquanto que os hidrogênios da superfície externa da β -CD (H1, H2, H4 e H6) mostraram desvios químicos menores quando comparado com os hidrogênios da cavidade interna (H3 e H5). Portanto, os valores obtidos ($\Delta\delta$) para os hidrogênios situados na cavidade da β -CD, sugerem a formação do complexo entre α -terpineol e β -CD.

Tabela 3: Sinais de ^1H RMN para a β -CD e complexo de inclusão α -terpineol- β -CD (mudanças observadas nos sinais da β -CD).

β -CD	δ β -CD (ppm)	δ α -terpineol- β -CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	4,805	4,811	0,006
H2	3,315	3,320	0,005
H3	3,630	3,640	0,010
H4	3,274	3,280	0,006
H5	3,520	3,529	0,009
H6	3,605	3,611	0,006

Legenda: δ (deslocamento químico); $\Delta\delta$ ($\delta_{\alpha\text{-terpineol-}\beta\text{-CD}} - \delta_{\beta\text{-CD}}$).

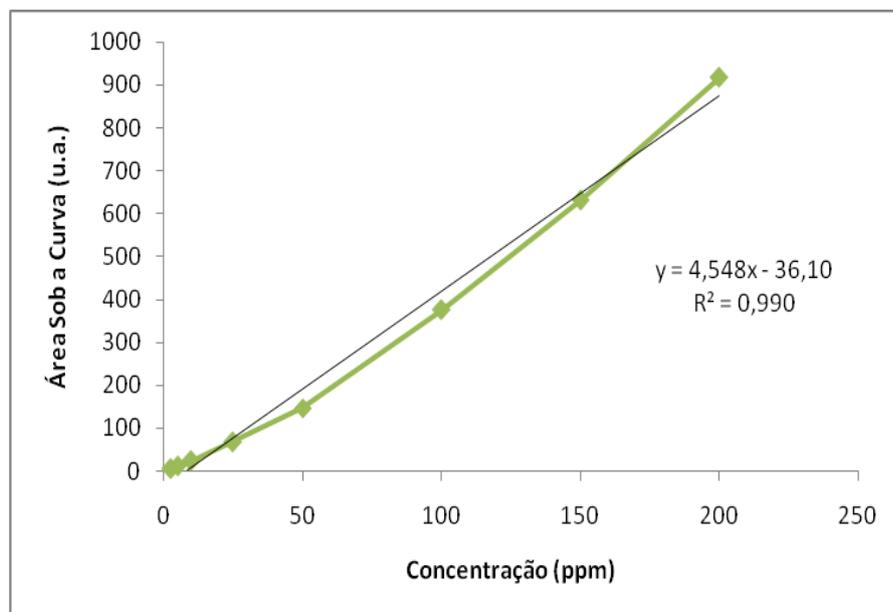
Fonte: Arquivo pessoal (2016).

5.1.5 Quantificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa de Alta Resolução (CG-EMAR)

Os testes de caracterização (DRX, IV, MEV e RMN) sugerem a formação do complexo de inclusão por spray drying, tornando-se, portanto um candidato viável para testes em modelos animais com hipertensão. Contudo, antes da realização em testes *in vivo*, é necessário realizar a quantificação do α -terpineol no complexo de inclusão. A técnica utilizada para tal procedimento foi a cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa de alta resolução, que possibilita detectar e quantificar os constituintes, que são ionizados, de uma matriz complexa com alta sensibilidade e seletividade (ALBERICI, et al., 2010).

A curva analítica (**Figura 12**) foi construída com oito concentrações diferentes (2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 200 ppm), sendo que cada concentração foi preparada em triplicata. O coeficiente de correlação (R^2) apresentou um valor satisfatório de 0,990 e a equação da reta foi $y = 4,548x - 36,10$. Em sequência, o cálculo da concentração foi realizado com base na equação obtida na curva de calibração, e o valor obtido foi 291,2 ppm, com uma eficiência de complexação de 72,8 %.

Figura 12: Curva analítica para a quantificação do teor de α -terpineol em complexo de inclusão por spray drying obtida por CG-EMAR.



Fonte: Arquivo pessoal (2016).

