



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ELISABETE REGINA FERNANDES RAMOS RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXO DE INCLUSÃO CONTENDO O ÓLEO
ESSENCIAL DE *Eugenia gracillima* PARA O TRATAMENTO DE CONVULSÕES**

**RECIFE
2020**

ELISABETE REGINA FERNANDES RAMOS RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXO DE INCLUSÃO CONTENDO O ÓLEO
ESSENCIAL DE *Eugenia gracillima* PARA O TRATAMENTO DE CONVULSÕES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Márcia Vanusa

Coorientador: Me. Bruno Oliveira de Veras

**RECIFE
2020**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Ribeiro, Elisabete Regina Fernandes Ramos.

Desenvolvimento de complexo de inclusão contendo óleo essencial de eugenia gracillima para o tratamento de convulsões. / Elisabete Regina Fernandes Ramos Ribeiro. – 2020.

48 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Márcia Vanusa.

Coorientador: Bruno Oliveira de Veras.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2020.

Inclui referências.

1. Óleo essencial. 2. D Germacrene. 3. Complexo de inclusão. 4. Betaciclodextrina. I. Vanusa, Márcia. (Orient.). II. Veras, Bruno Oliveira de. III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-124

ELISABETE REGINA FERNANDES RAMOS RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXO DE INCLUSÃO CONTENDO O ÓLEO
ESSENCIAL DE *Eugenia gracillima* PARA O TRATAMENTO DE CONVULSÕES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 11/11/2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva
UFPE

Titular interno: Profa. Dra. Maria Betânia Melo
UFPE

Titular externo: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
UFPE

Dedico este trabalho a minha família que,
incondicionalmente, me apoiou em todos
os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a **Deus** por tornar possível finalizar mais uma etapa da minha vida. Agradeço a minha **família** pelo amor incondicional e por sempre torcer pelo meu sucesso. Ao meu esposo **Francisberg** pelo carinho e dedicação que, nos momentos mais difíceis, foi meu sustento. A minha filha **Maria Helena**, meu bem mais precioso que, mesmo tão pequena, entendeu meus momentos de ausência. A minha orientadora **Márcia Vanusa** pela oportunidade de me instruir na vida acadêmica, que sempre será um exemplo de trabalho com dedicação e amor envolvido pelo crescimento da Caatinga. A minha amiga **Fernanda Granja** que sempre me ajudou e tenho como exemplo de profissional dedicada. A **Bruno Veras**, que foi meu norteador em todos os momentos. Obrigada pelos puxões de orelha. **Aos colaboradores** dos laboratórios que, em associação, foram importantes para a realização das análises, mesmo no período da pandemia. A **João**, que tão pacientemente nos ajudou na realização das atividades biológicas. A **Paulo Eloi**, pelas madrugadas perdidas em nossa busca pelo gráfico perfeito. À **UFPE** pela estrutura física para realização dos protocolos experimentais. Ao órgão de fomento **CAPES** pelo apoio financeiro imprescindível no desenvolvimento desta dissertação. E também gostaria de agradecer à banca examinadora (Profa. Maria Teresa e Jaciana Aguiar) por contribuir para o meu crescimento acadêmico. A todos o meu eterno agradecimento!

RESUMO

A Epilepsia atinge 1% da população mundial e como reação comum ocasiona crises convulsivas. Aproximadamente 30% dos portadores, não possuem controle das crises com a terapia farmacológica disponível. Diante deste contexto, o presente trabalho desenvolveu um complexo de inclusão com o óleo essencial de *Eugenia gracillima* e avaliou sua atividade anticonvulsivante. O óleo essencial foi caracterizado por GC-EMS. A produção do complexo de inclusão foi realizada através da incorporação do óleo essencial de *Eugenia gracillima* em betaciclodextrina, utilizando a razão molar do componente majoritário do óleo essencial (D-Germacrene). Para comprovar a complexação, foram realizadas as análises de Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier, Termogravimetria e Calorimetria de Varredura diferencial. A avaliação da toxicidade aguda do complexo de inclusão e do óleo essencial foi avaliada. A caracterização do óleo essencial demonstrou o componente majoritário D-Germacrene (16,1%). As análises realizadas para comprovar a complexação demonstraram que houve a formação do complexo hóspede-hospedeiro entre a betaciclodextrina e o óleo essencial. A avaliação da atividade anticonvulsivante do óleo essencial e de seu respectivo complexo de inclusão demonstrou que os dois obtiveram atividade, em congruência com outros óleos essenciais que possuem o mesmo componente majoritário, e potencial neuroprotetor nos animais, corroborando com resultados obtidos por óleos essenciais da espécie *Eugenia* spp., bem como redução da mortalidade porém, o desempenho do complexado demonstrou maior efetividade, em doses iguais. Ambos também não demonstraram toxicidade aguda. Diante dos resultados obtidos, foi possível comprovar que o óleo essencial de *Eugenia gracillima* possui atividade anticonvulsivante, semelhante a outros óleos com o componente majoritário D Germacrene e a sua complexação com betaciclodextrina provocou melhora significativa da atividade anticonvulsivante frente ao o óleo essencial livre.

Palavras-chave: Óleo Essencial. D Germacrene. Complexo De Inclusão. Betaciclodextrina

ABSTRACT

Epilepsy reaches 1% of the world population and as a common reaction it causes convulsive crises. Approximately 30% of the patients do not have seizure control with the available pharmacological therapy. In this context, the present work developed an inclusion complex with the essential oil of *Eugenia gracillima* and evaluated its anticonvulsant activity. The essential oil was characterized by GC-EMS. The production of the inclusion complex was carried out by incorporating the essential oil of *Eugenia gracillima* in betacyclodextrin, using the molar ratio of the majority component of the essential oil (D-Germacrene). To prove the complexation, Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetry and differential scanning calorimetry analyses were performed. The evaluation of the acute toxicity of the inclusion complex and essential oil was evaluated. The essential oil characterization demonstrated the major component D-Germacrene (16.1%). The analyses performed to prove the complexation showed that there was the formation of the host complex between the betacyclodextrin and the essential oil. The evaluation of the anticonvulsive activity of the essential oil and of its respective complex of inclusion demonstrated that the two obtained activity, in congruence with other essential oils that possess the same majority component, and neuroprotector potential in the animals, corroborating with results obtained by essential oils of the species *Eugenia* spp., as well as reduction of mortality, however, the performance of the complexado demonstrated greater effectiveness, in equal doses. Both also did not demonstrate acute toxicity. In view of the results obtained, it was possible to prove that the essential oil of *Eugenia gracillima* has anticonvulsant activity, similar to other oils with the majority component D Germacrene and its complexation with betacyclodextrin caused significant improvement of the anticonvulsant activity compared to the free essential oil.

Key-words: Oil Essential. D germacrene. Anticonvulsant. Inclusion Complex. Cyclodextrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Metabolismo primário (basal) e Metabolismo secundário (especial).....	19
Figura 2 Estrutura molecular das CDs.....	20
Figura 3 Espectros de FTIR do OEEG (preto), MFOEEG (vermelho) e β -OEEG (azul).....	35
Figura 4 Termograma de DSC das Amostras de β -CD (vermelho), MFOEEG (azul), β -OEEG (verde) e OEEG (preto).....	37
Figura 5 Termogravimetria de β -CD (preto), MFOEEG (vermelho), β -OEEG (Azul) e OEEG (preto).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Propriedades Físico-Químicas Das CDs.....	21
Tabela 2 Composição Química Do Óleo Essencial De <i>Eugenia Gracillima</i>	31
Tabela 3 Avaliação Do Efeito Anticonvulsivante Do Óleo Essencial Livre De <i>Eugenia Gracillima</i> (Oeeg) E Complexado Em B-Ciclodextrina (B-Oeeg), Sob Convulsões Induzidas Por Picrotoxina.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 GERAL	15
2.2 ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 O GÊNERO <i>EUGENIA SPP.</i> E BIOATIVIDADE	16
3.2 A ESPÉCIE <i>EUGENIA GRACILLIMA</i>	16
3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS	17
3.4 A CICLODEXTRINA	20
3.5 CONVULSÕES E FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAL VEGETAL	26
4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	26
4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	26
4.4 PREPARAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO	27
4.5 ANIMAIS	27
4.6 MEDICAMENTOS E TRATAMENTOS	27
4.7 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO	28
4.7.1 ANÁLISES TÉRMICAS	28
4.7.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	28
4.8 TOXICIDADE AGUDA	29
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE	29
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO OE DE <i>EUGENIA GRACILLIMA</i>	31
5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO CONTENDO OE DE <i>EUGENIA GRACILLIMA</i>	33
5.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	34
5.2.2 ANÁLISES TÉRMICAS	36
5.2.2.1 CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC)	36

5.2.2.2 TERMOGRAVIMETRIA (TG)	37
5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	38
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE	39
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS	44

INTRODUÇÃO

A Epilepsia é um grave distúrbio neuronal, sendo relatada pela primeira vez na Grécia antiga quando era associada a possessões espirituais. No século XIX, a comunidade científica elucidou que sua origem está relacionada a desordens cerebrais e, deste então, é considerada uma patologia. Esta doença acomete indivíduos em todas as faixas etárias e, atualmente, cerca de 1% da população mundial. Como sintoma comum, ocasionam crises convulsivas que podem ter etiologia conhecida ou não (COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020).

Variadas são as causas que podem desencadear crises convulsivas. Em países em desenvolvimento há uma maior frequência de casos relacionados a doenças infecciosas, parasitárias e traumatismo cranioencefálico, enquanto que nos países desenvolvidos há uma maior frequência associada a distúrbios do desenvolvimento e de causas idiopáticas. Os resultados dessa patologia englobam redução na qualidade de vida, comorbidades importantes como dificuldade no aprendizado, problemas psicológicos e psiquiátricos, além de déficits neurológico (CASTAN; CUNEGATTO, 2018; COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020; MARCHETTI et al., 2005).

