



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA -
PPQB**

ANDREZA GUEDES BARBOSA RAMOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO
ISOPULEGOL E DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ISOPULEGOL/ β -
CICLODEXTRINA EM MODELOS ANIMAIS**

Crato - CE

2021

ANDREZA GUEDES BARBOSA RAMOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO
ISOPULEGOL E DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ISOPULEGOL/ β -
CICLODEXTRINA EM MODELOS ANIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Crato - CE

2021

ANDREZA GUEDES BARBOSA RAMOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO
ISOPULEGOL E DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ISOPULEGOL/ β -
CICLODEXTRINA EM MODELOS ANIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Aprovado em: 28/06/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (Orientador Membro interno)

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Membro interno-URCA)

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha (Membro interno - URCA)

Prof. Dr. Makson Gleydson Brito de Oliveira (Membro Externo - UFS)

Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte (Membro Externo - UFS)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Regional do Cariri
Biblioteca Universitária

Ramos, Andreza Guedes Barbosa.

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do isopulegol e do complexo de inclusão isopulegol/ β -ciclodextrina em modelos animais/Andreza Guedes Barbosa Ramos– 2021.
100 f. il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Regional do Cariri, Centro De Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Crato, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior.

Co-orientação: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes.

1. *Docking molecular*. 2. Terpenos. 3. Citocinas 4. Dor 5. ciclodextrinas

Dedico este trabalho a Deus e minha família, que todos os dias me dão forças para continuar seguindo em frente. Será sempre por vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha fonte de sabedoria e alimento diário, à Ele toda a minha honra e glória, hoje e para sempre.

À minha família, força na hora necessária, incentivo no momento difícil, amor para uma vida toda. Aos meus familiares, representados na pessoa da minha vó, Maria Barbosa, que me deixou no início do doutorado, saudade eterna, lembrança constante, certeza de reencontro.

Ao meu companheiro e amigo, Luiz Jardelino de Lacerda Neto, pelo otimismo e amor. À sua família, sempre carinhosa e receptiva.

Ao meu orientador, Lucindo José Quintans Júnior e co-orientador, Irwin Rose Alencar de Menezes, pela oportunidade de estar concluindo mais essa etapa da minha vida. Obrigada.

A todos os professores e ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Química Biológica, professor Henrique Douglas de Melo Coutinho, pela dedicação para com os alunos. À secretária do programa, Manuela Fernandes, pela paciência e disponibilidade.

Às minhas companheiras de pós-graduação, Renata Evaristo e Lindaiane Bezerra: vocês tornaram o percurso menos difícil.

À minha banca de defesa e qualificação pelas valiosas considerações.

Aos amigos e companheiros de jornada durante esse doutorado, Sanádia Alexandre, Renata Pessoas e Lucas Yuri: eu nunca terei palavras suficientes para agradecer a vocês por toda dedicação e carinho oferecido durante esses 4 longos anos. Esse título é nosso! A Roger, por ter-se feito um companheiro e amigo nesse percurso. A Cícero Júnior, Isabel Sousa e Ísis Oliveira por todo carinho.

À Anita Oliveira e Maria Rayane, pela atenção e respeito em cada palavra de apoio, pela disponibilidade e ensinamentos ofertados. Sou grata pela amizade de vocês.

À família LFQM, por todo apoio e por terem sido casa quando eu mais precisei.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS), em especial ao Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior e Prof.^a Dr.^a. Jullyana Quintans, por terem me recebido tão bem em seu laboratório e me proporcionado tanto aprendizado, e a doutoranda Fabíola Rocha Santos pela valiosa contribuição.

À Universidade Regional do Cariri – URCA, minha casa desde a graduação. Aos funcionários e amigos que aqui fiz.

À Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – onde trabalho atualmente, por apoiar seus professores e me permitir o fechamento de mais um ciclo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

“No fundo, todos temos a necessidade de dizer quem somos e o que é que estamos a fazer e a necessidade de deixar algo feito, porque essa vida não é eterna e deixar coisas feitas pode ser uma forma de eternidade”.

José Saramago
(20.07.1997)

RESUMO

Os terpenos são os constituintes químicos de maior ocorrência natural, extraídos principalmente de plantas, sendo compostos que podem apresentar importante volatilidade e normalmente característica oleosa. O isopulegol (ISO) é um monoterpene oxigenado amplamente encontrado em diferentes espécies vegetais, com propriedades farmacológicas de interesse. As características de volatilidade e insolubilidade em água tem limitado seu emprego e assim, o uso de ciclodextrinas (CDs), tais como a β -CD (beta-ciclodextrina), tem sido uma abordagem promissora que visa aprimorar características como solubilidade e biodisponibilidade. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do ISO e ISO/CD em ensaios pré-clínicos com camundongos. Para a investigação da atividade anti-inflamatória foram realizados modelos antiedematogênicos (edemas de pata), de ancoragem molecular e modelos sistêmicos de inflamação aguda (peritonite e pleurisia) e crônica (granuloma). A administração de ISO e ISO/CD nas doses testadas inibiram significativamente a atividade edematogênica induzida por diversos agentes flogísticos, indicando por meio de *docking* molecular, a interação do ISO com receptores de histamina tipo 1 (H1) e cicloxigenase 2 (COX 2). Além disso, ISO e ISO/CD foram capazes de interferir na resposta inflamatória aguda reduzindo o extravasamento de albumina, a migração leucocitária e a atividade da mieloperoxidase (MPO), promovendo a redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α no exsudato pleural, bem como reduzindo o processo inflamatório crônico no modelo de granuloma. Na avaliação da atividade antinociceptiva a administração oral de ISO e ISO/CD mostraram efeito antinociceptivo significativo nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg para o ensaio de formalina e de contorções abdominais, com destaque para a dose de 10 mg/kg. Desta forma, a dose de 10 mg/kg foi selecionada para avaliação dos efeitos sobre SNC e avaliação das vias de sinalização envolvidas no potencial analgésico. O ISO e o ISO/CD não apresentaram alterações sobre os parâmetros avaliados do SNC e os resultados sugerem uma ação antinociceptiva aguda nos testes de formalina, contorções abdominais, placa quente e hipernocicepção mecânica plantar, propondo o envolvimento das vias de sinalização opioide, canais de potássio, colinérgica, óxido nítrico, via do monofosfato cíclico de guanosina, vaniloide e glutamatérgica. Os achados sugerem uma importante atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do ISO e ISO/CD, não havendo diferença significativa entre os grupos tratados com os compostos em questão, porém vale ressaltar que o processo de complexação envolve quantidades bem inferiores do composto, o que levou ao aperfeiçoamento das propriedades farmacológicas do isopulegol que parecem estar relacionadas a sua complexação em β -CDs, trazendo a perspectiva de futuras investigações do potencial farmacológico desse monoterpene.

Palavras-chave: *docking* molecular; terpenos; citocinas; dor; ciclodextrinas.

ABSTRACT

Terpenes are the most naturally occurring chemical constituents, extracted mainly from plants, being compounds that can present important volatility and usually oily characteristics. Isopulegol (ISO) is an oxygenated monoterpene widely found in different plant species, with pharmacological properties of interest. The characteristics of volatility and insolubility in water have limited its use and thus, the use of cyclodextrins (CDs), such as β -CD (beta-cyclodextrin), has been a promising approach that aims to improve characteristics such as solubility and bioavailability. Thus, the present study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activity of ISO and ISO/CD in preclinical trials with mice. To investigate the anti-inflammatory activity, antiedematogenic models (paw edema), molecular anchorage and systemic models of acute inflammation (peritonitis and pleurisy) and chronic (granuloma) were performed. The administration of ISO and ISO/CD in the tested doses inhibited significantly the edematogenic activity induced by several phlogistic agents, indicating, through molecular docking, the interaction of ISO with histamine type 1 (H1) and cyclooxygenase 2 (COX 2) receptors. In addition, ISO and ISO/CD were able to interfere in the acute inflammatory response, reducing albumin extravasation, leukocyte migration and myeloperoxidation (MPO) activity, promoting a reduction in the levels of IL-1 β and TNF- α in the exudate pleural, as well as reducing the chronic inflammatory process in the granuloma model. In the assessment of antinociceptive activity, oral administration of ISO and ISO/CD showed a significant antinociceptive effect at doses of 1, 5 e 10 mg/kg for the formalin test and the abdominal contortion test, with emphasis on the dose of 10 mg/kg. Thus, the 10 mg/kg dose was selected to assess the effects on the CNS and to assess the signaling pathways involved in the analgesic potential. ISO and ISO/CD did not show changes on the evaluated CNS parameters and the results suggest an acute antinociceptive action in formalin, abdominal writhing, hot plate and plantar mechanical hypernociception tests, proposing the involvement of opioid signaling pathways, signaling channels potassium, cholinergic, nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate pathway, vanilloid and glutamatergic. The findings suggest an important antinociceptive and anti-inflammatory activity of ISO and ISO/CD, with no significant difference between the groups treated with the compounds in question, however it is worth mentioning that the complexation process involves much lower amounts of the compound, which led to the improvement of the pharmacological properties of isopulegol that seem to be related to its complexation in β -CDs, bringing the perspective of future investigations of the pharmacological potential of this monoterpene.

Keywords: molecular docking; terpenes; cytokines; pain; cyclodextrins.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 01** - Estrutura química do isopulegol (C₁₀H₁₈O). 18
- Figura 02** – Estrutura química das três ciclodextrinas mais vendidas comercialmente (α, β e γ) e utilizadas na complexação com fármacos. 20
- Figura 03** - Representação esquemática das principais alterações vasculares e celulares no processo inflamatório 22
- Figura 04** - Representação dos mecanismos básicos da dor: lesão tecidual, liberação de mediadores químicos e transmissão do estímulo doloroso. 26

Capítulo II

- Figura 01** - The binding poses the best stability of isopulegol and diclofenac in cyclooxygenase 2 binding site enzyme. 45
- Figura 02** - Maps of amino acid residues within binding pocket. 45
- Figura 03** - Effect of isopulegol and β-cyclodextrin–ISO inclusion complex (10 mg/kg/v.o.) on the inflammatory cytokines. 47

Capítulo III

- Figura 01** – Efeito do ISO e ISO/CD (10, 5 e 1 mg/kg/v.o.) no teste de formalina 66
- Figura 02** – Efeito do ISO e ISO/CD (10, 5 e 1 mg/kg/v.o.) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. 66
- Figura 03** – Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) no tempo de permanência na placa quente. 67
- Figura 04** - Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) sobre a hipernocicepção mecânica plantar analisada por aparelho de Von Frey. 67
- Figura 05** – Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) no teste do campo aberto (A, B e C) e Rota Rod (D). 68
- Figura 06** - Avaliação do efeito antinociceptivo do ISO e do ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) na nocicepção de pata induzida por formalina em camundongos. Envolvimento do sistema: (A) α2-adrenérgico (B) adenosinérgico e (C) dopaminérgico. 70
- Figura 07** - Avaliação do efeito antinociceptivo do ISO e do ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) na nocicepção de pata induzida por diferentes agentes em camundongos. A) Envolvimento do sistema opioide; B) Envolvimento da participação de canais de 73

potássio ATP dependente; C) Envolvimento da via colinérgica; D) Envolvimento do sistema vaniloide; E) Envolvimento do óxido nítrico e F) Envolvimento da via do monofosfato cíclico de guanosina; G) Envolvimento do sistema glutamatérgico

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA – Receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA – Análise de variância
 β -ciclodextrina – beta-ciclodextrina
CD - ciclodextrina
COX – Cicloxigenase
DMAPP – Dimetialil difosfato
FDA - Food and Drug Administration
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico
H1 – Receptor de histamina tipo 1
IL-1 – Interleucina
IPP – Isopentil difosfato
ISO – isopulegol
LOX – Lipoxigenase
MEP - Metileritritol fosfato
MPO – Mieloperoxidase
MVA – Ácido mevalônico
NO – Óxido nítrico
OMS – Organização Mundial da Saúde
PKA – Constante de acidez
PKC – Proteína quinase C
TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 Objetivos e questionamentos.....	11
1.2 Estratégias de pesquisa.....	12
1.3 Estrutura da tese	15
2. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Terpenos e isopulegol.....	17
2.2 INFLAMAÇÃO	21
2.3 NOCICEPÇÃO	24
3. CAPÍTULO II – Artigo 1: Antiedematogenic and Anti-inflammatory activity of the monoterpene isopulegol and its β – cyclodextrin (β – CD) inclusion complex in animal inflammation models	39
4. CAPÍTULO III – Manuscrito 1: Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do isopulegol e seu complexo em ciclodextrinas usando modelos de nocicepção aguda em camundongos	56
5. CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
5.1 Discussão geral.....	89
5.2 Conclusões gerais	90
5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS	90
ANEXOS – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS – CEUA/URCA PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	92
APÊNDICES.....	93

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

A inflamação e a dor, apesar de importantes mecanismos de proteção do organismo, persistem ao longo do tempo como problemática de saúde em virtude dos inúmeros obstáculos enfrentados no tratamento instituído, pela falta de conhecimento dos profissionais que lidam com esses pacientes e principalmente pelos efeitos colaterais e custo-benefício dos fármacos disponíveis no mercado. O impacto do uso de medicamentos no tratamento de doenças é uma questão multifacetada. Por um lado, os medicamentos podem promover a cura de doenças, podem aumentar a expectativa de vida, amenizar o quadro sintomatológico trazendo alívio e melhor qualidade de vida para os indivíduos; por outro, podem levar à ocorrência de efeitos adversos relevantes, principalmente quando essas reações geram hospitalizações, prolongamento de internações, incapacidades e até a morte.

É crescente a busca por novas entidades químicas ou formulações farmacêuticas mais seguras, com menor toxicidade e efeitos adversos, melhor relação custo-benefício, bem como a melhoria na biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade. A presença de inúmeras substâncias apreciadas na medicina considerada popular, tais como o uso de plantas medicinais, bem como a comprovação científica de suas propriedades biológicas, são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos fármacos. Diante do uso na medicina popular de óleos essenciais ricos em moléculas bioativas e comprovação de diversas atividades biológicas tanto desses óleos, como de constituintes isolados, foi despertado o interesse em investigar e validar cientificamente o possível efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do isopulegol (ISO) e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina (ISO/CD).

As ciclodextrinas (CDs), por serem substâncias importantes nas formulações farmacêuticas segundo a literatura científica, são amplamente utilizadas visando à obtenção de vantagens como aumento da solubilidade da substância a ser complexada e melhora da estabilidade e biodisponibilidade de vários princípios bioativos. Dentre as CDs empregadas para formação de complexos de inclusão com compostos ativos, as β -CDs apresentam características que favorecem a sua escolha, como fácil obtenção, preço mais acessível, propriedades físico-químicas e também pelos diversos estudos já publicados no meio científico comprovando os benefícios da complexação no aperfeiçoamento das propriedades farmacológicas de drogas e produtos naturais.

Portanto, partindo da premissa que a β -CD tem melhorado as propriedades biológicas de compostos terpênicos e considerando os importantes achados da literatura científica acerca do constituinte químico isopulegol, combinado à alta prevalência de doenças inflamatórias associadas aos distúrbios da dor e ao crescente interesse da indústria farmacêutica na descoberta de novas drogas com menores custos e melhor eficácia terapêutica, torna-se imprescindível o

desenvolvimento de pesquisas que abordem o potencial biológico do constituinte em questão formando complexo de inclusão com β -CD. O presente estudo visou elucidar as possíveis atividades biológicas do isopulegol e do complexo de inclusão isopulegol/ β -ciclodextrina, dentre elas as atividades anti-inflamatórias e antinociceptiva, fazendo um comparativo entre os resultados obtidos com os grupos tratados com o ISO e o ISO/CD. Como objetivos específicos, buscou-se determinar a toxicidade aguda não clínica do ISO e do ISO/CD, investigar a atividade antiedematogênica e anti-inflamatória dos compostos por meio dos ensaios de edema de pata, peritonite, pleurisia e granuloma, além de *docking* molecular e em seguida avaliar os seus possíveis efeitos antinociceptivos pelos ensaios de formalina, contorções abdominais por ácido acético, placa quente, hiperalgesia mecânica plantar com investigação das possíveis vias de sinalização da dor que possam estar envolvidas na resposta antinociceptiva do ISO e do ISO/CD, além de investigar a possível influência dos compostos sobre o sistema nervoso central.

1.2 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

A busca por novas formulações farmacêuticas requer modelos experimentais apropriados e que forneçam reprodutibilidade e confiança. Inúmeros são os protocolos e técnicas disponíveis para a avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de moléculas bioativas, cada um desses, com suas vantagens e limitações. Considerações críticas sobre a sensibilidade, custos e confiabilidade são portanto, necessários quando da escolha do modelo (CAVALETTI *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2019).

Os modelos experimentais que se baseiam em princípios farmacológicos, devem fornecer um modelo fisiológico e clínico relevante para prever a indicação terapêutica a que se pretende e é considerado importante quando os resultados a nível pré-clínico estão vinculados aos resultados no contexto clínico (PATIL *et al.*, 2019).

Antes da execução, os ensaios devem ser devidamente planejados, atentando para a amostra, as vias de administração, uso de controles e sua real necessidade e por fim, os métodos estatísticos que serão utilizados para a avaliação dos resultados esperados (BUTTERWECK; NAHRSTEDT, 2012). Ao selecionar modelos para avaliação de uma atividade biológica deve-se considerar a correlação dos mecanismos por trás dos modelos experimentais já bem estabelecidos (PATIL *et al.*, 2019).

A avaliação da toxicidade aguda não-clínica foi realizada de acordo com a OECD com algumas modificações e com a tabela de Malone e Robichaud. Para a avaliação da atividade anti-inflamatória do ISO e do ISO/CD foram selecionados modelos tradicionais de inflamação, inicialmente os modelos de edema de pata. O edema de pata induzido por carragenina é amplamente utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória de compostos naturais e sintéticos (BOOMINATHAN *et al.*, 2004; PANTHONG *et al.*, 2007) mais particularmente da

atividade antiedematogênica, já que o edema é um dos sinais flogísticos do processo inflamatório. Uma vez administrada, a carragenina promove a dilatação dos pós-capilares venosos, o que resulta no extravasamento vascular e esse processo envolve a liberação de uma série de mediadores infamatórios (DUWIEJUA; WOODE; OBIRI, 2002). O edema produzido pela carragenina é um edema bifásico (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962) que envolve a liberação de mediadores como histamina e bradicinina num primeiro momento (POSADAS *et al.*, 2004) seguida de uma segunda fase caracterizada pelos produtos da ativação da via das cicloxigenases (COX), as prostaglandinas (PATIL; PATIL., 2017).

Outro agente indutor utilizado ainda no modelo de edema de pata foi a dextrana, que uma vez administrada, resulta em uma permeabilidade vascular aumentada e ativação de mediadores como histamina e serotonina (ANOSIKE; OBIDOA; EZEANYIKA, 2012). Para verificar o envolvimento da histamina e prostaglandinas, esses mediadores foram utilizados como agentes indutores no edema de pata. Histamina além de provocar aumento na permeabilidade vascular, age juntamente com as prostaglandinas induzindo inflamação (SINGH, B. *et al.*, 2003; VASUDEVAN; GUNNAM; PARLE, 2007; BEN; ETIM; UDO, 2016). Visando corroborar com os ensaios *in vivo* anteriormente citados, uma investigação da inibição da cicloxigenase (COX-2) e do receptor de histamina tipo 1 (H1) mediada pelo isopulegol foi realizada *in silico*.

Continuando a investigação da atividade anti-inflamatória, agora em uma avaliação sistêmica, foram executados os protocolos de peritonite e pleurisia. Em ambos os modelos, a carragenina foi o agente de escolha, justificado pelo seu potencial pró-inflamatório, sendo frequentemente utilizado em modelos animais de edema (MARTINS *et al.*, 2017), pleurisia (BARRETO, R. *et al.*, 2016) e peritonite (BARTH *et al.*, 2016; OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2018).

No modelo de peritonite, foram avaliadas a migração leucocitária, a atividade da mieloperoxidase (MPO) e a permeabilidade vascular com dosagem de albumina. Já no protocolo experimental de pleurisia, mais uma vez os níveis de leucócitos, como medida de inflamação, foram avaliados e de uma alíquota do exsudato, citocinas como a interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram dosadas. Como já citado, a carragenina induz um processo inflamatório que envolve migração celular, extravasamento vascular e produção de uma série de mediadores, dentre esses as IL-1 β e TNF- α (LORAM *et al.*, 2007); sendo esses mediadores capazes de recrutar leucócitos, como os neutrófilos, que contém a enzima MPO, responsável pelo impacto na lesão oxidativa causada pelos neutrófilos (KETTLE; WINTERBOURN, 1997).

Para avaliação da atividade anti-inflamatória crônica foi utilizado o modelo de granuloma induzido por *pellets* de algodão. A formação de tecido granulomatoso é uma característica marcante do processo inflamatório crônico e a avaliação de elementos transudativos e proliferativos podem ser avaliados por esse protocolo (NETO *et al.*, 2005). O peso úmido dos

pellets associa-se ao transudato, enquanto o peso seco tem uma relação direta com os tecidos granulomatosos; a massa de granuloma formada é quantificada como medida da inflamação (OJEWOLE, 2006).

Objetivando a avaliação de uma possível atividade antinociceptiva do ISO e do ISO/CD foram utilizados protocolos clássicos de dor, como o teste da formalina, contorções abdominais por ácido acético, teste da placa quente ou *hot plate*, e Von Frey. O teste de formalina é um método de avaliação comportamental muito utilizado para investigar o potencial antinociceptivo de diversos agentes, permitindo a avaliação de dois tipos diferentes de dor: uma de primeira fase, relacionada a estimulação química direta de nociceptores das fibras A δ e C e uma de segunda fase associada a liberação de vários mediadores inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, temos um modelo de nocicepção química, sendo considerado sensível à avaliação de drogas analgésicas, sendo um protocolo geral, não seletivo (COUTO *et al.*, 2011). O teste da placa quente, diferente do modelo de contorções, é um teste específico para avaliação de agentes analgésicos com efeito central, já que apenas drogas analgésicas centrais conseguem aumentar o tempo de resposta do animal na placa, já que esse modelo utiliza a temperatura como estímulo nociceptivo (RAQUEL *et al.*, 2013). Finalizando os modelos tradicionais de dor, foi realizado o ensaio do Von Frey, método de escolha para avaliação da sensibilidade ao estímulo mecânico, que permite ao pesquisador avaliar o aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos, caracterizando a alodínia, ou nocivos, a hiperalgesia (LE BARS, 2001).

Concluindo a estratégia metodológica, foram investigadas as possíveis vias sinalizadoras envolvidas na resposta antinociceptiva do ISO e do ISO/CD investigando-se a participação das seguintes vias:

- Sistema opioide;
- Canais de potássio;
- Sistema colinérgico;
- Participação dos receptores α_2 adrenérgicos;
- Via *L*-arginina/Óxido Nítrico/GMPc;
- Sistema vanilóide;
- Sistema dopaminérgico;
- Sistema adenosinérgico;
- Sistema glutamatérgico;
- E via da guanosina monofosfato cíclico

A análise estatística dos resultados foi planejada concomitante ao desenho do estudo e o programa estatístico utilizado foi o *GraphPad Prisma 6*. Os dados foram analisados pelo modelo

de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias conforme o caso. ANOVA é um dos métodos estatísticos mais comuns usados em ensaios pré-clínicos (ABAN; GEORGE, 2015). Assim, para os ensaios foi utilizado o ANOVA de uma ou duas vias seguidas pelo teste de Tukey, sendo os valores expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e diferenças a partir de $p < 0.05$ sendo consideradas significativas.

1.3 ESTRUTURA DA TESE

A presente tese discorrerá sobre as atividades biológicas do terpeno ISO e do seu complexo de inclusão em β -CD através de modelos experimentais de inflamação e dor realizados em animais, constando de 4 capítulos que trazem informações acerca do terpeno isopulegol, vantagens do seu processo de complexação e atividades biológicas já descritas em literatura, toxicidade, respostas anti-inflamatória e antinociceptiva e respectivos modelos experimentais utilizados para alcance dos resultados.

A primeira parte da tese traz informações sobre os questionamentos que estimularam o desenvolvimento da mesma, apresentando a necessidade do desenvolvimento de estudos em busca de novos protótipos farmacológicos com menos efeitos adversos e melhor custo-benefício.

O capítulo I consta da fundamentação teórica, embasando a discussão sobre os questionamentos levantados e contribuindo com a elaboração dos capítulos seguintes. Essa fundamentação teórica relata informações pertinentes sobre a importância dos produtos naturais na busca de novos fármacos, características dos terpenos e do isopulegol e discorre acerca das atividades biológicas abordadas no estudo, inflamação e nocicepção, além de outros tópicos relevantes que contribuem para o desenvolvimento da pesquisa.

O Capítulo II é um artigo que foi publicado na *Foods* – IF 3.0 - e apresenta a avaliação da atividade antiedematogênica e anti-inflamatória do isopulegol e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrinas.

O Capítulo III, apresenta um manuscrito que aborda a atividade antinociceptiva do isopulegol e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrinas nos modelos clássicos de dor, bem como avaliação dos mecanismos de ação envolvidos nessa potencial atividade, submetido na revista *Food Chemistry* - FI: 6,306

Nas considerações finais, o capítulo IV relata as associações das evidências produzidas durante o desenvolvimento da tese e as conclusões que foram feitas com base nelas, além da possibilidade de investigações futuras envolvendo o objeto em estudo.

2. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A química de produtos naturais, devido à grande diversidade estrutural e de grupos funcionais presentes em muitas substâncias da biodiversidade terrestre, sempre foi considerada importante para o desenvolvimento de novos protótipos farmacológicos, relevante na indústria de cosméticos, alimentos e na produção de outros bioprodutos (BOLZANI, 2016). Os produtos naturais ou seus metabólitos secundários estão presentes em milhares de organismos e funcionam como os mediadores de interações biológicas, essas últimas, foco de inúmeras pesquisas envolvendo o isolamento desses metabólitos, a obtenção de moléculas com atividade biológica para desenvolvimento de novos fármacos, bem como o seu papel ecológico (TEIXEIRA, 2013).

A investigação de produtos naturais com atividade farmacológica tem despertado um interesse crescente das indústrias farmacêuticas, sendo considerada prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS). É estimada em cerca de 40% a quantidade disponível de medicamentos desenvolvidos de forma direta ou indireta a partir de produtos naturais, sendo a maioria desses, plantas (ROBINSON; ZHANG, 2011). No Brasil, o uso de terapias a partir de produtos naturais, para o tratamento das mais diversas patologias, principalmente as crônico-degenerativas, representa ganho importante na área de saúde ao reduzir custos. Dessa forma, os fitoterápicos podem ser utilizados de maneira opcional quando considerado o baixo custo, cujos benefícios se equiparam aos fármacos utilizados na terapêutica tradicional (BORGES; BAUTISTA; GUILERA, 2008).

As pesquisas para a avaliação da segurança dos produtos de origem natural, como uso de plantas medicinais e fitoterápicos, no Brasil ainda é escassa. Infelizmente, a grande maioria desses produtos tem seu perfil tóxico desconhecido, nem mesmo possuem seu perfil químico e farmacológico, fazendo-se necessário o controle rígido tanto do comércio quanto do uso desses produtos (SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012).

A prática do uso de produtos naturais para fins terapêuticos, seja como terapia de primeira escolha ou adjuvante, deve ser fortalecida através do desenvolvimento de estudos que garantam a eficácia da substância de origem natural em seres humanos, traçando um perfil de toxicidade do seu uso a curto e longo prazo, e apresentando uma boa relação custo-benefício. Nesse contexto, o uso tradicional de espécies da biodiversidade pode ser encorajado, visando reduzir a exposição da população às práticas pouco seguras, evitando complicações decorrentes do uso indiscriminado de produtos naturais.

2.1 TERPENOS E ISOPULEGOL

Óleos essenciais configuram-se como uma mistura complexa de compostos (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017) sendo os terpenos os principais constituintes de óleos essenciais, constituindo uma importante e vasta classe química, contendo mais de 50.000 compostos (SATO, 2013) e estão descritos na literatura como constituintes químicos responsáveis pelas mais diversas atividades biológicas, como atividade analgésica (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS- JÚNIOR, 2013), anticonvulsivante (SOUSA; QUINTANS; ALMEIDA, 2007), anti-inflamatória (SANTANA *et al.*, 2014) e seguros como potencializadores da absorção percutânea de drogas (CHEN *et al.*, 2016). Os terpenos são os constituintes químicos de maior ocorrência natural, extraídos principalmente de plantas, sendo compostos que podem apresentar importante volatilidade e compostos apenas de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Sua estrutura básica consiste em várias unidades repetidas de isopreno (C_5H_8) e são classificados em grupos de acordo com o número de carbonos que contêm (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007; KIRBY; KEASLING, 2009; MEWALAL *et al.*, 2017).

Os terpenos, também conhecidos como isoprenoides, variam desde metabólitos primários (esteróis, carotenoides, hormônios) a metabólitos secundários específicos de uma espécie vegetal, estando associados ao mecanismo de defesa e à comunicação no meio ambiente (LANGE *et al.*, 2000). Nas plantas, a síntese dos terpenos acontece de forma compartimentalizada; os monoterpenos e diterpenos são produzidos em plastídeos pela via não-mevalonato, enquanto os sesqui e triterpenos são gerados no citosol pela via mevalonato (KIRBY; KEASLING, 2009).

Os terpenos são formados a partir de duas rotas principais de síntese, a rota do ácido mevalônico (MVA) e a rota do metileritritol fosfato (MEP). A via do MEP ocorre principalmente nos plastídios, enquanto a MVA distribui-se entre citoplasma, retículo endoplasmático e peroxissomos (VRANOVÁ; COMAN; GRUISSEM, 2013). Na rota do MVA três moléculas de Acetil-CoA são utilizadas para formar o ácido mevalônico, que é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir isopentil difosfato (IPP), unidade básica de formação dos terpenos. Na via MEP, o gliceraldeído-3-fosfato condensa-se com dois átomos de carbono do piruvato, formando o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato que é reduzida a metileritritol fosfato, eventualmente convertido a DMAPP (dimetialil difosfato), um isômero do IPP (HENRY *et al.*, 2018).

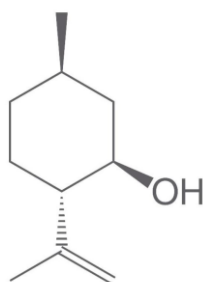
Dentre os terpenos, os monoterpenos se destacam como componentes primários de óleos essenciais de várias espécies vegetais e as atividades biológicas dessas espécies têm sido atribuídas a esses compostos (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2008). Os monoterpenos tem como estrutura básica a ligação de duas unidades de isopreno, cada uma dessas com uma cadeia composta por cinco carbonos e representam cerca de 90% de todos os constituintes de óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008), podendo ser classificados em diferentes grupos, como monoterpenos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e glicosídeos iridoides. Os derivados dos

monoterpenos contendo heteroátomos (tipicamente o oxigênio) são conhecidos como monoterpenoides e esses, juntamente com os monoterpenos são amplamente estudados por suas potenciais atividades biológicas (SALAKHUTDINOV; VOLCHO; YAROVAYA, 2017).

Os monoterpenos possuem uma grande variedade de estruturas (BAKKALI *et al.*, 2008) com várias funções biológicas importantes como antimicrobiana (KORDALI *et al.*, 2005), hipotensora e vasorrelaxante (BASTOS *et al.*, 2010), anti-inflamatória (SANTANA *et al.*, 2014) e analgésica (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS- JÚNIOR, 2013).

Na indústria farmacêutica, os monoterpenos se destacam pelo seu relevante potencial nutracêutico (BASU; THOMAS, J. E.; ACHARYA, 2007; GHASEMI *et al.*, 2009). Alguns estudos reportam a atividade anti-inflamatória dos monoterpenos modulando a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como regulando a liberação de outros mediadores inflamatórios (QUINTANS *et al.*, 2019). No contexto do desenvolvimento de novos fármacos com potencial anti-inflamatório e analgésico, os monoterpenos tornaram-se objeto de grande interesse da indústria farmacêutica, com um expoente número de novas pesquisas e pedidos de patentes (GUIMARÃES *et al.*, 2012; KOZIOL *et al.*, 2014; PINA *et al.*, 2017).

Figura 01 - Estrutura química do isopulegol (C₁₀H₁₈O).