5.2 Análise dos níveis pressóricos em ratas em estro permanente

Síndrome dos ovários policísticos é uma doença endócrina que apresenta um fenótipo heterogêneo com anormalidades ovariana, hormonal e metabólica, que em algumas mulheres pode estar associada com eventos cardiovasculares (CONNOLLY et al., 2015; SHI et al., 2014). No entanto, o estudo de mulheres com ovários policísticos apresenta limitações de natureza ética, daí a busca de modelos experimentais. (WALTERS, ALLAN, HANDELSMAN, 2012). Entre os vários modelos animais existentes, a rata apresenta morfologia e endocrinologia com pontos que se assemelham aos da espécie humana. Esses animais são do tipo poliestro, ou seja, apresentam ciclos estrais regulares e sucessivos, que se manifestam por mudanças morfológicas nos ovários, útero, vagina e glândulas mamárias (RUSSO & RUSSO, 1987; DA SILVA, 1997; WANG et al., 2012).

No entanto, a interrupção do ciclo estral da rata ou estro permanente é, portanto, diferente do curto período de receptividade sexual denominado estro ou cio. O modelo de fêmeas em estro permanente foi melhor estudado por Barraclough (1961), que através da aplicação de propionato de testosterona do segundo ao quinto dia de vida ser capaz de produzir estro permanente em todos os animais (DA SILVA et al., 2009). No presente estudo, estes animais, quando adultos, apresentaram obliteração do terço externo vaginal, anovulação crônica e ovários policísticos, por ocasião da necrópsia, assim, mimetizando síndrome dos ovários policísticos, que se deve a influência de androgênios no hipotálamo dos animais no período pós-natal, ocorrendo lesão da área pré-óptica, levando a ausência de liberação cíclica de gonadotropinas a partir do período pubeal, não havendo assim postura ovular, e como consequência infertilidade, permanecendo funcionando a área mediana do hipotálamo (núcleo arqueado), área tônica (LIMA, 1966; OKUTSU et al., 2010; TEHRANI et al., 2014).

Alguns estudos mostraram que as ratas em estro permanente apresentam elevação significativa da pressão arterial em comparação a animais controles (GONTIJO et al., 2010). Dentre esses estudos, até onde investigamos, apenas três foram relatados na literatura (**tabela 4**). No estudo de Stener-Victorin et al. (2005), os autores encontraram um aumento na pressão arterial sistólica em ratas em estro permanente após administração intramuscular de 4 mg de valerato de estradiol na 8ª semana de vida, usando a metodologia de plestimografia de cauda em comparação com animais controle. Nos estudos brasileiros, Gontijo et al. (2010) e Ciampone (2016) induziram o estado de estro permanente em ratas após administração de 1,25 mg de propionato de testosterona no segundo dia de vida, no entanto apenas no trabalho

de Gontijo et al. (2010) foram encontrado um aumento na pressão arterial sistólica quando comparado com o controle.

Tabela 4: Estudos que relacionam o estado de estro permanente com hipertensão.

Autores	Metodologia	Aferição da pressão arterial	Ratas em estro permanente
Stener-Victorin et al. (2005)	Administração i.m de 4mg/0,2 mL de valerato de estradiol	Plestimografia de cauda	Hipertensas em relação ao controle
Gontijo et al. (2010)	Administração s.c de 1,25 mg/0,1mL de propionato de testosterona	Plestimografia de cauda	Hipertensas em relação ao controle
Ciampone (2016)	Administração s.c de 1,25 mg/0,1mL de propionato de testosterona	Plestimografia de cauda	Não houve diferença significativa

Fonte: Arquivo pessoal.

Com relação a presente pesquisa, o modelo de estro permanente androgenizado foi produzido como preconizado por Barraclough (1961), sendo o mesmo utilizado por Gontijo et al. (2010) e Ciampone (2016). No entanto, o resultado da aferição da pressão arterial dos animais utilizando-se então a medida direta foi diferente das pesquisas realizadas por Stener-Victorin et al. (2005) e Gontijo et al. (2010). No presente estudo, ao se comparar a pressão sanguínea de ratas em estro permanente por medida direta da pressão arterial por meio de canulação da artéria femoral (**Tabela 5**), não houve diferença significativa na pressão arterial entre ratas controle e em estro permanente, portanto diferente dos relatos de Stener-Victorin et al. (2005) e Gontijo et al. (2010), que mostraram elevação da pressão arterial, quando avaliação realizada na cauda (plestimografia).

Tabela 5: Registro do peso corporal e pressão arterial média (PAM) em ratas em estro permanente em comparação aos animais controle da mesma idade.

Grupo	Peso corporal (g)	PAM (mmHg)
Controle	284 ± 3,0	118,9 ± 1,43
PE	280 ± 4,5	116,7 ± 1,32

Os valores representam a média ± E.P.M. (n=6 por grupo).

Fonte: Arquivo pessoal.