No Brasil, cerca de 340 mil novos casos por ano são registrados, com acúmulo de 1,8 milhão de pacientes com epilepsia ativa. Concomitante a isso, estudos recentes mostram que 9 milhões de brasileiros já apresentaram, ao menos uma vez na vida, um episódio convulsivo. As crises são caracterizadas por uma hiperatividade neuronal associada a circuitos cerebrais, ocasionando descargas elétricas excessivas e sincrônicas que, em casos mais graves, as crises são prolongadas ou repetidas em intervalos mais curtos (COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020).

Atualmente, existem mais de 20 tipos de medicamentos anticonvulsivantes (MA) que podem ser usados para o tratamento sintomático da doença. Para tanto, requer utilização de forma individual, ou seja, em monoterapia. No entanto, quando o modelo inicial não resultar em uma resposta positiva, ou seja, reduzir as crises convulsivas, sua duração e consequentemente melhorar a qualidade de vida do paciente, é necessário a associação de fármacos com diferentes mecanismos de ação que, estatisticamente surtem eficácia em apenas 10% dos casos que assim são tratados. A realização da intervenção cirúrgica, nessa situação, também é uma opção em casos mais remotos, devido sua complexidade (PASSOS, 2020; SISODIYA et al., 2002).

Aproximadamente 30% dos pacientes, mesmo com definição da causa originária das crises convulsivas, não respondem adequadamente as terapias farmacológicas disponíveis, apresentando epilepsia refratária às medicações existentes (SISODIYA et al., 2002; STEVELINK et al., 2017). Além disso, drogas que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) podem interagir entre si ou desencadear efeitos adversos indesejáveis como dependência, amnesia, sedação, disfunções cognitivas, dentre outros, que ocasionam grande dificuldade na adesão terapêutica (SIQUEIRA-LIMA et al., 2017; SUCHER; CARLES, 2015).

A Biodiversidade brasileira apresenta um potencial farmacológico representativo. As indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias buscam constantemente produtos naturais, que sejam derivados dessa biodiversidade. Muitas são as plantas encontradas no Brasil, porém, as do gênero *Eugenia spp.* destacam-se pelo potencial bioativo. Estudos demonstraram que essas plantas apresentam ação farmacológica como agente antimicrobiano, antifúngico (MARIATH; LIMA; LIMA, 2006), grande capacidade antioxidante (STIEVEN; ET AL, 2009), efeito diurético, hipotensor, vasodilatador, antidiarreica (QUEIROZ et al., 2015), atividade anticonvulsivante (POURGHOLAMI et al., 1999), além de potencial neuroprotetor (FLORES et al., 2020).

A espécie *Eugenia gracillima* é encontrada no Brasil, onde é utilizada como matéria prima para a gastronomia e produção de bebidas tradicionais (ARAUJO, 2015), além disso, seu óleo essencial (OE) foi relatado com propriedades antioxidante e antiprotozoária, importantes para a prospecção de novos medicamentos, além de ajudar no combate a patologias negligenciadas (GOMES, 2019).

Os óleos essenciais (OEs) são compostos por moléculas de baixíssimo peso molecular que possuem facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica, favorecendo sua aplicabilidade terapêutica inclusive para tratamento de patologias neurológicas. Por isso, é crescente a utilização terapêutica, na aromaterapia, por exemplo, como antidepressivos e ansiolíticos (CAROLINE et al., 2020; PASSOS et al., 2009).

Os componentes majoritários dos óleos essenciais são determinantes para a atividade biológica dos mesmos que, comumente possuem terpenos em sua composição (PASSOS et al., 2009). Dentre os sesquiterpenos, o D Germacrene é comum como componente majoritário dos óleos essenciais que possuem atividade anticonvulsivante (COIMBRA et al., 2019; SYLVESTRE; NAGAU; LEGAULT, 2006)

Ao prospectar novos medicamentos, estudos biofarmacêuticos são realizados afim de verificar características intrínsecas das matérias primas. Os OEs possuem pontos positivos como permear as membranas corporais, que favorece sua chegada ao respectivo local de ação, no entanto, outros aspectos precisam ser melhorados, como a baixa hidrossolubilidade, resultando em baixa absorção e consequente redução da biodisponibilidade. Biotecnologias são aplicadas com o intuito de melhorar esses aspectos e equilibrar as características das matérias primas utilizadas nos medicamentos sem alterar sua composição química, como a complexação desses compostos em polímeros (AGUIAR et al., 2014; COIMBRA et al., 2019; SIQUEIRA-LIMA et al., 2017).

Diante deste contexto, o presente trabalho utiliza o óleo essencial de *Eugenia gracillima* (OEEG) oriundo da biodiversidade brasileira, para avaliar a atividade anticonvulsivante induzidas por picrotoxina (PIC), além de comparar com o desempenho do seu respectivo complexo de inclusão em betaciclodextrina (β -CD).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um anticonvulsivante natural utilizando o óleo essencial de *Eugenia gracillima*.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Obter e caracterizar a composição química do óleo essencial de *Eugenia gracillima*;
- ✓ Obter e caracterizar físico-quimicamente complexos de inclusão de β -ciclodextrina contendo o óleo essencial;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial e do complexo de inclusão;
- ✓ Avaliar a atividade anticonvulsivante do óleo essencial e do complexo de inclusão.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O GÊNERO *EUGENIA* SPP. E BIOATIVIDADE

A biodiversidade vegetal brasileira é continuamente investigada e ainda assim há muito a esclarecer. Dentre todas as famílias que tem potencial medicamentoso, cosmético e alimentício está a família *Myrtaceae*. Divide-se em duas subfamílias: *Myrtoideae* e *Leptospermoideae*; compreendendo cerca de 144 gêneros e mais de 5000 espécies distribuídas pelo mundo, com exceção da Antártica. No Brasil, mais de 900 espécies e cerca de 23 gêneros são encontrados, sendo a maioria neotropical. Dentre os gêneros mais conhecidos, está a *Eugenia spp* (AURICCHIO, 2003; FONTANA; LUÍS DE GASPER; SEVEGNANI, 2014).

O gênero *Eugenia*, da subtribo Eugeniinae, ordem Myrtales, subclasse Rosidae, classe Magnoliopsida possui grande potencial farmacológico, comercial, alimentício que, continuamente, é validado através das inúmeras pesquisas realizadas. Apresentam cerca de 400 espécies distribuídas pelo Brasil, no entanto, grande parcela ainda não é identificada e são desconhecidas quando a sua composição química e atividades biológicas (AURICCHIO, 2003).

Da grande parcela que é popularmente utilizada e possui composição conhecida, estudos demonstram que desempenham inúmeras atividades biológicas comprovadas como antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antioxidante, imunomoduladoras (AURICCHIO, 2003; BEZERRA FILHO et al., 2020; GHADERMAZI; KERAMAT; GOLI, 2017; HAN; PARKER, 2017; MENDES et al., 2018; MICHELON et al., 2020; WUERGES; GANDRA, 2016). Representantes do gênero *Eugenia spp.* também obtiveram resultados satisfatórios ao atuar no SNC, atuando na redução da dor através de mecanismos ligados opioide e colinérgico (KHALILZADEH et al., 2016), como agente antidepressivo (BARAUNA et al., 2018), e neuro protetor (FLORES et al., 2020).

3.2 A ESPÉCIE *EUGENIA GRACILLIMA*.

Eugenia gracillima conhecida popularmente como murta, é uma espécie de Myrtaceae da Região Nordeste do Brasil e também do cambuí no estado do Paraná. Apresenta-se como um arbusto variando em entre 1,5 a 5,0 metros de altura. Considera-se uma espécie nativa endêmica bastante difundida no território brasileiro. A espécie é encontrada naturalmente na Chapada do Araripe, estado de Pernambuco, Brasil, onde as frutas apresentam importância socioeconômica para a região (ARAÚJO et al., 2016).

O fruto da murta possui grande quantidade de vitamina C, antocianinas totais, flavonoides, carotenoides que indicam grande potencial antioxidante dos mesmos que, ainda assim, não é explorado tanto quanto deveria. Esses frutos tem despertado o interesse dos consumidores locais por apresentar funções nutricionais e funcional, no entanto, é necessário a aplicação de tratamentos tecnológicos, com o intuito de aumentar sua durabilidade e, com isso, ser possível a comercialização e dos mesmos (FEITOSA et al., 2017).

Estudos com distintas atividades biológicas dos derivados da *Eugenia gracillima* ainda são pouco evidenciados, porém, em recente trabalho seu potencial antioxidante e antiprotzoário foi avaliado e o resultado foi bastante significativo. O óleo essencial de *Eugenia gracillima* (OEEG) apresentou majoritariamente sesquiterpenos como o germacrene D e B, α -muurolene e bicyclgermacrene, que possuem grande relevância por estar correlacionado com outros óleos essenciais que desempenham atividade neurológica, inclusive anticonvulsivante (APEL et al., 2011; COIMBRA et al., 2019; GOMES, 2019).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas realizam metabolismos essenciais para sua sobrevivência, que podem ser dividido em primário e secundário (Figura 1). O primário (basal) constitui um conjunto de processos comuns, semelhante entre as diversas espécies vegetais, que levam a produção de compostos importantes e vitais, responsáveis por intermediar outras vias metabólicas e fornecer energia, como carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. O metabolismo secundário (especial) produz substâncias

complexas, como os OEs, que não participam das funções primárias das plantas (KREIS et al., 2017; REZENDE et al., 2016).