Fonte: disponível em: <https://cymitquimica.com/products/11-5036/89-79-2/-isopulegol/>

Entre os monoterpenos, o isopulegol (Figura 01) é um álcool monocíclico que está presente nos óleos essenciais de diversas espécies vegetais, entre elas a espécie *Corymbia citriodora* Hook, constituindo cerca de 6,5% (ambos os isômeros) entre todos os constituintes do óleo essencial (VERNIN *et al.*, 2004) e apresenta potenciais propriedades terapêuticas (SILVA *et al.*, 2007). Plantas do gênero *Cymbopogon* e *Eucalyptus* são ricas em óleos essenciais que apresentam o ISO como um dos compostos majoritários e suas propriedades terapêuticas estão relacionadas com a presença de terpenos (EKPENYONG; AKPAN; NYOH, 2015; DHAKAD *et al.*, 2018). O ISO é um importante intermediário na produção de (-) – mentol, uma substância amplamente utilizada em preparações farmacêuticas (LENARDAO *et al.*, 2007) e o citronelal pode ser convertido em isopulegol com tratamento com ácido, a partir do qual uma mistura de

mentol estereoisomérica é produzida por um processo de hidrogenação catalítica (YADAV; NAIR, 2000).

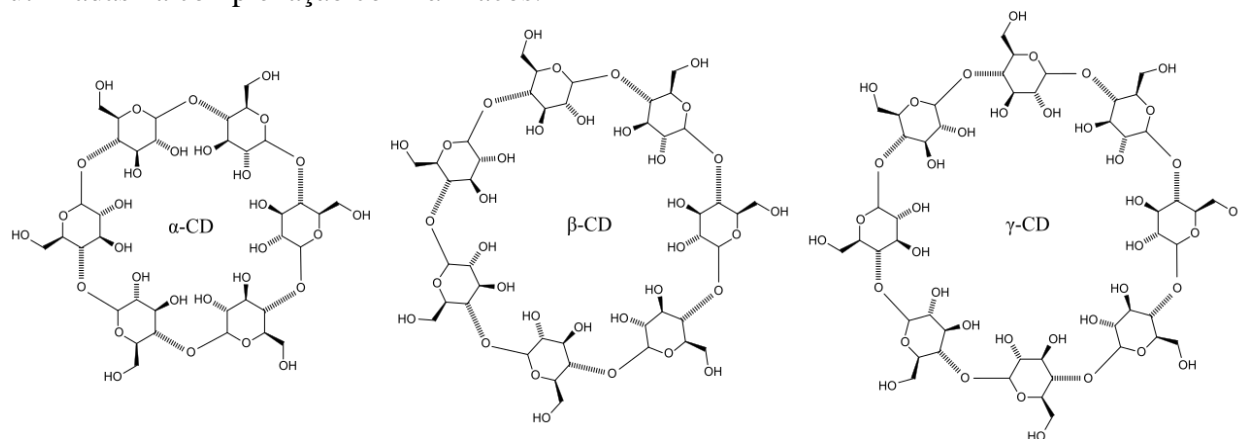
O (-)-isopulegol (2-isopropenil-5-metilciclohexanol) tem sido usado amplamente na fabricação de produtos cosméticos (SOUZA, 2004; BHATIA *et al.*, 2008) e a partir de uma reação de oxidação do (-)-isopulegol, pode-se obter a (-)-isopulegona (2-isopropenil-5-metilciclohexanona), um composto cíclico contendo dois grupos alquila com configuração trans (MOREIRA; CORRÊA, 2003).

Em estudos relacionados à atividade antinociceptiva do ISO foi sugerido o envolvimento dos receptores muscarínicos, do sistema opioide e *L*-arginina/NO/cGMP na sua atividade analgésica (PRÓSPERO *et al.*, 2018). Pesquisas também sugeriram que o ISO apresentou efeitos anticonvulsivantes e bioprotetores e essa atividade pode estar relacionada à modulação positiva dos receptores tipo GABA_A sensíveis a benzodiazepina, bem como às suas propriedades antioxidantes (SILVA *et al.*, 2009b). Outro estudo apresentou um resultado relevante sobre o papel do isopulegol atenuando o estresse oxidativo que é capaz de contribuir com a patogênese da disfunção das células β -pancreáticas no *diabetes mellitus*, em ratos com diabetes induzida por uma dieta rica em gordura/estreptozotocina (SANKARANARAYANAN; KALAIVANI, 2020), além de apresentar importante atividade gastroprotetora (SILVA; MOURA *et al.*, 2009).

Estudos de toxicidade e imunotoxicidade foram realizados com o ISO em experimentos *in vivo*, onde após 14 dias de uma ingestão única de ISO, essa substância apresentou baixa toxicidade e não suprimiu a produção e atividade de anticorpos (BHATIA *et al.*, 2008). O isopulegol, segundo a patente US20130084257 promoveu a absorção transdérmica de vários agentes farmacológicos com baixa irritação da pele, sendo sugerido como um promotor de absorção de alta segurança (não provocando irritações) e aplicabilidade (ISHIDA; OBATA; TAKAYAMA, 2013).

Uma importante limitação na aplicação dos monoterpenos é a sua meia-vida curta e várias abordagens visam aprimorar as propriedades farmacológicas dos monoterpenos, incluindo sistemas que tenham por finalidade aumentar a solubilidade desses compostos em água e assim, a sua biodisponibilidade (MOURTZINOS *et al.*, 2008; SERAFINI *et al.*, 2010; MENEZES *et al.*, 2012). Como um monoterpeno, o ISO apresenta alta volatilidade e odor forte o que acaba limitando as suas aplicações e assim como mais de 40% dos promissores agentes químicos, o isopulegol é praticamente insolúvel em água (HAMOUDI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015). A biodisponibilidade oral dessas substâncias poderia ser modificada a partir do uso de novas formulações, como nanopartículas, (VENTURINI *et al.*, 2011), micropartículas (RASSU *et al.*, 2015) e ciclodextrinas (MENEZES *et al.*, 2013; PINHO *et al.*, 2014).

Figura 02 – Estrutura química das três ciclodextrinas mais vendidas comercialmente (α , β e γ) e utilizadas na complexação com fármacos.



Fonte: (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Os complexos com ciclodextrinas (CDs) (Figura 02) são utilizados para melhorar a solubilidade, dissolução e taxas de biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (ABDOH *et al.*, 2007; AL-MARZOUQI *et al.*, 2008). As CDs são oligossacarídeos cíclicos cujo exterior é altamente hidrofílico (presença de grupos hidroxilas), enquanto a cavidade interior é hidrofóbica, interagindo com fatores também hidrofóbicos dos compostos, formando complexos de inclusão (FERNANDES *et al.*, 2009; ZIELENKIEWICZ *et al.*, 2010; AMBRUS *et al.*, 2011). As ciclodextrinas tem altos níveis de biocompatibilidade e são aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA), não sendo danosas aos seres humanos (JUG; BEĆIREVIĆ-LAĆAN, 2008).

As CDs além de promoverem uma melhora na solubilidade de moléculas biotivas aumentam a sua vida útil e reduzem as concentrações dessas moléculas necessárias para alcançar um efeito biológico (FANG; BHANDARI, 2010; CARLOTTI *et al.*, 2011), modulando a taxa de entrega do princípio ativo encapsulado. Dentre as CDs, a β -ciclodextrina (β -CD) é empregada de forma ampla no encapsulamento de fármacos na indústria farmacêutica devido seu baixo custo e alta taxa de produção (ABDOH *et al.*, 2007; AL-MARZOUQI *et al.*, 2008; SALÚSTIO *et al.*, 2009; TSAI *et al.*, 2010), e por eliminar propriedades desagradáveis dos fármacos, como odor e irritação, além de melhorar a estabilidade das drogas que são sensíveis à luz e oxigênio (MARQUES; HADGRAFT; KELLAWAY, 1990; ALI; UPADHYAY; MAHESHWARI, 2007). As β -CDs apresentam uma cavidade com diâmetro ideal para hospedar drogas (SZENTE; SZEJTLI, 2004) e se ligam às moléculas bioativas por meio de ligações não covalentes (TAO *et al.*, 2014). Recentemente nosso grupo vem demonstrando vários benefícios da complexação de terpenos com β -CDs, inclusive com o aperfeiçoamento das propriedades farmacológicas destes compostos voláteis (COSTA *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2020).

Como ISO é um monoterpene altamente volátil e insolúvel em água, a sua inclusão em β -CD, conduziria à formação de um complexo com maior solubilidade em água, mais biodisponível e sem características tóxicas, visando o aperfeiçoamento das propriedades farmacológicas do ISO.

2.2 INFLAMAÇÃO

A vida dos organismos vivos depende da sua habilidade para se proteger de agentes patógenos exógenos bem como reparar danos a tecidos causados por traumas ou infecções (NATHAN; DING, 2010). No entanto, a resposta inflamatória pode prejudicar os tecidos envolvidos no processo inflamatório e causar importantes disfunções orgânicas (CASTELLHEIM *et al.*, 2009). Quando ocorre a lesão, componentes celulares do sistema imune, cascata da coagulação sanguínea e vias inflamatórias são todas ativadas levando a um processo de diferenciação, proliferação e migração de células para que a integridade e homeostase dos tecidos sejam assim recuperadas e todo esse processo é ativado por meio de mediadores inflamatórios (AARABI; LONGAKER; GURTNER, 2007).

A inflamação cursa assim como uma resposta biológica complexa contra agentes agressivos, que podem ser agentes patógenos irritantes ou até mesmo células danificadas, podendo se desenvolver de forma aguda ou crônica e envolver o sistema vascular local, sistema imunológico e uma gama de células do tecido lesado. A resposta inicial do processo inflamatório é uma resposta aguda que envolve o recrutamento e ativação de células do sistema imune inato, do sangue para os tecidos lesados. Contudo, com a persistência do agente causador da inflamação, o processo se cronificará, os tipos celulares no local da reação inflamatória mudarão progressivamente, caracterizando-se pela destruição, seguida de reparação do tecido lesionado (FERRERO- MILIANI *et al.*, 2007).

As alterações vasculares iniciam-se imediatamente após o estímulo inflamatório e desenvolvem-se nas primeiras horas, consistindo de vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo para o local da lesão, aumento da permeabilidade vascular com exsudação de volume plasmático (WILLIAMS, 1983). Os gatilhos envolvidos na iniciação do processo inflamatório residem na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (NETEA *et al.*, 2017) (Figura 03).

Figura 03 - Representação esquemática das principais alterações vasculares e celulares no processo inflamatório.



Disponível em: <http://www.interacaomedicamentosa.com/2018/04/inflamacao-aguda.html>. Acesso em: 03 de setembro de 2020

As duas principais citocinas envolvidas nesse processo inicial da inflamação são o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1) e ambas têm atividade autócrina e efeitos parácrinos, levando à ativação de macrófagos e neutrófilos. As citocinas levam a um aumento da permeabilidade vascular, resultado da ativação de células endoteliais, o que facilita o recrutamento de células para o local da lesão (DINARELLO, 2007). A produção dessas citocinas pró-inflamatórias pode ser induzida pela presença de lipopolissacarídeos presentes em microorganismos como bactérias, capazes de ativar macrófagos que liberam mediadores inflamatórios, bem como óxido nítrico, visando à restauração da homeostase tecidual (SÁ *et al.*, 2014). Já as quimiocinas tem por função recrutar outras células imunes para o local da infecção (BONECCHI *et al.*, 2009), como os neutrófilos, que fagocitam e destroem os patógenos. Os neutrófilos nos tecidos produzem substâncias capazes de atrair mais neutrófilos, macrófagos e células T e regulam sua atividade (BORREGAARD, 2010).

Uma vez na circulação sanguínea, neutrófilos e monócitos ativados liberam citocinas e essas por sua vez estimulam a liberação de prostaglandinas que irão atuar no hipotálamo, mediando alguns sinais e sintomas como febre, fadiga, sonolência (SHATTUCK; MUEHLENBEIN, 2015). Além das prostaglandinas, outros produtos do metabolismo do ácido araquidônico (que incluem ambos os produtos das cicloxigenases (COX) - tromboxanos e prostaciclina – e produtos da lipooxigenase (LOX) – os leucotrienos) também participam da resposta inflamatória, podendo estar envolvidos no recrutamento de leucócitos, mudanças no tônus vascular e fluxo sanguíneo (LANTZ *et al.*, 2005).

Outros mediadores envolvidos no processo inflamatório são as aminas vasoativas, histamina e serotonina, pré-formadas e armazenadas em grânulos celulares, liberadas após indução do processo inflamatório (KUMAR, 2010). Essas substâncias tem um importante papel

na resposta inflamatória por terem capacidade de causar contração da musculatura lisa, vasodilatação e proporcionar aumento da permeabilidade vascular (RAPPORT; GREEN; PAGE, 1948). A histamina tem um importante papel nas respostas de hipersensibilidade e é uma amina vasoativa liberada por mastócitos, causando vasodilatação, edema e constrição do músculo liso (MACGLASHAN, 2003).

O óxido nítrico (NO) é outra molécula envolvida em diversos processos biológicos, incluindo vasodilatação, broncodilatação, neurotransmissão, defesa antimicrobiana e regulação da resposta imune inflamatória (MONCADA, 1991). O NO está claramente envolvido no processo inflamatório devido seu papel na vasodilatação e em resposta a estímulos imunológicos ou microbianos, altas quantidades de NO são liberadas (DIJKSTRA *et al.*, 1998). Além da vasodilatação, o NO promove outras alterações na resposta inflamatória como aumento da permeabilidade vascular e edema, incremento no fluxo sanguíneo e na produção de prostaglandinas (SALVEMINI *et al.*, 1996).

Além das citocinas envolvidas no processo inicial da inflamação, como o TNF- α e a IL-1, existe uma ampla variedade de citocinas com diferentes funções e ações. São polipeptídeos produzidos por vários tipos de células em resposta a diferentes estímulos e atuam como mediadores da inflamação e da resposta imune (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997). Essas citocinas podem exercer suas funções atuando de forma sinérgica ou mesmo modulando as funções uma das outras (GALVÃO *et al.*, 2018) e os diferentes tipos de citocinas incluem as interleucinas, fator de necrose tumoral e interferons, sendo esses últimos envolvidos na resposta imune antiviral (LOPUŠNÁ *et al.*, 2013).

Outro mecanismo envolvido no controle da resposta inflamatória é a ativação do sistema complemento, que desempenha papel fundamental na resposta imune inata, contribuindo para eliminação de patógenos, células anormais e doentes. É um sistema complexo composto por proteínas sintetizadas no fígado e liberadas na circulação (DUNKELBERGER; SONG, 2010; LUBBERS *et al.*, 2017). Seu envolvimento no controle da resposta inflamatória está relacionado a sua ligação a imunocomplexos e células apoptóticas, auxiliando na retirada dos mesmos do local da inflamação (NESARGIKAR; SPILLER; CHAVEZ, 2012).

Os mecanismos que objetivam a resolução da resposta inflamatória têm primordial importância no retorno à homeostase e é um processo ativo que visa não somente a eliminação do agente estressor, mas a reprogramação funcional de células através de mediadores (NETEA *et al.*, 2017). Uma resolução bem sucedida limita a lesão tecidual e reduz as possibilidades do desenvolvimento de uma inflamação crônica imuno-mediada (COTRAN; KUMAR; STANLEY, 2004).

O reparo tecidual para a maioria das lesões se dá pela formação de tecido fibroso, produzido principalmente por fibroblastos (AARABI; LONGAKER; GURTNER, 2007). A

cicatriz é caracterizada por fibroblastos e uma matriz desorganizada, formada principalmente por colágeno (RUH *et al.*, 2013). Entretanto, quando a resposta ao estímulo nocivo é desregulada e o estímulo é persistente, a resposta inflamatória se cronifica e esta condição está associada com uma diversidade de distúrbios inflamatórios crônicos, incluindo quadros de artrites, doenças autoimunes, doenças cardiovasculares e até mesmo câncer (MEDZHITOV, 2008).

A dor, um dos sinais clássicos do processo inflamatório, também chamada de dor inflamatória, resulta da interação entre mediadores já conhecidos e seus receptores nos neurônios sensoriais primários nociceptivos no sistema nervoso periférico (BASBAUM *et al.*, 2009). Os mediadores inflamatórios importantes na transmissão nociceptiva podem ser divididos em dois grupos: mediadores que sensibilizam os nociceptores e os que ativam nociceptores já sensibilizados, representados pelas citocinas e prostaglandinas, cininas e neuropeptídeos respectivamente (MILLAN, 1999).

2.3 NOCICEPÇÃO

A dor se apresenta como uma resposta adaptativa essencial para a manutenção da integridade do organismo frente a estímulos que gerem danos teciduais reais ou potenciais, afetando a qualidade de vida e as atividades diárias dos indivíduos (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2016). É uma experiência complexa que envolve componentes sensorio-discriminativos, afetivo-motivacionais e cognitivo-emocionais, processada por uma complexa rede neural, abrangendo diversos mecanismos (CAO *et al.*, 2014).

A dor pode ser considerada assim, como uma sensação subjetiva, resultado de uma experiência emocionalmente desagradável (CALVINO; GRILO, 2006) enquanto a nocicepção pode ser compreendida como a detecção de estímulos potenciais ou realmente prejudiciais. Nesse contexto é importante salientar que nocicepção e dor são distintas em aspectos, já que um indivíduo com lesões teciduais pode ou não apresentar comportamento de dor (KOPF, ANDREAS; PATEL, 2009).

Em relação à classificação, a dor pode ser categorizada de acordo com os mecanismos fisiológicos envolvidos, duração e gravidade, mecanismos neuroquímicos, local anatômico acometido, bem como causas e características temporais. Quanto à sua origem ou fisiopatologia a dor pode ser classificada como nociceptiva (quando ocorre ativação excessiva dos nociceptores, cujas terminações se localizam na pele, vísceras e outros órgãos); neuropática ou neurogênica (resultante do processamento somatossensorial anormal a nível periférico ou central), e em psicogênica (dor de origem psicológica e que não possui fator somático identificável) (MILLAN, 1999).

A dor aguda está associada a uma ativação de nociceptores a partir de uma injúria tecidual, podendo desaparecer de forma rápida ou então se cronificar como consequência de uma lesão

persistente, ultrapassando o tempo de recuperação do organismo, trazendo incapacidade e sofrimento (MILLAN, 2002). Nesses casos, o estado de dor é patológico, desadaptativo e debilitante (WOLLER *et al.*, 2017).

Os nociceptores ou receptores para dor são um conjunto de neurônios sensoriais especializados que medeiam a dor, sendo densamente encontrados em tecidos periféricos e respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, que podem se constituir em estímulos nocivos para o organismo (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2016). Esses estímulos são transmitidos até o sistema nervoso central onde é processado e interpretado pelo córtex cerebral como dor. As fibras nociceptivas são compostas por nervos aferentes e eferentes, diferenciadas entre si pelo diâmetro da fibra, mielinização, velocidade de transmissão de um estímulo e pelo tipo de sensação dolorosa (FEIN, 2010).

Em contraste com os receptores de pressão e toque, os nociceptores são terminações nervosas livres e podem ser classificadas em dois tipos de fibras: fibras pequenas e mielinizadas, as fibras A δ e fibras C, menores e não-mielinizadas (LYNN, 1994). As fibras A δ são sensíveis ao estímulo térmico, diâmetro de 1-5 μ m, velocidade de condução de 5-40 m/s e carregam informações de calor, frio e mecanotérmica; já as fibras C são termicamente sensíveis, possuem diâmetro de 0,02-1,5 μ m, velocidade de condução de 0,5-2 m/s e carregam informações mecânica, térmica e/ou química (JOHN SMITH, 2018; WOLLER *et al.*, 2017; BISTA; IMLACH, 2019).

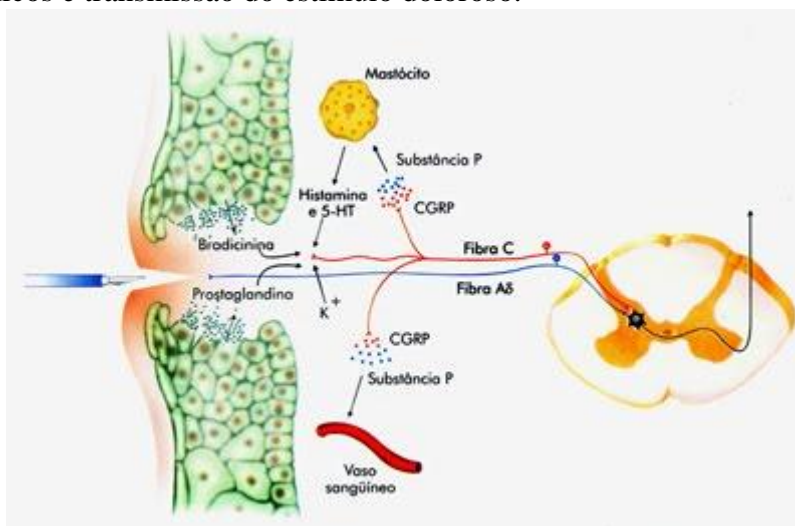
As fibras C são estimuladas secundariamente às fibras A δ , e somente se o estímulo nocivo for persistente, uma vez ativadas as fibras C elas rapidamente se adaptam ao estímulo (TRACEY, 2017; WOLLER *et al.*, 2017; SNEDDON, 2018). Acredita-se que as fibras A δ sinalizam a chamada “primeira dor” devido a sua alta velocidade de condução (KOLTZENBURG; STUCKY; LEWIN, 1997) enquanto as fibras C estão envolvidas na sensação de dor a longo prazo, principalmente devido a sua lenta velocidade de condução (SNEDDON, 2018).

Os terminais nervosos dos nociceptores expressam canais iônicos controlados por ligantes ou voltagem, que são as chaves moleculares na transdução dos estímulos nocivos. Na periferia, a ativação de nociceptores nas terminações das fibras A δ e C levará a modificações na membrana que resultará no disparo de um potencial de ação. Esse estímulo, uma vez transformado em estímulo elétrico, será transportado até o sistema nervoso central e interpretado no córtex como dor (ROCHA *et al.*, 2007). O sistema nervoso tem uma capacidade expressiva em propagar sinais, cuja velocidade chega a milissegundos, dada essa característica os receptores para dor estão devidamente posicionados para que sejam os primeiros estimulados por patógenos ou lesões teciduais (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2016).

Em face das lesões teciduais células são danificadas, ocorre extravasamento de plasma, movimentação de células inflamatórias no local da lesão levando à liberação de vários produtos ativos, como aminas, citocinas, lipídeos, peptídeos transmissores que desempenham papéis

essenciais no mecanismo de dor periférica (ROCHA *et al.*, 2007; KIM; MOALEM-TAYLOR, 2011) (Figura 04). Vale ressaltar que o terminal aferente sensorial expressa receptores para praticamente todas as substâncias citadas e uma vez ativando esses receptores uma despolarização se desenvolverá, com aumento do cálcio (DELMAS; HAO; RODAT-DESPOIX, 2011) e sódio intracelulares e diminuição dos íons cloreto e potássio nesse meio (LAI *et al.*, 2002)

Figura 04 – Representação dos mecanismos básicos da dor: lesão tecidual, liberação de mediadores químicos e transmissão do estímulo doloroso.



Fonte: disponível em: <http://etnomedicina.blogspot.com/2012/> Acesso em: 19 de junho de 2020

A informação nociceptiva é mediada pelo gânglio da raiz dorsal e transportada através dos tratos da via ascendente, chegando em várias áreas do cérebro, como a formação reticular, sistema límbico, hipotálamo, gânglios da base, substância cinza periaquidital, córtex somatossensorial, entre outros (KNIERIM, 2015) e nesse contexto, o cérebro pode exercer controle sobre a dor descendente. A ativação de regiões como mesencéfalo e áreas medulares podem reduzir a nocicepção; a substância cinza periaquidital recebe informações de outras partes do cérebro e pode assim exercer um efeito analgésico profundo; e a medula rostral ventromedial pode inibir a informação nociceptiva e junto da substância cinza periaquidital podem influenciar a dor e a nocicepção (SNEDDON, 2018).

Na sensibilização central os aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato, ativam receptores específicos, seguido da produção de segundos mensageiros como AMPc, proteínas PKA e PKC, fosfolipase A e C, promovendo a abertura de canais de cálcio e produção de mediadores como prostaglandinas, NO, glutamato e substância P, que contribuirão para a sensação dolorosa (JI *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2007).

O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (LIAN *et al.*, 2018) e pode ativar tanto receptores ionotrópicos, como os receptores *N*-metil-*D*-aspartato, alfa-amino-3-hidroxi-metilisoxazolepropionato (AMPA) e cainato, como também

receptores metabotrópicos que são acoplados pela proteína G (GOUDET *et al.*, 2009). Os receptores glutamatérgicos têm um importante papel na modulação da transmissão da dor, tanto a nível central como periférico (ZHUO, 2017). Em situações de estresse ou quando a dor é persistente, estudos demonstram que a quantidade de glutamato a nível de coluna espinhal permanece elevada (YAN *et al.*, 2009; QUINTERO; CARDENAS; SUAREZ-ROCA, 2011) levantando a importância da modulação glutamatérgica, na efetividade na redução da dor

A dor interfere na capacidade produtiva do ser humano e pode afetar a sua qualidade de vida de maneira transitória ou permanente. A dor é uma manifestação frequente de pacientes que buscam soluções nas mais diversas estratégias terapêuticas. Várias classes de fármacos são utilizadas na terapia da dor, seja ela inflamatória ou não (PEURA; GOLDKIND, 2005).

Dentre as estratégias farmacológicas para o tratamento da dor, visando minimizar as sensações desagradáveis por ela provocadas, as principais classes de fármacos utilizadas são os analgésicos opiídeos, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), os corticosteroides e ainda, os anticonvulsivantes e antidepressivos. O manejo farmacológico da dor traz por muitas vezes, efeitos colaterais indesejáveis, problemática essa que desperta o interesse na descoberta de novas drogas que possam vir a oferecer menos efeitos colaterais, incentivando assim o desenvolvimento de novas pesquisas.

Apesar da alta prevalência dos distúrbios da dor e dos impactos na vida dos seus portadores, poucos foram os avanços efetivamente traduzidos para o cenário clínico nas últimas décadas (GREGORY *et al.*, 2013). Frente a essa problemática, os modelos animais de nocicepção vem sendo cruciais na compreensão dos processos relacionados a dor.

REFERÊNCIAS

- AARABI, S.; LONGAKER, M. T.; GURTNER, G. C. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: New approaches to treatment. **PLoS Medicine**, set. 2007. v. 4, n. 9, p. 1464–1470. DOI :10.1371/journal.pmed.0040234.
- ABAN, I. B.; GEORGE, B. Statistical considerations for preclinical studies. **Experimental Neurology**, 25 nov. 2015. v. 270, p. 82–87. DOI :10.1016/j.expneurol.2015.02.024.
- ABDOH, A. A. *et al.* Inclusion complexation of diclofenac with natural and modified cyclodextrins explored through phase solubility, 1H-NMR and molecular modeling studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2007. v. 57, n. 1–4, p. 503–510. DOI :10.1007/s10847-006-9241-8.
- AL-MARZOUQI, A. H. *et al.* Influence of the preparation method on the physicochemical properties of econazole- β -cyclodextrin complexes. **Journal of Inclusion Phenomena and**

- Macrocyclic Chemistry**, 2008. v. 60, n. 1–2, p. 85–93. DOI :10.1007/s10847-007-9356-6.
- ALI, S. M.; UPADHYAY, S. K.; MAHESHWARI, A. NMR spectroscopic study of the inclusion complex of desloratadine with β -cyclodextrin in solution. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2007. v. 59, n. 3–4, p. 351–355. DOI :10.1007/s10847-007-9335-y.
- AMBRUS, R. *et al.* Physico-chemical characterization and dissolution properties of niflumonic acid-cyclodextrin-PVP ternary systems. **akjournals.com**, 2011. DOI :10.1007/s10973-010-1069-1.
- ANOSIKE, C. A.; OBIDOA, O.; EZEANYIKA, L. U. S. The anti-inflammatory activity of garden egg (*Solanum aethiopicum*) on egg albumin-induced oedema and granuloma tissue formation in rats. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 2012. v. 5, n. 1, p. 62–66. DOI :10.1016/S1995-7645(11)60247-2.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, 2008. v. 46, n. 2, p. 446–475.
- BARRETO, R. S. S. *et al.* Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 15 set. 2016. v. 191, p. 9–18. DOI :10.1016/j.jep.2016.06.022.
- BARTH, C. R. *et al.* Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. **European Journal of Immunology**, 1 abr. 2016. v. 46, n. 4, p. 964–970. DOI :10.1002/eji.201545520.
- BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, 2009. v. 139, n. 2, p. 267–284.
- BASTOS, J. F. A. *et al.* Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, abr. 2010. v. 106, n. 4, p. 331–337. DOI :10.1111/j.1742-7843.2009.00492.x.
- BASU, S. K.; THOMAS, J. E.; ACHARYA, S. N. Prospects for growth in global nutraceutical and functional food markets: a Canadian perspective. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 2007. v. 1, n. 4, p. 637–649.
- BEN, I.; ETIM, O.; UDO, N. Anti-inflammatory effects of *Napoleona imperialis* P. Beauv. (Lecythidaceae) on rat model of inflammation. **Indian Journal of Health Sciences**, 2016. v. 9, n. 1, p. 89. DOI :10.4103/2349-5006.183686.
- BHATIA, S. P. *et al.* Fragrance material review on isopulegol. **Food and Chemical Toxicology**, 2008. v. 46, n. 11, p. S185–S189.
- BISTA; IMLACH. Pathological Mechanisms and Therapeutic Targets for Trigeminal Neuropathic Pain. **Medicines**, 2019. v. 6, n. 3, p. 91. DOI :10.3390/medicines6030091.
- BOLZANI, V. Da S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**,

2016. v. 68, n. 1, p. 4–5.

BONECCHI, R. *et al.* Chemokines and chemokine receptors: an overview. **Front Biosci**, 2009. v. 14, n. 1, p. 540–551.

BOOMINATHAN, R. *et al.* Anti-inflammatory evaluation of *Ionidium suffruticosam* Ging. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2004. v. 91, n. 2–3, p. 367–370. DOI :10.1016/j.jep.2003.12.019.

BORGES, K. B.; BAUTISTA, B. H.; GUILERA, S. Diabetes–utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 2008. v. 5, n. 2.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, 2010. v. 33, n. 5, p. 657–670.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. **Planta Medica**, 2012. v. 78, n. 8, p. 747–754. DOI :10.1055/s-0031-1298434.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, 2006. v. 73, n. 1, p. 10–16.

CAO, F. Le *et al.* Antinociceptive effects of systemic tanshinone IIA on visceral and somatic persistent nociception and pain hypersensitivity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2014. v. 124, p. 74–80. DOI :10.1016/j.pbb.2014.05.005.

CARLOTTI, M. E. *et al.* On the complexation of quercetin with methyl- β -cyclodextrin: photostability and antioxidant studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2011. v. 70, n. 1–2, p. 81–90.

CARNEIRO, S. B. *et al.* Cyclodextrin-drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019. v. 20, n. 3. DOI :10.3390/ijms20030642.

CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ, R. DE *et al.* molecules A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **Molecules**, 2014. v. 19, p. 1459–1480. DOI :10.3390/molecules19021459.

CASTELLHEIM, A. *et al.* Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**, jun. 2009. v. 69, n. 6, p. 479–491. DOI :10.1111/j.1365-3083.2009.02255.x.

CAVALETTI, G. *et al.* Comparative Medicine Animal Models & Translational Medicine: Quality and Reproducibility of Experimental Design AISAL Symposium MAIN LECTURE AND ORAL PRESENTATIONS The Translational Mouse: From Genetic Models to the Mouse Hospital and Co-Clinical Trials., [S.l.]: [s.n.], 2018.

CHEN, J. *et al.* Natural terpenes as penetration enhancers for transdermal drug delivery. **Molecules**, 2016. v. 21, n. 12, p. 1709.