A priori, a técnica a ser utilizada neste trabalho seria por plestimografia de cauda, mas pelo fato do aparelho desta Instuição não estar funcionando, não foi possível a avaliação da pressão arterial dos animais por plestimografia de cauda. Para dar seguimento à pesquisa, a técnica escolhida foi a medida direta através da implantação de cateter na artéria femoral esquerda. A leitura direta por meio de cateteres arteriais é considerada um método preciso por avaliar diretamente a pressão arterial na artéria femoral dos animais (ROSS, 1977).

O procedimento de canulação intra-arterial apesar de ser utilizado para aferição de pressão sanguínea, esta técnica cirúrgica invasiva apresenta inúmeras desvantagens, como dificuldade de introdução da cânula na artéria femoral, dor, sangramento e risco de óbito. Frente a essas desvantagens, para que se alcançasse o número de 12 animais utilizados até então no presente estudo, um total de 20 ratas foram submetidas à implantação da cânula, no entanto 40 % dos animais foram a óbito. A causa mortis é variada, podendo ser decorrente de sangramento, oclusão parcial da artéria invadida, infecção local e/ou sistêmica, inflamação tecidual, ou até de uma hemorragia devido ao deslocamento acidental da cânula no interior da artéria, por isso os estudos atuais vem utilizando a plestimografia caudal (HALL, CLARKE, 1987).

Com relação aos animais que foi possível a implantação com consequente aferição da pressão arterial, a ausência de diferença dos níveis pressóricos observados no grupo experimental com relação ao controle pode ser em decorrência da invasividade da técnica. A perda sanguínea, como consequência do procedimento cirúrgico, somada com ação dos anestésicos durante o período operatório podem promover alterações no sistema cardiovascular, dentre elas a hipotensão. Por conta disso, muitas pesquisas utilizam a medida indireta, mais precisamente a plestimografia de cauda, uma vez que não requer cirurgia ou destreza manual (STENER-VICTORIN et al, 2005; GONTIJO et al, 2010; CIAMPONE, 2016).

Assim, devido a não constatação de elevação da pressão arterial em ratas em estro permanente pelo método de medida direta, o complexo de inclusão com α -terpineol não foi administrado aos animais do grupo experimental, embora estudos espectroscópicos e cromatográficos sugiram ter havido a formação do complexo de inclusão da β -ciclodextrina com α -terpineol, um componente viável para ser testado no tratamento da hipertensão arterial. Portanto, há necessidade de futuros estudos comparando os métodos de aferição da pressão arterial em ratas em estro permanente através da implantação de cânula na artéria femoral esquerda com a avaliação caudal, para seleção segura do método mais adequado, neste modelo animal considerado hipertenso, como supracitado.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, os métodos espectroscópicos e cromatográficos sugerem a formação do complexo de inclusão da β -ciclodextrina com α -terpineol por spray drying, tornando-se, portanto um candidato viável para ser testado no tratamento da hipertensão arterial. Contudo, a pressão arterial dos animais em estro permanente no presente estudo, através da implantação de cânula na artéria femoral esquerda, não mostrou elevação da pressão arterial nestes animais, o que desperta o interesse para realização de novos estudos comparativos utilizando outros métodos de avaliação da pressão arterial de ratas em estro permanente.

PERSPECTIVAS

- Comparar os métodos de aferição da pressão arterial de ratas em estro permanente por implantação de cânula na artéria femoral esquerda com o método de plestimografia de cauda;
- Avaliar a atividade anti-hipertensiva do complexo de inclusão β -ciclodextrina- α -terpineol em comparação com a substância isolada em modelos de animais hipertensos.

REFERÊNCIA

AALTONEN, J.; ALLESO, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V.; GORDON, K. C.; RANTANEN, J. Solid form screening - A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 1, p. 23-37, 2009.

ABRANSOM, B.L.; MELVIN, R.G. Cardiovascular Risk in Women: Focus on Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 30, n. 5, p. 553-559, 2014.

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R.C.; SANVIDO, G.B.; ROMÃO, W.; LALII, P.M.; BENASSI, M.; CUNHA, I.B.S.; EBERLIN, M.N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world". **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 265-294, 2010.

AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; RAFIEE, S.; MADADLOU, A. Energy and exergy analyses of the spray drying process of fish oil microencapsulation. **Biosystems Engineering**, v. 111, p. 229-241, 2012.

AIN, S.; KUMAR, B.; PATHAK, K. Cyclodextrins: versatile carrier in drug formulations and delivery systems. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 583-598, 2015.

ALI, S.M.; SHAMIM, S. Structure Elucidation of Benzhexol- β -Cyclodextrin Complex in Aqueous Medium by ^1H NMR Spectroscopic and Computational Methods. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 4, p. 63-70, 2014.