Os OEs são compostos complexos extraídos de várias partes das plantas, por meio físico (prensagem ou destilação) e utilizados para inúmeros fins, pelo homem, desde os primórdios. Formados por agentes voláteis e não voláteis, com alta solubilidade em lipídeos, as moléculas que os compõem são diversas e responsáveis por desempenhar suas atividades biológicas além de assegurar a propagação da espécie ao desempenhar função de comunicação entre a planta e os agentes polinizadores das mesmas.

Os OEs possuem rápido metabolismo endógeno e eficiente distribuição corporal, podendo ser usado na forma de inalação, vapores e oralmente. Devido a isso, são potenciais matérias primas e o mesmo produto pode ser empregado para distintas utilidades como proteção antibacteriana, antifúngica, fotoprotetora, inseticida, estando em crescente investigação científica pelas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (CUI et al., 2019; DONSI; FERRARI, 2016).

Atualmente, existem mais de 3000 óleos essenciais reconhecidos, porém, apenas 10% deles são amplamente comercializados. A variabilidade na composição destes produtos é dependente de vários fatores como as condições do habitat natural, a composição do solo e o método de cultivo, a estação e o horário do dia em que a planta foi colhida, as condições de armazenamento e processamento, o método de extração do óleo e a análise dos componentes químicos (ALCÂNTARA et al., 2010; LAZARO et al., 2016).

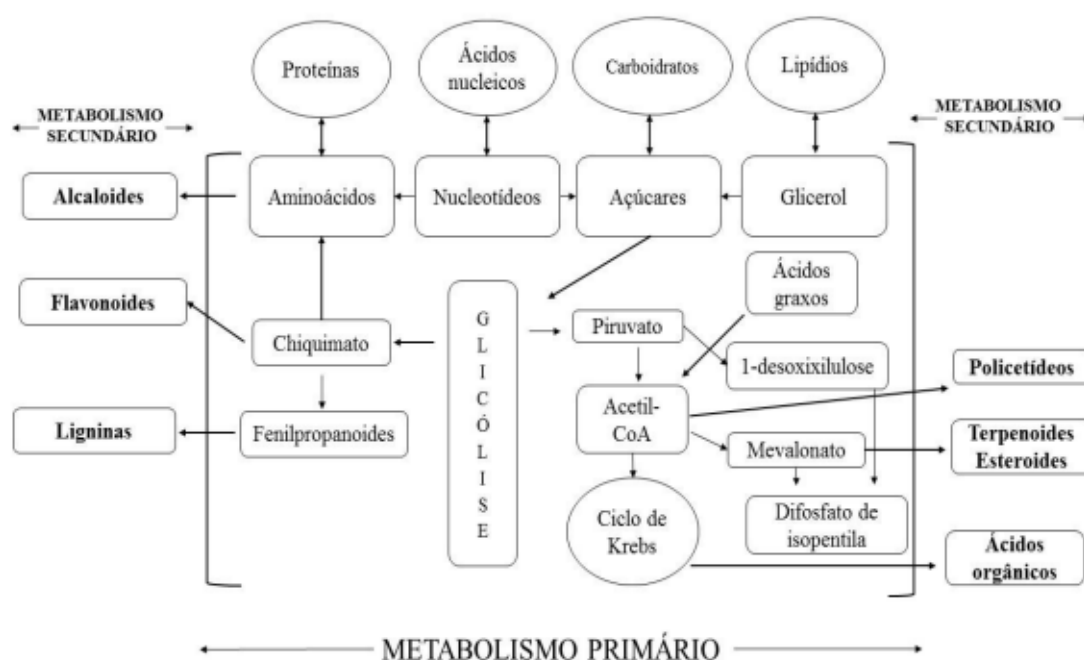


Figura 1: Metabolismo primário (basal) e Metabolismo secundário (especial)

Fonte: Adaptado de KREIS et al., 2017

Mais de 500 tipos diferentes de compostos podem estar presente no OE, porém, o maior grupo químico encontrado são os terpenos. Caracterizados como compostos químicos de hidrocarbonetos produzidos a partir de unidades de isopreno de 5 carbonos (C_5H_8). Consoante, a aglomeração de subunidades de isoprenos dar-se-á os monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}), sendo responsáveis também pelo odor característico. Estudos correlacionam também que, a presença de terpenóides, está associada a atividade neurológica OE. Existem várias interferências que influenciam a síntese destes compostos e são estes fatores que implicam o tipo de OE, mesmo dentro da mesma espécie. Estes podem ser segregados como fatores morfológicos, ambientais, geográficos e genéticos ou evolutivos (PASSOS et al., 2009).

A natureza instável dos OEs e a fragilidade de seus componentes voláteis são fatores que desencadeiam sua rápida degradação, necessitando para tanto caso proteção efetivamente contra os fatores do ambiente externo como calor, luz, umidade, oxidação e volatilização (WADHWA et al., 2017a).

3.4 A CICLODEXTRINA (CD)

As CDs ou dextrinas, são oligossacarídeos carreadores macrocíclicos, resultantes da degradação do amido oriundo da ação enzimática da ciclodextrinaglucanotransferase. Essas estruturas apresentam uma região hidrofílica (superfície externa) e outra região hidrofóbica (cavidade interna), devido a distribuição dos grupos hidroxilas (-OH) secundários (C2 e C3) e a hidroxila primária (C6). Estes estão posicionadas na borda da molécula, e o grupo apolar que se encontra no interior da mesma (Figura 2). Como resultado dessa conformação estrutural, as CDs possuem capacidade de “hospedar” em sua estrutura grande variedade de moléculas lipofílicas (DEL VALLE, 2004; VENTURINI et al., 2008; WADHWA et al., 2017b).

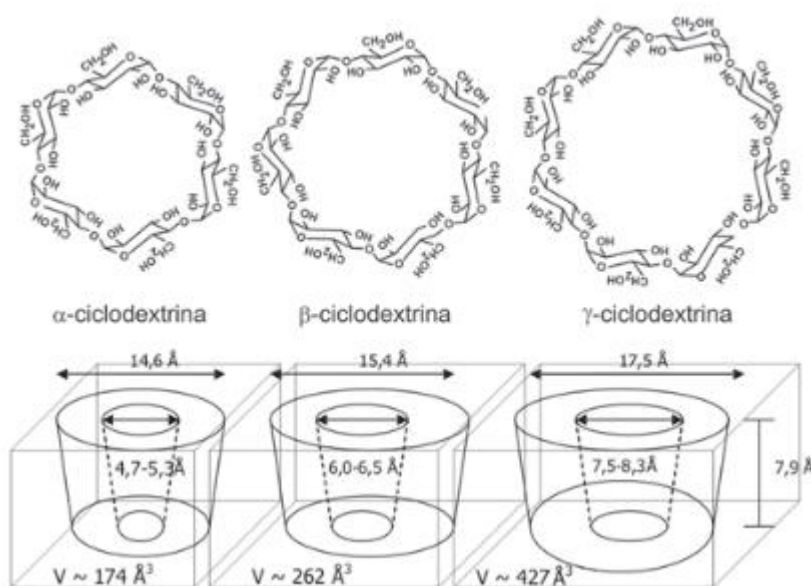


Figura 2: Estrutura molecular das CDs

Fonte: Adaptada, (VENTURINI et al., 2008)

As CDs naturais mais importantes são a β , α e γ -CD, compostas por 7, 8 e 6 moléculas de glicose, respectivamente. Apresentam diferentes propriedades apresentadas na Tabela 1. A betaciclodextrina (β -CD) atualmente é a forma mais comum utilizada em formulações farmacêuticas e, com isso, a provável CD que mais

é estuda em humanos, no entanto, devido sua baixa solubilidade em água, quando comparada as demais CDs, substituições nos grupos hidroxila da β -CD proporcionam a formação de derivados mais solúveis, por exemplo hidroxipropil- β -CD. Este possui radicais hidroxil-propil substituindo suas hidroxilas secundárias que consequentemente aumentam sua solubilidade para cerca de 600 g/L (DAVIS; BREWSTER, 2004; DEL VALLE, 2004)

Tabela 1: Propriedades Físico-químicas das CDs

Propriedade	α -CDs	β -CDs	γ -CDs
Número de resíduos de glicose	6	7	8
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade a 25° C (% m/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura da cavidade (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

Fonte: Adaptada, (DEL VALLE, 2004)

Devido sua capacidade de formar complexos de inclusão, as CDs são largamente avaliadas, principalmente pela indústria farmacêutica, como agentes que melhoram a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis, consequentemente auxiliam no aumento da biodisponibilidade e estabilidade farmacêutica. Essas moléculas também bem são responsáveis pela redução da irritabilidade dérmica, ocular e gástrica provocadas pelos fármacos, favorecendo assim sua eficácia, segurança adesão terapêutica. Em países como Estados Unidos, Japão e alguns situados na Europa, é crescente a presença dos derivados das ciclodextrinas naturais em medicamentos, devido suas grandes vantagens para aplicação em diversas formas farmacêuticas (GUEDES et al., 2008; URBAN et al., 2016).

O mecanismo de encapsulação molecular é possível devido a substituição das moléculas de água presentes da região interna das CDs. Quando em soluções aquosas, os ativos hidrofóbicos que serão complexados removem as moléculas do interior da cavidade e para tanto, ligações não covalentes são formadas e quebradas,

favorecendo a contínua complexação e dissociação dos envolvidos. A efetiva complexação está ligada a fatores estereoquímicos dos agentes que serão encapsulados, como compatibilidade geométrica com as CDs e sua polaridade. Outras ligações também são importantes para a formação dos complexos e a manutenção da estabilidade, como as interações eletrostáticas de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio (GUEDES et al., 2008). Atualmente, a complexação de OE com moléculas de CDs tem demonstrado ser bastante eficiente quanto a formação dos complexos. Existem dois métodos específicos mais utilizados a co-precipitação e o amassamento. (WADHWA et al., 2017a).