CHEN, Y. *et al.* Enhancement of skin permeation of flurbiprofen via its transdermal patches using

- isopulegol decanoate (ISO- C 10) as an absorption enhancer: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2015. v. 67, n. 9, p. 1232–1239.
- CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, 2017. v. 4, n. 3, p. 58.
- COSTA, M. D. S. *et al.* Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of D-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2019. v. 128, p. 158–161. DOI :10.1016/j.ejps.2018.11.036.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V. N.; STANLEY, R. L. **Robbins pathologic basis of disease**. [S.l.]: WB Saunders CompHny, Philadelphia, USA., 2004.
- COUTO, V. M. *et al.* Antinociceptive effect of extract of Emilia sonchifolia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011. v. 134, n. 2, p. 348–353. DOI :10.1016/j.jep.2010.12.028.
- CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical microbiology reviews**, 1997. v. 10, n. 4, p. 742–780.
- DELMAS, P.; HAO, J.; RODAT-DESPOIX, L. Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. **Nature Reviews Neuroscience**, 2011. v. 12, n. 3, p. 139–153. DOI :10.1038/nrn2993.
- DHAKAD, A. K. *et al.* Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 1 fev. 2018. v. 98, n. 3, p. 833–848. DOI :10.1002/jsfa.8600.
- DIJKSTRA, G. *et al.* Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, 1998. v. 186, n. 4, p. 416–421.
- DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European journal of immunology**, 2007. v. 37, n. S1, p. S34–S45.
- DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, 2010. v. 20, n. 1, p. 34.
- DUWIEJUA, M.; WOODE, E.; OBIRI, D. D. Pseudo-akuammigine, an alkaloid from Picralima nitida seeds, has anti-inflammatory and analgesic actions in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2002. v. 81, n. 1, p. 73–79. DOI :10.1016/S0378-8741(02)00058-2.
- EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf extracts. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 2015. v. 13, n. 5, p. 321–337. DOI :10.1016/S1875-5364(15)30023-6.
- FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols—a review. **Trends in Food Science & Technology**, 2010. v. 21, n. 10, p. 510–523.
- FEIN, A. Nociceptores: as células que sentem dor. **Dor On Line**, 2010. p. 106.

- FERNANDES, L. P. *et al.* Solid state studies on molecular inclusions of lippia sidoides essential oil obtained by spray drying. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2009. v. 95, n. 3, p. 855–863. DOI :10.1007/s10973-008-9149-1.
- FERREIRA, G. S. *et al.* Correction: A Standardised Framework to Identify Optimal Animal Models for Efficacy Assessment in Drug Development (PLoS ONE (2019) 14: 6 (e0218014) 10.1371/journal.pone.0218014). **PLoS ONE**, 2019. v. 14, n. 7. DOI :10.1371/journal.pone.0220325.
- FERRERO- MILIANI, L. *et al.* Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin- 1 β generation. **Clinical & Experimental Immunology**, 2007. v. 147, n. 2, p. 227–235.
- GALVÃO, I. *et al.* Mediators of Inflammation. **Immunopharmacology and Inflammation**. [S.l.]: Springer, 2018, p. 3–32.
- GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature chemical biology**, 2007. v. 3, n. 7, p. 408.
- GHASEMI, Y. *et al.* Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2009. v. 25, n. 7, p. 1301.
- GOUDET, C. *et al.* Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. **Brain Research Reviews**, 2009. v. 60, n. 1, p. 43–56. DOI :10.1016/j.brainresrev.2008.12.007.
- GREGORY, N. S. *et al.* An overview of animal models of pain: Disease models and outcome measures. **Journal of Pain**, 2013. v. 14, n. 11, p. 1255–1269. DOI :10.1016/j.jpain.2013.06.008.
- GUIMARÃES, A. G. *et al.* Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, 2012. v. 385, n. 3, p. 253–263. _____; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS- JÚNIOR, Lucindo J. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. **Phytotherapy research**, 2013. v. 27, n. 1, p. 1–15.
- HAMOUDI, M. C. *et al.* Formulations based on alpha cyclodextrin and soybean oil: an approach to modulate the oral release of lipophilic drugs. **Journal of controlled release**, 2012. v. 161, n. 3, p. 861–867.
- HENRY, L. K. *et al.* Contribution of isopentenyl phosphate to plant terpenoid metabolism. **Nature plants**, 2018. v. 4, n. 9, p. 721–729.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 1987. v. 30, n. 1, p. 103–114. DOI :10.1016/0304-3959(87)90088-1.
- ISHIDA, K.; OBATA, Y.; TAKAYAMA, K. **Transdermal absorption promoter, and external skin formulation thereof**. Google Patents.
- JI, R. R. *et al.* Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in Neurosciences**, 2003. v. 26, n. 12, p. 696–705. DOI :10.1016/j.tins.2003.09.017.

- JOHN SMITH, E. ST. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **Journal of Neurology**, 1 fev. 2018. v. 265, n. 2, p. 231–238. DOI :10.1007/s00415-017-8641-6.
- JUG, M.; BEĆIREVIĆ-LAĆAN, M. Cyclodextrin-based pharmaceutical. **Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti: Medicinske znanosti**, 2008. n. 499, p. 9–26.
- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant product. **Redox Report**, 1997. v. 3, n. 1, p. 3–15. DOI :10.1080/13510002.1997.11747085.
- KIM, C. F.; MOALEM-TAYLOR, G. Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice. **Brain Research**, 2011. v. 1405, p. 95–108. DOI :10.1016/j.brainres.2011.06.022.
- KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. **Annual review of plant biology**, 2009. v. 60, p. 335–355.
- KNIERIM, J. Neuroscience online an electronic textbook for the neurosciences. **UT HHealth, MC Govern Medical School**, 2015.
- KOLTZENBURG, M.; STUCKY, C. L.; LEWIN, G. R. Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. **Journal of Neurophysiology**, 1997. v. 78, n. 4, p. 1841–1850. DOI :10.1152/jn.1997.78.4.1841.
- KOPF, ANDREAS; PATEL, N. B. Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos. **Guide to Pain Management in Low-Resource Settings**, 2009. v. 1, p. 1–57.
- KORDALI, S. *et al.* Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicig.* **Journal of agricultural and food chemistry**, 2005. v. 53, n. 24, p. 9452–9458.
- KOZIOL, A. *et al.* An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 2014. v. 14, n. 14, p. 1156–1168.
- KUMAR, V. **Robbins & cotran-patologia bases patológicas das doenças 8a edição**. [S.l.]: Elsevier Brasil, 2010.
- LAI, J. *et al.* Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. **Pain**, 2002. v. 95, n. 1–2, p. 143–152. DOI :10.1016/S0304-3959(01)00391-8.
- LANGE, B. M. *et al.* Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2000. v. 97, n. 24, p. 13172–13177.
- LANTZ, R. C. *et al.* The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. **Phytomedicine**, 2005. v. 12, n. 6–7, p. 445–452.
- LENARDAO, E. J. *et al.* Citronellal as key compound in organic synthesis. **Tetrahedron**, 2007.

v. 63, n. 29, p. 6671–6712.

LIAN, Y. N. *et al.* The role of glutamate and its receptors in central nervous system in stress-induced hyperalgesia. **International Journal of Neuroscience**, 4 mar. 2018. v. 128, n. 3, p. 283–290. DOI :10.1080/00207454.2017.1387112.

LOPUŠNÁ, K. *et al.* Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. **Acta Virologica**, 2013. v. 57, n. 02, p. 171–179.

LORAM, L. C. *et al.* Behavioural, histological and cytokine responses during hyperalgesia induced by carrageenan injection in the rat tail. **Physiology and Behavior**, 2007. v. 92, n. 5, p. 873–880. DOI :10.1016/j.physbeh.2007.06.015.

LUBBERS, R. *et al.* Production of complement components by cells of the immune system. **Clinical & Experimental Immunology**, 2017. v. 188, n. 2, p. 183–194.

LYNN, B. The fibre composition of cutaneous nerves and the classification and response properties of cutaneous afferents, with particular reference to nociception. **Pain**, 1994. v. 1, p. 172–183.

MACGLASHAN, D. Histamine: a mediator of inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2003. v. 112, n. 4, p. S53–S59.

MARQUES, H. M. C.; HADGRAFT, J.; KELLAWAY, I. W. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. **International Journal of Pharmaceutics**, 1990. v. 63, n. 3, p. 259–266. DOI :10.1016/0378-5173(90)90132-N.

MARTINS, A. *et al.* Anti-Inflammatory and Physicochemical Characterization of the Croton Rhamnifolioides Essential Oil Inclusion Complex in β -Cyclodextrin. **Biology**, 2020. v. 9, n. 6, p. 114. DOI :10.3390/biology9060114.

MARTINS, A. O. B. P. B. *et al.* Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from Croton rhamnifolioides leaves and its major constituent 1, 8-cineole (eucalyptol). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2017. v. 96, p. 384–395. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.005.

MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation.** **Nature**. DOI :10.1038/nature07201.

MENEZES, P P *et al.* Inclusion complex of (–)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 1 mar. 2014. v. 115, n. 3, p. 2429–2437. DOI :10.1007/s10973-013-3367-x.

MENEZES, Paula P. *et al.* Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, 2012. v. 548, p. 45–50. DOI :10.1016/j.tca.2012.08.023.

MEWALAL, R. *et al.* Plant-derived terpenes: a feedstock for specialty biofuels. **Trends in biotechnology**, 2017. v. 35, n. 3, p. 227–240.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, 1999. v.

57, n. 1, p. 1–164.

_____. **Descending control of pain. Progress in Neurobiology.** [S.l.]: [s.n.], 2002.

MISHRA, R. K.; BAKER, M. T. Seizure prevention by the naturally occurring phenols, carvacrol and thymol in a partial seizure-psychomotor model. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 2014. v. 24, n. 23, p. 5446–5449.

MONCADA, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology review**, 1991. v. 43, p. 109–142.

MOREIRA, J. A.; CORRÊA, A. G. Enantioselective synthesis of three stereoisomers of 5, 9-dimethylpentadecane, sex pheromone component of *Leucoptera coffeella*, from (–)-isopulegol. **Tetrahedron: Asymmetry**, 2003. v. 14, n. 23, p. 3787–3795.

MOURTZINOS, I. *et al.* Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β -cyclodextrin and modified starch. **Journal of food science**, 2008. v. 73, n. 1, p. S89–S94.

NATHAN, C.; DING, A. **Nonresolving Inflammation. Cell.** DOI :10.1016/j.cell.2010.02.029.

NESARGIKAR, P.; SPILLER, B.; CHAVEZ, R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. **European Journal of Microbiology and Immunology**, 2012. v. 2, n. 2, p. 103–111.

NETEA, M. G. *et al.* A guiding map for inflammation. **Nature immunology**, 2017. v. 18, n. 8, p. 826.

NETO, A. G. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, 2005. v. 96, n. 1–2, p. 87–91. DOI :10.1016/j.jep.2004.08.035.

OJEWOLE, J. A. O. Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of *Zingiber officinale* (Roscoe) rhizomes (Zingiberaceae) in mice and rats. **Phytotherapy Research**, set. 2006. v. 20, n. 9, p. 764–772. DOI :10.1002/ptr.1952.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. De M. *et al.* Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, 2018. v. 41, p. 82–95. DOI :10.1016/j.phymed.2018.02.004.

ORHAN, İ. E. *et al.* Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. **Turkish Journal of Biology**, 2012. v. 36, n. 3, p. 239–246.

PANTHONG, A. *et al.* Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboge from *Garcinia hanburyi* Hook f. **Journal of Ethnopharmacology**, 2007. v. 111, n. 2, p. 335–340. DOI :10.1016/j.jep.2006.11.038.

PATIL, Kalpesh R.; PATIL, Chandragouda R; Anti-inflammatory activity of bartogenic acid containing fraction of fruits of *Barringtonia racemosa* Roxb. in acute and chronic animal models of inflammation. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 2017. v. 7, n. 1, p. 86–

93. DOI :10.1016/j.jtcme.2016.02.001.

PATIL, Kalpesh R *et al.* Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: Implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019. v. 20, n. 18, p. 4367. DOI :10.3390/ijms20184367.

PAVLOVA, A. V *et al.* Potent neuroprotective activity of monoterpene derived 4-[(3aR, 7aS)-1, 3, 3a, 4, 5, 7a-hexahydro-3, 3, 6-trimethylisobenzofuran-1-yl]-2-methoxyphenol in MPTP mice model. **Letters in Drug Design & Discovery**, 2014. v. 11, n. 5, p. 611–617.

PEURA, D. A.; GOLDKIND, L. Balancing the gastrointestinal benefits and risks of nonselective NSAIDs. **Arthritis Research and Therapy**, 2005. v. 7, n. SUPPL. 4. DOI :10.1186/ar1793.

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

PINHO-RIBEIRO, F. A. *et al.* Naringenin reduces inflammatory pain in mice. **Neuropharmacology**, 2016. v. 105, p. 508–519. DOI :10.1016/j.neuropharm.2016.02.019.

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

PIRES, L. F. *et al.* Neuropharmacological effects of carvacryl acetate on δ -aminolevulinic dehydratase, Na⁺, K⁺-ATPase activities and amino acids levels in mice hippocampus after seizures. **Chemico-biological interactions**, 2015. v. 226, p. 49–57.

POSADAS, I. *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, 1 maio. 2004. v. 142, n. 2, p. 331–338. DOI :10.1038/sj.bjpp.0705650.

PRÓSPERO, D. F. A. *et al.* Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway. **Chemico-biological interactions**, 2018. v. 293, p. 55–60.

QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo José *et al.* Plants with anticonvulsant properties: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2008. v. 18, p. 798–819.

QUINTANS, J. S. S. *et al.* Monoterpenes modulating cytokines - A review. **Food and Chemical Toxicology**, 2019. v. 123, p. 233–257. DOI :<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.058>.

QUINTERO, L.; CARDENAS, R.; SUAREZ-ROCA, H. Stress-induced hyperalgesia is associated with a reduced and delayed GABA inhibitory control that enhances post-synaptic NMDA receptor activation in the spinal cord. **Pain**, 2011. v. 152, n. 8, p. 1909–1922. DOI :10.1016/j.pain.2011.04.017.

RAMOS, A. G. B. *et al.* Antiedematogenic and anti-inflammatory activity of the monoterpene isopulegol and its β -cyclodextrin (β -CD) inclusion complex in animal inflammation models. **Foods**, 2020. v. 9, n. 5. DOI :10.3390/foods9050630.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Crystalline serotonin. **Science**, 1948. v. 108, n.

2804, p. 329–330.

RAQUEL, S. *et al.* Chemical and pharmacological studies of medicinal plants from Caatinga View project Antioxidant and pharmacological screening of natural product View project. **researchgate.net**, 2013.

RASSU, G. *et al.* Solid microparticles based on chitosan or methyl- β -cyclodextrin: A first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate. **Journal of controlled release**, 2015. v. 201, p. 68–77.

REKHA, K. R.; SELVAKUMAR, G. P. Gene expression regulation of Bcl2, Bax and cytochrome-C by geraniol on chronic MPTP/probenecid induced C57BL/6 mice model of Parkinson's disease. **Chemico-biological interactions**, 2014. v. 217, p. 57–66.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. **The world medicines situation**, 2011. p. 1–14.

ROCHA, A. P. C. *et al.* Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, jan. 2007. v. 57, n. 1, p. 94–105. DOI :10.1590/S0034-70942007000100011.

RUH, A. C. *et al.* Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saude**, 2013. v. 19, n. 1, p. 11–19. DOI :10.5212/publ.biologicas.v.19i1.0002.

SALAKHUTDINOV, N. F.; VOLCHO, K. P.; YAROVAYA, O. I. Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds. **Pure and Applied Chemistry**, 2017. v. 89, n. 8, p. 1105–1117.

SALÚSTIO, P. J. *et al.* The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a β -cyclodextrin cavity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2009. v. 71, n. 2, p. 377–386. DOI :10.1016/j.ejpb.2008.09.027.

SALVEMINI, D. *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan- induced rat paw inflammation. **British journal of pharmacology**, 1996. v. 118, n. 4, p. 829–838.

SANKARANARAYANAN, C.; KALAIVANI, K. Isopulegol Mitigates Hyperglycemia Mediated Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in HFD/STZ Induced Diabetic Rats. **Archives of Medical Research**, 2020. v. 51, n. 3, p. 204–214.

SANTANA SOUZA, M. T. DE *et al.* Structure–activity relationship of terpenes with anti- inflammatory profile–A systematic review. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, 2014. v. 115, n. 3, p. 244–256.

SANTOS, M. M.; NUNES, M. G. S.; MARTINS, R. D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2012. v. 14, n. 2, p. 327–334.

SATO, T. Unique biosynthesis of sesquiterpenes (C₃₅ terpenes). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 2013. v. 77, n. 6, p. 1155–1159. DOI :10.1271/bbb.130180.

- SERAFINI, Mairim R *et al.* Interaction of p-cymene with β -cyclodextrin. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, 2010. v. 109, n. 2, p. 951–955.
- SHATTUCK, E. C.; MUEHLENBEIN, M. P. Human sickness behavior: Ultimate and proximate explanations. **American Journal of Physical Anthropology**, 2015. v. 157, n. 1, p. 1–18.
- SILVA, M. I. G. *et al.* Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2007. v. 88, n. 2, p. 141–147.
- _____; SILVA, M. A. G.; *et al.* Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, 2009. v. 80, n. 8, p. 506–513.
- _____; MOURA, B. A.; *et al.* Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 29 set. 2009. v. 380, n. 3, p. 233–245. DOI :10.1007/s00210-009-0429-5.
- SINGH, B. *et al.* Anti-inflammatory activity of “TAF” an active fraction from the plant *Barleria prionitis* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, 2003. v. 85, n. 2–3, p. 187–193. DOI :10.1016/S0378-8741(02)00358-6.
- SNEDDON, L. U. Comparative Physiology of Nociception and Pain. **journals.physiology.org**, 1 jan. 2018. v. 33, n. 1, p. 63–73. DOI :10.1152/physiol.00022.2017.
- SOUSA, Damiao Pergentino DE; QUINTANS JR, L.; ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega DE. Evolution of the anticonvulsant activity of α -terpineol. **Pharmaceutical Biology**, 2007. v. 45, n. 1, p. 69–70.
- SOUZA, M. V. N. De. Utilização do TEMPO (N-oxil-2, 2, 6, 6-tetrametilpiperidina) na oxidação de álcoois primários e secundários. **Química Nova**, 2004. v. 27, n. 2, p. 287–292.
- SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, 2004. v. 15, n. 3–4, p. 137–142.
- TAO, F. *et al.* Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT-Food Science and Technology**, 2014. v. 59, n. 1, p. 247–255.
- TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista Virtual de Química**, 2013. v. 5, n. 3, p. 343–362.
- TRACEY, W. D. Nociception. **Current Biology**, 20 fev. 2017. v. 27, n. 4, p. R129–R133. DOI :10.1016/j.cub.2017.01.037.
- TSAI, Y. *et al.* Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, 2010. v. 120, n. 3, p. 837–841. DOI :10.1016/j.foodchem.2009.11.024.
- VASUDEVAN, M.; GUNNAM, K. K.; PARLE, M. Antinociceptive and anti-inflammatory

- effects of *Thespesia populnea* bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 2007. v. 109, n. 2, p. 264–270. DOI :10.1016/j.jep.2006.07.025.
- VENTURINI, C. G. *et al.* Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2011. v. 375, n. 1–3, p. 200–208.
- VERNIN, G. A. *et al.* GC/MS analysis of the volatile constituents of *Corymbia citriodora* Hook. from Réunion Island. **Journal of Essential Oil Research**, 2004. v. 16, n. 6, p. 560–565.
- VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. **Annual review of plant biology**, 2013. v. 64, p. 665–700.
- WILLIAMS, T. J. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. **British Medical Bulletin**, 1983. v. 39, n. 3, p. 239–242.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1962. v. 111, n. 3, p. 544–547. DOI :10.3181/00379727-111-27849.
- WOLLER, S. A. *et al.* An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, 2017. v. 35, n. 5, p. S40–S46.
- YADAV, G. D.; NAIR, J. J. Isomerization of citronellal to isopulegol using eclectically engineered sulfated zirconia– carbon molecular sieve composite catalysts, UDCaT-2. **Langmuir**, 2000. v. 16, n. 9, p. 4072–4079.
- YAN, L. H. *et al.* Imbalance between excitatory and inhibitory amino acids at spinal level is associated with maintenance of persistent pain-related behaviors. **Pharmacological Research**, 2009. v. 59, n. 5, p. 290–299. DOI :10.1016/j.phrs.2009.01.012.
- ZHUO, M. **Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. Neuropharmacology**. DOI :10.1016/j.neuropharm.2016.08.014.
- ZIELENKIEWICZ, W. *et al.* Enhancement of aqueous solubility of tricyclic acyclovir derivatives by their complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **akjournals.com**, 2010. DOI :10.1007/s10973-010-0847-0.

3. CAPÍTULO II

Artigo 1: Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models – Publicado na revista *Foods* - [doi:10.3390/foods9050630](https://doi.org/10.3390/foods9050630)







Fator de impacto: 4,092

Qualis (A2)

Observação: Nenhuma permissão especial é necessária para reutilizar todo ou parte do artigo publicado pelo MDPI, incluindo figuras e tabelas. Para artigos publicados sob uma licença Creative Common CC BY de acesso aberto, qualquer parte do artigo pode ser reutilizada sem permissão, desde que o artigo original seja claramente citado.

Article

Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and Its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models

Andreza Guedes Barbosa Ramos ¹, Irwin Rose Alencar de Menezes ¹ ,
 Maria Sanádia Alexandre da Silva ¹, Renata Torres Pessoa ¹ , Luiz Jardelino de Lacerda Neto ¹ ,
 Fabíola Rocha Santos Passos ², Henrique Douglas Melo Coutinho ¹ , Marcello Iriti ^{3,*}  and
 Lucindo José Quintans-Júnior ² 

¹ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil; andrezaurca@gmail.com (A.G.B.R.); irwinalencar@urca.br (I.R.A.d.M.);

sanadiaalexandre@gmail.com (M.S.A.d.S.); trabalho.renata18@gmail.com (R.T.P.); luizjardelino@gmail.com (L.J.d.L.N.); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)

² Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Aracaju-SE 49100-000, Brazil; fabiollarsp@hotmail.com (F.R.S.P.); lucindojr@gmail.com (L.J.Q.-J.)

³ Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, via G. Celoria 2, 20133 Milan, Italy

* Correspondence: marcello.iriti@unimi.it

Received: 10 April 2020; Accepted: 8 May 2020; Published: 14 May 2020



Abstract: Isopulegol (ISO) is an alcoholic monoterpene widely found in different plant species, such as *Melissa officinalis*, and has already been reported to have a number of pharmacological properties. Like other terpenes, ISO is a highly volatile compound that is slightly soluble in water, so its inclusion into cyclodextrins (CDs) is an interesting approach to increase its solubility and bioavailability. Thus, our aim was to evaluate the antiedematogenic and anti-inflammatory activity of isopulegol and a β -cyclodextrin–isopulegol inclusion complex (ISO/ β -CD) in rodent models. For the anti-inflammatory activity evaluation, antiedematogenic plethysmometry and acute (peritonitis and pleurisy), as well as chronic (cotton pellet-induced granuloma) anti-inflammatory models, were used. The docking procedure is used to evaluate, analyze, and predict their binding mode of interaction with H1 and Cox-2 receptors. The animals ($n = 6$) were divided into groups: ISO and ISO/ β -CD, negative control (saline), and positive control (indomethacin and promethazine). ISO and ISO/ β -CD were able to reduce acute inflammatory activity by decreasing albumin extravasation, leukocyte migration, and MPO concentration, and reducing exudate levels of IL-1 β and TNF- α . ISO and ISO/ β -CD significantly inhibited edematogenic activity in carrageenan- and dextran-induced paw edema. Moreover, both significantly reduced chronic inflammatory processes, given the lower weight and protein concentration of granulomas in the foreign body granulomatous inflammation model. The results suggest that the inclusion of ISO in β -cyclodextrins improves its pharmacological properties, with the histamine and prostaglandin pathways as probable mechanisms of inhibition, and also reinforces the anti-inflammatory profile of this terpene.

Keywords: terpenes; antiedematogenic effect; interleukin; tumor necrosis factor

1. Introduction

Functional foods contain ingredients that can be used for disease prevention, health promotion, and reductions of symptoms of inflammatory processes. These inflammatory processes are non-specific

biological immune responses of vascular tissues that occur in response to tissue damage and various types of aggressive agents, such as pathogens, irritants, and cells with functional changes [1]. Inflammation is characterized by a series of vascular, cellular, and biochemical changes following the activation of cellular and plasma components, as well as the immune system, aiming to eliminate the aggressor and restore the integrity of the tissue [2,3]. The inflammatory response is subdivided into an acute and chronic phase, where the acute phase is short-lived, characterized by fluid and plasma element extravasation, and the migration of neutrophils into the injured tissue, induced by the release of inflammatory mediators such as $\text{TNF}\alpha$, IL-1, PGE, and PAF [4]. The chronic phase occurs by the continuation of the inflammatory process, resulting in progressive changes in the cell types present at the site of the inflammatory reaction, structural changes in tissues, tissue destruction, and repair [5].

The effectiveness of anti-inflammatory drugs is assessed directly through changes in the levels of pro- and anti-inflammatory mediators, and also their ability to alter the activation state of cells involved in the inflammatory process [6,7]. The currently available anti-inflammatory drugs act by different mechanisms of action and include two main classes, glucocorticoids, and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Glucocorticoids inhibit the synthesis of interleukins and bioactive lipids, decrease cell-mediated immunity, and leukocyte activity and number [8,9], whereas non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the cyclooxygenase enzymes COX-1 and COX-2 [10–12]. However, long-term anti-inflammatory therapy produces a series of unwanted side effects, which has led to many studies being undertaken to try to discover new drugs that do not have this problem [6].

Cyclodextrins (CDs) are widely used in scientific research and in the pharmaceutical industry to increase the stability and solubility of drugs, and provide greater bioavailability and pharmacological effect [13,14]. CDs belong to the macrocyclic oligosaccharide family and form inclusion complexes with a wide variety of substances, changing their properties after complexation. Cyclodextrins are formed from the action of CD glycosyltransferase enzymes on starch, with the most important natural CDs being α , β , and γ [15]. Among the naturally occurring CDs, β -cyclodextrin (β -CD) is the one most commonly used for complexing drugs [14,16–19] and natural products [19–22], with the aim of potentiating their pharmacological effects through increasing their stability and solubility, and making them into promising alternative treatment options.

In terms of natural products, monoterpenes belonging to the terpene class, are a chemical group widely found in essential oils obtained from medicinal plants [23]. The monoterpene isopulegol (ISO) is found in different plant species, with several pharmacological properties being reported in the literature such as antihyperlipidemic activity [24], possible anxiolytic property [25], gastroprotective [26], analgesic [27], anticancer [28], antidiabetic [29] and an anticonvulsant activity [30] and even as a flavoring agent [31]. According to Lambe, Cadby, and Gibney [32] isopulegol is one of the flavoring substances present in several classes of food and drinks [31,33].

Thus, it was hypothesized that the inclusion of isopulegol in β -cyclodextrin would improve its pharmacological properties, making it a potential anti-inflammatory pharmacological prototype [34]. The objective of the present study was to evaluate the anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of isopulegol and its β -cyclodextrin (β -CD) inclusion complex in animal models.

2. Materials and Methods

The compounds used in the experiments were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), while xylazine and ketamine were acquired from Ceva Santé Animale, BR. All substances were prepared immediately before administrations by oral, intraperitoneal, intraplantar or intrapleural routes, according to the animals' weight (0.1 mL/10 g of body mass) and specific protocols. Isopulegol and its β -cyclodextrin complex (slurry complexation, H_2O : 12.465 \pm 0.71%; surface oil: 0.86%; total oil: 59.62%; ISOP complex: 58.76% and complexation ratio: 1:68.3%) were provided by Dr. Lucindo Quintans of the Federal University of Sergipe [34].

2.1. Animals

Male and female Swiss mice (*Mus musculus*) weighing between 20–30 g, were obtained from the Animal Containment Unit of the Regional University of Cariri (Unidade de Contenção Animal, Universidade Regional do Cariri-URCA). The animals were housed with food and water ad libitum (Labina, Purina, Brazil) in a temperature-controlled room at 22 to 24 °C, on a 12 h light/dark cycle. Prior to the experiments, the animals were kept in the Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry (Laboratório de Farmacologia e Química Molecular) of the URCA for a period of 24 h for acclimatization. The study was performed according to recommendations of the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the protocols were approved by the Experimentation Committee on the Use of Animals of the Regional University of Cariri (Comissão de Experimentação no Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri; CEUA N° 120/2018-GR).

2.2. Determination of Acute Non-Clinical Toxicity of ISO and ISO/ β -CD

Evaluation of the acute non-clinical toxicity was carried out according to the OECD [35], with some modifications and the table by Malone and Robichaud [36].

2.3. Evaluation of the Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activities

Evaluation of the anti-inflammatory activity of ISO and its inclusion complex (ISO/ β -CD) was performed using paw edema models (induced by different agents): carrageenan-induced peritonitis, with vascular permeability assessments using albumin; pleurisy and the measurement of cytokines IL1- β and TNF- α ; and the evaluation of chronic inflammation using the cotton pellet-induced granuloma model. The animals ($n = 6$) were divided into groups: ISO (1, 5 and 10 mg/kg), ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg) and a negative control. The histamine/prostaglandin E2 paw edema, peritonitis, pleurisy, and granuloma tests were performed with the most effective ISO and ISO/ β -CD doses, this being the 10 mg/kg dose for both. The isopulegol and its inclusion complex doses were chosen based on previously published results in the literature [27].

2.4. Evaluation of ISO and ISO/ β -CD Antiedematogenic Activity

Paw edema induced by intraplantar carrageenan/dextran administration [37,38]. Paw edema evaluation was performed according to Lapa et al. [39]. Paw edema induced by intraplantar histamine administration [40]. For the evaluation of the histamine-induced inflammatory processes, the protocol according to Maling et al. [40] was used. Paw edema induced by intraplantar prostaglandin E2 administration. Paw edema evaluation was performed according to Kawahara et al [41].

2.5. Edema Measurement

The plethysmometry method was used to evaluate paw edema models induced by phlogistic agents according to Winter, Risley and Nuss [37].

2.6. Molecular Docking

Docking simulations were procedure Vina[®] docking read by Chimera package. The most favorable pose, that show lowest binding free energy, aligned with binding pocket with RMSD not more than 1.0 Å was selected to analyze the interaction types using Discovery Studio 3.1 visualizer [42].

2.7. Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of ISO and ISO/ β -CD

2.7.1. Peritonitis

The carrageenan-induced peritonitis model was used to evaluate the effect of isopulegol and its inclusion complex on leukocyte recruitment according to Lapa et al. [39,43].

2.7.2. Evaluation of Leukocyte Function and Migration, and Protein Extravasation

To evaluate protein extravasation, albumin concentrations were determined using a Labtest kit, based on the bromocresol green method which has specificity for albumin and whose absorbance is proportional to the concentration of proteins in the analyzed sample [44,45].

2.7.3. Carrageenan Induced Pleurisy

The leukocyte migration was induced through the injection of carrageenan to obtain the pleural lavage according to Oliveira et al. [46].

2.8. Cytokine Measurement

The concentrations of TNF- α and IL-1 β were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Invitrogen®) according to the manufacturers' instructions.

2.9. Granuloma Induced by the Implantation of Cotton Pellets

The assessment of chronic anti-inflammatory activity was performed according to Lalitha and Sethuraman [47] and total protein measurement was performed by combining the homogenate and the reagent developed by Labtest according to the manufacturers' instructions.

2.10. Statistical Analysis

The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test or two-way ANOVA followed by Tukey's test using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Values were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and differences with $p < 0.05$ being considered significant.

3. Results

The following results show the antiedematogenic and anti-inflammatory activities of ISO and ISO/ β -CD. Then, one of the most significant results showed in this paper is that lower doses of isopulegol were shown to be effective when complexed with β -CD.

3.1. Acute Non-Clinical Toxicity

Acute oral treatment with ISO and ISO/ β -CD using a single oral dose of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg did not produce any clinical signs of toxicity or death in the animals within 14 days, demonstrating a low oral toxicity. Therefore, doses $<0.5\%$ of the single 2000 mg/kg dose of ISO and ISO/ β -CD (1, 5, and 10 mg/kg/v.o.) were used. Moreover, the study by Próspero et al., 2018, which evaluated the antinociceptive activity of the monoterpene isopulegol using 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 and 25 mg/kg doses contributed and guided the selection of the doses used in the present study.

3.2. Evaluation of the Antiedematogenic Activity of ISO and ISO/ β -CD

3.2.1. Paw Edema Induced by the Intraplantar Injection of 1% Carrageenan

Carrageenan increased edema at all assessment times, with the edematogenic peak at around the 4th hour. Oral treatment with ISO significantly reduced the edema induced by carrageenan with the doses of 5 and 10 mg/kg at all assessment times compared to the group that received only 0.9% saline, while the 1 mg/kg ISO dose only failed to show edema inhibition in the second hour of observation. ISO significantly inhibited edema at the following doses and respective evaluation times: 10 mg/kg (T1: 60%; T2: 67.74%; T3: 86.60%; T4: 84.96%); 5 mg/kg (T1: 54%; T2: 48.39%; T3: 56.70%; T4: 63.91%); 1 mg/kg (T1: 34%; T3: 43.30%; T4: 30.83%) (Figure S1-A).