ANDREUS, J.; DALMOLIN, M.C.; OLIVEIRA-JUNIOR, I.B.; BARCELLOS, I.O. Aplicação de Ciclodextrinas em Processos Têxteis. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 929-937, 2010.

AZZAM, K.M.; MUHAMMAD, E. Host-guest Inclusion Complexes between Mitiglinide and the Naturally Occurring Cyclodextrins α , β , and γ : A Theoretical Approach. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 2, p. 289-291, 2015.

AZZIZ, R. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: A reappraisal. **Fertility and Sterility**, v.83, n.5, 2005.

AZZIZ, R. PCOS in 2015: New insights into the genetics of polycystic ovary syndrome. **Nature Reviews Endocrinology**, v.12, n.2, p. 74-75, 2016.

BALDANI, D. P.; SKRGATIC, L.; OUGOUAG, R. Polycystic Ovary Syndrome: Important Underrecognised Cardiometabolic Risk Factor in Reproductive-Age Women. **International Journal of Endocrinology**. 2015.

BALDAUF, C.; KUBO, R.R.; SILVA, F.; IRGANG, B.E. "Ferveu, queimou o ser da erva": conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, 2009.

BARRACLOUGH, C.A. Production of anovulation, sterile rats by single injection of testosterone. **Endocrinology**, v. 68, 1961.

BENTLEY-LEWIS, R.; SEELY, E.; DUNAIF, A. Ovarian hypertension: Polycystic Ovary Syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 40, 2011.

BONNET, V.; GERVAISE, C.; DJEDAINI-PILARD, F.; FURLAN, A.; SARAZIN, C. Cyclodextrin nanoassemblies: a promising tool for drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 9, 2015.

CALDWELL, A. S. L.; MIDDLETON, L. J.; JIMENEZ, M.; DESAI, R.; MCMAHON, A. C.; ALLAN, C. M.; HANDELSMAN, D. J.; WALTERS, K. A. Characterization of Reproductive, Metabolic, and Endocrine Features of Polycystic Ovary Syndrome in Female Hyperandrogenic Mouse Models. **Endocrinology**, v.155, p. 3146-3159, 2014.

CAMARGO, F.P.; RAFFIN, R.; ROSSATO, J.; SILVA, I.Z.; HOELZEL, S.C. Preparation, characterization, antimicrobial activity and computational simulation of the inclusion complex of silver sulfadiazine with β -cyclodextrin. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**, v. 14, n. 1, p. 73-88, 2013.

CARVALHO, L.B.; PINTO, L.M.A. Formation of inclusion complexes and controlled release of atrazine using free or silica-anchored-cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.74, n. 14, p. 375-381, 2012.

CARVALHO, I.M. Ciclodextrinas: novas aplicações. Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Porto, 2013.

CHEN, M.J.; YANG, W.; YANG, J.; CHEN, C.; HO, H.; YANG, Y. Relationship between androgen levels and blood pressure in young women with polycystic ovary syndrome. **Hypertension**, v. 49, 2007.

CHI, L.; LIU, R.; GUO, T.; WANG, M.; LIAO, Z.; WU, L.; LI, H.; WU, D.; ZHANG, J. Dramatic improvement of the solubility of pseudolaric acid B by cyclodextrin complexation: Preparation, characterization and validation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 349-356, 2015.

CHO, L.W.; RANDEVA, H.S.; ATKIN, S.L. Cardiometabolic aspects of polycystic ovarian Syndrome. **Journal of Vascular Health and Risk Management**, v. 3, n. 1, p. 55-63, 2007.

CIAMPONE, S. Estudo da resposta metabólica, receptores da angiotensina e a pressão arterial em ratas androgenizadas em estro persistente: efeito do exercício físico aeróbio programado. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor, 2016.

CONNOLLY, F.; RAE, M.T.; SPÄTH, K.; BOSWELL, L.; MCNEILLY, A.S.; DUNCAN, W.C. In an Ovine Model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Prenatal Androgens Suppress Female Fetal Renal Gluconeogenesis. **Plos One**, 2015.

COSTA, S.B.; DUARTE, C.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; SERRA, A.T.; MARTINS, M.M.; JANUÁRIO, M.I.N.; VICENTE, A.A.; DELGADILLO, I.; DUARTE, C.; COSTA, M.L.B. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n.2, p. 190-199, 2012.

DA SILVA, B.B. Estudo morfológico e morfométrico da mama de ratas em estro-permanente tratadas com tamoxifeno e com estrogênios conjugados. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Medicina, São Paulo, 1997.