Diversas técnicas podem ser usadas para constatar a interação molecular entre a CD e a molécula-hóspede. Essas técnicas validam a formação do complexo de inclusão e utilizam para tanto, a verificação de mudanças nas propriedades das moléculas envolvidas, através de fluorescência, espectroscopia UV-Vis, RMN, infravermelho, análises térmicas, entre outras (AGUIAR et al., 2014; DE ALMEIDA MAGALHÃES et al., 2020; DE SANTANA et al., 2020; FRACETO et al., 2007).

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) possibilita o reconhecimento de grupos funcionais que, por outras metodologias, não é possível, por isso é bastante requerida para caracterização de compostos orgânicos. Essa identificação ocorre quando a radiação IV, ao ser absorvida pelas moléculas, se converte em energia de vibração molecular. O aparecimento de bandas, resultado do espectro vibracional, são característicos pois cada variação de nível de energia vibracional refere-se as diversas alterações de níveis de energia rotacional (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2006; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005).

A região mais utilizada na área farmacêutica, inclusive para identificação estrutural de moléculas, entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} pois, cada molécula orgânica representa um espectro na região do IV, não havendo repetições, sendo característico de cada molécula (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2006). As técnicas FTIR são rápidas e necessitam de pouca quantidade de amostra, além de não serem técnicas destrutivas. Dessa forma, torna-se possível avaliar a formação do complexo de inclusão através da comparação dos espectros do hóspede puro e de seus complexos sólidos obtidos por distintas técnicas (LYRA et al., 2010).

A análise de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), método usado para investigar a interação entre moléculas e CDs em estado sólido, tem como objetivo gerar curvas termais das amostras que revelam informações sobre modificações nas

propriedades físicas e energéticas das mesmas. A CD por exemplo, quando submetidas a análise de DSC, desenvolve um pico endotérmico entre 90 e 130 °C, que é compatível com a sua desidratação, e um pico característico com sua decomposição, após os 300 °C (ABARCA et al., 2016).

Como técnica complementar, a análise termogravimétrica (TG) é utilizada para certificar os resultados obtidos pelo DSC. Diante disso, é possível verificar o efeito da variação de temperatura na oscilação de massa da amostra. O aumento na estabilidade de moléculas encapsuladas em CD é mostrado nas curvas das análises térmicas pois, quando em comparação com a molécula livre, os picos endotérmicos e de decomposição são extintos, e o complexado desenvolve comportamento térmico semelhante ao da CD (ABARCA et al., 2016; MURA, 2015).

A complexação com CD é uma técnica eficiente e apresenta vantagens significativas que garantem a formação de um complexo molecular para fornecer vantagem biofarmacêuticas aos fármacos, redução de seus possíveis efeitos adversos e melhora na farmacocinética. Em congruência com estes aspectos, a vantagem da complexação com CD advém da pouca ou nenhuma bioatividade deste oligossacarídeo livre (MURA, 2015).

3.5 CONVULSÕES E FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES

Desde os primórdios a epilepsia configura um transtorno de proporções importantes e de grande interesse da população. Relatos datados de 2000 a.C. inicialmente a correlacionavam como “punição” enviada por Deus, no entanto, sua origem neurológica foi paulatinamente elucidada e interpretações equivocadas foram apagadas. Atualmente, sabe-se que esse distúrbio apresenta-se como crises convulsivas não fisiológicas, que estão ligadas a descargas elétricas neuronais, podendo ser focais ou disseminar-se em outras áreas do cérebro (COSTA; CORRÊA; PARTATA, 2012; COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020; DUNCAN et al., 2002).

Mundialmente cerca de 1% da população sofre com convulsões epiléticas, fixando-se com isso a patologia neurológica com maior frequência entre humanos. Países desenvolvidos e países em desenvolvimento diferem quanto a quantidade de acometidos. Os mais pobres superam em cerca de 2% o número de casos, estendendo as diferenças também às possíveis etiologias. No Brasil, estima-se que

cerca de 9 milhões de pessoas, ao menos uma vez na vida, já tiveram uma convulsão, e os pacientes portadores efetivos de epilepsia, excedem 1,8 milhão (COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020).

Diversos fatores ocasionam as crises como traumatismo no nascimento ou cranioencefálico, incompatibilidade sanguínea ou hemorragia, doenças infecciosas (meningite), doenças parasitárias, abuso de bebidas alcoólicas e de drogas, tumores cerebrais, doenças metabólicas, processos degenerativos, distúrbios vasculares e Acidente vascular cerebral (AVC) porém, cerca da metade dos casos são idiopáticos, ou seja, não é possível ser esclarecido a possível causa (COSTA; CORRÊA; PARTATA, 2012; COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020; GALANOPOULOU et al., 2012).

Após a comprovação clínica da convulsão, a etapa seguinte é classificar o tipo da crise. De acordo com a Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE) as crises podem ser focal ou generalizadas: Atônicas, que envolvem a perda do tônus muscular; Clônicas, presença de contrações rítmicas dos músculos; Tônicas, característica de rigidez dos músculos; Mioclônicas, envolvendo contrações súbitas dos músculos; Espasmos epiléticos e convulsões febris. Podem também ser com ou sem o comprometimento da consciência. Podendo ser motoras ou não motoras, ou de início desconhecido, também chamadas de idiopáticas. Para essa etapa, a observação geral do paciente é indispensável, inclusive para assegurar o potencial risco de mortalidade e selecionar a melhor opção para o tratamento do paciente (FISHER et al., 2017).

A terapia medicamentosa antiepilética, também chamada de anticonvulsivante, tem baseia-se em sinais clínicos. Inicialmente, o tratamento medicamentoso é realizado em monoterapia, ou seja, apenas uma medicação é prescrita porém, em casos que os pacientes não apresentam redução das convulsões, deve-se iniciar associações medicamentosas, no entanto, os resultados comumente não são positivos, e representam apenas 10% de eficácia nos pacientes que fazem uso. Os medicamentos que, tradicionalmente, são usados para o controle total das crises convulsivas são: fenobarbital, topiramato, carbamazepina, ácido valpróico e os benzodiazepínicos (COSTA; CORRÊA; PARTATA, 2012; COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020).

O uso das opções medicamentosas existentes estão correlacionadas com importantes efeitos adversos, como depressão, sedação, tremor, encefalopatias, entre outros, que comumente dificultam a adesão ao tratamento (COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020).

Aproximadamente 30% dos pacientes não reduzem as convulsões com as terapias medicamentosas existentes, seja em monoterapia ou associações, sendo estes considerados refratários às medicações. Esses pacientes podem ter apenas controle parcial das crises e não as reduzir completamente. Com isso, sérios problemas podem ser desencadeados como aumento do risco de morte e internações, neuropatias, deficiências psicológicas e redução da qualidade de vida. O diagnóstico de epilepsia refratária é bastante complexo e depende de vários fatores como a causa das convulsões, idade do paciente e, inclusive, se existe associação de causas genéticas (FRENCH, 2007; LÖSCHER et al., 2020).

Como alternativa aos pacientes que não respondem corretamente aos medicamentos existentes, novas opções vêm sendo continuamente avaliadas para diminuir essa lacuna. Produtos derivados das plantas são bastante investigados. A exemplo, o Canabidiol, componente da planta *Canabis sativa*, desbrava grande batalha para incorporar-se como opção terapêutica aos pacientes com epilepsia refratária (MATOS et al., 2017).

Os OEs também já possuem diversos exemplares que demonstraram positiva capacidade anticonvulsivante, como o extraído da *Eugenia caryophyllata* (NÓBREGA et al., 2003). No entanto, devido características intrínsecas como instabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e volatilidade, a complexação representa uma alternativa viável para seu melhoramento e, as CDs atualmente, representam uma alternativa viável e satisfatória para tal aplicabilidade (AGUIAR et al., 2014; COIMBRA et al., 2019; DE SANTANA et al., 2020; GUEDES et al., 2008; VENTURINI et al., 2008; WADHWA et al., 2017a).

Sendo assim, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos anticonvulsivantes são de extrema importância, principalmente para os pacientes que não respondem aos medicamentos que atualmente estão disponíveis. As novas opções terapêuticas naturais, oriundas da biodiversidade brasileira, representarão uma nova oportunidade para reduzir os danos causados aos pacientes acometidos pela epilepsia (CASTAN; CUNEGATTO, 2018; COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020; LÖSCHER et al., 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas da espécie *E. gracilima* foram coletadas na Serra dos Paus Dóias - Chapada do Araripe, município de Exu, Pernambuco (latitude 7°21"S, longitude 39°53"W e altitude 884m). A colheita foi realizada no mês de junho de 2019, onde o material vegetal foi identificado no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA e o comprovante da espécie foi depositado no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima - HCDAL da Universidade Regional do Cariri - URCA, catalogado sob o número de registro 13.055.

4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As folhas de *E. gracillima* foram separadas manualmente e colocadas no moinho de facas, após a retirada dos materiais indesejados. O OEEG foi obtido através de arraste a vapor de água, aquecida por 5 horas, na qual foi utilizado 300 g do material previamente triturado, sendo adicionado ao balão de hidroddestilação com água, na proporção de 1:10 (m/v). O OEEG foi resultante da condensação simultânea com o vapor de água no condensador. O restante de água foi removido pela passagem do OEEG através de um filtro contendo agente secante (Na_2SO_4). O mesmo foi mantido sob refrigeração a -4 °C.