Oral administration of ISO/ β -CD at the doses of 5 and 10 mg/kg significantly reduced the edema induced by carrageenan at all evaluation times, while the 1 mg/kg dose only showed significant edema

inhibition at the 3- and 4-h observation times. ISO/ β -CD significantly reduced edema at the following doses and respective evaluation times: 10 mg/kg (T1: 50%; T2: 59.68%; T3: 69.07%; T4: 81.20%); 5 mg/kg (T1: 36%; T2: 30.65%; T3: 45.36%; T4: 52.63%); 1 mg/kg (T3: 30.93%; T4: 30.83%) (Figure S1-B).

It is noteworthy that the 5 and 10 mg/kg doses of ISO and ISO/ β -CD showed the highest percentage of edema inhibition at the 4th hour of evaluation. Moreover, ISO/ β -CD did not show a significant difference when compared to ISO at the same dose in this model, demonstrating efficacy at almost all observation times and presenting a dose-dependent effect.

3.2.2. Paw Edema Induced by the Intraplantar Injection of 1% Dextran

The intraplantar injection of 1% dextran significantly increased edema, with an edematogenic peak being reached at the 2nd hour and declining in the subsequent hours. Oral administration of ISO at a dose of 10 mg/kg reduced edema at all assessment times, when compared to the saline group, with the following percentages: T1: 71.43%; T2: 85.11%; T3: 79%; T4: 75% (Figure S2-A).

ISO/ β -CD at a dose of 10 mg/kg, similarly to ISO at the same dose, reduced edema at all observation times with the following percentages: T1: 85.71%; T2: 82.98%; T3: 75%; T4: 82.14%. The 5 and 1 mg/kg doses also presented edema inhibition at the 2nd hour of evaluation by 10.64% and 8.51%, respectively (Figure S2-B).

3.2.3. Paw Edema Induced by the Intraplantar Injection of 1% Histamine and Prostaglandin E2

Histamine-induced edema increased significantly in the group receiving 0.9% saline, with an edematogenic peak at about 60 min after histamine administration and demonstrating a slight decline in the following hours. Promethazine (6 mg/kg/v.o.), an antihistamine used as a positive control, significantly reduced edema, when compared to the control group, demonstrating efficacy at all time intervals (T30: 78%; T60: 75%; T90: 64%; T120: 78%; T180: 88%) (Figure S3).

Treatment with ISO and ISO/ β -CD at the dose of 10 mg/kg significantly reduced edema when compared to the saline group, with significance at all assessment times: ISO (T30: 89%; T60: 86%; T90: 79%; T120: 81%; T180: 92%) and ISO/ β -CD (T30: 93%; T60: 96%; T90: 82%; T120: 85%; T180: 88%) (Figure S3).

In the paw edema model resulting from PGE2 administration, treatment with ISO and ISO/ β -CD at the dose of 10 mg/kg significantly reduced edema when compared to the control group at all evaluation times: ISO (T15: 80%; T30: 87%; T45: 78%; T60: 80%) and ISO/ β -CD (T15: 90%; T30: 94%; T45: 84%; T60: 84%) (Figure S4).

3.3. Investigation of Isopulegol-Mediated COX-2 and H1 Inhibition *in Silico*

The *in silico* docking procedure demonstrated that the root-mean-square deviations (RMSD) between the co-crystallized structure of doxepin or diclofenac and the redocked structure of ligands were 0.87 Å and 0.32 Å, respectively. This result shows a convergence in the calculated complexes formation and attesting the performance of the docking protocol. The best binding energy of isopulegol showed the same score energies of -6.4 kcal/mol to the H1 and COX-2 binding site, whereas, the docked ligands showed score energies of -8.6 kcal/mol to diclofenac and -11.5 kcal/mol for doxepin. The interaction analysis of different ligands shows hydrophobic and polar interactions in the COX-2 enzyme and H1 receptor binding sites, indicating a favorable interaction with both proteins. The best conformation of isopulegol, as well as of their respective ligands diclofenac and doxepin are shown in Figure 1.

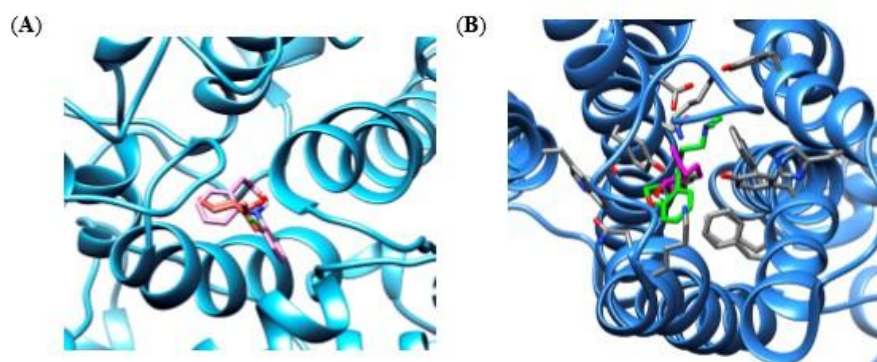


Figure 1. The binding poses the best stability of isopulegol (orange) and diclofenac (pink) in cyclooxygenase 2 (COX-2) binding site enzyme (A) and isopulegol (magenta) and doxepin (green) in binding site of H1 receptor (B).

Docking experiments show the same favorable position for both receptors, being stabilized close to the active site by hydrophobic interactions. In the COX-2 binding site, similar cavities, with residues of VAL492, TYR354, TRP356, MET491, PHE350, LEU353, ALA496, TYR317 that form hydrophobic interactions, were observed with co-crystallized diclofenac and the non-polar part of isopulegol. There was a predominance of van der Waals, Alkyl and π -Alkyl connections in the stabilizations of the interactions. In addition, eleven similar interaction points with hydrophobic and hydrophilic cavities were found when the docked structures of isopulegol and diclofenac were compared. However, diclofenac had relatively better docking energy, in part, generated by hydrogen bonds.

In the H1 receptor binding site, isopulegol showed potential Van der Waals interactions with ASP107, SER111, THR 112, TRP158, ASN198 (Figure 2). However, other interactions such as alkyl and π -alkyl contributed to the stabilization of the interaction, as well as to the formation of the lipophilic pocket in the binding site. The GPCR family aminergic receptors are structurally similar to the H1R. The co-crystallized doxepin in the H1 receptor shows that ASP107 is a strictly conserved residue with an important interaction. However, other interactions have been reported to be essential for the binding of H1R antagonists such as doxepin in the hydrophobic pocket with residues including ILE115, PHE424, TRP428, PHE432, TRP158, and ASN198. As can be seen in Figure 2, twelve similar interaction points with hydrophobic and hydrophilic cavities were found when the docked structures of isopulegol and doxepin were compared.

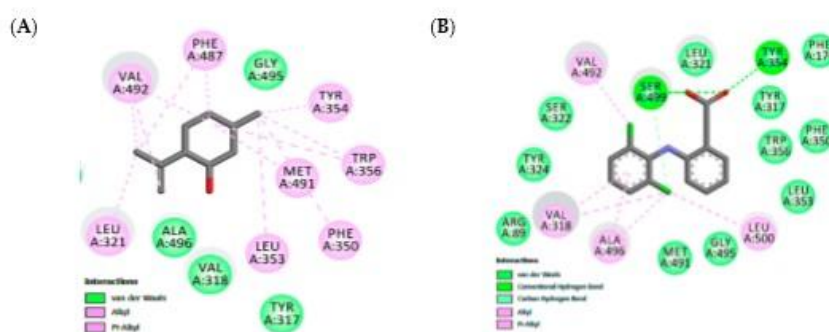


Figure 2. Cont.

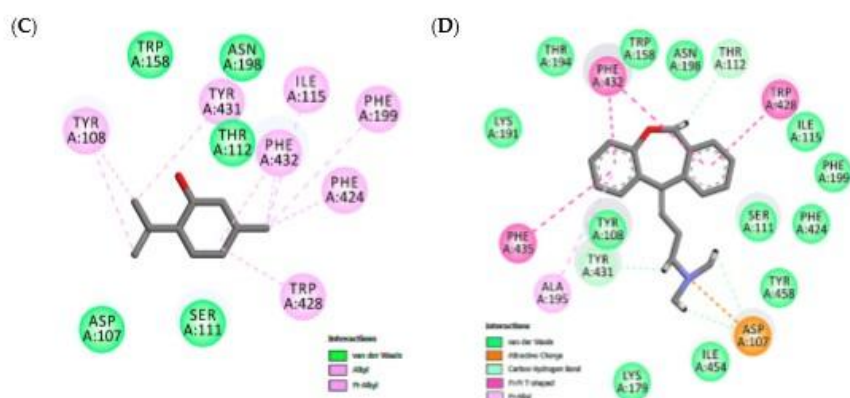


Figure 2. Maps of amino acid residues within binding pocket: (A,C) isopulegol, (B) Diclofenac; Doxepin (D).

Therefore, isopulegol shows favorable docking with the COX-2 enzyme and H1 receptor and, based on the similarities in anchor points, indicates that isopulegol may occupy the active site in both targets, corroborating our experimental data from the *in vivo* models.

3.4. Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of ISO and ISO/ β -CD

3.4.1. Peritonitis: Total Leukocytes, Protein Extravasation and Myeloperoxidase Measurement

The intraperitoneal administration of 1% carrageenan is a chemical stimulus capable of inducing the release of inflammatory mediators and of altering vascular permeability, causing protein extravasation from the plasma into the interstitial fluid, as well as intense leukocyte migration to the peritoneal cavity [39]. Initially, carrageenan-induced leukocyte migration was evaluated after 4 h of its administration. Figure S5 shows the inhibitory effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg) on leukocyte migration ($p < 0.0001$), as well as that of indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory, which significantly inhibited ($p < 0.0001$) leukocyte recruitment to the peritoneal cavity. No leukocytes were detected in the naive group, which received neither treatment nor induction.

In terms of protein extravasation, ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg) promoted a significant reduction ($p < 0.0001$) in the quantity of albumin present in the peritoneal lavage, when compared to the group that received saline solution (Figure S6). Indomethacin, the standard drug, significantly reduced albumin extravasation ($p < 0.0001$). After 4 h of carrageenan administration into the animals' peritoneal cavity, a significant reduction in myeloperoxidase (MPO) enzyme levels, an important marker of neutrophil infiltration, occurred in the groups treated with ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg) compared to the group that received only saline solution ($p < 0.001$). Animals treated with indomethacin also showed a significant reduction in MPO activity ($p < 0.001$) (Figure S7).

3.4.2. Pleurisy

As shown in Figure S8, injection of carrageenan into the pleural cavity of mice increased leukocyte migration as expected. Treatment with ISO 10 mg/kg, both pure and complexed, significantly reduced leukocyte migration relative to the saline group ($p < 0.001$).

In Figure 3, as expected, in mice subjected to carrageenan-induced pleurisy the levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β increased in animals treated with ISO or ISO/ β -CD (10 mg/kg). IL-1 β levels in the pleural lavage significantly decreased in relation to the saline group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), as did the TNF- α concentration ($p < 0.001$).

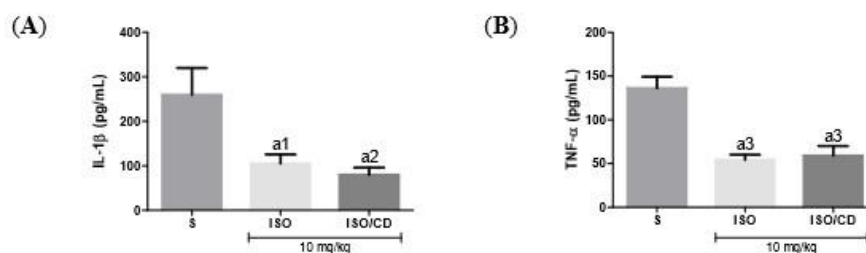


Figure 3. Effect of isopulegol (ISO) and β -cyclodextrin–ISO inclusion complex ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on the inflammatory cytokines IL-1 β (A) and TNF- α (B) in the pleural lavage of the animals submitted to the carrageenan-induced pleurisy. (a1- $p < 0.05$; a2- $p < 0.01$; a3- $p < 0.001$; vs. saline).

Effect of ISO e ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on the inflammatory cytokines IL-1 β (A) and TNF- α (B) in the pleural lavage of the animals submitted to the carrageenan-induced pleurisy. (S: control/saline). Data expressed as mean \pm SEM of 6 animals. Statistical analysis: One-way ANOVA followed by Tukey's test with multiple comparisons. (a1 $p < 0.05$; a2 $p < 0.01$; a3 $p < 0.001$; a4 $p < 0.0001$ vs. saline).

3.4.3. Effect of ISO and ISO/CD on Cotton Pellet-Induced Granulomas

The cotton pellet-induced granuloma model was used to assess the activity of ISO and ISO/ β -CD in chronic inflammation [48]. Treatment with ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg) significantly reduced the dry weight of cotton pellets (Figure S9-A) and total proteins (Figure S9-B) when compared to the group that received only saline solution, with a statistically significant correlation with the amount of granulomatous tissue, indicating that both compounds played an inhibitory role in this chronic inflammation model.

4. Discussion

Isopulegol, in addition to being used in the production of fragrances, has long been used as a food flavoring, being approved by the FDA (Food and Drug Administration) and the Council of Europe (1974) as an artificial flavoring substance without danger to public health. Research by the Food Chemicals Codex (1972) shows the average lethal dose (LD₅₀) of isopulegol orally in rats is 1.03 ± 0.10 mL [49]. As demonstrated previously, the literature data was showed that isopulegol present several biological activity as anticancer [28], anticonvulsant activity [30], antinociceptive [27], gastroprotective effect [26], antidiabetic [29], however, there is little information about anti-inflammatory and antiedematogenic potential. In fact, the formation of inclusion complexes containing β -CD and monoterpenes has been a successful and growing approach for researchers working with essential oils and their major compounds [18].

The phlogistic agent carrageenan, a polysaccharide obtained from seaweed, and a pro-inflammatory agent widely used in well-documented models of inflammation, was used in the evaluation of the antiedematogenic activity of ISO and ISO/ β -CD [50]. The inflammatory process induced by carrageenan is a complex event that involves the release of chemical mediators and cell migration into the tissues involved [37,51]. Edema development following intraplantar administration of carrageenan is a biphasic event involving mediators such as histamine, serotonin, bradykinin, and substance P in the initial phase (0–1 h). In the later phase (after 1 h), edema is maintained by the production of large amounts of prostaglandins and various cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α [38,52].

The results showed the ISO and ISO/ β -CD had an important anti-inflammatory effect at all tested doses by reducing the carrageenan-induced edema with a possible reduction in the release of inflammatory mediators. Quintans et al., (2013) found similar results in their study carried out with another monoterpene, p-cymene (PC) and its beta cyclodextrin inclusion complex (PC/CD), where both

PC and PC/CD were able to markedly inhibit carrageenan-induced edema when administered orally, with the complex producing a faster and more effective response [53].

Paw edema induced by dextran administration is a model characterized by an increase in vascular permeability, kinin activation and mast cell degranulation with histamine and serotonin release, resulting in edema with a small quantity of neutrophils and proteins [38,54]. Once released, histamine and serotonin quickly act on blood vessels, triggering vasodilation with a consequent increase in blood flow to the injured site [38,54].

In studies by Silva et al. [55] and Silva et al [56], both with carvacrol, a phenolic monoterpene, reduced dextran-induced paw edema by 46% when compared to the negative control group. In other monoterpene antiedematogenic activity evaluations, 1,8-cineole (10.3; 20.6; 41.3; and 82.6 mg/kg/v.o.) reduced dextran-induced paw edema at all tested doses [57]. In the present study, the ISO and the ISO/ β -CD, both at a dose of 10 mg/kg, inhibited dextran-induced edema at all evaluation times, demonstrating antiedematogenic activity against the edema caused by dextran, this being possibly the result of reduced histamine release or action on its receptors.

Since inflammation is characterized by a series of events that include increased vascular permeability, leukocyte migration, and connective tissue proliferation, edema is one of the first signs of the inflammatory process. Histamine is a potent vasoactive mediator, whose release following mast cell activation can induce vasodilation and increase vascular permeability. Once histamine is released, production of and increased levels of prostaglandins and neuropeptides follow, leading to hyperalgesia and other pro-inflammatory events [58,59]. The study by Martins et al. [57] evaluating the monoterpene 1,8-cineole in histamine-induced paw edema also showed an important antiedematogenic activity of this monoterpene, which inhibited edema by 65.95%, showing action at all evaluation times.

Prostaglandin E2 (PGE2) is considered to be a key pro-inflammatory mediator in the inflammatory process, being found at high levels in inflammatory exudates and when administered directly into tissue, and is capable of inducing a series of classic signs of inflammation [60]. PGE2 is an abundant metabolic product that plays an important role in the genesis of hyperalgesia, pyrexia, and vascular permeability, being an important pharmacological target in inflammatory disorders [61]. The antiedematogenic effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg) on the histamine and PGE2 pathway corroborates the antiedematogenic action observed in the paw edema models induced by carrageenan and dextran, which involves the participation of vasoactive amines and prostaglandins, revealing a potential action over acute phase inflammatory signs.

The binding site of the COX-2 enzyme contains two important regions of interaction formed by Tyr324, Trp356, Phe487, Phe350, Ala496, Tyr317, and Leu321 that confer a special hydrophobic characteristic in pocket and a hydrogen bond pocket formed by Ser-499 and Tyr-354 [62]. The Alkyl and Alkyl- π stacking interactions work as "anchors", favoring van der Waals interactions and contributing to the formation of a stable bond in the COX-2/isopulegol complex. Our results demonstrated a complementarity between the ligands and the active site of COX-2 at the same interactions, with the surrounding protein residues containing NAID-naproxen showing the hydrophobic interactions with Ala-527, Val-349, Gly-526, Trp-387, Tyr-385, and Leu-352 [63]. Previous studies with other terpene derivatives demonstrated that these compounds interacted similarly, although no involvement of hydrogen bonds was shown [64,65].

According to Shimamura et al. [66], taking part in the formation of the lipophilic pocket and hydrogen bond is crucial for the antagonist activity in the binding cavity of the H1 receptor. This study showed that doxepin sits deep in the ligand-binding pocket and directly interacts with TRP428 and ASP107, residues which have been reported to be essential for the binding of H1R antagonists. The tricyclic ring of doxepin that anchored in the hydrophobic pocket comprised side chains of helices III, V, and VI. Therefore, isopulegol shows favorable docking in both the target COX-2 enzyme and H1 receptor and, these results, corroborate the experimental data from the *in vivo* models.

Amid the biochemical changes triggered during the inflammatory process, changes in albumin levels are the most notable, with its reduced hepatic synthesis. The decrease in serum albumin levels is

also associated with increased capillary permeability, one of the events in the inflammatory response, which results in albumin escaping into the extravascular space [67,68]. Inflammation induced by carrageenan involves a series of events such as leukocyte migration, plasma leakage, and the production of a variety of mediators such as cytokines, prostaglandin E2 and nitric oxide [69]. During leukocyte migration, neutrophils are the most numerous leukocytes and MPO, an enzyme stored in neutrophil granules, plays an important role as a marker of the degree of inflammation in different tissues [70].

In this study, ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg) promoted a significant reduction in all inflammatory events induced by carrageenan. These data suggest that ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg) can attenuate vascular events, such as vascular permeability and leukocyte migration, with a consequent reduction in MPO activity. Other monoterpenes such as bisabolol, citral, thymol and hydroxydihydrocarvone also present considerable anti-inflammatory activity, reducing vascular permeability, leukocyte migration, and myeloperoxidase activity during carrageenan-induced peritonitis [71–74].

Pleurisy is one of the classical experimental models for assessing acute anti-inflammatory activity and involves the release of a series of chemical mediators such as vasoactive amines, cytokines and prostaglandins [75,76]. The administration of carrageenan promotes a significant increase in cytokine levels, such as TNF- α and IL-1 β , in the pleural exudate and propagates the inflammatory process systematically [4,77]. TNF- α and IL-1 β are responsible for several characteristics of the inflammatory reaction, such as increased body temperature, neutrophil accumulation at the injury site, induction of vascular adhesion molecules and stimulation of acute phase protein synthesis [78–80]. Additionally, these two cytokines positively regulate the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) and consequently the production of prostaglandins, which are relevant in the inflammatory response [81].

Given TNF- α and IL-1 β are fundamental cytokines in the inflammatory reaction, the anti-inflammatory effect of ISO and ISO/ β -CD may be associated with the inhibition of cytokine release, corroborating the results presented in this study, where isopulegol and its complex (both at a dose of 10 mg/kg) inhibited the main characteristics of the inflammatory response.

In the chronic anti-inflammatory activity assessment, the cotton pellet-induced granuloma model is an important indicator of the proliferative stages of inflammation, which involves the proliferation of macrophages, neutrophils, and fibroblasts, these being fundamental elements for the formation of a granuloma [82–84]. During granuloma development, macrophages play a central role in the formation, maintenance and progression of a granuloma at different stages of a disease [85], with the release of inflammatory and immunomodulatory cytokines resulting from macrophage activity [86].

In this same model of chronic inflammation, the monoterpene 1,8-cineole reduced both the mass of the pellets and the total protein quantity [57], similarly to ISO and ISO/ β -CD, suggesting a possible macrophage activity and fibroblast inhibition, corroborating the results from the present study, where a significant inhibition of vascular and cellular alterations such as vasodilation, vascular permeability, and cellular infiltration occurred.

Several studies indicate that the interaction between drugs and cyclodextrins alter the pharmacokinetic properties of a drug's active principle when complexed, altering characteristics such as solubility, stability, bioavailability, and dissolution, with beta-cyclodextrins (β -CD) being the most commonly used cyclodextrins in the drug complexation processes [87]. Da Silva Pires et al. [88], demonstrated that tenoxicam has a better dissolution profile when complexed with β -CD, resulting in a final product with greater chemical stability and better bioavailability, also reducing the adverse effects of tenoxicam.

In this study, isopulegol and its β -CD complex showed significant results against acute and chronic inflammatory models, attenuating the main responses of the inflammatory process. When compared, the results obtained by ISO and ISO/ β -CD groups (10 mg/kg) did not differ statistically from each other, both showing relevant anti-inflammatory activity. However, the results obtained with ISO/ β -CD (10 mg/kg) become significant, since the complexation process involves much smaller quantities of isopulegol [34], these being up to 12 times smaller in the complexed dose (10 mg/kg). Moreover, the upgrading of anti-inflammatory and modulator of pro-inflammatory cytokines profiles produced by

terpenes after inclusion with CDs has been strongly described in the literature, which are corroborated by our data.

5. Conclusions

Together, our results demonstrated that ISO and ISO/ β -CD possess antiedematogenic and anti-inflammatory activities in the animal models assessed, producing a more detailed profile of the possible benefits of this alcoholic monoterpene. Moreover, the complexation with β -CD proved to be beneficial and brought advantages that need to be highlighted, particularly as there is much less active compound in the complex compared to the pure compound, although the results are similar. The molecular docking studies indicated that the ISO mechanism of action involves the histamine and eicosanoid pathways. Thus, ISO and ISO/ β -CD have shown promising anti-inflammatory properties and may be highly effective in the treatment of inflammatory disorders (acute or chronic) that cause pain. The study also provided further evidence of the possible benefits of CDs in optimizing the already appreciable pharmacological properties of terpenes.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2304-8158/9/5/630/s1>, **Figure S1:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of 1% carrageenan in mice; **Figure S2:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of 1% dextran in mice; **Figure S3:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of 1% histamine in mice; **Figure S4:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of prostaglandin E2 in mice; **Figure S5:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on leukocyte migration in 1% carrageenan-induced peritonitis; **Figure S6:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on protein extravasation in 1% carrageenan-induced peritonitis; **Figure S7:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on MPO activity in 1% carrageenan-induced peritonitis; **Figure S8:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) in the leukocytes migration in mice submitted to carrageenan-induced pleurisy; **Figure S9:** Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on granuloma formation.

Author Contributions: The individual contributions of each author are as follows: Conceptualization—A.G.B.R., I.R.A.d.M., and L.J.Q.-J.; Methodology—A.G.B.R., M.S.A.d.S., R.T.P., L.J.d.L.N. and F.R.S.P.; Validation—A.G.B.R., I.R.A.d.M., Henrique Douglas Melo Coutinho, L.J.Q.-J.; Formal analysis, I.R.A.d.M.; Investigation—A.G.B.R., M.S.A.d.S., R.T.P., L.J.d.L.N. and F.R.S.P.; Resources, A.G.B.R., M.S.A.d.S., R.T.P., L.J.d.L.N. and F.R.S.P.; Data curation—A.G.B.R.; Writing of original draft—A.G.B.R.; Writing, review and editing—A.G.B.R., I.R.A.d.M., H.D.M.C., L.J.d.L.N.; Supervision—M.L., I.R.A.d.M. and L.J.Q.-J.; Project administration—I.R.A.d.M.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to thank a CAPES, CNPq and FUNCAP for their financial support. A.G.B.R. is PhD student of the Graduate Program in Biological Chemistry at URCA. This publication is derived from the INCT-RENNOFITO (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Rede Norte-Nordeste de Fitoprodutos) and INCT ETNOBIOLOGIA, BIOPROSPECÇÃO E CONSERVAÇÃO DA NATUREZA projects. We dedicate this article to the brave health professionals who are fighting in hospitals against COVID-19.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ferrero-Miliani, L.; Nielsen, O.H.; Andersen, P.S.; Girardin, S.E. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, *147*, 227–235. [[CrossRef](#)]
2. Ashley, N.T.; Weil, Z.M.; Nelson, R.J. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2012**, *43*, 385–406. [[CrossRef](#)]
3. Ley, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 8–18. [[CrossRef](#)]
4. Fröde, T.S.; Souza, G.E.P.; Calixto, J.B. The modulatory role played by TNF- α and IL-1 β in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine* **2001**, *13*, 162–168. [[CrossRef](#)]
5. Lawrence, T.; Gilroy, D.W. Chronic inflammation: A failure of resolution? *Int. J. Exp. Pathol.* **2007**, *88*, 85–94. [[CrossRef](#)]
6. Gossiau, A.; Li, S.; Ho, C.; Chen, K.Y.; Rawson, N.E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 74–82. [[CrossRef](#)]
7. Buchman, A.L. Side effects of corticosteroid therapy. *J. Clin. Gastroenterol.* **2001**, *33*, 289–294. [[CrossRef](#)]

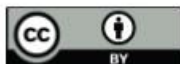
8. Alderson, P.; Roberts, I. Corticosteroids for acute traumatic brain injury. *Cochrane database Syst. Rev.* **2005**. [[CrossRef](#)]
9. Caramori, G.; Adcock, I. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids targeting granulocytes. *Curr. Drug Targets-Inflam. Allergy* **2005**, *4*, 455–463. [[CrossRef](#)]
10. Hein, A.M.; O'Banion, M.K. Neuroinflammation and memory: The role of prostaglandins. *Mol. Neurobiol.* **2009**, *40*, 15–32. [[CrossRef](#)]
11. Domiati, S.; El-Mallah, A.; Ghoneim, A.; Bekhit, A.; El Razik, H.A. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic activities, and side effects of some pyrazole derivatives. *Inflammopharmacology* **2016**, *24*, 163–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hoque, I.; Chatterjee, A.; Bhattacharya, S.; Biswas, R.; Auddy, S.; Mondal, K. A Review on different types of the Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *Int. J. Adv. Multidiscip. Res* **2016**, *3*, 41–51. [[CrossRef](#)]
13. Rodrigues, L.B.L.B.; Martins, A.O.B.P.B.; Ribeiro-Filho, J.; Cesário, F.R.A.S.; e Castro, F.F.; de Albuquerque, T.R.; Fernandes, M.N.M.; da Silva, B.A.F.; Júnior, L.J.Q.; de Sousa Araújo, A.A.; et al. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *109*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Carneiro, S.B.; Duarte, C.; Ilary, F.; Heimfarth, L.; Quintans, S.; de Souza, J.; Quintans-Júnior, L.J.; da Veiga Júnior, V.F.; Neves de Lima, Á.A. Cyclodextrin–drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 642. [[CrossRef](#)]
15. Rasheed, A.; VVNS, S.S.; Volltexte, S.A.F.A.B.; Rasheed, A.; VVNS, S.S. Cyclodextrins as drug carrier molecule: A review. *Sci Pharm* **2008**, *76*, 567–598. [[CrossRef](#)]
16. Menezes, P.; Araujo, A.; Doria, A.A.; Quintans-Junior, L.; GB de Oliveira, M.; RV dos Santos, M.; Oliveira, J.; Matos, J.; Carvalho, F.; Alves, P.; et al. Physicochemical characterization and analgesic effect of inclusion complexes of essential oil from *Hyptis pectinata* L. Poit leaves with beta-cyclodextrin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2015**, *16*, 440–450. [[CrossRef](#)]
17. Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1–11. [[CrossRef](#)]
18. de Oliveira Makson, G.; Guimarães, A.G.; Araújo Adriano, A.; Quintans Jullyana, S.; Santos, M.R.; Quintans-Júnior, L.J. Cyclodextrins: Improving the therapeutic response of analgesic drugs: A patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, *25*, 897–907. [[CrossRef](#)]
19. Lima, P.S.S.S.; Lucchese, A.M.; Araújo-Filho, H.G.; Menezes, P.P.; Araújo, A.A.S.S.; Quintans-Júnior, L.J.; Quintans, J.S.S.S. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 965–987. [[CrossRef](#)]
20. Oliveira, M.G.B.; Brito, R.G.; Santos, P.L.; Araújo-Filho, H.G.; Quintans, J.S.S.; Menezes, P.P.; Serafini, M.R.; Carvalho, Y.M.B.G.; Silva, J.C.; Almeida, J.R.G.S. A-Terpeneol, b-cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *254*, 4e62. [[CrossRef](#)]
21. Andrade, T.A.; Freitas, T.S.; Araújo, F.O.; Menezes, P.P.; Dória, G.A.A.; Rabelo, A.S.; Quintans-Júnior, L.J.; Santos, M.R.V.; Bezerra, D.P.; Serafini, M.R.; et al. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in β -cyclodextrin. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *89*, 201–207. [[CrossRef](#)]
22. Santos, P.L.; Brito, R.G.; Oliveira, M.A.; Quintans, J.S.S.; Guimarães, A.G.; Santos, M.R.V.; Menezes, P.P.; Serafini, M.R.; Menezes, I.R.A.; Coutinho, H.D.M.; et al. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 948–957. [[CrossRef](#)]
23. Raut, J.S.; Karuppaiyil, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *62*, 250–264. [[CrossRef](#)]
24. Kalaivani, K.; Sankaranarayanan, C. Isopulegol Ameliorates Dyslipidemia by Modulating Adipokine Secretion in High Fat Diet/Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *J. Drug Deliv. Ther.* **2019**, *9*, 126–136. [[CrossRef](#)]
25. Silva, M.I.G.; de Aquino Neto, M.R.; Neto, P.F.T.; Moura, B.A.; do Amaral, J.F.; de Sousa, D.P.; Vasconcelos, S.M.M.; de Sousa, F.C.F. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2007**, *88*, 141–147. [[CrossRef](#)]