DA SILVA, B.B.; LOPES-COSTA, P.V.; ROSAL, M.A.; DOS SANTOS, L.G.; GONTIJO, J.A.; ALENCAR, A.P.; DE JESUS SIMÕES, M. Morphological and morphometric analysis of the Adrenal cortex of androgenized female rats. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 64, n. 1, p. 44-48, 2007.

DA SILVA, B.B.; LOPES-COSTA, P.V.; DOS SANTOS, A.R.; PIRES, C.G.; BORGES C.S.; GONTIJO, J.A. Evaluation of Ki-67 antigen expression. in the zona reticularis of the adrenal cortex of female rats in persistent estrus. **Human Reproduction**. v. 24, n. 3, p. 705-709, 2009.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2007.

DEMISSIE, M.; LAZIC, M.; FOECKING, E.M.; AIRD, F.; DUNAIF, A.; LEVINE, J.E. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats.

American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, v. 295, n. 2, p. 262-268, 2008.

DE SOUSA, G.V.; BORGES C.S.; ALENCAR A.P.; NAZÁRIO, A.C.P.; DA SILVA B.B. Ki-67 antigen expression in the mammary epithelium of female rats in persistent estrus treated with raloxifene. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 36, p. 694-697, 2015.

DONZE, C., COLEMAN, A.W. β -CD Inclusion Complexes: Relative selectivity of terpene and aromatic guest molecules studied by competitive inclusion experiments. **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry**, v.16, 1993.

DUMESIC, D.A.; OBERFIELD, S.E.; STENER-VICTORIN, E.; MARSHALL, J.C.; LAVEN, J.S.; LEGRO, R.S. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 487-525, 2015.

DUMITRESCU, R.; MEHEDINTU, C.; BRICEAG, I.; PURCAREA, V.L.; HUDITA, D. The Polycystic Ovary Syndrome: An update on metabolic and hormonal mechanisms. **Journal of Medicine and Life**, v. 8, n. 2, p. 142-145, 2015.

DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 6, p. 774-800, 1997.

ERHMANN, D.A. Polycystic Ovary Syndrome. **The New England Journal of medicine**, 2005.

ESCOBAR-MORREALE, H.F.; CARMINA, E.; DEWAILLY, D.; GAMBINERI, A.; KELESTIMUR, F.; MOGHETTI, P.; PUGEAT, M.; QIAO, J.; WIJEYARATNE, C.N.; WITCHEL, S.F.; NORMAN, R.J. Epidemiology, diagnosis and managem hirsutism: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. **Human Reproduction Update**, v.18, p. 146-170, 2012.

FRACETO, L.F. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1203-1207, 2007.

FREITAS, M.R.; ROLIM, L.A.; SOARES, M.F.; ROLIM-NETO, P.J.; ALBUQUERQUE, M.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1095-1100, 2012.

GAMBINERI, A.; PELUSI, A.; VICENNATI, V.; PAGOTTO, U.; PASQUALI, R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 26, n. 7, p. 883-896, 2002.

GARCÍA, A.; LEONARDI, D.; LAMAS, M.C. Promising applications in drug delivery systems of a novel β -cyclodextrin derivative obtained by green synthesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 602-608, 2016.

GIDWANI, B.; VYAS, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. **BioMed Research International**, 2015.

GONÇALVES, N.M.; GERENUTTI, M.; CHAVES, D.S.A.; VILA, M.M. A tradição popular como ferramenta para a implantação da fitoterapia no município de Volta Redonda – RJ. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, 2011.

GONTIJO, J.A.R.; GUI, D.C.; BOER, P.A.; SANTOS, A.R.; FERREIRA-FILHO, C.P.; AGUIAR, A.R.N.; DA SILVA, B.B. Evaluation of arterial blood pressure and renal sodium handling in a Model of female rats in persistent estrus. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 32, n. 6, p. 385-389, 2010.

GOPALAN, P.R.; ANNASELVI, A.G.; SUBRAMANIAM, P.. Preparation and characterization of inclusion complexes of isoproteron with native and modified β -cyclodextrins. **International Journal of Agriculture and Food Science**, v.2, n. 4, p. 164-169, 2012.

HALL, L. W.; CLARKE, K. W. Anestesia veterinária. São Paulo: **Manole**, 1987.

HARRIS, G.W.; LEVINE, S. Sexual differentiation of the brain and its experimental control. **The Journal of Physiology**, v. 181, 1965.

HEALD, P.J.; O'GRAY, J.E.; HOWIE, A.J. Quantitative changes in uterine nucleic acids during the oestrous cycle in rats. **Journal Reproduction an Fertility**, v. 21, n. 3, p. 481-488, 1970.