4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

Para determinação da composição química do OEEG foi utilizado um Cromatógrafo a Gás (Palo Alto, CA, EUA), série 5975C, com sistema de detecção de quadrupolo triplo ligado a uma coluna Agilent Technologies DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Amostras contendo 1 μL (1:50 do OEEG), foram injetadas no cromatografo gasoso acoplado à espectrometria de massa CG-EMS. Os compostos foram identificados pela comparação de seus espectros de massa usando o software MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry TM 9th Edition, integrados ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) e ao Índice de Retenção. As amostras foram quantificadas por cromatografia gasosa com detector

de ionização de chama (GC-DIC), em triplicata para o cálculo do desvio padrão da porcentagem da área de pico para cada composto no cromatograma.

4.4 PREPARAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

Após a caracterização e identificação do componente majoritário do OEEG, a preparação do complexo de inclusão foi realizada. Para tanto, utilizou-se o D-Germacrene (16,1%). O componente majoritário D Germacrene foi escolhido e na razão molar de 1:1 (D Germacrene presente no OEEG: β -CD) foram pesados. Imediatamente adicionados a um Erlenmeyer juntamente com uma solução de água (25%) e etanol (75%) deixando em um agitador magnético por 24 horas. Em seguida, a amostra foi congelada em temperatura de -4 °C e posteriormente liofilizadas a -50 °C e 1,09 Pa, até que toda a água fosse retirada. Após esse procedimento, as amostras foram conservadas em dessecador em temperatura ambiente (COIMBRA et al., 2019; MARRETO et al., 2008). Também foi realizada uma mistura física, em gral de vidro com as mesmas quantidades de OEEG e β -CD.

4.5 ANIMAIS

Foram usados camundongos adultos machos albinos Swiss (3 meses de idade, entre 30 g e 40 g). Os mesmos foram mantidos em gaiolas apropriadas, com temperatura controlada (22 °C +/- 2 °C). Foi mantido um ciclo claro/escuro de 12 h cada, com acesso gratuito a alimentos e água e um período de aclimação de 24 h. O estudo foi previamente aprovado pelo comitê, nº 0043/2020.

4.6 MEDICAMENTOS E TRATAMENTOS

Como veículo para solubilização e aplicação dos medicamentos foi utilizado Tween 80 (50%) Solução salina (NaCl 0,15M) (50%); *Diazepam* 5 mg/Kg (Germed) foi usado oralmente como medicamento de referência (controle positivo) para a atividade anticonvulsivante; Picrotoxina (PIC) 80 mg/Kg (Sigma) foi utilizado como agente indutor das convulsões por via intraperitoneal; O OEEG nas dosagens de 10, 50, 100,

200 ou 1000 mg/kg foram administrados oralmente nos camundongos; O β -OEEG nas dosagens 10, 50, 100, 200 ou 1000 mg/Kg foram administrados oralmente nos camundongos. Os camundongos foram submetidos aos testes 30 minutos após a administração intraperitoneal do agente anticonvulsivante (PIC) e 1 hora após administração oral do β -OEEG e OEEG. As soluções foram preparadas no momento dos testes e administradas em um volume de 10 ml/kg de peso corporal.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

4.7.1 Análises Térmicas

Foram realizadas as análises de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG). Ambas utilizaram um analisador térmico simultâneo (NETZSCH STA 449 F3 Jupiter) onde, aproximadamente 7mg das amostras de β -CD, OEEG, β -OEEG e MFOEEG foram adicionados, separadamente, a um cadinho de alumínio e posteriormente submetidos a uma faixa de temperatura (40 °C a 600 °C) em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e aquecimento de 10 °C por minuto. Para as curvas de DSC, foi utilizado o DSC de cada amostra, sob temperatura controlada. Os valores obtidos para todas as amostras foram plotados em gráfico e submetidas a avaliação da curva de comportamento térmico para cada uma delas. Para as curvas de TG foi utilizada a variação de massa das amostras sob temperatura controlada. Os valores obtidos para todas as amostras foram plotados em gráfico e submetidas a avaliação da curva comportamento térmico para cada uma delas (VAN HEES et al., 2002).

4.7.2 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do OEEG, MFOEEG e β -OEEG foram coletados usando um espectrofotômetro Nicolet 550-II FT-IR (Nicolet, EUA) com 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹. As amostras em foram envolvidas em pó de brometo de potássio (KBr) em uma proporção de massa 1:100. Logo após, foram comprimidos em discos com 8mm de diâmetro e

foram analisados por transmissão. Os espectros de FTIR foram analisados pelo software (OMNIC 5.2)

4.8 TOXICIDADE AGUDA

A avaliação toxicidade aguda foi realizada em duas etapas onde, inicialmente, os animais foram divididos em seis grupos com 1 animal cada. Doses distintas por via oral do OEEG (10, 100 e 1000 mg/kg) e do β -OEEG (10, 100 e 1000 mg/kg) foram aplicadas. Em seguida, os animais foram mantidos sob observação por 24 horas. Na segunda etapa os animais foram distribuídos em seis grupos, com 1 animal por grupo, que receberam por via oral altas doses do OEEG (1.600, 2.900 e 5.000 mg/kg) e do β -OEEG (1.600, 2.900 e 5.000 mg/kg), respectivamente. Os animais foram mantidos sob observação por 24 horas. Após o período, foram verificados quantos animais tinham morrido e a LD_{50} (dose letal mediana) serão determinadas através da fórmula:

$$LD_{50} = \sqrt{(D_0 \times D_{100})}$$

Onde,

D_0 = Maior dose onde não houve mortalidade

D_{100} = Menor dose que houve mortalidade

$$CED_{50} = \sqrt{(D_0 \times D_{100})}$$

Onde,

D_0 = Maior dose onde não houve efeitos colaterais

D_{100} = Menor dose que houve efeitos colaterais.

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE

A avaliação da atividade anticonvulsivante foi realizada utilizando 8 grupos experimentais (n=5), separados por: **Grupo Controle Negativo** – animais tratados com Solução salina (NaCl 0,15M) v.o; **Grupo Controle Positivo** – animais tratados

com Diazepam (5 mg/kg; v.o.); **Grupo experimental OE I-** animais tratados com OEEG (50 mg/Kg; v.o.); **Grupo experimental OE II-** animais tratados com OEEG (100 mg/Kg; v.o.); **Grupo experimental OE III-** animais tratados com OEEG (200 mg/Kg; v.o.); **Grupo experimental B-CDOE I-** animais tratados com β -OEEG (50 mg/Kg; v.o.); **Grupo experimental B-CDOE II-** animais tratados com β -OEEG (100 mg/Kg; v.o.); **Grupo experimental B-CDOE III-** animais tratados com β -OEEG (200 mg/Kg; v.o.). Uma hora após a administração dos compostos, foi administrado PIC (10 mg/Kg, i.p.) para induzir as convulsões. Após 30 (trinta) minutos, os animais foram avaliados de acordo com: Intensidade da crise convulsiva (número de convulsões), latência para início da primeira convulsão (em segundos) e latência de morte (em segundos).

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos passaram por análise quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando o mesmo foi detectado como normal, passou pelo teste de análise de variância (ANOVA) com subsequente teste de Tukey. Em caso de anormalidade os dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis, com subsequente método de Dunn. Tanto ANOVA quanto Kruskal-Wallis foram usados para indicar variabilidade entre os grupos. Os testes de Tukey e Dunn foram usados para localizar quais grupos divergem entre si. As análises estatísticas, em sua totalidade, foram consideradas com nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$) utilizando o *Graph Pad Prism*, versão 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial que foi obtido das folhas da *Eugenia gracillima*, pelo método de arraste a vapor, teve um rendimento de 0,136%. A análise química do OE por GC-EMS, das folhas de *Eugenia gracillima* (OEEG) demonstrou que os componentes majoritários presentes no óleo são Germacrene D, γ -Muuirolene-g, Byclogermacrene, Germacrene B, Δ -Cadiene, Δ -Elemene. Conforme disposto na Tabela 2, foram encontrados 45 compostos, totalizando 99,68% do óleo total. Desse percentual, 64,45% são de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 22,22% são de sesquiterpenos oxigenados, 2,22% de hidrocarbonetos monoterpenos e 11,11% de outros elementos.

Tabela 2: Composição química do óleo essencial de *Eugenia gracilima*.