26. Silva, M.I.G.; Moura, B.A.; de Aquino Neto, M.R.; da Rocha Tomé, A.; Rocha, N.F.M.; de Carvalho, A.M.R.; Macêdo, D.S.; Vasconcelos, S.M.M.; de Sousa, D.P.; de Barros Viana, G.S. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: Investigation of possible mechanisms of action. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **2009**, *380*, 233–245. [CrossRef]
27. Próspero, D.F.A.; Reis Filho, A.C.; Piauilino, C.A.; Lopes, E.M.; de Sousa, D.P.; de Castro Almeida, F.R. Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *293*, 55–60. [CrossRef]
28. Jaafari, A.; Tilaoui, M.; Mouse, H.A.; M'bark, L.A.; Aboufatima, R.; Chait, A.; Lepoivre, M.; Zyad, A. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: Relationship to cell cycle analysis. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, *22*, 534–540. [CrossRef]
29. Sankaranarayanan, C.; Kalaivani, K.; Isopulegol, A. Dietary Monoterpene Mitigates Hyperglycemia Mediated Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in HFD/STZ Induced Diabetic Rats. *Arch. Med. Res.* **2020**. [CrossRef]
30. Silva, M.I.G.; Silva, M.A.G.; de Aquino Neto, M.R.; Moura, B.A.; de Sousa, H.L.; de Lavor, E.P.H.; de Vasconcelos, P.F.; Macêdo, D.S.; de Sousa, D.P.; Vasconcelos, S.M.M. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. *Fitoterapia* **2009**, *80*, 506–513. [CrossRef]
31. Cadby, P. Novel estimates of the exposure to flavouring substances. *Toxicol. Lett.* **2004**, *149*, 215–222. [CrossRef]
32. Lambe, J.; Cadby, P.; Gibney, M. Comparison of stochastic modelling of the intakes of intentionally added flavouring substances with theoretical added maximum daily intakes (TAMDI) and maximized survey-derived daily intakes (MSDI). *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 2–14. [CrossRef]
33. Speijers, G.J.A. WHO food additives series 46: Pulegone and related substances. *Europe* **2001**, *50*, 1.
34. dos Passos Menezes, P.; Dória, G.A.A.; de Souza Araújo, A.A.; Sousa, B.M.H.; Quintans-Júnior, L.J.; Lima, R.N.; Alves, P.B.; Carvalho, F.M.S.; Bezerra, D.P.; Mendonça-Júnior, F.J.B. Docking and physico-chemical properties of α - and β -cyclodextrin complex containing isopulegol: A comparative study. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2016**, *85*, 341–354. [CrossRef]
35. OECD, O. Guidelines for testing of chemicals, acute oral toxicity-fixed dose procedure. *Organ. Econ. Coop. Dev.* **2001**. [CrossRef]
36. Malone, M.H.; Robichaud, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. In *Proceedings of the Lloydia; Lloydia: Gorakhpur, India, 1962; Volume 25*, p. 320.
37. Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Exp. Biol. Med.* **1962**, *111*, 544–547. [CrossRef]
38. Lo, T.N.; Almeida, A.P.; Beaven, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1982**, *221*, 261–267.
39. Lapa, A.J.; Souccar, C.; Lima-Landman, M.T.R.; Castro, M.S.; Lima, T.C.M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. *Soc. Bras. Plantas Med.* **2003**, *64*–66.
40. Maling, H.M.; Webster, M.E.; Williams, M.A.; Saul, W.; Anderson, W. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: Antagonists and mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1974**, *191*, 300–310.
41. Kawahara, K.; Hohjoh, H.; Inazumi, T.; Tsuchiya, S.; Sugimoto, Y. Prostaglandin E₂-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851*, 414–421. [CrossRef]
42. Systèmes, D. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio visualizer, v. 3.1. Available online: <https://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/> (accessed on 20 December 2019).
43. Wirtz, S.; Neufert, C.; Weigmann, B.; Neurath, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 541–546. [CrossRef] [PubMed]
44. Bradley, P.P.; Christensen, R.D.; Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* **1982**, *60*, 618–622. [CrossRef] [PubMed]
45. Sherwood, E.R.; Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2004**, *18*, 385–405. [CrossRef]

46. De Oliveira, A.M.; Conserva, L.M.; de Souza Ferro, J.N.; Brito, F.; Lemos, R.P.L.; Barreto, E. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of octacosanol from the leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 1598–1611. [[CrossRef](#)]
47. Lalitha, K.G.; Sethuraman, M.G. Anti-inflammatory activity of roots of *Ecolium viride* (Forsk) Merrill. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*, 248–250. [[CrossRef](#)]
48. Laveti, D.; Kumar, M.; Hemalatha, R.; Sistla, R.; Gm Naidu, V.; Talla, V.; Verma, V.; Kaur, N.; Nagpal, R. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: A review. *Inflamm. Allergy-Drug Targets (Formerly Curr. Drug Targets-Inflammation Allergy)* **2013**, *12*, 349–361. [[CrossRef](#)]
49. Opdyke, D.L.J. Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet. Toxicol.* **1973**, *11*, 1011–1081. [[CrossRef](#)]
50. Wang, W.; Mei, X.-P.; Chen, L.; Tang, J.; Li, J.-L.; Wu, S.-X.; Xu, L.-X.; Li, Y.-Q. Triptolide prevents and attenuates neuropathic pain via inhibiting central immune response. *Pain Physician* **2012**, *15*, E995–E1006.
51. Thomson, A.W.; Fowler, E. Carrageenan: A review of its effects on the immune system. *Agents Actions* **1981**, *11*, 265–273. [[CrossRef](#)]
52. Feghali, C.A.; Wright, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* **1997**, *2*, d12–d26.
53. Quintans, J.; Menezes, P.P.; Santos, M.R.V.; Bonjardim, L.R.; Almeida, J.R.G.S.; Gelain, D.P.; Araújo, A.A.; Quintans-Júnior, L.J. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 436–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lee, S.; Stubelius, A.; Hamelmann, N.; Tran, V.; Almutairi, A. Inflammation-Responsive Drug-Conjugated Dextran Nanoparticles Enhance Anti-Inflammatory Drug Efficacy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 40378–40387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Silva, F.V.; Guimarães, A.G.; Silva, E.R.S.; Sousa-Neto, B.P.; Machado, F.D.F.; Quintans-Júnior, L.J.; Arcanjo, D.D.R.; Oliveira, F.A.; Oliveira, R.C.M. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpane present in the essential oil of oregano. *J. Med. Food* **2012**, *15*, 984–991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. da Silva Lima, M.; Quintans-Júnior, L.J.; de Santana, W.A.; Kaneto, C.M.; Soares, M.B.P.; Villarreal, C.F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *699*, 112–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Martins, A.O.B.P.B.; Rodrigues, L.B.; Cesário, F.R.A.S.; de Oliveira, M.R.C.; Tintino, C.D.M.; Castro, F.F.; Alcântara, I.S.; Fernandes, M.N.M.; de Albuquerque, T.R.; da Silva, M.S.A.; et al. Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1,8-cineole (eucalyptol). *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96*, 384–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kim, S.-H.; Choi, C.-H.; Kim, S.-Y.; Eun, J.-S.; Shin, T.-Y. Anti-allergic effects of *Artemisia iwayomogi* on mast cell-mediated allergy model. *Exp. Biol. Med.* **2005**, *230*, 82–88. [[CrossRef](#)]
59. Osman, A.S.; Labib, D.A.; Kamel, M.M. Carvedilol can attenuate histamine-induced paw edema and formaldehyde-induced arthritis in rats without risk of gastric irritation. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *50*, 243–250. [[CrossRef](#)]
60. Claudino, R.F.; Kassuya, C.A.L.; Ferreira, J.; Calixto, J.B. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318*, 611–618. [[CrossRef](#)]
61. ur Rashid, H.; Yiming, X.; Ahmad, N.; Muhammad, Y.; Wang, L. Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E2, inducible NO synthase and nuclear factor κ B activities. *Bioorg. Chem.* **2019**. [[CrossRef](#)]
62. Joy, M.; Elrashedy, A.A.; Mathew, B.; Pillay, A.S.; Mathews, A.; Dev, S.; Soliman, M.E.S.; Sudarsanakumar, C. Discovery of new class of methoxy carrying isoxazole derivatives as COX-II inhibitors: Investigation of a detailed molecular dynamics study. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1157*, 19–28. [[CrossRef](#)]
63. Duggan, K.C.; Hermanson, D.J.; Musee, J.; Prusakiewicz, J.J.; Scheib, J.L.; Carter, B.D.; Banerjee, S.; Oates, J.A.; Marnett, L.J. (R)-Profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. De Santana Souza, M.T.; Almeida, J.R.G.; de Souza Araujo, A.A.; Duarte, M.C.; Gelain, D.P.; Moreira, J.C.F.; dos Santos, M.R.V. Quintans-Júnior, L.J. Structure–activity relationship of terpenes with anti-inflammatory profile—A systematic review. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *115*, 244–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Singh, S.; Pandey, V.P.; Naaz, H.; Singh, P.; Dwivedi, U.N. Structural modeling and simulation studies of human cyclooxygenase (COX) isozymes with selected terpenes: Implications in drug designing and development. *Comput. Biol. Med.* **2013**, *43*, 744–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Shimamura, T.; Shiroishi, M.; Weyand, S.; Tsujimoto, H.; Winter, G.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Liu, W.; Han, G.W. Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin. *Nature* **2011**, *475*, 65–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lundberg, C.; Gerdin, B. The inflammatory reaction in an experimental model of open wounds in the rat. The effect of arachidonic acid metabolites. *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *97*, 229–238. [[CrossRef](#)]
68. Menzies, S.A.; Hoff, J.T.; Betz, A.L. Extravasation of albumin in ischaemic brain oedema. In *Brain Edema VIII*; Springer: Vienna, Austria, 1990; pp. 220–222.
69. Loram, L.C.; Fuller, A.; Fick, L.G.; Cartmell, T.; Poole, S.; Mitchell, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J. Pain* **2007**, *8*, 127–136. [[CrossRef](#)]
70. Odobasic, D.; Kitching, A.R.; Holdsworth, S.R. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: The role of myeloperoxidase. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)]
71. Quintans-Júnior, L.J.; Guimarães, A.G.; de Santana, M.T.; Araújo, B.E.S.; Moreira, F.V.; Bonjardim, L.R.; Araújo, A.A.S.; Siqueira, J.S.; Antonioli, A.R.; Botelho, M.A. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 497–502. [[CrossRef](#)]
72. Riella, K.R.; Marinho, R.R.; Santos, J.S.; Pereira-Filho, R.N.; Cardoso, J.C.; Albuquerque-Junior, R.L.C.; Thomazzi, S.M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *143*, 656–663. [[CrossRef](#)]
73. De Cássia Da Silveira, E.; Sá, R.; Andrade, L.N.; De Sousa, D.P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* **2013**, *18*, 1227–1254. [[CrossRef](#)]
74. De, O.; Leite, G.; Leite, L.H.L.; De, S.; Sampaio, R.; Araruna, M.K.A.; De Menezes, I.R.A.; Da Costa, J.G.M.; Campos, A.R. (-)- α -Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 208–211. [[CrossRef](#)]
75. Moore, A.R. Pleural Models of Inflammation. In *Inflammation Protocols*; Springer: New York, NY, USA, 2003; pp. 123–128.
76. Sedgwick, A.D.; Lees, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions* **1986**, *18*, 439–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mazzon, E.; Esposito, E.; Di Paola, R.; Muia, C.; Crisafulli, C.; Genovese, T.; Caminiti, R.; Meli, R.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S. Effect of tumour necrosis factor- α receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: A comparison with etanercept. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *153*, 136–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Dinarello, C.A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 457–499. [[CrossRef](#)]
79. Utsunomiya, I.; Ito, M.; Oh-ishi, S. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. *Cytokine* **1998**, *10*, 956–963. [[CrossRef](#)]
80. Quintans, J.S.S.; Shanmugam, S.; Heimfarth, L.; Araújo, A.A.S.; Almeida, J.R.G.; Picot, L.; Quintans-Júnior, L.J. Monoterpenes modulating cytokines—a review. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *123*, 233–257. [[CrossRef](#)]
81. Chang, Y.-C.; Yang, S.-F.; Huang, F.-M.; Liu, C.-M.; Tai, K.-W.; Hsieh, Y.-S. Proinflammatory cytokines induce cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human pulp cell cultures. *J. Endod.* **2003**, *29*, 201–204. [[CrossRef](#)]
82. Adams, D.O. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am. J. Pathol.* **1976**, *84*, 164.
83. Roos, D. Chronic granulomatous disease. In *NADPH Oxidases*; Springer: New York, NY, USA, 2019; pp. 531–542.
84. Rieber, N.; Hector, A.; Kuijpers, T.; Roos, D.; Hartl, D. Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, *2012*. [[CrossRef](#)]
85. Behrens, E.M. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: What is the role of the antigen presenting cell? *Autoimmun. Rev.* **2008**, *7*, 305–308. [[CrossRef](#)]
86. Kumar, V. *Robbins & Cotran- Patologia Bases Patológicas das Doenças 8a Edição*; Elsevier: Rio de Janeiro, Brasil, 2010; ISBN 8535246339.

87. Venturini, C.; Nicolini, J.; Machado, C.; Machado, V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 360–368. [[CrossRef](#)]
88. Da Silva Pires, Y.M.; Almeida, L.R.; Meirelles, L.M.A. Perfil de dissolução do tenoxicam em complexos de inclusão de beta-ciclodextrinas. *Rev. Eletrônica Farmácia* **2016**, *13*, 64–70. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4. CAPÍTULO III

Manuscrito 1: Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do isopulegol e seu complexo em ciclodextrina usando modelos de nocicepção aguda em camundongos

Submetido na revista *Food Chemistry*

Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do isopulegol e seu complexo em ciclodextrina usando modelos de nocicepção aguda em camundongos

Andreza Guedes Ramos Barbosa¹, Lucas Yuri Santos da Silva¹, Renata Torres Pessoa¹, Luiz Jardelino de Lacerda Neto¹, Roger Henrique Sousa da Costa¹, Anita Oliveira Pereira Bezerra Brito Martins¹, Maria Rayane Correia de Oliveira¹, Henrique Douglas Melo Coutinho², Lucindo José Quintans Junior³, Irwin Rose Alencar de Menezes¹

¹ Laboratório de Farmacologia e Química Molecular; Departamento de Química Biológica; Universidade Regional do Cariri; Rua Coronel Antônio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brazil.

² Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular; Departamento de Química Biológica; Universidade Regional do Cariri; Rua Coronel Antônio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brazil.

³ Laboratório de Neurociências e ensaios farmacológicos; Departamento de Fisiologia; Universidade Federal de Sergipe; Avenida Marechal Rondon, S/N, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

RESUMO

O isopulegol é um composto terpênico comumente presente em óleos essenciais de várias plantas aromáticas e pode apresentar várias atividades farmacológicas importantes. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito antinociceptivo do monoterpene isopulegol (ISO) e seu complexo de inclusão em β -ciclodextrinas (ISO/CD), bem como investigar as vias de sinalização envolvidas na resposta antinociceptiva. Foram avaliados os efeitos do ISO e ISO/CD sobre o sistema nervoso central (SNC) por meio dos ensaios de campo aberto e rota rod e o efeito antinociceptivo em modelos de formalina, contorções abdominais por ácido acético, placa quente e hipernocicepção mecânica plantar. Camundongos machos e fêmeas (*Mus musculus*), pesando entre 20-30 g foram divididos em grupos de 6 animais. A administração oral de isopulegol e de seu complexo mostraram efeito antinociceptivo significativos nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg para ensaio de formalina e para o de contorções abdominais, com destaque para a dose de 10 mg/kg do ISO e ISO/CD em ambos os ensaios. Desta forma, a dose de 10 mg/kg foi selecionada para avaliação dos efeitos sobre SNC, efeito antinociceptivo central e periférico e avaliação das vias de sinalização envolvida no potencial analgésico. O ISO e o ISO/CD, ambos na dose de 10 mg/kg v.o., não apresentaram alterações sobre os parâmetros avaliados do SNC e os resultados sugeriram haver ação antinociceptiva aguda nos testes de formalina, contorções abdominais, placa quente e hipernocicepção mecânica plantar, propondo o envolvimento das vias de sinalização opioide, canais de potássio, colinérgica, óxido nítrico, via monofosfato cíclico de

guanosina, vaniloide e glutamatérgica. Os resultados sugerem que o ISO e o ISO/CD apresentam um potencial antinociceptivo promissor, como possível alternativa para o tratamento farmacológico da dor, demonstrando que a inclusão do ISO em ciclodextrinas aperfeiçoa as suas propriedades farmacológicas, uma vez que o processo de complexação envolve quantidades bem inferiores do composto o que contribui para melhor biodisponibilidade e menor probabilidade do desenvolvimento de efeitos colaterais.

Palavras-chave: isopulegol; nocicepção; ciclodextrinas.

1 INTRODUÇÃO

A dor se apresenta como uma resposta adaptativa essencial para a manutenção da integridade do organismo frente a estímulos que gerem danos teciduais reais ou potenciais (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2016). É uma experiência complexa que envolve componentes sensório-discriminativos, afetivo-motivacionais e cognitivo-emocionais, processada por uma complexa rede neural, abrangendo diversos mecanismos (CAO *et al.*, 2014). Embora dor e nocicepção sejam considerados termos distintos, a dor não pode acontecer sem a nocicepção, um processo que envolve a detecção de estímulos que possam vir a ser prejudiciais, com consequente comportamento reflexo imediato e defensivo (SNEDDON, 2018). Logo, a nocicepção é um mecanismo sensorial crítico para a sobrevivência animal, permitindo a detecção de estímulos prejudiciais e prevenção de danos teciduais (TRACEY, 2017). Entretanto, a dor é sinal cognitivo que interfere na capacidade produtiva do ser humano afetando a sua qualidade de vida de maneira transitória ou permanente, sendo uma manifestação clínica frequente, consequência de diversos processos patológicos (PEURA; GOLDKIND, 2005). Os principais desafios no gerenciamento das condições dolorosas agudas e crônicas surgem como resultado do desconhecimento e da não compreensão dos mecanismos da dor (MENDONÇA *et al.*, 2010) e dos efeitos colaterais decorrentes do tratamento terapêutico.

Li *et al.*, (2009) afirmam que historicamente, a maioria dos novos medicamentos disponíveis no mercado tem sido gerada a partir de produtos naturais ou compostos derivados de produtos naturais. Apesar de um número substancial de medicamentos analgésicos estar disponível para o tratamento da dor, a busca por novas drogas como alternativas terapêuticas continua (AMARAL *et al.*, 2007), já que, o manejo farmacológico da dor traz por muitas vezes efeitos colaterais indesejáveis e potencial de tolerância e dependência farmacológica.

Considerando o seu baixo custo e fácil disponibilidade, os produtos naturais podem ser utilizados na síntese de drogas mais seletivas (GONCALVES *et al.*, 2008) incluindo novos

agentes analgésicos. Os terpenos são considerados uma das maiores classes de metabólitos secundários (PERVEEN; AL-TAWEEL, 2018) cuja funções variam desde termoproteção e aromatizante, sendo também utilizados por suas propriedades medicinais (YANG *et al.*, 2012). Dentre os terpenos, os monoterpenos constituem um grupo com várias atividades biológicas (QUINTANS *et al.*, 2019), sendo compostos relevantes devido às suas atividades farmacológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórios, antitumorais, cardioprotetores, neuroprotetores, entre outros (JAKARIA *et al.*, 2018).

Dentre os monoterpenos oxigenados, o isopulegol (p-Menth-8-en-3-ol, C₁₀H₁₈O) é composto comumente presente em óleos essenciais de várias plantas aromáticas e pode apresentar várias atividades farmacológicas importantes como a atividade protetora sobre células beta pancreáticas e estímulo à secreção de insulina em ratos diabéticos (KALAIVANI; SANKARANARAYANAN, 2019), potencial agente anticancerígeno contra carcinoma de pulmão (VELU, 2020), atividade gastroprotetora (SILVA *et al.*, 2009), anti-inflamatória e antiedematogênica (RAMOS *et al.*, 2020) e ação antinociceptiva (PRÓSPERO *et al.*, 2018).

Uma importante limitação na aplicação dos monoterpenos, entre eles o isopulegol, como potenciais terapêuticos está na sua volatilidade, meia-vida curta devido processos oxidativos e baixa solubilidade em sistemas aquosos (CHEN, Y. *et al.*, 2015; HAMOUDI *et al.*, 2012) que dificultam sua aplicação terapêutica. Neste sentido, várias abordagens fisicoquímicas e farmacotécnicas visam aprimorar suas propriedades farmacológicas, incluindo sistemas de incorporação que tenham por finalidade reduzir sua perda por volatilidade, aumentar a solubilidade desses compostos em água e conseqüentemente sua biodisponibilidade (MENEZES *et al.*, 2012; MOURTZINOS *et al.*, 2008; SERAFINI *et al.*, 2010). Desta forma, a biodisponibilidade oral de substâncias com características físico-químicas semelhantes as do isopulegol, podem ser modificadas a partir do uso de formulações nanoestruturadas como nanopartículas (VENTURINI *et al.*, 2011), micropartículas (RASSU *et al.*, 2015) e complexação em ciclodextrinas (MENEZES *et al.*, 2013; PINHO *et al.*, 2014) aperfeiçoando a solubilidade, dissolução e taxas de biodisponibilidade de substâncias com potencial terapêutico pouco solúveis em água (ABDOH *et al.*, 2007; AL-MARZOUQI *et al.*, 2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar, de forma comparativa, a atividade antinociceptiva do isopulegol e seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina (β -CD) em modelos animais, bem como investigar as possíveis de sinalização envolvidas na resposta antinociceptiva.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os compostos utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todas as substâncias foram preparadas imediatamente antes das administrações por via oral, intraperitoneal, intraplantar e subcutânea, de acordo com o peso dos animais (0,1 mL/10 g de massa corporal) e protocolos específicos. Isopulegol e seu complexo em β -ciclodextrina (complexação de pasta, H₂O: 12,465 \pm 0,71%; óleo de superfície: 0,86%; óleo total: 59,62%; complexo ISOP: 58,76% e razão de complexação: 1: 68,3%) foram fornecidos por Dr. Lucindo Quintans da Universidade Federal de Sergipe – UFS (PASSOS MENEZES DOS *et al.*, 2016).

2.1 Animais

Camundongos *Swiss* machos e fêmeas (*Mus musculus*) pesando entre 20-30 g, foram obtidos na Unidade de Contenção de Animais da Universidade Regional do Cariri. Os animais foram alojados com ração e água *ad libitum* (Labina, Purina, Brasil) em sala com temperatura controlada de 22 a 24°C, em ciclo claro/escuro de 12 h. Previamente aos experimentos, os animais foram mantidos no Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) da Universidade Regional do Cariri – URCA - por um período de 24 h para aclimação. O estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri (CEUA Nº 120/2018-GR).

2.2 Ensaios

Para avaliação do efeito antinociceptivo foram realizados os seguintes protocolos: teste de formalina 2,5%, contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%, placa quente e teste de hiperalgesia mecânica plantar. Os animais foram divididos em grupos (n = 6) com tratamento com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g/ v.o.), ISO e ISO/CD (1, 5 e 10 mg/kg v.o.) no teste de triagem de formalina e contorções abdominais. Para os demais ensaios e avaliação das vias de sinalização da dor foi utilizada a menor dose efetiva de ISO e ISO/CD - 10 mg/kg - definida nos protocolos anteriores de triagem. Para a avaliação da sinalização da dor envolvida na resposta antinociceptiva foram investigadas as vias opioide, canais K⁺_{ATP}, colinérgica, adrenérgica α 2, óxido nítrico, adenosinérgica, dopaminérgica, vaniloide, glutamatérgica e monofosfato cíclico de guanosina.

2.3 Efeito do ISO e ISO/CD no Sistema Nervoso Central (SNC)

A avaliação da influência do ISO e ISO/CD no sistema nervoso central foi realizada apenas com a menor dose efetiva de 10 mg/kg utilizando os ensaios de campo aberto e Rota Rod.

2.3.1 Campo aberto

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram tratados como segue: solução salina 0,9% (0,1mL/10 g), ISO e ISO/CD (10 mg/kg). Após 1 h (v.o) os animais foram colocados individualmente em campo aberto por um período de 5 min, onde foram registrados seus comportamentos de exploração horizontal (número de travessias), comportamento de autolimpeza (“*grooming*”) e exploração vertical (“*rearing*”) (ARCHER, 1973).

2.3.2 Rota-rod

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram selecionados e pré-treinados com até 3 sessões (1 min) 24h antes do tratamento. Os animais selecionados foram divididos em grupos e tratados respectivamente com solução salina 0,9% (0,1mL/10 g), ISO e ISO/CD (10 mg/kg) onde após 1 h (v.o.) os animais foram colocados no aparelho *rota-rod* por 1 min (16 rpm) e o número de quedas foi registrado (DUNHAM, 1957).

2.4 Triagem do efeito antinociceptivo

2.4.1 Teste da formalina (2,5%)

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram tratados com solução salina 0,9% (0,1mL/10 g), ISSO e ISO/CD (1, 5 e 10 mg/kg). Após 1 h (v.o.), os animais foram injetados com 20 µL de formalina (2,5%) na pata direita traseira (espaço subplantar) e colocados individualmente logo em seguida sob um funil de vidro invertido, próximo a um espelho para facilitar a observação. O tempo foi registrado (segundos), em que o animal lambeu, continuou lambendo ou mordendo a pata injetada (“*licking time*”) durante a primeira fase, atribuído à fase neurogênica (0-5 min.) e segunda fase caracterizada como inflamatória (15-30 min) (TJØLSEN *et al.*, 1992).

2.4.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%)

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram tratados com solução salina 0,9% (0,1mL/10 g), ISO e ISO/CD (1, 5 e 10 mg/kg). Após 1 h (v.o.) dos tratamentos, os animais receberam ácido acético glacial PA (0,6%/0,1 mL/10 g i.p.) diluído em água para injeção. Após a administração de ácido acético, os animais foram colocados sob funis de vidro transparentes individuais por 30 min e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente e caracterizado pela contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras (STEVENSON; BILSKY; NEGUS, 2006).

2.5 Avaliação da ação antinociceptiva central e periférica do ISO e ISO/CD

2.5.1 Placa Quente

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram colocados individualmente em uma placa quente ($52-54^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e após a obtenção de dois valores basais 24 h e 30 min antes do teste, os camundongos foram tratados (v.o.) de acordo com os grupos: solução salina 0,9% (0,1mL/10 g), ISO e ISO/CD (10 mg/kg). Em seguida, a resposta foi avaliada após 30, 60, 120 e 180 min após a administração do tratamento com o tempo máximo de contato do animal com a placa quente sendo mantido em 15 s (tempo de corte basal) e 30 s (tempo de corte-teste) para evitar lesões nas patas. A resposta nociceptiva foi caracterizada por agitação das patas traseiras, lambeu ou levantar a pata ou pulos na placa (JACOB; RAMABADRAN, 1978). Para comparar os efeitos ao longo do tempo, a porcentagem de cada grupo foi calculada usando o efeito médio observado em todos os momentos.

2.5.2 Teste de hiperalgesia mecânica plantar

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 3 grupos tratados com solução salina 0,9% (0,1mL/10 g), ISO e ISO/CD (10 mg/kg). Após 60 min (v.o.) dos tratamentos, todos os animais foram injetados com 20 μL de CFA (2,5%) na pata traseira direita. Os animais foram colocados individualmente em caixas de vidro sobre superfície elevada e cobertas com tela de arame. Os estímulos foram aplicados com o filamento do anestesiômetro Von Frey na superfície plantar injetada. O aparelho registra a força em gramas suficiente para retirar a pata em contato com o filamento (VRINTEN; HAMERS, 2003). Foram consideradas respostas positivas aquelas em que o animal realizou movimentos de retirada, seguidos de estremecimento após estimulação mecânica. Todos os testes foram realizados após a obtenção de duas medidas basais (com intervalo de 24 h) (MARTINOV *et al.*, 2013). Após a injeção de CFA, cada animal foi avaliado em 1, 2, 3, 4 e 24 h. Os resultados foram expressos como a média da diferença entre o valor basal e após a injeção de CFA (Δ), nos períodos de tempo citados (OLIVEIRA *et al.*, 2015; YOWTAK *et al.*, 2011).

2.6 Vias de sinalização da dor envolvidas na resposta antinociceptiva ISO e ISO/CD (opióide, canais de potássio, colinérgico, $\alpha 2$ adrenérgico, óxido nítrico, adenosinérgico, dopaminérgico, vanilóide, glutamatérgico e monofosfato cíclico de guanosina)

2.6.1 Participação do sistema opioide

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 8 grupos, de modo que os primeiros 4 grupos foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g), agonista opioide morfina (5 mg/kg s.c.), ISO e ISO/CD (10 mg/kg) respectivamente, enquanto os 4 grupos restantes receberam naloxona - antagonista opioide (4 mg/kg i.p.) 15 min antes do tratamento. Após 1 h

(v.o.) ou 30 min (s.c.) dos tratamentos, os animais foram avaliados com o teste de nocicepção induzida por formalina a 2,5% (0-5 min.) (STEVENSON; BILSKY; NEGUS, 2006).

2.6.2 Participação dos canais K^+_{ATP}

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 6 grupos para a avaliação da participação dos canais K^+_{ATP} no efeito antinociceptivo dos compostos, onde 4 grupos foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g), glibenclamida (um bloqueador de canais K^+_{ATP}), ISO e ISO/CD (10 mg/kg). Outros 2 grupos foram previamente tratados com glibenclamida (3 mg/kg, i.p.) e após 30 min receberam o ISO ou ISO/CD (10 mg/kg). A resposta nociceptiva foi avaliada após 1 h (v.o.) ou 30 min (i.p.) dos tratamentos, através do teste de nocicepção induzida por formalina a 2,5% (0-5 min) (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

2.6.3 Participação da via L-arginina/Óxido nítrico/cGMP

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 8 grupos, onde os primeiros 4 grupos foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g), L-NOARG (inibidor de óxido nítrico sintase-NOS; 75 mg/kg, i.p.), ISO e ISO/CD (10 mg/kg), enquanto os outros 4 grupos foram pré-tratados com L-Arginina (substrato da NOS 600 mg/kg i.p.), 15 min antes do tratamento com ISO ou ISO/CD. Em seguida, 1 h (v.o.) ou 30 min (i.p.) após o tratamento, os animais foram avaliados através do teste de nocicepção induzida por formalina a 2,5% (0-5 min) (SCHMIDTKO; TEGEDER; GEISLINGER, 2009).

2.6.4 Participação da via do monofosfato cíclico de guanosina

Para verificar o envolvimento do monofosfato cíclico de guanosina na antinocicepção causada pelos compostos em estudo, os animais foram pré-tratados com o azul de metileno (20 mg/kg, i.p.), um inibidor de guanilato ciclase, 15 min antes da administração do ISO e ISO/CD (10 mg/kg). Além disso, outros grupos foram tratados apenas com ISO ou ISO/CD (10 mg/kg) ou azul de metileno (20 mg/kg, i.p.). A resposta nociceptiva foi avaliada após 1 h (v.o.) ou 15 min (i.p.) dos tratamentos, através da injeção intraplantar de 20 μ L de solução de formalina e quantificado o tempo de lambertura da pata (0-5 min) (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

2.6.5 Participação do sistema colinérgico

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 8 grupos, onde os 4 primeiros grupos foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g), acetilcolina (agonista colinérgico 1 mg/kg i.p.), ISO ou ISO/CD (10 mg/kg), enquanto os outros 4 grupos foram pré-tratados com atropina (antagonista colinérgico não seletivo 1 mg/kg i.p.) 15 min antes do tratamento com ISO

ou ISO/CD. Em seguida, 1 h (v.o.) ou 30 min (i.p.) após o tratamento, os animais foram avaliados em relação ao teste de formalina a 2,5% (0–5 min) (SCHECHTMANN *et al.*, 2008).

2.6.6 Participação do receptor α -2 adrenérgico

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 8 grupos, onde os 4 primeiros grupos foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g v.o.), clonidina (α -2 agonista 0,1 mg/kg i.p.), ISO e ISO/CD (10 mg/kg), enquanto os outros 4 grupos receberam ioimbina (antagonista α -2 - 0,15 mg/kg i.p.) 15 min antes do tratamento com ISO ou ISO/CD. Em seguida, 1 h (v.o.) ou 30 min (i.p.) após o tratamento os animais foram avaliados em relação ao teste de formalina a 2,5% (0-5 min) (SANTOS *et al.*, 2005).

2.6.7 Participação do sistema vanilóide

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 4 grupos que foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g), vermelho de rutênio (antagonista TRP não seletivo 3 mg/kg i.p.) (TOMINAGA *et al.*, 1998), ISO e ISO/CD (10 mg/kg). Então, 1 h (v.o.) ou 30 min (i.p.) após o tratamento os animais foram analisados por 5 min em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 μ l de capsaicina (agonista do receptor TRPV1) a 5,2 nmol/pata (MANTOVANI *et al.*, 2006) onde o tempo (segundos) em que o animal passou lambendo a pata foi considerado como sugestivo de dor.