HOLTE, J.; GENNARELLI, G.; BERNE, C.; BERGH, T.; LITHELL, H. Elevated ambulatory day-time blood pressure in women with polycystic ovary syndrome: a sign of a pre-hypertensive state?. **Human Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 23-28, 1996.

HOUTEN, E. L.; VISSER, J.A. Mouse models to study polycystic ovary syndrome: A possible link between metabolism and ovarian function?. **Reproductive Biology**, v.14, p. 32-43, 2014.

HSU, M. Changes in the PCOS phenotype with age. **Steroids**, v.78, p. 761-766, 2013.

HSU, M. Clinical characteristics in Taiwanese women with polycystic ovary syndrome. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, n. 3, p. 86-93, 2015.

HUANG, Z.; LONDON, E. Effect of Cyclodextrin and Membrane Lipid Structure upon Cyclodextrin–Lipid Interaction. **Langmuir**, v. 29, p. 14631-14638, 2013.

HUTTUNEN, K.M.; RAUNIO, H.; RAUTIO, J. Prodrugs - From Serendipity to Rational Design. **Pharmacological Reviews**, v. 63, p. 750-771, 2011.

IKEDA, K.; BABA, T.; MORISHITA, M.; HONNMA, H.; ENDO, T.; KIYA, T.; SAITO, T. Long-term treatment with dehydroepiandrosterone may lead to follicular atresia through interaction with anti-Mullerian hormone. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, n. 46, 2014.

JAMBHEKAR, S.S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, 2015.

JANTARAT, C.; SIRATHANARUN, P.; RATANAPONGSAI, S.; WATCHARAKAN, P.; SUNYAPONG, S.; WADU, A. Curcumin-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Preparation Methods: Effect of Common Solvent Evaporation, Freeze Drying, and pH Shift on Solubility and Stability of Curcumin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n.8, p. 1215-1223, 2014.

KARGILI, A.; KARAKURT, F.; KASAPOGLU, B.; DERBENT, A.; KOCA, C.; SELCOKI, Y. Association of polycystic ovary syndrome and a non-dipping blood pressure pattern in young women. **Clinics**, v. 65, n. 5, p. 475-479, 2010.

KING, J. Polycystic Ovary Syndrome. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 51, n. 6, 2006.

KUNLE, O.F.; EGHAREVBA, H.O.; AHMADU, P.O. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n.3, p. 101-112, 2012.

LEGRO, R.S.; ARSLANIAN, S.A.; EHRMANN, D.A.; HOEGER, K.M.; MURAD, M.H.; PASQUALI, R.; WELT, C.K. Diagnosis and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 98, n. 12, 2013.

LENART-LIPIŃSKA, M.; MATYJASZEK-MATUSZEK, B.; WOŹNIAKOWSKA, E.; SOLSKI, J.; TARACH, J.S.; PASZKOWSKI, T. Polycystic ovary syndrome: clinical implication in perimenopause. **Przegląd Menopauzalny**, v.13, n.6, p. 348-351, 2014.

LIMA, G.R. Contribuição para o estudo da fisiopatologia de ratas em estro permanente: sensibilidade uterina à ocitocina. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Medicina, São Paulo, 1966.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas, Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p.117-124, 2010.

LUQUE-RAMIREZ, M.; ESCOBAR-MORREALE, H.F. Polycystic ovary syndrome as a paradigm for prehypertension, prediabetes, and preobesity. **Current Hypertension Reproduction**. v. 16, n. 12, 2014.

MA, Z.; MOULTON, B. Recent advances of discrete coordination complexes and coordination polymers in drug delivery. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, p. 1623-1641, 2011.

MAAZAOUI, R.; ABDERRAHIM, R. Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization. **International Journal of Advanced Research**, v.3, n. 2, 2015.

MACUT, D.; BAIEVIC, M.; BOZIC-ANTIC, I.; BJEKIC-MACUT, J.; CIVCIC, M.; ERCEG, S.; MILUTINOVIC, D.V.; STANOJLOVIC, O.; ANDRIC, Z.; KASTRATOVIC-KOTLICA, B.; ŠUKILOVIC, T. Predictors of Subclinical Cardiovascular Disease in Women with Polycystic Ovary Syndrome: Interrelationship of Dyslipidemia and Arterial Blood Pressure. **International Journal of Endocrinology**, 2015.

MARCH, W.A.; MOORE, V.M.; WILLSON, K.J.; PILLIPS, D.I.W.; NORMAN, R.J.; DAVIES, M.J. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. **Human reproductive**, v. 25, n. 2, p. 544-551, 2010.

MAZZOBRE, M. F.; SANTOS, C. I.; BUERA, M. P. Solubility and Stability of β -Cyclodextrin–Terpineol Inclusion Complex as Affected by Water. **Food Biophysics**, v. 6, 2011.