TR (min)	Composto	Area (%)
22.649	Δ -Elemene	6.06
23.863	Sativene	0.21
24.052	α -ylangene	0.50
24.246	Copaene	0.60
24.351	Guaia-6,9-diene	0.68
24.611	β -boubonene	0.71
24.860	β -cubene	0.11
24.959	Cyclohexane	1.41
25.097	α -cubene	0.12
26.059	Bicyclo	4.89
26.473	β -copaene	0.31
26.685	γ -elemene	0.73

26.868	α -guaiene	1.80
27.194	Cadina-3,5-diene	0.26
27.278	Alloaromadendrene	0.90
27.450	α -humulene	1.64
27.755	Trans-caryophyllene	0.40
27.862	γ -amorphene	1.77
28.270	Cyclohexene	0.27
28.488	γ -muurolene	1.37
28.677	Germacrene D	16.10
28.820	Naphthalene	0.16
29.050	(-)-isoledene	1.30
29.278	Bicyclogermacrene	8.53
29.351	Zonarene	0.93
29.430	α -Muurolene	0.73
29.579	Cyclohexane	0.61
29.704	α -gurjunene	4.03
30.040	γ Muurolene-g	15.60
30.369	Δ -cadiene	6.23
30.518	(+)- β -guaiene	0.84
30.893	α -cadiene	2.33
31.020	Selina-3,7(11)-diene	0.15
31.636	Germacrene B	7.43
32.443	(-)-Spathulenol	0.67
32.615	2- β -pirene	0.29
32.802	Gobulol	1.03

33.026	1H-Cycloprope-azulen-4-ol	1.01
33.879	Cubenol	3.58
34.274	Viridiflorol	0.42
34.436	(+)-spathulenol	1.12
34.765	Isospathulenol	0.13
34.896	Cadin-4-en-10-ol	0.67
35.066	Torreyol	0.60
35.365	α -cadinol	0.45
Total		99.68

TR: tempo de retenção (minutos); (%) percentagem dos compostos na amostra

O componente majoritário do OE presente na espécie deste estudo, germacrene-D, anteriormente avaliado *in vitro*, apresentou atividade citotóxica em células MDA-MB-231 (RICHMOND et al., 2009), repelente e inseticida (NOGE; BECERRA, 2009). Óleos essenciais que contêm germacrene-D e bicyclogermacrene como compostos majoritários, também apresentaram atividade citotóxica melanoma murino B16F10 (SILVA et al., 2013).

Óleos essenciais de outras espécies que continham a presença de germacrene-D, germacrene B, bicyclogermacrene, espatulenol, α -humulene, α -cadinol, cubenol demonstraram atividade neurofarmacológica (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2018; DINIZ et al., 2019). No presente estudo, os mesmos compostos foram evidenciados (Tabela 1), colaborando assim a prospecção de estudos que envolvam atividades correlacionadas ao SNC.

O óleo essencial de *Annona vepretorum*, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, apresentou atividade no SNC com ação farmacológica ansiolítica, sedativa, anticonvulsivante e antidepressiva *in vivo*. Os compostos majoritários evidenciados na caracterização desde OE foram (E)- β -Ocimene, Germacrene D, Bicyclogermacrene, Limonene (DINIZ et al., 2019). O OEEG apresentou composição semelhante, com a presença de Germacrene D, Bicyclogermacrene como componentes em excesso, direcionado com isso a aplicação neurofarmacológica do óleo.

O OE de *Croton conduplicatus*, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, apresentou atividades neurofarmacológicas, como antinociceptiva, ansiolítica e sedativa em ratos, e a composição química apresentou como majoritários o 1,8-cineol, espatulenol, p-cymene e óxido de cariofileno. Adicionalmente, o OE também apresentou α -humulene, germacrene-D e bicyclogermacrene (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2018). O OEEG tem composição química semelhante ao OE de *Croton conduplicatus* e o emprego de novos ativos derivados de plantas são alternativas promissoras e, a composição química está relacionada aos efeitos farmacológicos desses derivados.

5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

5.2.1 Espectroscopia De Infravermelho Com Transformada De Fourier (FTIR)

A avaliação da formação do complexo de inclusão através da comparação dos espectros do hóspede puro e de seus complexos sólidos obtidos por distintas técnicas é imprescindível para a comprovação da encapsulação dos ativos (LYRA et al., 2010).

O deslocamento dos picos, a variação de sua forma e intensidade do IV do complexo de inclusão (azul) relacionam a formação do complexo hóspede-hospedeiro. A Figura 3 mostra os espectros de IV do OEEG, MFOEEG e β -OEEG. O Espectro do OE mostrou bandas características e de intensidade moderada em $2958,08\text{ cm}^{-1}$ e $2931,38\text{ cm}^{-1}$, já espectros da MFOEEG e β -OEEG são semelhantes aos da β -CD pura, encontrados anteriormente (ABARCA et al., 2016; LI et al., 2011).

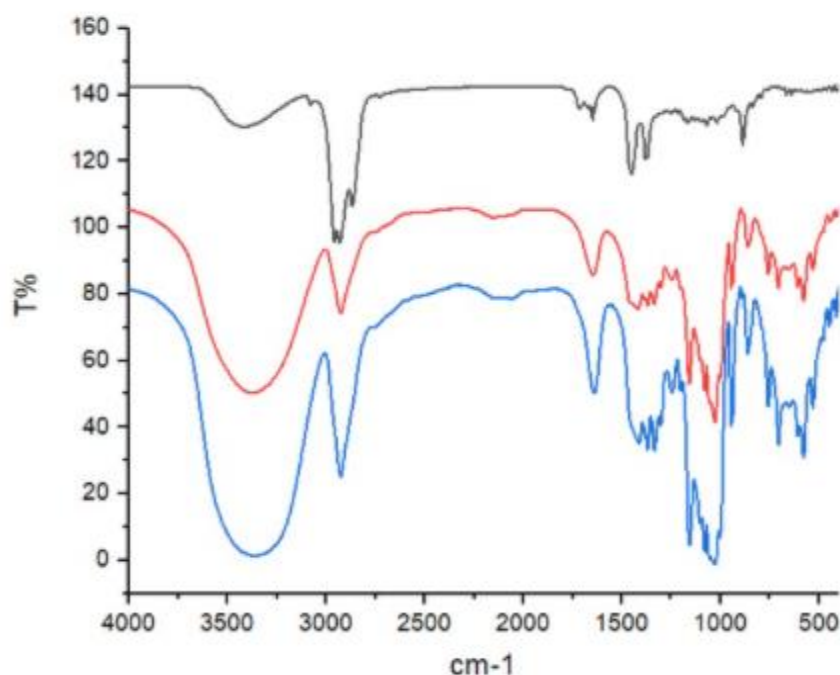


Figura 3: Espectros de FTIR do OEEG (preto), MFOEEG (vermelho) e β -OEEG (azul).

A análise dos espectros das amostras de OEEG, MFOEEG e β -OEEG permite observar que o padrão de absorção do β -OEEG sofreu uma maior perturbação pela interação com o OEEG, e isso se comprova pelo maior achatamento da banda em 1642.73cm^{-1} (no gráfico do complexo de inclusão) em comparação ao espectro atribuído ao padrão de absorção da MFOEEG. Estudos anteriores conferem que um maior estreitamento de bandas pode ser observado na formação de complexos de inclusão, fator não observado nas misturas físicas (CORTES, 2001). Os espectros da figura 3 também revelam que nas bandas 757.34cm^{-1} e 861.89cm^{-1} do β -OEEG ocorreu maior achatamento em comparação as bandas da MFOEEG.

A inclusão de uma molécula na cavidade da β -CD causa restrição conformacional, implicando na diminuição da movimentação das moléculas incluídas, desenvolvendo com isso uma redução da intensidade de sinal das mesmas (ALVES et al., 2019). A Figura 3 apresenta espectros com maior intensidade de sinal dos componentes que não foram complexados, evidenciando maior restrição de movimentação no complexo de inclusão, evidenciando com isso a formação da complexação,

5.2.2 Análises Térmicas

5.2.2.1 Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

As análises térmicas foram realizadas para confirmar a formação do complexo de inclusão. A Figura 4 mostra o comportamento das curvas de DSC de quatro amostras: β -CD, OEEG, β -OEEG e MFOEEG. A curva de DSC da β -CD mostrou um pico definido correspondente a liberação de água de sua cavidade interna da molécula, demonstrando congruência com trabalhos anteriores (DE SANTANA et al., 2020; KARATHANOS et al., 2007). A avaliação da variação térmica demonstra que o OEEG exibiu dois picos endotérmicos sendo um na temperatura de cerca 55 °C e outro na em 240 °C, que corresponde ao seu ponto de ebulição.

A Figura 4 também mostra que na curva correspondente ao o β -OEEG o pico endotérmico em 55 °C do OEEG desapareceu sugerindo a proteção do OEEG, uma vez que está na cavidade da molécula β -CD e o perfil da curva mostra sobreposição do comportamento da β -CD e OEEG.

A comparação entre o perfil de substâncias que foram complexadas e de seu respectivo preparado apenas pela mistura dos agentes corrobora para a indicação da formação do complexo de inclusão (ABARCA et al., 2016; AGUIAR et al., 2014; DE SANTANA et al., 2020). Os testes realizados no β -OEEG e na MFOEEG evidenciaram que a variação de comportamento das duas alíquotas foram pertinentes e que, o β -OEEG forneceu proteção ao OEEG, evidenciando com isso a total complexação do OE.

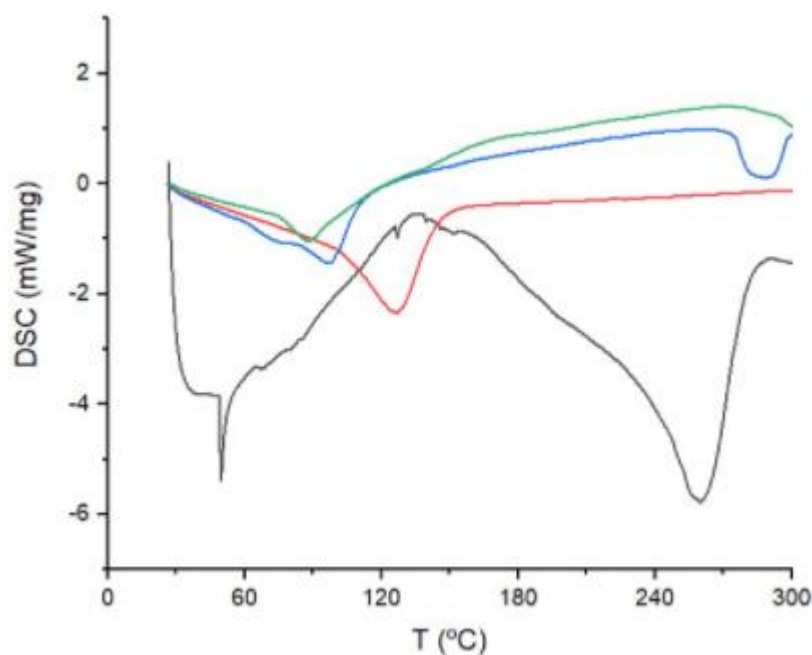


Figura 4: Termograma de DSC das Amostras de β -CD (vermelho), MFOEEG (azul), β - OEEG (verde) e OEEG (preto)

5.2.2.2 Termogravimetria (TG)

A perda de massa de β -CD pode ser observado em gráficos de TG, na qual existe um perfil termodinâmico, onde envolve a perda de água da molécula em temperatura aproximada a 120 °C com posterior decomposição térmica em temperatura acima de 300 °C (AGUIAR et al., 2014; DE SANTANA et al., 2020; SIQUEIRA-LIMA et al., 2017).