2.6.8 Participação do sistema dopaminérgico

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 6 grupos: os primeiros 4 grupos foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g), haloperidol (antagonista não seletivo do receptor de dopamina 2 mg/kg i.p.), ISO e ISO/CD (10 mg / kg), enquanto os outros 2 grupos foram pré-tratados com haloperidol 15 min antes do tratamento com ISO ou ISO/CD. Em seguida, 1 h (v.o.) ou 30 min (i.p.) após o tratamento os animais foram avaliados em relação ao teste de formalina a 2,5% (0–5 min) (FINAN; SMITH, 2013).

2.6.9 Participação do sistema adenosinérgico

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 6 grupos: os primeiros 4 grupos foram tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g), cafeína (10 mg/kg i.p.), ISO e ISO/CD (10 mg/kg), enquanto os outros 2 grupos foram pré-tratados com cafeína 15 min antes do tratamento com ISO ou ISO/CD. Em seguida, 1 h (v.o.) ou 30 min (i.p.) após o tratamento os animais foram avaliados em relação ao teste de formalina a 2,5% (0–5 min) (FERRÉ *et al.*, 2007).

2.6.10 Participação do sistema glutamatérgico

Camundongos *Swiss* (n = 6) foram divididos em 4 grupos tratados com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g), ácido ascórbico (antagonista do receptor NMDA 100 mg/kg i.p.), ISO e ISO/CD (10 mg/kg). Então, 1 h (v.o.) ou 30 min (i.p.) após o tratamento os animais foram analisados por 15 min em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 µl de glutamato tamponado a 20 µmol/pata, onde o tempo (segundos) que o animal passou lambendo a pata foi considerado um parâmetro sugestivo de dor (ZERAATI; ARAGHCHIAN; FARJOO, 2014).

2.7 Expressão dos dados e análise estatística

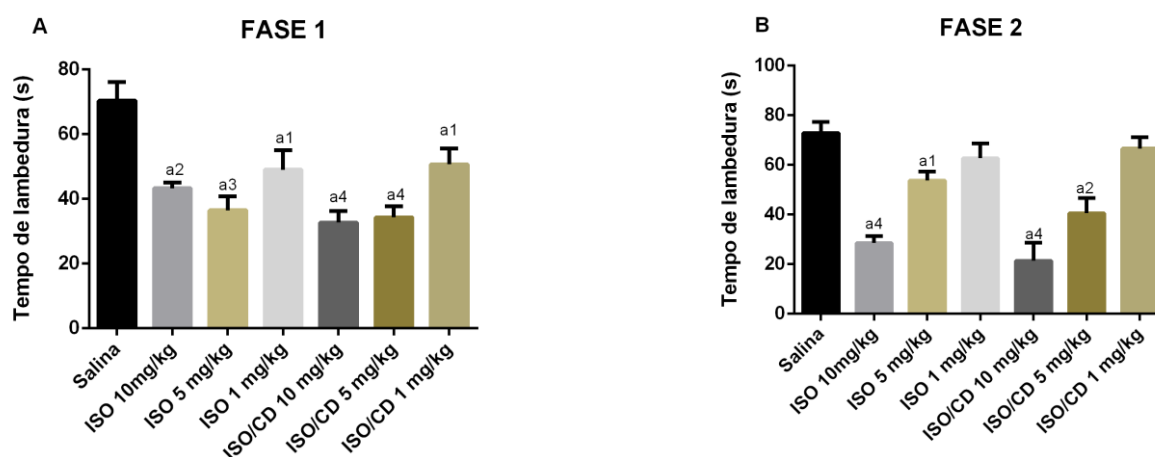
Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E. P. M), avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via e ou de duas vias, utilizando os testes de múltipla comparação de Tukey, sendo os cálculos realizados a partir do *software* estatístico *GraphPad Prism* (versão 6.0), de acordo com os valores obtidos nos testes. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Triagem do efeito antinociceptivo

3.1.1 Teste da formalina (2,5%)

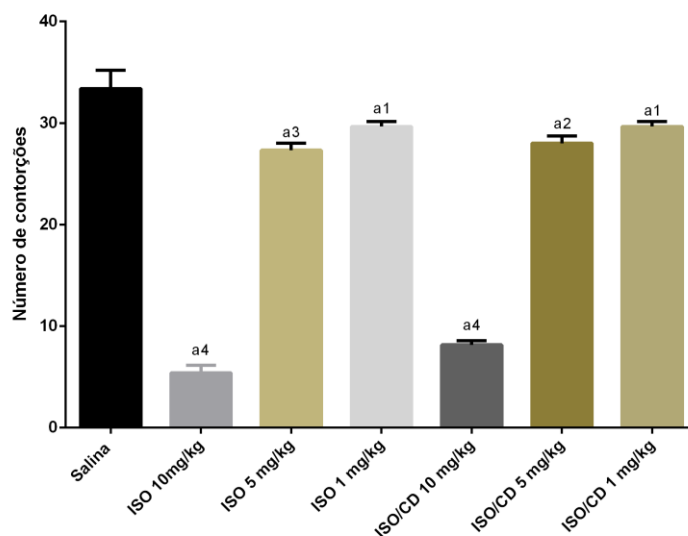
Na primeira fase (fase neurogênica: 0-5 min) o ISO (10, 5 e 1 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de lambida da pata injetada com formalina em 38,5, 48,1 e 30,3% respectivamente quando comparado ao grupo solução salina, enquanto o ISO/CD (10, 5 e 1 mg/kg) reduziu em 53,5, 51,2 e 27,9% respectivamente o tempo de lambadura da pata (Figura 01A). Na segunda fase (fase inflamatória: 15-30 min), apenas as doses de 10 e 5 mg/kg de ISO demonstraram uma redução significativa no tempo de lambida da pata em 60,9 e 26,2%, enquanto o ISO/CD, também nas doses de 10 e 5 mg/kg, reduziu esse tempo em 70,7 e 44,3% respectivamente (Figura 01B) ambos quando comparados ao grupo salina. Embora os resultados entre os grupos tratados com ISO e ISO/CD não difiram entre si, o grupo ISO/CD apresenta características farmacológicas aperfeiçoadas pelas ciclodextrinas, já que o processo de complexação envolve quantidades bem menores do composto puro complexado.

Figura 01 – Efeito do ISO e ISO/CD (10, 5 e 1 mg/kg/v.o.) no teste de formalina

Efeito do ISO e ISO/CD (10, 5 e 1 mg/kg/v.o.) no teste de formalina. (A) Primeira fase (0-5 min) e (B) Segunda fase (15-30 min). Valores representam a média \pm S.E.M. (n=6/grupo). Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey com múltiplas comparações (a1 p <0.05; a2 p <0.01; a3 p <0.001; a4 p <0.0001 vs. grupo salina).

3.1.2 Contorções abdominais por ácido acético

As doses de ISO e ISO/CD (10, 5 e 1 mg/kg) reduziram significativamente o número de contorções abdominais em 83,8, 18,3 e 11,1% respectivamente para ISO e 75,5, 16,2 e 11,2% para ISO/CD respectivamente quando comparado ao grupo salina (Figura 02).

Figura 02 – Efeito do ISO e ISO/CD (10, 5 e 1 mg/kg/v.o.) no teste de contorções abdominais por ácido acético.

Efeito do ISO e ISO/CD (10, 5 e 1 mg/kg/v.o.) no teste de contorções abdominais por ácido acético. Valores representam a média \pm S.E.M. (n=6/grupo). Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey com múltiplas comparações (a1 p <0.05; a2 p <0.01; a3 p <0.001; a4 p <0.0001 vs. grupo salina).

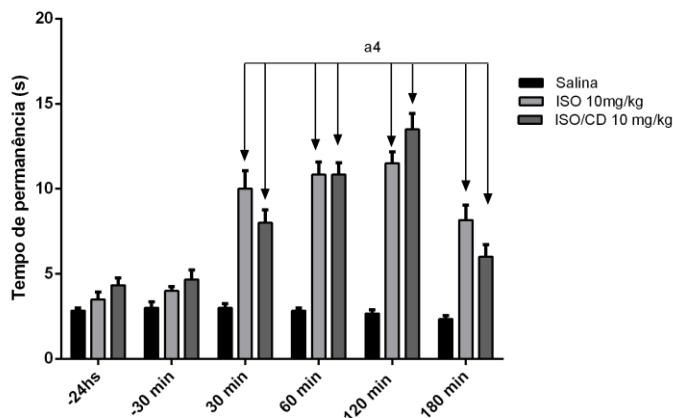
3.2 Avaliação da ação antinociceptiva central e periférica do ISO e ISO/CD

Para avaliação do mecanismo central e periférico, e possível via envolvida na ação antinociceptiva utilizamos apenas a dose mais efetiva de ISO e ISO/CD - 10mg / kg.

3.2.1 Placa Quente

O tratamento com ISO (10 mg/kg) aumentou o tempo de permanência da placa em 71,21%, enquanto o ISO/CD (10 mg/kg) aumentou o tempo de permanência em 71,61% quando comparado ao grupo salina no intervalo de tempo de 30 a 180 minutos (Figura 03).

Figura 03 – Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) no tempo de permanência na placa quente

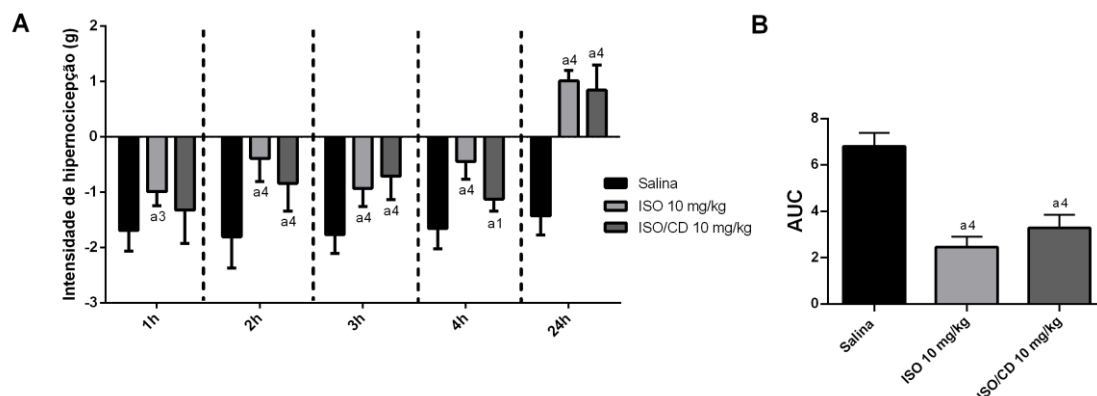


Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) no tempo de permanência na placa quente. Valores representam a média \pm S.E.M. (n=6/grupo). Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey com múltiplas comparações (a1p<0.05; a2p<0.01; a3p<0.001; a4p<0.0001 vs. grupo salina).

3.2.2 Teste de hipernociceção mecânica por pressão - Von Frey

O tratamento com ISO e ISO/CD na dose de 10 mg/kg, apresentaram efeitos antinociceptivos significativos no teste de hipernociceção mecânica plantar, ambos a partir da segunda hora de avaliação do teste, aumentando o tempo de resposta do animal à pressão. Pode-se observar que o ISO e o ISO/CD aumentaram o tempo de latência da pata do animal em 63,84 e 51,75% respectivamente quando comparados ao grupo salina (Figura 04A e 04B).

Figura 04 – Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) sobre a hipernociceção mecânica plantar analisada por aparelho de Von Frey



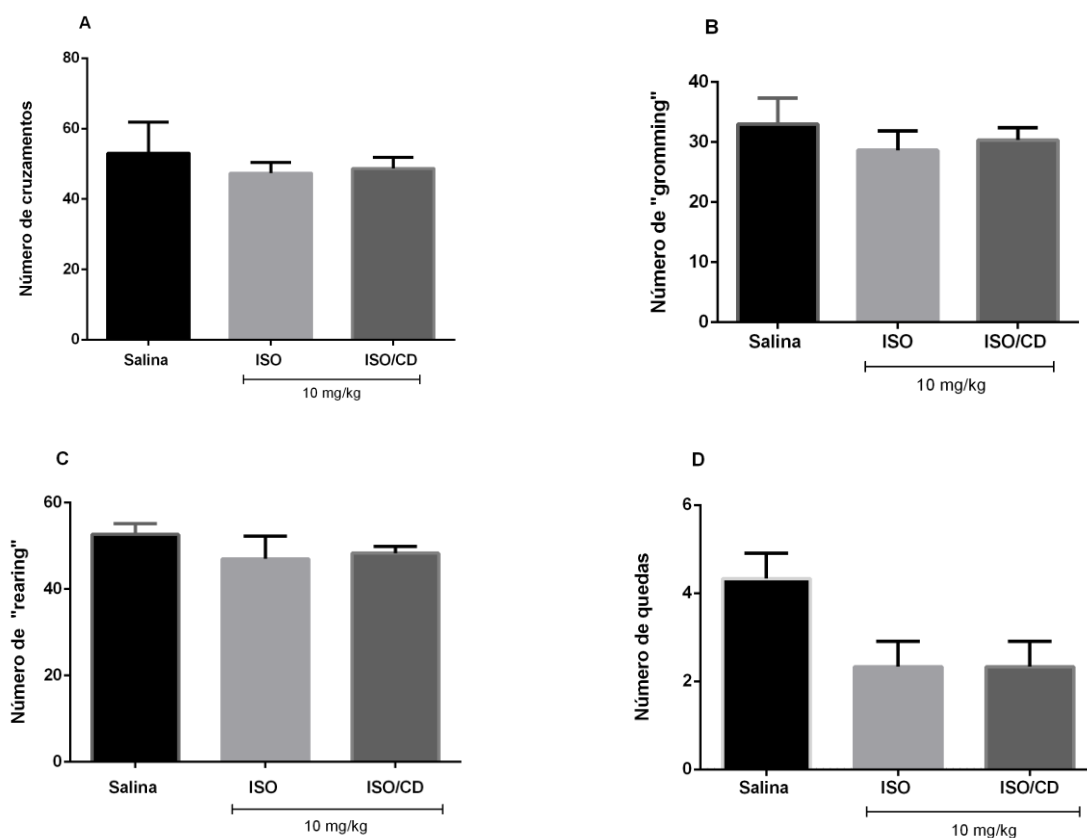
Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) no teste de hipernociceção mecânica plantar. (A) Efeito ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) em função dos tempos de avaliação; (B) Resultados do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) em função do efeito. Valores representam a média \pm S.E.M. (n=6/grupo). Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey com múltiplas comparações (a1p<0.05; a2p<0.01; a3p<0.001; a4p<0.0001 vs. grupo salina).

3.3 Efeito do ISO e ISO/CD no Sistema Nervoso Central (SNC)

O tratamento oral com ISO e ISO/CD (10 mg/kg) não alterou o número de cruzamentos com percentuais de 90 e 92,4% respectivamente (Figura 05A). Com relação ao comportamento de autolimpeza (“grooming”) os percentuais observados foram 86,6 e 91,8% (Figura 05B), e em relação ao comportamento exploratório vertical (“rearing”) foram 89% e 91,8% (Figura 05C) respectivamente, quando comparado ao grupo solução salina.

O tratamento oral com ISO e ISO/CD (10 mg/kg) não apresentou diferenças significativas quanto ao número de quedas quando comparado ao grupo solução salina (Figura 05D). Então, esses resultados demonstram que o ISO e ISO/CD (10 mg/kg) não apresentam efeito depressor sobre o SNC ou redução do reflexo da resposta motora.

Figura 05 - Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) no teste de campo aberto (A, B e C) e no teste de rota rod (D)



Efeito do ISO e ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) no (A) número de cruzamentos (B), autolimpeza ou “grooming” e (C) exploração vertical ou “rearing” no teste do campo aberto; (D) Teste do Rota Rod. Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey com múltiplas comparações ($a1p < 0.05$; $a2p < 0.01$; $a3p < 0.001$; $a4p < 0.0001$ vs. grupo salina).

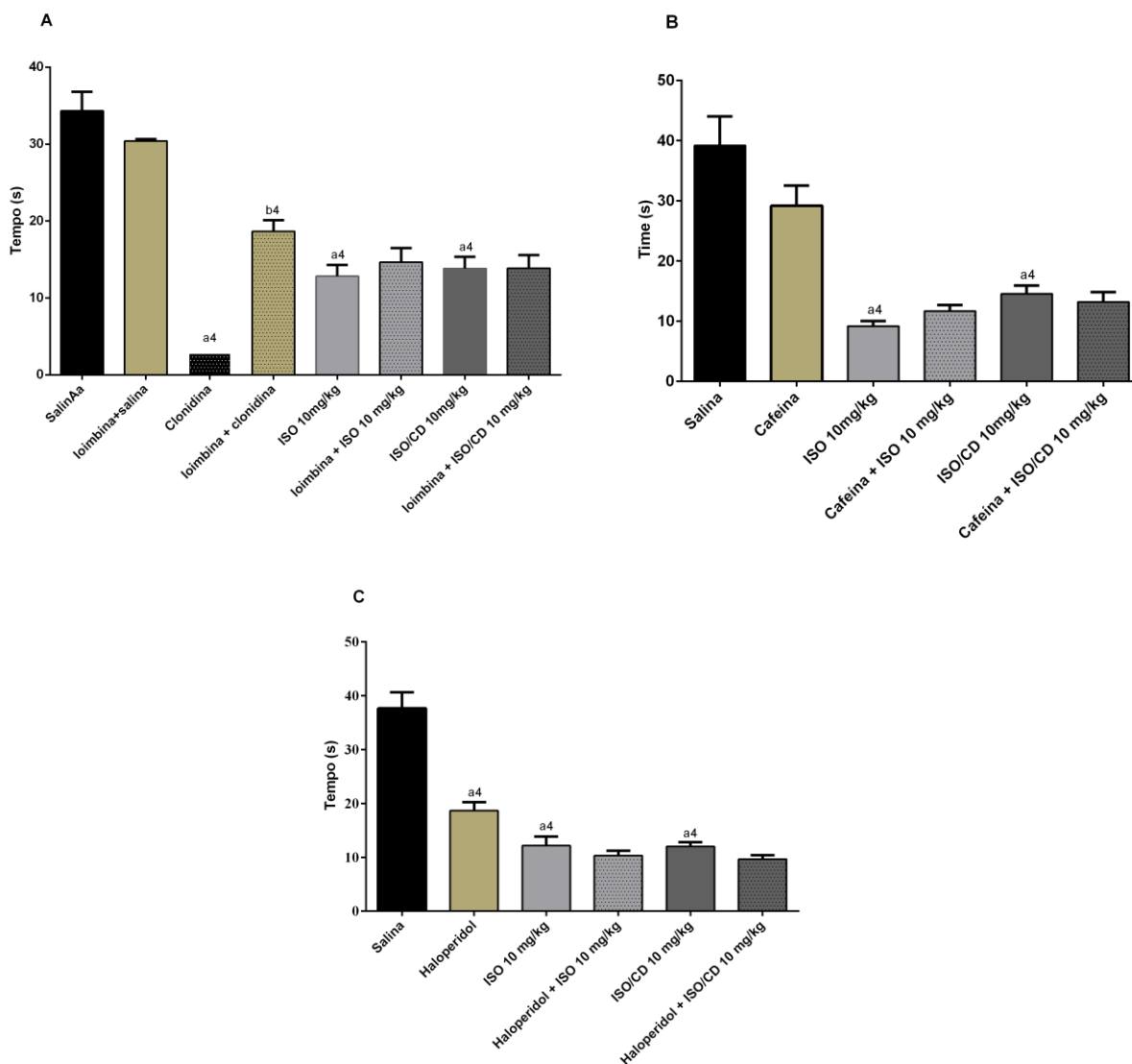
3.4 *Vias de sinalização de dor envolvidas na resposta antinociceptiva do ISO e ISO/CD (opióide, canais de potássio (K^+_{ATP}), colinérgico, α 2-adrenérgico, óxido nítrico, adenosinérgico, dopaminérgico, vanilóide, glutamatérgico e monofosfato cíclico de guanosina)*

Os resultados demonstraram não haver envolvimento do receptor α 2-adrenérgico, das vias adenosinérgica e dopaminérgica no mecanismo de antinocicepção do isopulegol e seu complexo de inclusão. Ao avaliar a relação com os receptores α 2-adrenérgicos, o pré-tratamento com um antagonista α 2 – a ioimbina – 15 min antes da administração de clonidina (um agonista α 2), ISO e ISO/CD (10 mg/kg) não reverteu a atividade antinociceptiva dos grupos. Clonidina, ISO e ISO/CD (10 mg/kg) apresentaram uma redução significativa no tempo de lambertura da pata em 91,7, 62,6 e 60% respectivamente quando comparado ao grupo salina (Figura 06A).

A ativação dos receptores adenosinérgicos leva a uma diminuição da estimulação dolorosa e quando avaliado o seu envolvimento no mecanismo de ação dos compostos, o tratamento com ISO e ISO/CD (10 mg/kg) reduziu de forma significativa o tempo de lambertura da pata injetada com formalina em 76,6 e 62,9% respectivamente, quando comparado ao grupo salina. Entretanto o pré-tratamento com cafeína (um antagonista não específico dos receptores de adenosina) não reverteu a atividade antinociceptiva do ISO e ISO/CD (Figura 06B), descartando o envolvimento dos receptores adenosinérgicos.

A via dopaminérgica tem um importante papel na supressão da dor através da ativação dos receptores para dopamina e quando investigamos o envolvimento do sistema dopaminérgico na figura 06C, o tratamento com ISO e ISO/CD (10 mg/kg) reduziu expressivamente o tempo de lambertura da pata após administração intraplantar de formalina, quando comparado ao grupo salina em 67,7 e 68,2% respectivamente. Todavia, o haloperidol, um antagonista dos receptores de dopamina, não reverteu a atividade antinociceptiva do ISO e ISO/CD o que nos leva descartar que a ação antinociceptiva dessas duas substâncias envolve o sistema dopaminérgico.

Figura 06 – Avaliação do efeito antinociceptivo do ISO e do ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) na nocicepção de pata induzida por formalina em camundongos. Envolvimento do sistema: A) α 2-adrenérgico; B) adenosinérgico; C) dopaminérgico



Valores representam a média \pm S.E.M. (n=6/grupo). Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey com múltiplas comparações (a1p<0.05; a2p <0.01; a3p <0.001; a4p <0.0001 quando comparado ao grupo salina; b1p<0.05; b2p <0.01; b3p <0.001; b4p <0.0001 quando comparado o antagonista + agonista vs agonista).

O isopulegol demonstrou ser capaz de promover a modulação da ação antinociceptiva tanto a nível central como periférico com o envolvimento das vias opioide, participação de canais de potássio, colinérgica, via dos vaniloides, óxido nítrico, via do monofosfato cíclico de guanosina e glutamatérgica.

No sistema opioide a ativação dos receptores opioides resulta em ação analgésica importante e com relação ao envolvimento dessa via, o tratamento com morfina (agonista opioide), ISO e ISO/CD (10 mg/kg) reduziram significativamente o tempo de lambadura da pata administrada com formalina em 97,6, 68,8 e 75,5% respectivamente quando comparado ao grupo salina (Figura 07A). Quando os grupos ISO e ISO/CD receberam pré-tratamento com naloxona (antagonista opioide), ocorreu uma reversão do efeito antinociceptivo do ISO e do

ISO/CD, sugerindo assim que a atividade antinociceptiva de ambas as substâncias podem envolver a via de sinalização opioide.

A ativação dos canais de K^+_{ATP} pode estar envolvida no mecanismo de ação de outras vias aqui apresentadas, fazendo-se necessária a investigação da participação desses canais na atividade analgésica das substâncias avaliadas. Para averiguar a participação dos canais de K^+_{ATP} , o tratamento com ISO e ISO/CD (10 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de lambadura da pata administrada com formalina em 55 e 51,7% respectivamente quando comparado ao grupo salina (Figura 07B). Quando os grupos ISO e ISO/CD receberam pré-tratamento com glibenclamida (um antagonista dos canais de potássio), ocorreu uma reversão do efeito antinociceptivo do ISO e do ISO/CD, sugerindo assim que a atividade antinociceptiva de ambas as substâncias podem envolver os canais K^+_{ATP} .

No sistema colinérgico, importante via antinociceptiva avaliada, o pré-tratamento com atropina (um antagonista muscarínico não-seletivo) antes da administração de acetilcolina (um agonista colinérgico), ISO e ISO/CD (10 mg/kg) reverteu a ação antinociceptiva dos grupos tratados. A acetilcolina, ISO e ISO/CD (10 mg/kg) apresentaram uma redução significativa no tempo de lambadura da pata induzida com formalina em 70, 55,1 e 60% respectivamente quando comparado ao grupo salina. Os dados apresentados na figura 07C sugerem que o isopulegol e seu complexo de inclusão podem funcionar como agonistas de receptores muscarínicos visto que a sua atividade antinociceptiva pode ser revertida pela atropina.

No que diz respeito à via dos vaniloides, o tratamento com o ISO e ISO/CD (10 mg/kg), e vermelho de rutênio (um antagonista dos receptores de potencial transitório – TRP não seletivo) reduziu significativamente o tempo de lambadura da pata administrada com capsaicina em 48,75, 34,57 e 100% respectivamente quando comparado ao grupo salina (Figura 07D), o que justifica possivelmente que a ação antinociceptiva do ISO e o ISO/CD pode envolver a participação do sistema vanilóide.

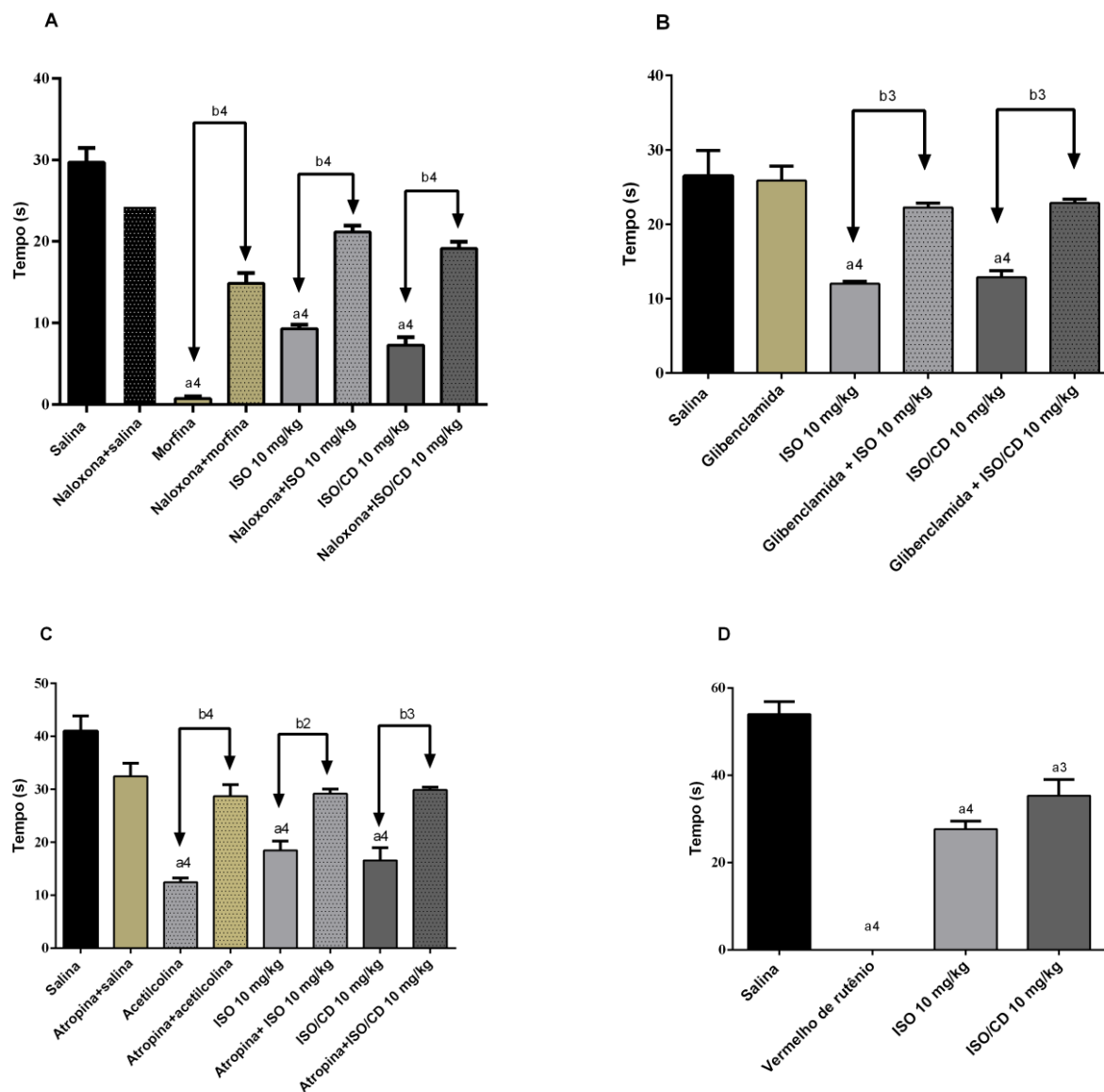
O óxido nítrico (NO) é um importante mediador da resposta inflamatória e a inibição da óxido nítrico sintase indutiva (iNOS) reduz a formação de NO e consequentemente o estímulo doloroso de forma indireta, ao reduzir o processo inflamatório. Na investigação da participação da via L-arginina/Óxido Nítrico/GMPc (Figura 07E), o pré-tratamento com L-arginina (substrato da óxido nítrico sintase - NOS) 15 min antes do L-NOARG (inibidor da NOS) reverteu o efeito antinociceptivo do L-NOARG, o que também pode ser visto nos grupos que receberam a associação da L-arginina com o ISO e o ISO/CD (10 mg/kg). O L-NOARG, ISO e ISO/CD reduziram o tempo de lambadura da pata injetada com formalina em 66,2, 65,9 e 68,4% respectivamente, quando comparados com o grupo salina. Sugere-se que o efeito antinociceptivo do ISO e ISO/CD envolve a via L-arginina/Óxido Nítrico/GMPc, uma vez que o ISO e o

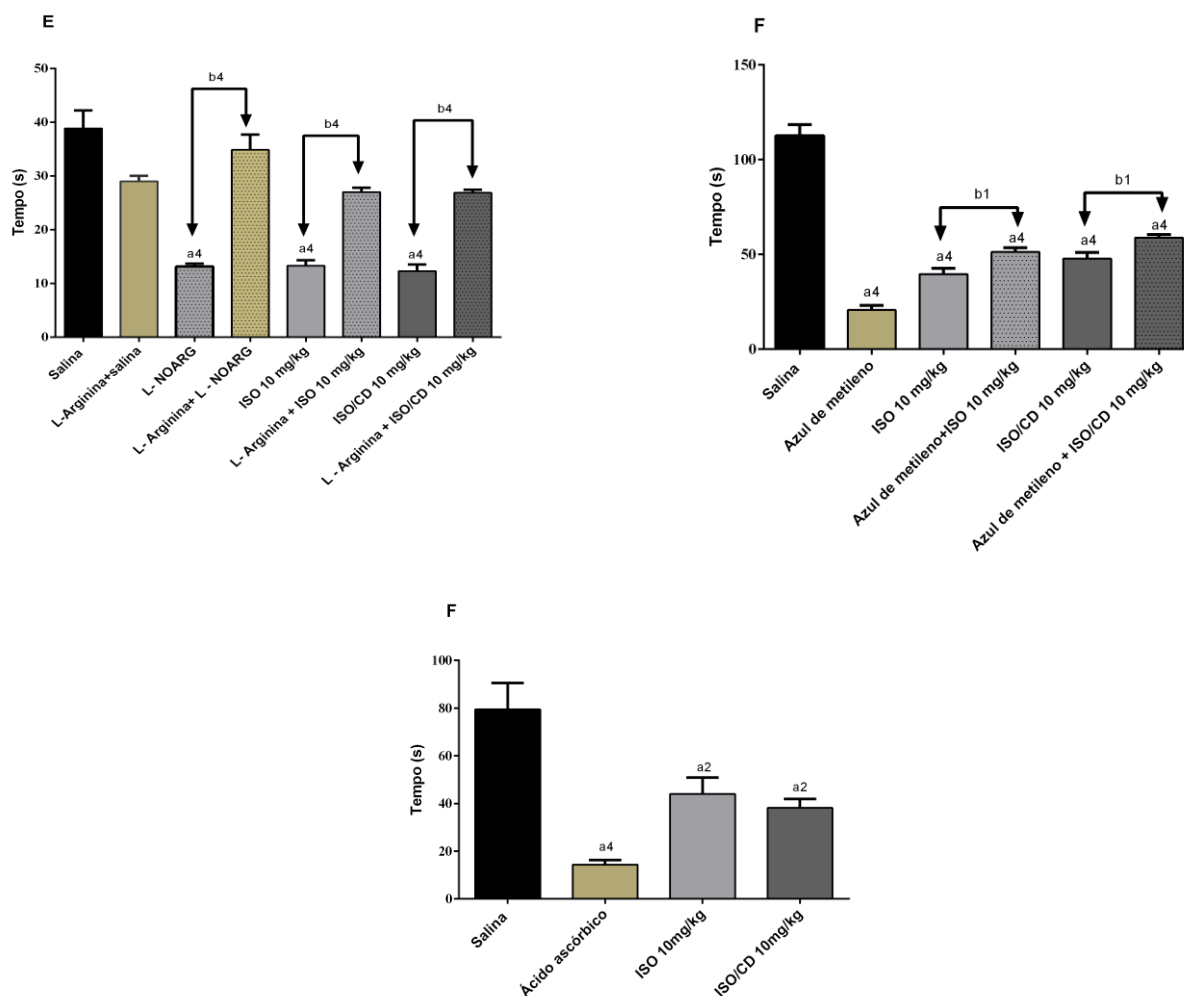
ISO/CD tiveram sua atividade analgésica revertida pela L-arginina.