MELO, A.S.; DIAS, S.V.; CAVALLI, R.C.; CARDOSO, V.C.; BETTIOL, H.; BARBIERI, M.A.; FERRIANI, R.A.; VIEIRA, C.S. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. **Society for Reproduction and Fertility**, 2015.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G.G. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, 2011.

MIRANDA, C.B.; RAQUEL WOLFF CABALA, R.W.; ATAN, J.B.C.D.; MÜLLER, L.C.M.; SILVA, P.C.; VIVAS, L.A.M.; FERREIRA, M.L. Contenção farmacológica em primatas não-humanos com emprego de ketamina e xilazina. Uma revisão bibliográfica. **Pubvet**, Londrina, v. 5, n. 8, 2011a.

MIRANDA, J. C.; MARTINS, T.E.A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, 2011b.

MOURA, H.H.G.; COSTA, D.L.M.; BAGATIN, E.; SODRÉ, C.T.; AZULAY, M.M. Síndrome do ovário policístico: abordagem dermatológica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.1, p.111-119, 2011.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226-238, 2015.

OKUTSU, Y.; ITOH, M.T.; TAKAHASHI, N.; ISHIZUKA, B. Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, 2010.

OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PALOMBA, S.; SATAGNI, S.; FALBO, A.; LA SALA, G.B. Complications and challenges associated with polycystic ovary syndrome: current perspectives. **International Journal Women's Health**, v.7, p. 745-763, 2015.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. Introduction to Spectroscopy. 3^o ed. **Thomson Learning, Inc.**, 2001.

PHISUT, N. Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 1297- 1306, 2012.

PIRES, M.A.S. Preparo de compostos de inclusão de hidroclorotiazida, pioglitazona e claritromicina em ciclodextrinas por diferentes técnicas: caracterização e estudos biológicos. Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Belo Horizonte, 2011.

RAMESH, C.N.; BHUVANESWARA, R.C.; BALAKRISHNAN, M.; SEKHAR, K.B.C. Preparation and characterization of pioglitazone hcl solid inclusion complex - an solubility enhancement technique. **International Journal of Biopharmaceutics**, v. 5, n. 3, p. 180-183, 2014.

ROSS, A.R. Measurement of Blood Pressure in Unrestrained Rats. **Physiology & Behavior**, v. 19, p. 327-329, 1977.

RUDRANGI, S.R.S.; BHOMIA, R.; TRIVEDI, V.; VINE, G.J.; MITCHELL, J.C.; ALEXANDER, B.D.; WICKS, S.R. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- β -cyclodextrin complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 381-390, 2015.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Biology of disease: biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Laboratory Investigation**, v. 57, 1987.

SABINO, C. K. B.; FERREIRA-FILHO, E.S.; MENDES, M.B.; SILVA-FILHO, J.C.; PONTE, M.P.; MOURA, L.H.; OLIVEIRA, E.C.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; SANTOS, M.R.; OLIVEIRA, C.M.; OLIVEIRA, A.P. Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. **Flavour Fragrance Journal**, v. 28, 2013.

SAMI, F.; PHILIP, B.; PATHAK, K. Effect of Auxiliary Substances on Complexation Efficiency and Intrinsic Dissolution Rate of Gemfibrozil- β -CD Complexes. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 11, n. 1, p. 27-35, 2010.

SANTOS, C.; BUERA, M. P.; MAZZOBRE, M.F. Phase solubility studies of terpineol with β -cyclodextrins and stability of the freeze-dried inclusion complex. **Procedia Food Science**, 2011.

SANTOS, M. E. P. Envolvimento dos canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo I no efeito cardiovascular das inflorescências de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (mimosaceae) em ratos normotensos. Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia, Teresina, 2014.

SAVJANI, K.T.; GAJJAR, A.K.; SAVJANI, J.K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **International Scholarly Research Network**, 2012.

SHAH, B.; KAKUMANU, V. K.; BANSAL, A. K. Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 8, p. 1641-1665, 2006.

SHI, Y.; CUI, Y.; SUN, X.; MAA, G.; MAA, Z.; GAO, Q.; CHEN, Z. Hypertension in women with polycystic ovary syndrome: prevalence and associated cardiovascular risk factors. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 173, p. 66-70, 2014.

SHOFINITA, D.; LANGRISH, T.A.G. Spray drying of orange peel extracts: Yield, total phenolic content, and economic evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 139, p. 31-42, 2014.

SINGH, K.B. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 2, p. 1228-1234, 2005.

SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S.N. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

SIVA, S.; NAYAKIB, S.K.; RAJENDIRAN, N. Fabrication of cyclodextrins-procainamide supramolecularself-assembly: Shape-shifting of nanosheet into microtubularstructure. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p.123-124, 2015.

SÓTER, M.O.; FERREIRA, C.N.; SALES, M.F.; CANDIDO, A.L.; REIS, F.M.; MILAGRES, K.S.; RONDA, C.; SILVA, I.O.; SOUSA, M.O.; GOMES, K.B. Peripheral blood-derived cytokine gene polymorphisms and metabolic profile in women with polycystic ovary syndrome. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 227-235, 2015.

STENER-VICTORIN, E.; PLOJ, K.; LARSSON, B.; HOLMANG, A. Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 44, n. 3, p. 1-10, 2005.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. B.; FERRAZ, H. G. A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization - part I: phase solubility diagram, dissolution and scanning electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2012.

TEHRANI, F.R.; NOROOZZADEH, M.; ZAHEDIASL, S.; PIRYAEI, A.; HASHEMI, S.; AZIZI, F. The Time of Prenatal Androgen Exposure Affects Development of Polycystic Ovary Syndrome-Like Phenotype in Adulthood in Female Rats. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 12, n. 2, 2014.

TOSI, F.; FIERS T.; KAUFMAN, J.; DALL'ALDA, M.; MORETTA, R.; GIAGULLI, V.A.; BONORA, E.; MOGHETTI, P. Implications of androgen assay accuracy in the phenotyping of women with polycystic ovary syndrome. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, 2015.

TSIKOURAS, P.; SPYROS, L.; MANAV, B.; ZERVOUDIS, S.; POIANA, C.; NIKOLAOS, T.; PETROS, P.; DIMITRAKI, M.; KOUKOULI, C.; GALAZIOS, G.; TEMPELHOFF, G.F. Features of Polycystic Ovary Syndrome in adolescence. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 11, n. 10, p. 2508-2514, 2014.

WALTERS, K.A.; ALLAN, C.M.; HANDELSMAN, D.J. Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 5, 2012.

WANG, F.; YU, B.; YANG, W.; LIU, J.; LU, J.; XIA, X. Polycystic ovary syndrome resembling histopathological alterations in ovaries from prenatal androgenized female rats. **Journal of Ovarian Research**, v. 5, n. 1, 2012.

WILD, S.; PIERPOINT, T.; MCKEIGUE, P.; JACOBS, H. Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. **Clinical Endocrinology**, v. 52 p. 595-600, 2000.

WITCHEL, S.F.; RECARBARREN, S.E.; GONZALEZ, F.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; CHEANG, K.I.; DULEBA, A.J.; LEGRO, R.S.; HOMBURG, R.; PASQUALI, R.; LOBO, R. Emerging Concepts About Prenatal Genesis, Aberrant Metabolism and Treatment Paradigms in Polycystic Ovary Syndrome. **Endocrine**, v. 42, n. 3, p. 526-534, 2012.

YANG, L.J.; CHEN, W.; MA, S.X.; GAO, Y.T.; HUANG, R.; YAN, S.J.; LIN, J. Host-guest system of taxifolin and native cyclodextrin or its derivative: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 629-637, 2011.

ZUEFF, L.F.N; MARTINS, W.P.; VIEIRA, C.S.; FERRIANI, R.A. Ultrasonographic and laboratory markers of metabolic and cardiovascular disease risk in obese women with polycystic ovary syndrome. **Ultrasound Obstetrics Gynecology**, v. 39, p. 341-347, 2012.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal da UFPI do projeto.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 28 de Novembro de 2014.

Ilmo.

Prof. Dr. BENEDITO BORGES DA SILVA.
Departamento: Materno Infantil/Ginecologia- CCS/UFPI

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (28 de Novembro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **089/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Desenvolvimento de produto tecnológico com ação anti-hipertensiva em modelo de ratas em estro permanente**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Dezembro/2014 à Março/2015, e serão usados 18 Ratos heterogênicos (Fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof.ª Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO B – Artigo submetido à REVISTA DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA.

19/01/2016 ScholarOne Manuscripts

 Revista da Associação Médica Brasileira

Submission Confirmation

Thank you for your revision

Submitted to
Revista da Associação Médica Brasileira

Manuscript ID
RAMB-2015-0087.R1

Title
Current aspects of polycystic ovary syndrome: A literature review

Authors
de Andrade, Victor
Mata, Ana
Borges, Rafael
Costa-Silva, Danylo
Martins, Luana
Ferreira, Paulo
Cunha-Nunes, Lívio
da silva, Benedito

Date Submitted
19-Jan-2016