A curva de TG do OEEG demonstra uma transição de fase correspondente ao pico endotérmico, na qual existiu uma decomposição gradual entre 120 °C e 230 °C com uma perda de massa equivalente a 90,8% do total da amostra. O perfil de degradação do β -OEEG sugere a formação efetiva da complexação, uma vez que ocorre uma diminuição de perda de massa, correspondendo ao fato de que as moléculas de água no interior da molécula foram substituídas pelas moléculas do OEEG.

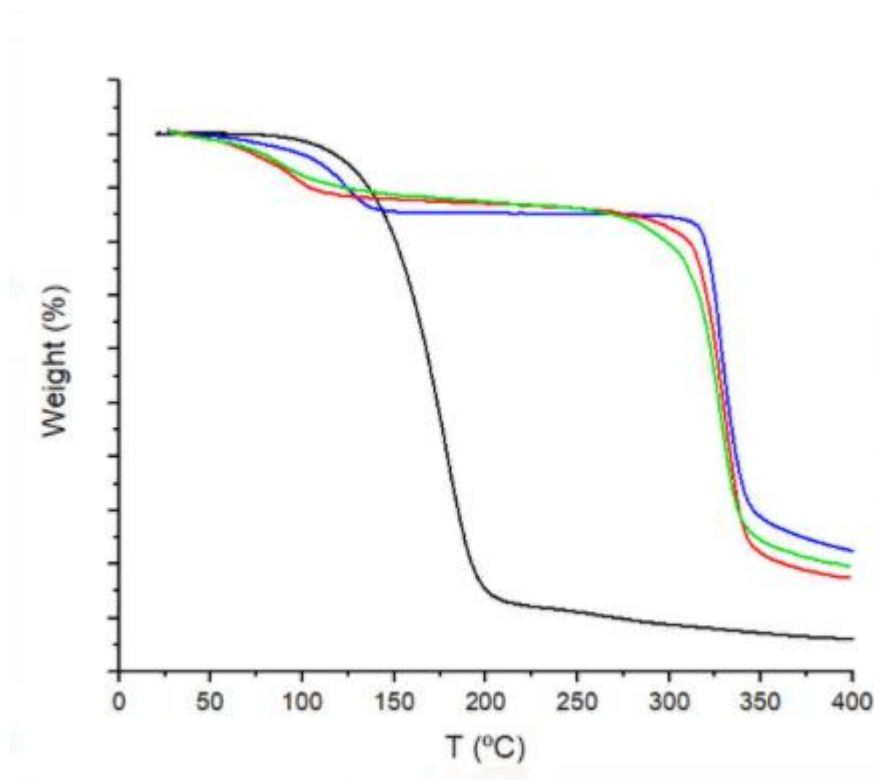


Figura 5: Termogravimetria de β -CD (preto), MFOEEG (vermelho), β -OEEG (Azul) e OEUG (preto)

A variação entre a MFOEEG e β -OEEG representam indícios importantes, visto que a perda de água da primeira, ocasionada pelo o deslocamento e posterior evaporação da água em sua cavidade molecular, configuram a possível não formação da complexação. O perfil de degradação do OEEG e do β -OEEG representam fortes indícios pois, a molécula complexada passa a degradar-se em temperatura mais elevada que o OEEG livre, fato determinado pela proteção fornecida ao fixa-se na região hospedeira da molécula de β -CD (TAKAHASHI, 2009). Os resultados das análises térmicas mostram congruência com o comportamento de outros óleos essenciais complexados em β -CD (ABARCA et al., 2016; COIMBRA et al., 2019; DE SANTANA et al., 2020).

5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade aguda configura-se como um resultado indesejado que é relatado imediatamente, ou em um pequeno intervalo de tempo, após única administração, ou várias administrações de determinado ativo, em 24h (CHINEDU;

AROME; AMEH, 2013). No presente estudo, verificamos se ocorreu mortalidade dos animais tratados com o óleo essencial livre ou complexado. Na primeira etapa do teste, os animais receberam por via oral as doses 10, 100 e 1000 mg/Kg do OEEG e do β -OEEG e nenhum animal morreu. Na etapa posterior, onde os animais receberam doses elevadas, e a maior dose foi de 5000 mg/Kg não ocorreram mortes de nenhum animal. Com isso, não foi possível determinar a DL_{50} do OEEG (DIAS et al., 2007; LIMA et al., 2010) bem como de seu respectivo complexo de inclusão.

Ativos cuja a DL_{50} encontra-se superior a 5000mg/kg são, contudo, consideradas de baixa toxicidade, sugerindo assim que tanto o OEEG e β -OEEG são substâncias de que, inicialmente, podem ser consideradas com baixa toxicidade, necessitando, contudo, de análises posteriores para verificação de parâmetros hematológicos e análises comportamentais (LORKE, 1983).

Estudos anteriores indicaram que a β -CD trata-se de molécula menos tóxica entre as CDs, não demonstrando atividade irritante na forma livre, fornecendo também proteção contra irritação gástrica causada por fármacos que foram complexados em seu interior, favorecendo sua empregabilidade como agente complexante (GUEDES et al., 2008).

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE

Foi observado que o tratamento com OEEG livre na dose de 50 mg/kg não apresentou redução significativa na duração das crises convulsivas, latência para início das convulsões e mortalidade. No entanto, observou-se que nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg, o óleo essencial livre reduziu significativamente os parâmetros avaliados, apresentando resposta dose dependente, e chegando a conferir proteção de mortalidade em 80% na dose de 200 mg/kg (Tabela 3).

Os animais tratados via oral com β -OEEG, apresentaram uma redução estatisticamente significativa sob a latência, duração das crises convulsivas e mortalidade dos animais, semelhante ao OEEG, comportamento dose dependente, chegando a inibir por completo as convulsões e mortalidade na dose de 200 mg/kg, fato este observado no fármaco Diazepam (Tabela 3).

A prevenção de convulsões induzidas por picrotoxina é um teste utilizado para triagem preliminar, sendo possível identificar potenciais drogas anticonvulsivantes. O

presente estudo revelou que tanto o óleo essencial livre (OEEG), quanto em sua forma complexada (β -OEEG) foram capazes de proteger os animais contra as convulsões induzidas pelo antagonista não competitivo dos receptores GABA-A (picrotoxina) mecanismo este, similar aos benzodiazepínicos e fenobarbital (MACDONALD; KELLY, 1993).

Estudos sobre o potencial anticonvulsivante de óleos essenciais vem crescendo nas últimas décadas, indicando o potencial farmacológico destas misturas (FEDTSCH et al., 2012; POURGHOLAMI et al., 1999; VILAR et al., 2019). O óleo essencial da espécie *Eugenia caryophyllata*, popularmente conhecido como óleo de cravo, demonstrou atividade antiepiléptica, contra convulsões induzidas por Pentilenetetrazol (POURGHOLAMI et al., 1999). Semelhantemente, o OEEG pertence a mesma espécie (*Eugenia* spp.). Outro óleo essencial que também apresentou atividade anticonvulsivante foi o extraído de *Anona vepretorum*. O mesmo apresentou abundantemente os majoritários Germacrene D e Bicyclogermacrene em sua composição, onde nas dosagens de 25, 50 e 100 mg/kg do OE, conseguiu reduzir significativamente a duração das crises convulsivas (COIMBRA et al., 2019).

Tratamento	Latência para primeira convulsão (s)	Duração da convulsão (s)	Mortalidade dos animais (%)	Proteção contra a morte dos animais (%)
NaCl 0,15M	473.80±22.05 ^e	147.00±18.17 ^a	100	0
Diazepam (5 mg/kg)	—	—	0	100
OEEG (50 mg/kg)	461.00±18.45 ^e	134.60±9.60 ^a	80	20
OEEG (100 mg/kg)	539.20±23.71 ^d	136.00±9.24 ^a	60	40
OEEG (200 mg/kg)	852.80±82.79 ^c	42.8±2.13 ^b	20	80
β -OEEG (50 mg/kg)	1.860.8±39.70 ^b	18.4±6.51 ^c	20	80

β-OEEG (100 mg/kg)	2.458.80±36.61 ^a	12.00±0.00 ^d	0	100
β-OEEG (200 mg/kg)	-	-	0	100

Tabela 3: Avaliação do efeito anticonvulsivante do óleo essencial livre de *Eugenia gracillima* (OEEG) e complexado em β-ciclodextrina (β-OEEG), sob convulsões induzidas por picrotoxina. Os valores são expressos em média ±desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatísticas.