Na figura 07F investigamos a participação da via do monofosfato cíclico de guanosina no efeito antinociceptivo das substâncias em avaliação. O grupo salina foi o único a apresentar um elevado tempo de lambertura da pata enquanto o tratamento com ISO e ISO/CD (10 mg/kg) e azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase) reduziu significativamente o tempo de lambertura da pata injetada com formalina em 64,5, 57,3, e 81,5% respectivamente, quando comparado ao grupo salina. Na associação do azul de metileno com o ISO e o ISO/CD o padrão antinociceptivo desses compostos foi mantido quando comparados às administrações sem associação, indicando a participação desta via no efeito antinociceptivo do ISO e ISO/CD e corroborando com os resultados observados para via óxido nítrico.

Por fim, o glutamato - neurotransmissor excitatório de atividade nociceptiva - teve seu envolvimento avaliado a partir do tratamento com ISO e ISO/CD (10 mg/kg), e ácido ascórbico (antagonista dos receptores NMDA - Ácido N-Metil-D-Aspártico – ativados pelo glutamato) que reduziram significativamente o tempo de lambertura da pata injetada com glutamato em 44,6, 48 e 82,1% respectivamente quando comparado ao grupo salina, comprovando assim um possível envolvimento do sistema glutamatérgico na resposta antinociceptiva dos compostos (Figura 07G).

Figura 07 - Avaliação do efeito antinociceptivo do ISO e do ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) na nocicepção de pata induzida por diferentes agentes em camundongos. A) Envolvimento do sistema opioide; B) Envolvimento da participação de canais de potássio ATP dependente; C) Envolvimento da via colinérgica; D) Envolvimento do sistema vaniloide; E) Envolvimento do óxido nítrico e F) Envolvimento da via do monofosfato cíclico de guanosina; G) Envolvimento do sistema glutamatérgico





Valores representam a média \pm S.E.M. ($n=6$ /grupo). Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey com múltiplas comparações ($a1p < 0.05$; $a2p < 0.01$; $a3p < 0.001$; $a4p < 0.0001$ quando comparado ao grupo salina; $b1p < 0.05$; $b2p < 0.01$; $b3p < 0.001$; $b4p < 0.0001$ quando comparado o antagonista + agonista vs agonista).

Diante da complexidade do processo doloroso, se faz evidente a necessidade de compreensão dos diferentes mecanismos envolvidos na fisiologia da dor, com múltiplas vias de sinalização comunicando-se entre si e empregando uma diversidade de neurotransmissores e outros mediadores, que estão influenciando na resposta nociceptiva desde a transdução até a modulação da mesma, fornecendo potenciais alvos de intervenção farmacológica.

4 DISCUSSÃO

O isopulegol, um monoterpene pertencente a classe dos terpenoides, é um composto de inúmeras propriedades farmacológicas e de ocorrência natural presente em frutas de várias espécies vegetais como uva e menta (HUSSAIN *et al.*, 2010), óleos essenciais de várias plantas aromáticas (SILVA *et al.*, 2007) e altamente volátil e insolúvel em água. A formação de um complexo “host-guest”, utilizando como composto transportador as ciclodextrinas tem sido uma estratégia para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de substâncias voláteis e pouco solúveis em água como o isopulegol (CEBORSKA; SZWED; SUWINSKA, 2013; CRINI *et al.*,

2018). Em um estudo recente Ramos e colaboradores (2020) demonstraram que o isopulegol e seu complexo de inclusão em β -ciclodextrinas apresentaram potencial anti-edematogênico e anti-inflamatório promissores em modelos de doenças inflamatórias agudas e crônicas.

Muitas drogas disponíveis no mercado apresentam problemas na sua solubilidade, baixa taxa de biodisponibilidade, dissolução lenta e efeitos gastrointestinais que limitam sua utilização (YADAV *et al.*, 2010). Nesse contexto, as ciclodextrinas tem sido largamente utilizadas para tornar produtos naturais, como terpenos, óleos essenciais e até mesmo medicamentos, mais biodisponíveis aperfeiçoando os perfis dessas substâncias (LU *et al.*, 2004; QUINTANS- JÚNIOR, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o presente estudo foi desenhado para avaliar o potencial antinociceptivo do isopulegol e seu complexo de inclusão em β -ciclodextrinas em modelos animais, assim como as possíveis vias de sinalização envolvidas nesse processo. Drogas que atuam no sistema nervoso podem mascarar a avaliação da expressão nociceptiva em modelos animais, principalmente as drogas depressoras como ansiolíticos, relaxantes musculares, drogas sedativo-hipnóticas que modulam a via GABAérgica e que promovem uma diminuição na atividade locomotora e estado de alerta que são sinais clínicos utilizados na avaliação do efeito antinociceptivo das substâncias (HOSSEN *et al.*, 2013; KOLAWOLE; MAKINDE, 2007). Os resultados para o tratamento com ISO e ISO/CD não demonstraram alterações comportamentais no número de cruzamentos, no comportamento de autolimpeza e exploração vertical na avaliação no campo aberto (PRUT; BELZUNG, 2003), bem como alterações na coordenação motora dos animais no ensaio de rota rod (SHIOTSUKI *et al.*, 2010).

O teste da formalina mede a eficácia de agentes antinociceptivos com mecanismos de ação diferentes e em intervalos de tempo também diferentes, sendo dividido em duas fases: uma aguda, precoce, também denominada neurogênica e outra tardia, a fase inflamatória (MAGALHÃES *et al.*, 2017). A primeira fase inicia-se após a administração de formalina (3-5 min) que estimula neurônios aferentes primários com participação de receptores TRPA1 (receptor de potencial transitório anquirina 1) expresso por um subconjunto de nociceptores de fibra C, seguido por aumento do influxo de íons cálcio estando também associada a liberação de óxido nítrico e substância P (SP) (MCNAMARA *et al.*, 2007). A segunda fase começa 15-20 min após a injeção de formalina com liberação de vários mediadores inflamatórios como histamina, serotonina e prostaglandinas (TJØLSEN *et al.*, 1992). De forma específica, esses mediadores podem despolarizar aferentes primários por meio da abertura de canais de sódio, porém na maioria dos casos eles atuam reduzindo o limiar de ativação das células nervosas (GOODWIN; MCMAHON, 2021).

O tratamento com ISO e ISO/CD nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg de ambas as substâncias

apresentou efeito antinociceptivo na primeira fase do teste, enquanto apenas as doses de 5 e 10 mg/kg do ISO e do ISO/CD apresentaram efeitos significativos na segunda fase quando comparadas com o grupo salina, com destaque para a dose de 10 mg/kg das duas substâncias, capaz de reduzir a resposta nociceptiva em todo o tempo de avaliação. Estes resultados corroboram com os ensaios mecanísticos que mostraram que ISO e ISO/CD interferem na via dos receptores TRPV. Próspero (2018) e colaboradores observaram que o ISO também foi capaz de reduzir o tempo de reação ao estímulo doloroso no teste de formalina corroborando com nossos achados.

O teste de contorções abdominais induzida por ácido acético é utilizado para avaliar o potencial analgésico por intermédio de efeitos sobre o sistema nervoso central e periférico (COLLIER *et al.*, 1968). Neste modelo, a administração intraperitoneal de ácido acético provoca a liberação de mediadores inflamatórios como substância P, bradicinina, prostaglandinas e diversas citocinas (PINHEIRO *et al.*, 2011) que promovem a redução do limiar de estímulo nervoso alterando a condução das terminações nervosas aferentes nociceptivas. A condução nervosa periférica é regulada pela presença de receptores opioides, glutamatérgicos e serotoninérgicos. Em relação ao efeito antinociceptivo, o tratamento com ISO e ISO/CD reduziu significativamente o número de contorções. Estudos tem demonstrado que receptores opioides tipo GPCRs ativam canal de K_{ATP} através da via do óxido nítrico (NO) – monofosfato guanosina cíclica (cGMP) – proteína quinase G (PKG) (PRADHAN *et al.*, 2012). Tais vias também então envolvidas no efeito antinociceptivo do ISO e do ISO/CD (10 mg/kg/v.o.) que foram afetadas, demonstrando o envolvimento do sistema opioide, participação de canais de potássio ATP dependente e envolvimento do sistema óxido nítrico. Outros monoterpenos álcool, como o geraniol e o linalol também apresentaram importante redução no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético quando avaliados seus potenciais antinociceptivos (ROCCA, LA *et al.*, 2017; SOUTO-MAIOR *et al.*, 2017).

No modelo da placa quente um estímulo térmico provoca ativação dos nociceptores térmicos e polimodais tipo $A\delta$ - β formados por fibras A mielinizadas e fibras C amielinizadas que são responsáveis pela dor acentuada e dor fraca em queimação respectivamente. Estímulos de calor também influenciam os canais de cátions do TRP tipo V1 que são ativados pela capsaicina e temperaturas acima de 43°C, enquanto, detecção de sensações de calor nocivo ocorre por meio de TRPV2 que apesar de não responder a capsaicina, é ativado por temperatura igual ou superior a 52°C (NAZIROĞLU; CIĞ, 2013; NAZIROĞLU; BRAIDY, 2017). Desta forma, a ativação do TRPA1 desempenha papel na dor aguda, mas tanto a ação dos TRPV1 e TRPV2 são necessários ao desenvolvimento da hiperalgesia térmica por influenciar a modulação descendente da dor, como o córtex e a amígdala (JULIUS; BASBAUM, 2001). Os resultados

demonstram que o ISO e ISO/CD produziram redução significativa do comportamento de nocicepção induzida pela capsaicina, entretanto, outras vias também estão relacionadas com a excitação deste nociceptor com a abertura dos canais de potássio no potencial de membrana em repouso e a participação do glutamato, ambas vias afetadas pelo isopulegol. Estudos com o citronelal, mirtenal e o p-cimeno descrevem a ação antinociceptiva desses monoterpenos no modelo da placa quente (BONJARDIM *et al.*, 2012; DRAGOMANOVA *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2010), com destaque para o complexo de inclusão p-cimeno/ β -CD que produziu um efeito analgésico duradouro e induziu um forte efeito analgésico quando comparado com o p-cimeno (QUINTANS *et al.*, 2013).

A hipernocicepção mecânica plantar foi avaliada pelo teste de Von Frey (SAKUMA *et al.*, 2013) após administração do adjuvante completo de Freund (CFA), cuja estimulação provoca sensibilização de fibras sensoriais primárias a partir da liberação de múltiplos mediadores inflamatórios de ação prolongada como citocinas pró-inflamatórias entre elas, fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina (IL-6) (SALEEM *et al.*, 2020) que induzem a expressão de receptores TRPV em quadros de hiperalgesia (NI *et al.*, 2020) também envolvidos na sensibilização térmica. Os resultados demonstram que o ISO e o ISO/CD apresentaram uma significativa eficácia antinociceptiva evidenciada no teste de hipernocicepção mecânica com efeitos perdurando até 24h após a administração do CFA. Em parte, este resultado pode ser explicado devido ação anti-inflamatória do isopulegol e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrinas em reduzir a expressão das citocinas TNF α e IL-1 β (RAMOS *et al.*, 2020). Conforme demonstrado, a ação antinociceptiva do ISO e ISO/CD afeta vias de sinalização centrais e periféricas com envolvimento das vias opioide, canais de K⁺_{ATP}, via óxido nítrico, colinérgica, vaniloide, glutamatérgica e via do monofosfato cíclico de guanosina.

A analgesia promovida a partir da estimulação do sistema opioide pode ser associado a receptores GPCR μ -opioides periféricos envolvendo a inibição da adenilato ciclase que medeia à via de ação da morfina ao canal de K⁺_{ATP} através da via do óxido nítrico (NO) – monofosfato guanosina cíclica (cGMP) levando à hiperpolarização neuronal (PRADHAN *et al.*, 2012) bloqueando a resposta nociceptiva. Opioides endógenos medeiam os efeitos antinociceptivos através da abertura de canais para K⁺_{ATP}, levando a repolarização ou hiperpolarização da membrana, dificultando a propagação do estímulo nociceptivo (CUNHA *et al.*, 2012). Na avaliação da participação do sistema opioide, a associação do antagonista de receptor opioide - naloxona - reverteu o efeito antinociceptivo do ISO e ISO/CD indicando a possível participação desse sistema no mecanismo de analgesia. Esse efeito também foi observado para o p-cimeno que também apresentou o envolvimento da via opioide responsável por inibição da via descendente da dor, com incremento no número de neurônios da substância cinzenta

periaquidital, região do mesencéfalo envolvida na modulação da dor e ativada por agonistas opioides (SANTANA *et al.*, 2015). Os resultados mostraram que antinocicepção promovida pelo ISO e ISO/CD é revertida pela glibenclamida, um bloqueador de canais de K^+_{ATP} desta forma, sugerindo que este efeito antinociceptivo afeta o sistema opioide via canais de K^+_{ATP} . Resultados similares também foram observados no estudo de Próspero (2018).

O óxido nítrico é um importante neurotransmissor envolvido no processo nociceptivo central e periférico. A produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (CURY *et al.*, 2011) no SNC requer o influxo de Ca^{2+} decorrente da ativação dos receptores NMDA (ácido N-metil-d-aspartico) pelo glutamato e periféricamente relacionado às citocinas como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e interleucina-10 (IL-10), sugerindo um ciclo de *feedback* entre NO e citocinas na geração de hipersensibilidade (SHIH *et al.*, 2017). Os dados apontam que antinocicepção do ISO e ISO/CD interfere da via L-arginina/Óxido Nítrico/GMPc que acarreta na minimização da estimulação e sensibilização dos nociceptores nos terminais nervosos e sua correlação com o sistema glutamatérgico. Além disso, esses dados sugerem que a ação analgésica do NO depende de uma via de sinalização intracelular envolvendo a formação de GMPc confirmada pelo azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase).

O papel nos mecanismos periféricos envolvidos no desenvolvimento de fenômenos nociceptivos também envolvem o sistema colinérgico. Substâncias colinomiméticas tem como principal sítio de ação na analgesia a medula espinhal, com aumentos nos níveis de acetilcolina (ACh) após estímulos nociceptivos ativados pelas vias modulatórias da dor noradrenérgica descendente inibitória e serotoninérgica. Esta ACh é liberada dos interneurônios colinérgicos no corno dorsal, ativam receptores muscarínicos espinhais que medeiam os efeitos antinociceptivos, entretanto parte desta ação analgésica da ACh é mediada pela liberação de óxido nítrico das células endoteliais (CURY *et al.*, 2011). Um segundo mecanismo indireto promovido pela ACh é a inibição dos neurônios excitatórios responsáveis pela liberação de glutamato e modulação das ações dos receptores opiáceos. Pesquisas demonstram que as interações entre os sistemas colinérgico e opioide ocorrem em várias regiões do sistema nervoso, sugerindo que os mecanismos colinérgicos potencializam a analgesia opioide (NASER; KUNER, 2018). Nossos resultados indicam o envolvimento do sistema colinérgico na antinocicepção do ISO e ISO/CD, com participação dos receptores muscarínicos, uma vez que a atropina (antagonista muscarínico não seletivo) inibiu o efeito analgésico promovido pelos compostos afetando também outras vias envolvidas pela ação colinérgica, como via glutamatérgica e óxido nítrico. Os monoterpenos α -felandreno e γ -terpineno, quando avaliadas as possíveis vias envolvidas nos seus efeitos antinociceptivos, evidenciaram além da participação dos sistemas opioide e canais de K^+_{ATP} , o

envolvimento do sistema colinérgico, tendo o γ -terpineno importante efeito analgésico nas vias central e periférica (LIMA *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2015).

O TRPV, um receptor de canal catiônico pertencente à super-família do receptor de potencial transitório, é amplamente expresso em neurônios sensoriais nociceptivos do gânglio dorsal da medula espinhal (CORTRIGHT *et al.*, 2001) dando origem a pequenas fibras sensoriais C e A δ que contem SP e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (SZALLASI; BLUMBERG, 1999). A capsaicina, ativador direto de TRPV1, induz liberação de SP que excita neurônios inibitórios das lâminas I, III e IV do corno dorsal resultando no incremento de GABA e glicina (FERRINI *et al.*, 2007) afetando o tônus inibitório da raiz dorsal da medula. O ISO e o ISO/CD demonstraram ação antinociceptiva ao reduzir o tempo de lambadura da pata administrada com capsaicina, efeito semelhante ao do grupo que recebeu vermelho de rutênio, um antagonista dos receptores de potencial transitório (TRPs), sugerindo a participação do sistema vaniloide no mecanismo de ação analgésico do ISO e ISO/CD. A evidência que dois mecanismos possíveis para modulação dos canais envolvendo o sistema TRPV1, seja mediante fosforilação do TRPV1 por ativação da proteína quinase C (PKC) via DAG (diacilglicerol) e/ou por depleção do PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) que normalmente atua ao inibir o TRPV1. Uma outra possibilidade é que o ISO e o ISO/CD estariam impedindo a liberação de neuropeptídeos, como as neurocininas A (NKA) e B (NKB) e SP, que participam na transmissão da dor e em processos inflamatórios (LABRAKAKIS; MACDERMOTT, 2003; SAKURADA *et al.*, 1996). Outros monoterpenos como o mirtenol, citronelal e carvacrol também promoveram atividade antinociceptiva relevante em modelos de dor por capsaicina (JÚNIOR *et al.*, 2011; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2010; SILVA, *et al.*, 2014), fortalecendo a possibilidade do antagonismo vaniloide ou interferência na mediação da cascata iniciada pela ativação desses receptores.

Após uma lesão tecidual, uma diversidade de neurotransmissores é liberada estando entre eles a SP, glutamato, CGRP, neurocinina A, todos relacionados com a ativação de receptores NMDA e não-NMDA (N-metil-D-aspartato), sendo o glutamato o principal ativador desses receptores, cuja interação leva a retirada de íons magnésio do interior celular e influxo de cálcio para a célula, com produção de prostaglandinas e NO. Estes últimos estimulam a liberação de mais glutamato, SP e CGRP, ampliando o processo algico (DICKENSON, 1991; JI *et al.*, 2003; WOOLF, 1995). Vale ressaltar que a capsaicina induz uma forte liberação de glutamato após ativação do TRPV1 nas fibras aferentes primárias com aumento significativo das correntes excitatórias pós-sinápticas na lâmina II do corno dorsal da medula espinhal (BACCEI; BARDONI; FITZGERALD, 2003).

Adicionalmente, o presente estudo também avaliou a participação da via glutamatérgica no efeito antinociceptivo do ISO e ISO/CD, que demonstraram redução significativa na nocicepção induzida pelo glutamato, semelhante ao grupo que recebeu o ácido ascórbico, um inibidor de receptores NMDA (ROSA *et al.*, 2005). Estes resultados vão de encontro aos achados da via vaniloide, já que estudos demonstram que a SP, um neurotransmissor envolvido no processo doloroso induzido pela capsaicina, induz a transmissão sináptica glutamatérgica (SAKURADA *et al.*, 1992; WALLENGREN; HÅKANSON, 1987). Por fim, o efeito antinociceptivo do ISO e ISO/CD não suporta a participação das vias adenosinérgica, α 2-adrenérgica e dopaminérgica.

Neste estudo o isopulegol e seu complexo de inclusão em β -CD mostraram resultados significativos nos modelos de nocicepção, com investigação das possíveis vias de sinalização envolvidas neste mecanismo permitindo maior conhecimento e ampliando as suas possíveis aplicações clínicas. Quando comparados os resultados obtidos nos grupos ISO e ISO/CD (10 mg/kg) podemos perceber uma vantagem do processo de complexação que mantém as mesmas propriedades farmacológicas com significativos ganhos na biodisponibilidade, uma vez que o processo de complexação envolve quantidades muito menores de isopulegol (PASSOS MENEZES *et al.*, 2016). Frente aos resultados evidenciados nesse estudo, somada à atividade anti-inflamatória já comprovada na literatura, o isopulegol e seu complexo de inclusão se tornam substâncias promissoras para o tratamento farmacológico da dor e importantes protótipos analgésicos.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que as atividades antinociceptivas centrais e periféricas do ISO e ISO/CD foram aperfeiçoadas pela complexação em ciclodextrinas. Embora os resultados entre esses grupos sejam semelhantes, há muito menos composto ativo no complexo em comparação com o composto puro. A avaliação das possíveis vias de sinalização envolvidas no efeito analgésico das substâncias em questão, indicam a participação do sistema opioide, dos canais de potássio, via óxido nítrico, via do monofosfato cíclico de guanosina, colinérgico, vaniloide e glutamatérgico. Assim, o estudo além de apresentar as propriedades antinociceptivas do ISO e ISO/CD, também forneceu evidências do possível benefício do uso das ciclodextrinas na otimização das propriedades farmacológicas desse monoterpeneo.

REFERÊNCIAS

- ABDOH, A. A. *et al.* Inclusion complexation of diclofenac with natural and modified cyclodextrins explored through phase solubility, ¹H-NMR and molecular modeling studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2007. v. 57, n. 1–4, p. 503–510. DOI :10.1007/s10847-006-9241-8.
- AL-MARZOUQI, A. H. *et al.* Influence of the preparation method on the physicochemical properties of econazole- β -cyclodextrin complexes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2008. v. 60, n. 1–2, p. 85–93. DOI :10.1007/s10847-007-9356-6.
- AMARAL, Jeferson Falcão DO *et al.* Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2007. v. 30, n. 7, p. 1217–1220. DOI :10.1248/bpb.30.1217.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, 1973. v. 21, n. 2, p. 205–235.
- BACCEI, M. L.; BARDONI, R.; FITZGERALD, M. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. **The Journal of Physiology**, 2003. v. 549, n. 1, p. 231–242. DOI :10.1113/jphysiol.2003.040451.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. .; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, 2002. v. 924, n. 2, p. 219–228. DOI :10.1016/S0006-8993(01)03240-1.
- BONJARDIM, Leonardo R *et al.* Evaluation of the Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of p-Cymene in Mice. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 2012. v. 67, n. 1–2, p. 15–21. DOI :10.1515/znc-2012-1-203.
- CAO, F. Le *et al.* Antinociceptive effects of systemic tanshinone IIA on visceral and somatic persistent nociception and pain hypersensitivity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2014. v. 124, p. 74–80. DOI :10.1016/j.pbb.2014.05.005.
- CEBORSKA, M.; SZWED, K.; SUWINSKA, K. β -Cyclodextrin as the suitable molecular container for isopulegol enantiomers. **Carbohydrate polymers**, 2013. v. 97, n. 2, p. 546–550.
- CHEN, Y. *et al.* Enhancement of skin permeation of flurbiprofen via its transdermal patches using isopulegol decanoate (ISO- C 10) as an absorption enhancer: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2015. v. 67, n. 9, p. 1232–1239.
- COLLIER, H. O. J. *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, 1968. v. 32, n. 2, p. 295–310.

- CORTRIGHT, D. N. *et al.* The tissue distribution and functional characterization of human VR1. **Biochemical and biophysical research communications**, 2001. v. 281, n. 5, p. 1183–1189.
- CRINI, G. *et al.* Cyclodextrins, from molecules to applications. **Environmental chemistry letters**, 2018. v. 16, n. 4, p. 1361–1375.
- CUNHA, T. M. *et al.* Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. **Molecular pain**, 2012. v. 8, p. 1744–8069.
- CURY, Y. *et al.* Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric oxide**, 2011. v. 25, n. 3, p. 243–254.
- DICKENSON, A. H. Recent advances in the physiology and pharmacology of pain: plasticity and its implications for clinical analgesia. **Journal of psychopharmacology**, 1991. v. 5, n. 4, p. 342–351.
- DRAGOMANOVA, S. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity of monoterpenoid myrtenal in rodents. **Journal of IMAB–Annual Proceeding Scientific Papers**, 2019. v. 25, n. 1, p. 2406–2413.
- DUNHAM, N. W. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Ass**, 1957. v. 46, p. 208–209.
- FERRÉ, S. *et al.* Adenosine A_{2A} receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry: implications for drug addiction, sleep and pain. **Progress in neurobiology**, 2007. v. 83, n. 5, p. 332–347.
- FERRINI, F. *et al.* Vanilloid receptor-1 (TRPV1)-dependent activation of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse. **Pain**, 2007. v. 129, n. 1–2, p. 195–209.
- FINAN, P. H.; SMITH, M. T. The comorbidity of insomnia, chronic pain, and depression: dopamine as a putative mechanism. **Sleep medicine reviews**, 2013. v. 17, n. 3, p. 173–183.
- GONCALVES, J. C. R. *et al.* Antinociceptive activity of (–)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2008. v. 31, n. 5, p. 1017–1020.
- GOODWIN, G.; MCMAHON, S. B. The physiological function of different voltage-gated sodium channels in pain. **Nature Reviews Neuroscience**, 2021. p. 1–12.
- HAMOUDI, M. C. *et al.* Formulations based on alpha cyclodextrin and soybean oil: an approach to modulate the oral release of lipophilic drugs. **Journal of controlled release**, 2012. v. 161, n. 3, p. 861–867.
- HOSSEN, M. A. *et al.* CNS depressant and analgesic activities of Okra (*Abelmoschus esculentus*

- Linn.). **Mol Clin Pharmacol**, 2013. v. 4, n. 1, p. 44–52.
- HUSSAIN, A. I. *et al.* Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2010. v. 90, n. 11, p. 1827–1836. DOI :10.1002/jsfa.4021.
- JACOB, J. J. C.; RAMABADRAN, K. Enhancement of a nociceptive reaction by opioid antagonists in mice. **British journal of pharmacology**, 1978. v. 64, n. 1, p. 91–98.
- JAKARIA, M. *et al.* Neuropharmacological potential and delivery prospects of thymoquinone for neurological disorders. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018. v. 2018.
- JII, R. R. *et al.* Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in Neurosciences**, 2003. v. 26, n. 12, p. 696–705. DOI :10.1016/j.tins.2003.09.017.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 2001. v. 413, n. 6852, p. 203–210.
- JÚNIOR, L. J. Q. *et al.* Antinociceptive activity of carvacrol in formalin-, capsaicin- and glutamate- induced orofacial nociception in rodents. 2011. DOI :10.1096/fasebj.25.1_supplement.617.8.
- KALAIVANI, K.; SANKARANARAYANAN, C. Isopulegol Ameliorates Dyslipidemia by Modulating Adipokine Secretion in High Fat Diet/Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 2019. v. 9, n. 4- A, p. 126–136. DOI :10.1016/j.arcmed.2020.02.001.
- KOLAWOLE, O. T.; MAKINDE, J. M. Central nervous system depressant activity of *Russelia equisetiformis*. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, 2007. v. 22, n. 1–2.
- LABRAKAKIS, C.; MACDERMOTT, A. B. Neurokinin receptor 1-expressing spinal cord neurons in lamina I and III/IV of postnatal rats receive inputs from capsaicin sensitive fibers. **Neuroscience letters**, 2003. v. 352, n. 2, p. 121–124.
- LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, 2009. v. 325, n. 5937, p. 161–165.
- LIMA, D. F. *et al.* Antinociceptive activity of the monoterpene α - phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2012. v. 64, n. 2, p. 283–292.
- LU, W.-L. *et al.* Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen β -cyclodextrin inclusion complexes in animals. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2004. v. 27, n. 10, p. 1515–1520.
- MAGALHÃES, F. E. A. *et al.* Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, 2017. v. 14, n. 5, p. 422–429.
- MANTOVANI, M. *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in

- mice. **Journal of pineal research**, 2006. v. 41, n. 4, p. 382–389.
- MARTINOV, T. *et al.* Measuring changes in tactile sensitivity in the hind paw of mice using an electronic von Frey apparatus. **Journal of visualized experiments: JoVE**, 2013. n. 82.
- MCNAMARA, C. R. *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2007. v. 104, n. 33, p. 13525–13530.
- MELO, M S *et al.* Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical biology**, 2010. v. 48, n. 4, p. 411–416.
- MENDONÇA, J. M. D. *et al.* Analysis and detection of dental prescribing errors at primary health care units in Brazil. **Pharmacy world & science**, 2010. v. 32, n. 1, p. 30–35.
- MENEZES, P P *et al.* Inclusion complex of (–)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2014. v. 115, n. 3, p. 2429–2437. DOI :10.1007/s10973-013-3367-x.
- MENEZES, Paula P. *et al.* Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, 2012. v. 548, p. 45–50. DOI :10.1016/j.tca.2012.08.023.
- MOURTZINOS, I. *et al.* Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β - cyclodextrin and modified starch. **Journal of food science**, 2008. v. 73, n. 1, p. S89–S94.
- NASER, P. V; KUNER, R. Molecular, cellular and circuit basis of cholinergic modulation of pain. **Neuroscience**, 2018. v. 387, p. 135–148.
- NAZIROĞLU, M; CIĞ, B.; ÖZGÜL, C. Neuroprotection induced by N-acetylcysteine against cytosolic glutathione depletion-induced Ca^{2+} influx in dorsal root ganglion neurons of mice: role of TRPV1 channels. **Neuroscience**, 2013. v. 242, p. 151–160.
- NAZIROĞLU, Mustafa; BRAIDY, N. Thermo-sensitive TRP channels: novel targets for treating chemotherapy-induced peripheral pain. **Frontiers in Physiology**, 2017. v. 8, p. 1040.
- NI, W. *et al.* Antinociceptive Effects of Emodin on CFA-Induced Inflammatory Pain in Rats. **Natural Product Communications**, 2020. v. 15, n. 7, p. 1934578X20942002.
- OLIVEIRA MAKSON, G. B. DE *et al.* Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. **Expert opinion on therapeutic patents**, 2015. v. 25, n. 8, p. 897–907.
- PASSOS, F. F. De B. *et al.* Involvement of cholinergic and opioid system in γ -terpinene-mediated antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. v. 2015.
- PASSOS MENEZES, P. DOS *et al.* Docking and physico-chemical properties of α - and β -cyclodextrin complex containing isopulegol: a comparative study. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2016. v. 85, n. 3–4, p. 341–354.
- PERVEEN, S.; AL-TAWEEL, A. Introductory chapter: Terpenes and terpenoids. **Terpenes and**

terpenoids, 2018. p. 1–12.

PEURA, D. A.; GOLDKIND, L. Balancing the gastrointestinal benefits and risks of nonselective NSAIDs. **Arthritis Research and Therapy**, 2005. v. 7, n. SUPPL. 4. DOI :10.1186/ar1793.

PINHEIRO, B. G. *et al.* Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of ethnopharmacology**, 2011. v. 138, n. 2, p. 479–486.

PINHO-RIBEIRO, F. A. *et al.* Naringenin reduces inflammatory pain in mice.

Neuropharmacology, 2016. v. 105, p. 508–519. DOI :10.1016/j.neuropharm.2016.02.019.

PINHO, E. *et al.* Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds.

Carbohydrate polymers, 2014. v. 101, p. 121–135.

PRADHAN, A. A. *et al.* Ligand- directed signalling within the opioid receptor family. **British journal of pharmacology**, 2012. v. 167, n. 5, p. 960–969.

PRÓSPERO, D. F. A. *et al.* Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway.

Chemico-biological interactions, 2018. v. 293, p. 55–60.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, 2003. v. 463, n. 1–3, p. 3–33.

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

QUINTANS- JÚNIOR, Lucindo J *et al.* β - Cyclodextrin- complexed (-)- linalool produces antinociceptive effect superior to that of (-)- linalool in experimental pain protocols. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, 2013. v. 113, n. 3, p. 167–172.

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

QUINTANS, J. S. S. *et al.* Monoterpenes modulating cytokines - A review. **Food and Chemical Toxicology**, 2019. v. 123, p. 233–257. DOI :<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.058>.

RAMOS, A. G. B. *et al.* Antiedematogenic and anti-inflammatory activity of the monoterpene isopulegol and its β -cyclodextrin (β -CD) inclusion complex in animal inflammation models.

Foods, 2020. v. 9, n. 5. DOI :10.3390/foods9050630.

RASSU, G. *et al.* Solid microparticles based on chitosan or methyl- β -cyclodextrin: A first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate. **Journal of controlled release**, 2015. v. 201, p. 68–77.

ROCCA, V. LA *et al.* Geraniol induces antinociceptive effect in mice evaluated in behavioural

- and electrophysiological models. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, 2017. v. 120, n. 1, p. 22–29.
- RODRIGUES, L. B. *et al.* Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, 2017. v. 109, p. 836–846.
- ROSA, K. A. *et al.* Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience letters**, 2005. v. 381, n. 1–2, p. 185–188.
- SAKUMA, T. *et al.* Comparison of CatWalk analysis and von Frey testing for pain assessment in a rat model of nerve crush plus inflammation. **Spine**, 2013. v. 38, n. 15, p. E919–E924.
- SAKURADA, T. *et al.* The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, 1992. v. 31, n. 12, p. 1279–1285.
- SAKURADA, T. *et al.* Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin-and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry international**, 1996. v. 29, n. 3, p. 271–278.
- SALEEM, A. *et al.* *Polystichum braunii* extracts inhibit Complete Freund's adjuvant-induced arthritis via upregulation of I- κ B, IL-4, and IL-10, downregulation of COX-2, PGE2, IL-1 β , IL-6, NF- κ B, and TNF- α , and subsiding oxidative stress. **Inflammopharmacology**, 2020. p. 1–16.
- SANTANA, Michele Fraga DE *et al.* The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of p-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines. **Pharmaceutical biology**, 2015. v. 53, n. 11, p. 1583–1590.
- SANTOS, A. R. S. *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, 2005. v. 48, n. 7, p. 1021–1034.
- SCHECHTMANN, G. *et al.* Cholinergic mechanisms involved in the pain relieving effect of spinal cord stimulation in a model of neuropathy. **Pain**, 2008. v. 139, n. 1, p. 136–145.
- SCHMIDTKO, A.; TEGEDER, I.; GEISSLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. **Trends in neurosciences**, 2009. v. 32, n. 6, p. 339–346.
- SERAFINI, Mairim R *et al.* Interaction of p-cymene with β -cyclodextrin. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, 2010. v. 109, n. 2, p. 951–955.
- SHIH, C.-C. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of ethyl acetate fraction of an edible red macroalgae *Sarcodia ceylanica*. **International journal of molecular sciences**, 2017. v. 18, n. 11, p. 2437.
- SHIOTSUKI, H. *et al.* A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of neuroscience methods**, 2010. v. 189, n. 2, p. 180–185.
- SILVA, M. I. G. *et al.* Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2007. v. 88, n. 2, p. 141–147.

- _____. *et al.* Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2009. v. 380, n. 3, p. 233–245. DOI :10.1007/s00210-009-0429-5.
- SILVA, R. O. *et al.* Evaluation of the anti- inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant- derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, 2014. v. 29, n. 3, p. 184–192.
- SNEDDON, L. U. Comparative Physiology of Nociception and Pain. **Physiology**, 2018. v. 33, n. 1, p. 63–73. DOI :10.1152/physiol.00022.2017.
- SOUTO-MAIOR, F. N. *et al.* Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpene linalool oxide. **Pharmaceutical biology**, 2017. v. 55, n. 1, p. 63–67.
- STEVENSON, G. W.; BILSKY, E. J.; NEGUS, S. S. Targeting pain-suppressed behaviors in preclinical assays of pain and analgesia: effects of morphine on acetic acid-suppressed feeding in C57BL/6J mice. **The Journal of Pain**, 2006. v. 7, n. 6, p. 408–416.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacological reviews**, 1999. v. 51, n. 2, p. 159–212.
- TJØLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 1992. v. 51, n. 1, p. 5–17.
- TOMINAGA, M. *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, 1998. v. 21, n. 3, p. 531–543.
- TRACEY, W. D. Nociception. **Current Biology**, 2017. v. 27, n. 4, p. R129–R133. DOI :10.1016/j.cub.2017.01.037.
- VELU, P. TNF- α regulated inflammatory pathway by Isopulegol in human lung adenocarcinoma (A549) cells through ROS generation. **Australian Journal of Science and Technology**, 2020.
- VENTURINI, C. G. *et al.* Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2011. v. 375, n. 1–3, p. 200–208.
- VRINTEN, D. H.; HAMERS, F. F. T. ‘*CatWalk*’ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. **Pain**, 2003. v. 102, n. 1–2, p. 203–209.
- WALLENGREN, J.; HÅKANSON, R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. **European journal of pharmacology**, 1987. v. 143, n. 2, p. 267–273.
- WOOLF, C J. Somatic pain--pathogenesis and prevention. **British Journal of Anaesthesia**, 1995. v. 75, n. 2, p. 169–176.
- YADAV, V. R. *et al.* RETRACTED: Cyclodextrin-complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher

cellular uptake. **Biochemical Pharmacology**, 2010. v. 80, n. 7, p. 1021–1032. DOI :10.1016/j.bcp.2010.06.022.

YANG, J. *et al.* Enhancing production of bio-isoprene using hybrid MVA pathway and isoprene synthase in *E. coli*. **PloS one**, 2012. v. 7, n. 4, p. e33509.

YOWTAK, J. *et al.* Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. **Pain®**, 2011. v. 152, n. 4, p. 844–852.

ZERAATI, F.; ARAGHCHIAN, M.; FARJOO, M. H. Ascorbic Acid interaction with analgesic effect of morphine and tramadol in mice. **Anesthesiology and pain medicine**, 2014. v. 4, n. 3.

5. CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 DISCUSSÃO GERAL

O isopulegol, um monoterpeneo com diversas atividades biológicas já comprovadas na literatura é uma substância muito utilizada como aromatizante artificial, com toxicidade baixa e relativa segurança. Apesar das inúmeras pesquisas envolvendo o isopulegol, há pouca informação sobre o seu potencial anti-inflamatório e antinociceptivo. Uma importante limitação na aplicação dos monoterpeneos é a sua meia-vida curta, volatilidade e baixa solubilidade em água e várias abordagens visam a aprimorar as propriedades farmacológicas dos monoterpeneos, sendo a inclusão em β -CDs uma solução bem-sucedida e de aplicabilidade crescente entre os pesquisadores.

Na avaliação da atividade antiedematogênica os resultados mostraram que a ISO e o ISO/CD tiveram um importante efeito anti-inflamatório em todas as doses testadas, reduzindo o edema induzido pela carragenina, dextrana, histamina e prostaglandina E₂, indicando um possível envolvimento nos mecanismos de ação da via dos eicosanoides e da histamina, o que pode ser corroborado pelo ensaio de ancoragem molecular. Outros monoterpeneos, como o p-cimeno, carvacrol e 1,8-cineol também foram efetivos reduzindo o edema induzido por diferentes agentes flogísticos.

A inflamação sistêmica induzida pela carragenina envolve uma série de eventos como migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos (em cujas grânulos está armazenada a MPO); vazamento de plasma e produção de uma variedade de mediadores, como citocinas, prostaglandinas, aminas vasoativas, entre outros. Neste estudo, ISO e ISO/CD promoveram uma redução significativa em todos os eventos inflamatórios induzidos pela carragenina, atenuando os eventos vasculares, como permeabilidade vascular e migração de leucócitos, com uma consequente redução na atividade de MPO. Outros monoterpeneos como bisabolol, citral e timol também apresentam considerável atividade anti-inflamatória no quadro de peritonite induzida por carragenina.

A pleurisia é um dos modelos experimentais clássicos para avaliar a atividade anti-inflamatória aguda e a administração de carragenina promove um aumento significativo nos níveis de citocinas no exsudato pleural, propagando de forma sistêmica o processo inflamatório. Dado que TNF- α e IL-1 β são citocinas fundamentais na reação inflamatória, o ISO e ISO/CD inibiram significativamente os níveis dessas últimas no lavado pleural, indicando que os seus efeitos anti-inflamatórios possam estar associados à inibição dessas citocinas.

A atividade anti-inflamatória crônica foi avaliada pelo modelo de granuloma induzido por *pellets* de algodão, sendo um protocolo importante como indicador dos estágios proliferativos da inflamação, que envolve a proliferação de macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, essenciais na

formação do granuloma. Nesse modelo, o ISO e ISO/CD, reduziram a massa do granuloma, sugerindo uma possível atividade inibitória sobre macrófagos e fibroblastos, semelhante aos resultados encontrados com o monoterpeno 1,8-cineol.

Neste estudo, o isopulegol e seu complexo em β -CDs apresentaram resultados significativos em relação aos modelos inflamatórios agudos e crônicos, bem como uma importante atividade antinociceptiva através de modelos clássicos de dor como formalina, contorções abdominais por ácido acético, placa quente e hipernocicepção mecânica plantar, com determinação das possíveis vias de sinalização envolvidas e exclusão de efeito depressor sobre SNC. Os grupos tratados com ISO e ISO/CD não diferiram estatisticamente entre si, no entanto os resultados obtidos com o grupo ISO/CD tornam-se superiores aos encontrados com o ISO, já que o processo de complexação envolve quantidades bem inferiores de isopulegol, demonstrando assim um aperfeiçoamento das propriedades farmacológicas do ISO pelo processo de inclusão em ciclodextrinas.

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados aqui demonstram que o ISO e ISO/CD possuem uma relevante atividade anti-inflamatória nos modelos animais que foram realizados, além de apresentar baixa toxicidade aguda não clínica. Assim, o isopulegol e seu complexo de inclusão apresentaram uma importante atividade antiedematogênica, quando utilizados diferentes agentes de indução, reduzindo o edema de pata, com destaque para a dose de 10 mg/kg tanto para o grupo ISO, quanto ISO/CD, ressaltando que a dose complexada possui uma concentração bem menor do composto ativo. Um *docking* molecular corroborou com os ensaios antiedematogênicos, indicando que o mecanismo de ação do ISO envolve as vias histamínicas e dos eicosanoides.

O ISO e ISO/CD apresentaram uma promissora atividade anti-inflamatória sistêmica, interferindo em vários eventos do processo inflamatório, reduzindo a permeabilidade vascular, a contagem leucocitária, a atividade da enzima MPO e os níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α . Além disso, foram efetivos no modelo de inflamação crônica reduzindo o peso do granuloma e os níveis de proteínas. Os compostos também apresentaram uma importante atividade antinociceptiva nos modelos clássicos avaliados, apresentando possíveis ações centrais e periféricas, com prováveis vias de sinalização determinadas.

5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

A comprovação científica das possíveis atividades biológicas de inúmeras moléculas bioativas é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas formulações terapêuticas e mesmo diante da crescente oferta de drogas pela indústria farmacêutica, é necessária a busca por agentes que apresentem maior biodisponibilidade, menor toxicidade ou

efeitos colaterais e uma boa relação custo-benefício, aperfeiçoando características como estabilidade e solubilidade.

Mesmo diante do quadro de pandemia instalado em nosso país e no mundo e frente a todas as dificuldades encontradas, desde o deslocamento até o laboratório para realização dos ensaios experimentais, obtenção de reagentes, recursos humanos, necessidade do isolamento social, conseguimos executar todo a metodologia planejada no projeto do estudo. Os dados aqui relatados sugerem que o isopulegol e seu complexo de inclusão em ciclodextrinas são potenciais agentes farmacológicos, em particular, fonte para o desenvolvimento de novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios de interesse clínico. Acreditamos estar contribuindo com informações inéditas que possam ser utilizadas na validação científica de um futuro novo fármaco, com menores custos e melhor eficácia terapêutica, que podem ser determinantes para uma melhor qualidade de vida de indivíduos portadores de doenças inflamatórias e distúrbios da dor, além de incentivar positivamente o uso correto e seguro de produtos naturais pela sociedade.

**ANEXOS – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E
USO DE ANIMAIS – CEUA/URCA PARA O DESENVOLVIMENTO DA
PESQUISA**



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil
propp@urca.br - www.urca.br/ceua



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado "**Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do isopulegol e do complexo de inclusão isopulegol/ β -ciclodextrina em modelos animais**", Processo Nº 00186/2018.2, foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA.

Marta Regina Kerntopf

Membro do CEUA/URCA

(Portaria nº 120/2018-GR)

CRATO-CE

2018

APÊNDICES

APÊNDICE A – METODOLOGIA EXTENDIDA DO MANUSCRITO 1

Appendix

Evaluation of the acute non-clinical toxicity of ISO and ISO/ β -CD

Evaluation of the acute non-clinical toxicity was carried out according to the OECD [21], with some modifications and the table by Malone and Robichaud [22]. The animals were divided into three groups (n=3), in which the control group received 0.9% saline solution (0.01 mL/g, v.o.) and the groups treated with ISO and ISO/ β -CD received a single dose of 2000 mg/kg (v.o.). Following treatment, the animals were observed for the first 30, 60, 120, 180 and 360 min, and then every 24 h for 14 days.

Evaluation of the ISO and ISO/ β -CD antiedematogenic activity

Paw edema induced by intraplantar carrageenan/dextran administration

Paw edema evaluation was performed according to Lapa et al., [24]. The animals (n=6) were pre-treated (v.o) with 0.9% saline solution, ISO (1, 5 and 10 mg/kg) or ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg). After 1 h of treatment, each animal received 20 μ L of 1% carrageenan (w/v) or 1% dextran in the right hind paw and the same volume of the vehicle in the left hind paw. The right and left hind paw volumes of each animal were recorded 1, 2, 3 and 4 h after administration of the inflammatory stimulus.

Paw edema induced by intraplantar histamine administration

For the evaluation of the histamine-induced inflammatory process [25] the animals (n=6) were pretreated (v.o.) with 0.9% saline, promethazine (6 mg/kg), ISO or ISO/ β -CD (10 mg/kg). After 1 h of treatment, each animal received 20 μ L of 1% histamine (w/v) in the right hind paw and the same volume of the vehicle in the left hind paw. The right and left hind paw volumes of each animal were recorded 30, 60, 90, 120 and 180 min after administration of the inflammatory stimulus.

Paw edema induced by intraplantar prostaglandin E2 administration

The groups (n=6) were pretreated (v.o) with 0.9% saline, ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg). After 1 h of the treatment, each animal received 20 μ L of prostaglandin E2 in the right hind paw and the same volume of the vehicle, phosphate buffered saline (PBS), in the left hind paw. The right and left hind paw volumes of each animal were recorded 15, 30, 45 and 60 min after administration of the inflammatory stimulus [26].

Edema measurement

The plethysmometry method was used to evaluate paw edema models induced by phlogistic agents (carrageenan, dextran, histamine and prostaglandin E2). The animals had the initial volume (V_i) of their right and left hind paws assessed before the administration of the phlogistic agent. Expression of the results was obtained by the difference between the final and initial paw volume for each time, calculated by the formula: Volume of right or left paw edema (in μ L), = V_f (final volume) - V_i (initial volume) [27].

Molecular docking

Docking simulations were procedure Vina® docking read by Chimera package. The targets, H1 receptor and COX-2 enzyme structures, were obtained in Protein Data Bank with PDB code 1PXX and 3RZE. The 3D target complexed with diclofenac or doxepin were minimized using a protein preparation tool provided by the Chimera package, the isopulegol structure were modeled using the corina® 3D structure generator and optimized energy was achieved using the UCSF Chimera structure build module. The binding region was defined by a 10 Å × 10 Å × 10 Å

box set at the centroid of the co-crystallized ligand in the crystal complex to explore a large region of the enzyme structure. The docking procedure were carried out by iterated local search global optimizer, the amino acid binding site with 4Å of distance of the center the co-crystallized ligands and isopulegol were maintained flexible during the docking process. The most favorable pose, that show lowest binding free energy, aligned with binding pocket with RMSD not more than 1.0 Å was selected to analysis of interactions type using Discovery Studio 3.1 visualizer [28].

Peritonitis

The carrageenan-induced peritonitis model was used to evaluate the effect of isopulegol and its inclusion complex on leukocyte recruitment [24], where the groups were first treated with 0.9% saline vehicle, ISO (10 mg/kg) or ISO/ β -CD (10 mg/kg). After 1 h of the initial treatment, the animals were administered with 1% carrageenan intraperitoneally. 4 h after the induction of inflammation, the animals were sacrificed and 3 mL of heparinized PBS (10 IU/mL) were injected into the animals' peritoneal cavity. The peritoneal fluid was collected using a Pasteur pipette and cell counts were performed with the SDH-20 device (Labtest®, Lagoa Santa - MG, Brazil).

Evaluation of leukocyte function and migration, and protein extravasation

To assess leukocyte migration, the 1.5 mL peritoneal lavage samples were separated for analysis using a SDH-20 device (cell counter that aspirates using micropipettes and uses bioimpedance to count blood cells) and for the production of slides for differential leukocyte count using fast panoptic staining, which consists of a fixative, and a basic and an acid dye. The slides were evaluated by optical microscopy following preparation, and the remaining 1.5 mL of the peritoneal lavage samples were centrifuged (6000 rotations for 2 min) and separated for albumin and myeloperoxidase (MPO) measurements.

To evaluate protein extravasation, albumin concentrations were determined using the Labtest kit, based on the bromocresol green method which has specificity for albumin and whose absorbance is proportional to the concentration of proteins in the analyzed sample. Then, the sample was read on the Bioplus semiautomatic biochemical analyzer, which performs the absorbance reading on the filter between 600 and 640 nm. Then, the samples were read on a Bioplus semiautomatic biochemical analyzer, which performs absorbance readings with a filter between 600 and 640 nm. Myeloperoxidase was measured for the evaluation of leukocyte function by adding 40 μ L of the samples to test tubes, followed by the addition of 1960 μ L of the o-dianisidine reaction and H₂O₂ in PBS (PBS with 6.0 pH), for evaluation in a spectrophotometer with a 450nm filter [29].

Carrageenan induced pleurisy

First the animals was treated orally with ISO (10 mg/kg) or ISO/ β -CD (10 mg/kg) (Tween 80 0,2% in saline solution). After one hour, the leukocyte migration was induced through the injection of carrageenan (1%, i.p., 0.25 mL, Sigma, EUA) into the pleural cavity of the mice. Four hours after the induction, the mice were anesthetized with ketamine and xylocaine (80 and 8 mg/kg, respectively) and euthanized by cervical dislocation, to obtain pleural lavage [30]. One milliliter of saline solution containing Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Sigma, EUA) 1 mM was injected and suctioned from the pleural cavity three times to get a representative sample of pleural fluid. The pleural lavage was centrifuged (5,000 rpm, 5 min, at room temperature) and the supernatant was stored for further use in cytokine measurement (frozen to -80°C) and the precipitate was resuspended with 1 mL of phosphate buffered saline. Then, an aliquot of 10 μ L from this solution was added in 190 μ L of Turk solution and after a few minutes the total leukocytes were counted in a Neubauer chamber, through the optical microscopy. The results were expressed as the number of total leukocyte by cavity.

Cytokine measurement

The concentrations of TNF- α and IL-1 β were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Invitrogen®) according to protocol's instructions. Briefly, the supernatant obtained after centrifugation of pleural lavage was diluted 1:1 (w/w) in the diluent solution present in the ELISA kit, and the colorimetric measurements at 450 nm were made in a microplate reader (ASYS®). The concentration was obtained by interpolation from a standard curve. All results were expressed as picograms (pg) of cytokine per milliliter.

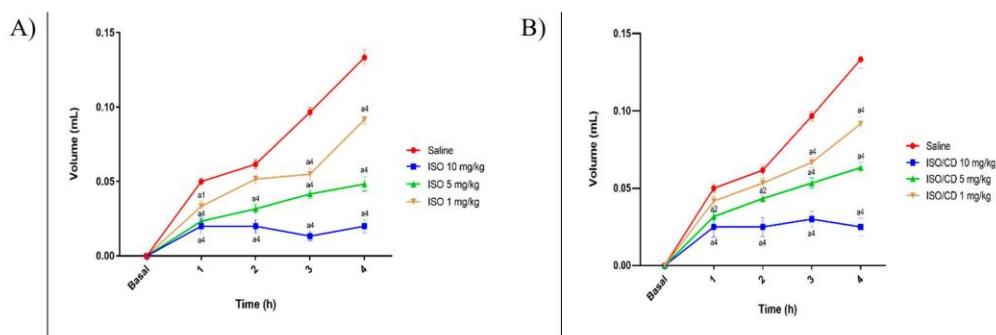
Granuloma induced by the implantation of cotton pellets

Four cotton pellets weighing approximately 0.01 g each (0.04 g total) were implanted in the animals (n=6) through a small dorsal incision in mice previously anesthetized with 80 mg/kg of ketamine and 20 mg/kg of xylazine. The animals were treated orally with 0.9% saline, ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg) for ten consecutive days from the day following the pellet implantation. On the eleventh day, the animals were euthanized and the cotton pellets containing surrounding fibrovascular tissues were removed and dried at 37 °C for 24h. The results were expressed as the difference between the initial (0.04 g) and final dry weight [31]. For protein concentrations, the pellets were placed in test tubes, separated by their groups and animals, and a homogenate was obtained with 1 mL of 0.9% saline. Total protein measurement was performed by combining the homogenate and the reagent developed by Labtest, based on a reaction with copper ions in alkaline solution, resulting in a violet color complex whose absorbance is proportional to the concentration of proteins in the sample analyzed. Thereafter, the samples were read by spectroscopy with a 550nm filter.

APÊNDICE B – FIGURAS DO ARTIGO 1

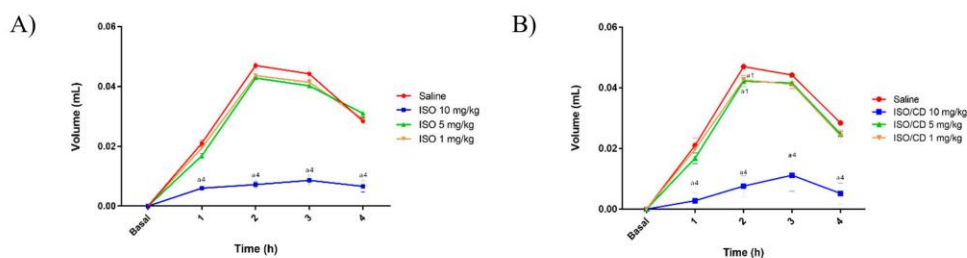
All Figures

Figure A1 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of 1% carrageenan in mice.



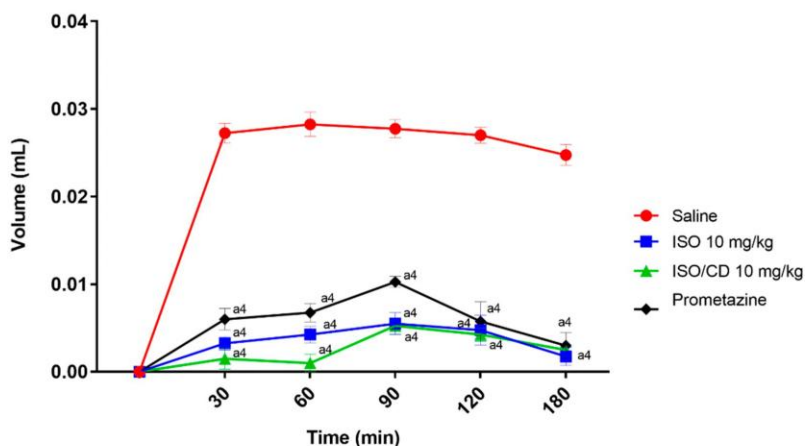
Effect of ISO (A) and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) (B) on paw edema induced by the intraplantar injection of 1% carrageenan in mice up to the 4th hour. Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6/group). Statistical analysis: Two-way ANOVA followed by Tukey's Test with multiple comparisons (a1 p <0.05; a2 p <0.01; a3 p <0.001; a4 p <0.0001 vs. saline).

Figure A2 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of 1% dextran in mice.



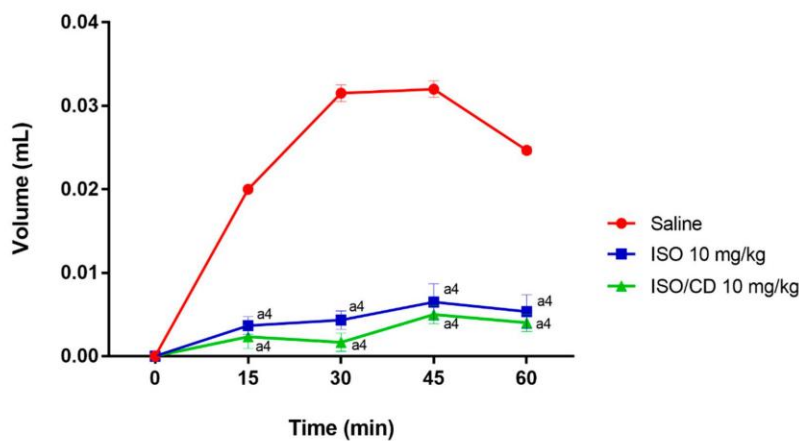
Effect of ISO (A) and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) (B) on paw edema induced by the intraplantar injection of 1% dextran in mice up to the 4th hour. Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6/group). Statistical analysis: Two-way ANOVA followed by Tukey's Test with multiple comparisons (a1 p <0.05; a2 p <0.01; a3 p <0.001; a4 p <0.0001 vs. saline)

Figure A3 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of 1% histamine in mice.



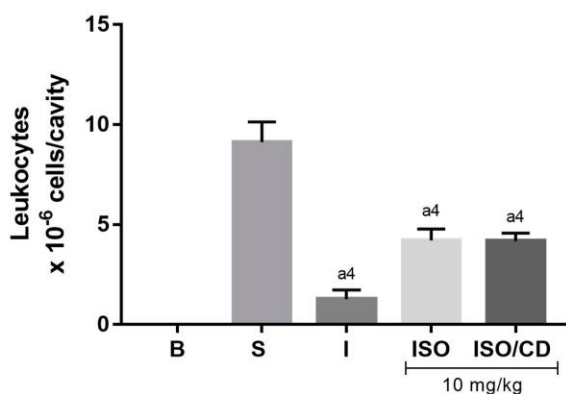
Effect of ISO (A) and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) (B) on paw edema induced by the intraplantar injection of 1% histamine in mice up to 180 minutes. Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6/group). Statistical analysis: Two-way ANOVA followed by Tukey's Test with multiple comparisons (a1 p <0.05; a2 p <0.01; a3 p <0.001; a4 p <0.0001 vs. saline).

Figure A4 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of prostaglandin E2 in mice.



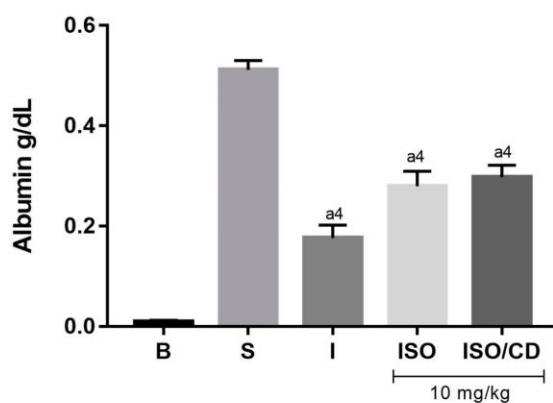
Effect of ISO (A) and ISO/ β -CD (1, 5 and 10 mg/kg/v.o.) (B) on paw edema induced by the intraplantar injection of PGE2 in mice up to 60 minutes. Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6/group). Statistical analysis: Two-way ANOVA followed by Tukey's Test with multiple comparisons (a1 p <0.05; a2 p <0.01; a3 p <0.001; a4 p <0.0001 vs. saline).

Figure A5 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on leukocyte migration in 1% carrageenan-induced peritonitis.



Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on leukocyte migration in peritonitis induced by 1% carrageenan in mice (B: blank; S: control/saline; I: indomethacin 25 mg/kg). Values represent the mean \pm S.E.M (n=6/group). One-way ANOVA followed by Tukey's Test with multiple comparisons (a1 p <0.05; a2 p <0.01; a3 p <0.001; a4 p <0.0001 vs. saline).

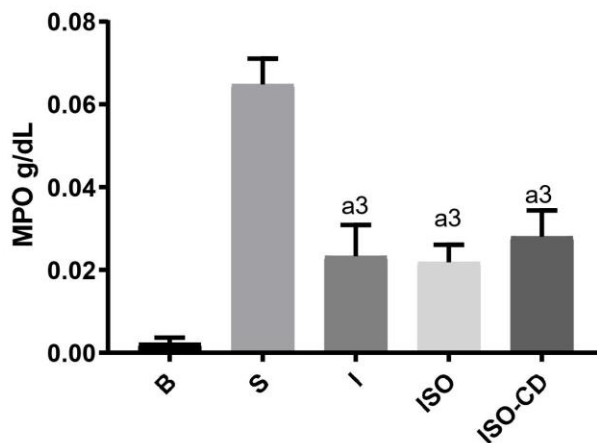
Figure A6 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on protein extravasation in 1% carrageenan-induced peritonitis.



Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on protein extravasation in peritonitis induced by 1% carrageenan in mice (B: blank; S: control/saline; I: indomethacin 25 mg/kg). Values represent the mean \pm

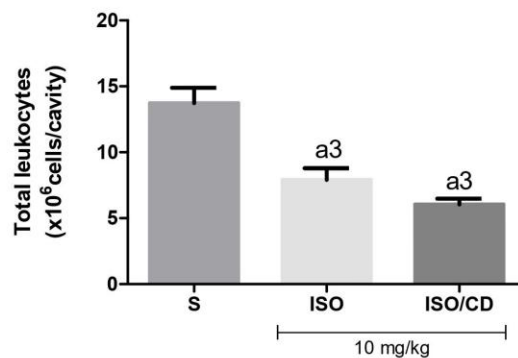
S.E.M (n=6/group). One-way ANOVA followed by Tukey's Test with multiple comparisons ($a_1p < 0.05$; $a_2p < 0.01$; $a_3p < 0.001$; $a_4p < 0.0001$ vs. saline)

Figure A7 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on MPO activity in 1% carrageenan-induced peritonitis.



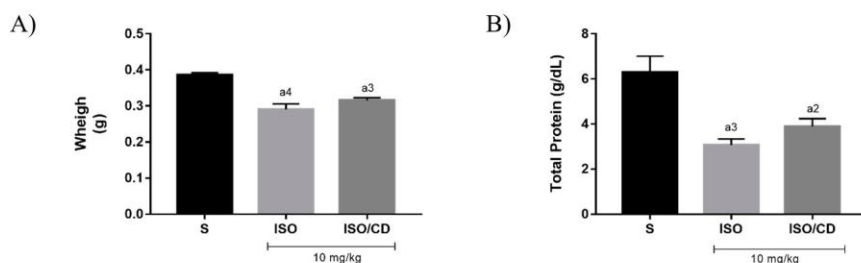
Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on MPO activity in peritonitis induced by 1% carrageenan in mice (B: blank; S: control/saline; I: indomethacin 25 mg/kg). Values represent the mean \pm S.E.M (n=6/group). One-way ANOVA followed by Tukey's Test with multiple comparisons ($a_1p < 0.05$; $a_2p < 0.01$; $a_3p < 0.001$; $a_4p < 0.0001$ vs. saline).

Figure A8 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) in the leukocytes migration in mice submitted to carrageenan-induced pleurisy.



Effect of ISO e ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) in the leukocytes migration in mice submitted to carrageenan-induced pleurisy. (S: control/saline). Data were expressed as mean \pm SEM of 6 animals. Statistical analysis: One-way ANOVA followed by *Tukey's test* with multiple comparisons. (a1 p <0,05; a2 p <0,01; a3 p <0,001; a4 p <0,0001 vs. saline).

Figure A9 - Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on granuloma formation.



Effect of ISO and ISO/ β -CD (10 mg/kg/v.o.) on granuloma formation. (S: control/saline). A) Granuloma weight; B) Total proteins obtained from the granuloma homogenate. Values represent the mean \pm S.E.M (n=6/group). One-way ANOVA followed by *Tukey's Test* with multiple comparisons (a1 p <0.05; a2 p <0.01; a3 p <0.001; a4 p <0.0001 vs. saline).