Os óleos essenciais são compostos por diversas substâncias (componentes majoritários) e, esta complexa associação, é responsável por diferentes atuações e utilizações farmacológicas para um mesmo produto. Os componentes majoritários são constantemente avaliados e, de acordo com as literaturas disponíveis podem ser avaliados quanto atuação em distintas atividades biológicas (LAZARO et al., 2016; NÓBREGA et al., 2003; PONTES et al., 2019; SYLVESTRE; NAGAU; LEGAULT, 2006).

A epilepsia é uma patologia que acomete o SNC. Atualmente, existem algumas opções medicamentosas para o tratamento farmacológico destinado aos pacientes acometidos por essas crises, no entanto, a farmacodinâmica destas substâncias são distintas onde, de acordo com a origem da crise, o melhor medicamento é selecionado, podendo ser uma opção que tem interação com os canais iônicos ou com os receptores dos neurotransmissores (GALANOPOULOU et al., 2012; MACDONALD; KELLY, 1993).

O OEEG possui, abundantemente, os compostos majoritários Germacrene D (16.10%), γ-Murolene (15.60%), Bicyclogermacrene (8.53%), Germacrene B (7.43%) e Δ-Elemene (6.06%) na qual, anteriormente, já foram correlacionados com atividades neurológicas. O componente Germacrene D (LENGTH, 2011) e γ-Murolene (CAROLINE et al., 2020), são agente inibidores da Acetilcolinesterase, atuando no SNC contra a interação do neurotransmissor acetilcolina. Atividades neurológicas também foram associadas ao gênero *Eugenia spp.*, dentre elas, anticolinesterase (SILVA et al., 2015), e anticonvulsivante (POURGHOLAMI et al., 1999) corroborando assim com o indicativo de matéria prima promissora com atuação no SNC, inclusive contra a convulsão (COIMBRA et al., 2019; OYEDEJI; AFOLAYAN, 2005)

No presente estudo o β -OEEG apresentou superior atividade anticonvulsivante quando comparado ao OEEG. Estudos biofarmacêuticos determinam que a biodisponibilidade dos fármacos está fortemente correlacionada a hidrosolubilidade destes, bem como a permeabilidade entre as membranas celulares (ROY, 2012). A complexação é uma estratégia competente para os casos de ativos extremamente lipossolúveis, que por esta característica intrínseca não possuem alta biodisponibilidade pois, eliminam seu fator limitante mantendo sua capacidade característica de permear nas diversas membranas do organismo (LOFTSSON, 2002).

O impacto dos efeitos colaterais apresentados pelos fármacos anticonvulsivantes ou de aplicação no sistema nervoso central disponíveis atualmente na terapêutica são comuns. Dentre eles: problemas relacionados ao aumento da incidência de tumores hepatocelulares, potencial mutagênico em altas concentrações, infertilidade, teratogenicidade, aumento na incidência de encefalopatia hepática em pacientes com insuficiência hepática grave, reações paradoxais, amnésia anterógrada, cansaço, sonolência, fraqueza muscular, distúrbios no sistema nervoso central, distúrbios gastrointestinais, oculares, vasculares diversos, distúrbios renais e urinários, distúrbios na pele e tecido subcutâneo, cardiopatias, distúrbios respiratórios e hepatobiliares (ANVISA, 2020(COSTA; BRANDÃO; SEGUNDO, 2020; MACDONALD; KELLY, 1993; SUCHER; CARLES, 2015).

Em contrapartida, tanto o OEEG quanto o β -OEEG não apresentaram mortes em nenhuma das doses testadas no estudo, podendo ser posteriormente melhor investigado como possível ativo com baixa toxicidade. Os dois produtos também foram capazes de reduzir as convulsões e a duração das mesmas, bem como reduziu também a mortalidade dos animais. Sendo assim, os resultados para ação anticonvulsivante do OEEG e β -OEEG foram muito relevantes, e a sua complexação com a β -CD demonstrou um grande aumento no desempenho farmacodinâmico do óleo essencial da espécie.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, verificou-se que o OEEG apresenta como composto majoritário o germacrene-D encontrado majoritariamente também em outros óleos essenciais que obtiveram, semelhantemente, atividade anticonvulsivante bem como em outras espécies do gênero *Eugenia spp.*

As técnicas utilizadas para comprovar a complexação do OEEG demonstraram que ocorreu a devida complexação do OEEG pela molécula da β -CD.

Com os resultados encontrados no ensaio de toxicidade aguda, no qual não ocorreu mortes, mesmo na maior dose de 5.000 mg/Kg.

A comparação entre os resultados para atividade anticonvulsivante entre o OEEG e seu respectivo complexo de inclusão demonstrou que ao realizar tal tecnologia, ocorreu melhora nos parâmetros obtidos com importante ação neuroprotetora nos camundongos.

7. REFERÊNCIAS

- ABARCA, R. L. et al. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p. 968–975, 2016.
- AGUIAR, U. N. et al. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton zehntneri* COM B-CICLODEXTRINA. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 50–55, 2014.
- ALCÂNTARA, J. M. et al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae) Composition and biology activity of essential oils from leaves and stems of. v. 40, n. 3, 2010.
- APEL, M. A. et al. Chemical Composition of the Essential Oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: Section *Dichotomae*. v. 2905, 2011.
- ARAUJO, D. R. D. ET AL. Características físicas, químicas e físico-químicas dos frutos da murta Physical and physico-chemical fruits characteristics of myrtle. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 11–17, 2015.
- AURICCHIO, M. T. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. v. 62, n. 1, p. 55–61, 2003.
- BARAUNA, S. C. et al. Antioxidant and antidepressant-like effects of *Eugenia catharinensis* D. Legrand in an animal model of depression induced by corticosterone. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 6, p. 1985–1994, 2018.
- BEZERRA FILHO, C. M. et al. Antimicrobial and Antivirulence Action of *Eugenia brejoensis* Essential Oil in vitro and in vivo Invertebrate Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. March, p. 1–11, 2020.
- BILIA, A. R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. v. 2014, 2014.
- CAROLINE, D. et al. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory potential, in silico, of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg fruit peel essential oil. **Industrial Crops & Products**, v. 151, n. March, p. 112372, 2020.
- CASTAN, J. U.; CUNEGATTO, F. R. Depressão Em Pacientes Com Epilepsia Refratária Do Lobo Temporal Mesial. **Perspectivas em Psicologia**, v. 22, p. 155–167, 2018.
- CHINEDU, E.; AROME, D.; AMEH, F. S. A new method for determining acute toxicity in animal models. **Toxicology International**, v. 20, n. 3, p. 224–226, 2013.
- COIMBRA, T. et al. Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. v. 111, n. December 2018, p. 1074–1087, 2019.
- COSTA, Á. R. DA; CORRÊA, P. DE C.; PARTATA, A. K. Epilepsia e os fármacos mais utilizados no seu tratamento. **Revista Científica do ITPAC**, v. 5, n. 3, p. 1–6,

2012.

- COSTA, O.; BRANDÃO, E. C.; SEGUNDO, B. M. Atualização em epilepsia: revisão de literatura. v. 99, n. 2, 2020.
- CUI, H. et al. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. June, p. 111498, 2019.
- DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1023–1035, 2004.
- DE ALMEIDA MAGALHÃES, T. S. S. et al. Development and evaluation of antimicrobial and modulatory activity of inclusion complex of euterpe oleracea mart oil and β -cyclodextrin or HP- β -cyclodextrin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 2020.
- DE SANTANA, N. A. et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of the Eugenia brejoensis essential oil inclusion complex with β -cyclodextrin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, n. January, 2020.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.
- DIAS, K. S. et al. Avaliação dos efeitos miorelaxante, antiespasmódico e antinociceptivo do extrato aquoso da Phoradendron piperoides (Kunt.) Trel. (Viscaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 373–377, 2007.
- DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106–120, 2016.
- DUNCAN, J. S. et al. Adult epilepsy. p. 1087–1100, 2002.
- FEDTSCH, B. B. et al. Anticonvulsant activity of the essential oil and methanolic extract of. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 447–451, 2012.
- FISHER, R. S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522–530, 2017.
- FLORES, N. P. et al. Eugenia uniflora fruit extract exerts neuroprotective effect on chronic unpredictable stress-induced behavioral and neurochemical changes. **Journal of Food Biochemistry**, n. August, p. 1–8, 2020.
- FONTANA, C.; LUÍS DE GASPER, A.; SEVEGNANI, L. Espécies raras e comuns de Myrtaceae da Floresta Estacional Decidua de Santa Catarina, Brasil. **Rodriguesia**, v. 65, n. 3, p. 767–776, 2014.
- FRACETO, L. F. et al. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1203–1207, 2007.
- FRENCH, J. A. Refractory epilepsy: Clinical overview. **Epilepsia**, v. 48, n. SUPPL. 1, p. 3–7, 2007.
- GALANOPOULOU, A. S. et al. Identification of new epilepsy treatments : Issues in preclinical methodology. v. 53, n. 3, p. 571–582, 2012.

- GHADERMAZI, R.; KERAMAT, J.; GOLI, S. A. H. Antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb), oregano (*Origanum vulgare* L) and sage (*Salvia officinalis* L) essential oils in various model systems. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 4, p. 1628–1635, 2017.
- GOMES, M. ET AL. Chemical composition , antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk . leaves essential oil. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019.
- GUEDES, F. DE L. et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 3, p. 220–225, 2008.
- HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1619–1622, 2017.
- KARATHANOS, V. T. et al. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 652–658, 2007.
- LAZARO, M. et al. Rendimento , composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes. n. June, 2016.
- LENGTH, F. Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp . *dalmatica* (Vis .) Franco. v. 5, n. 30, p. 6590–6596, 2011.
- LIMA, A. P. et al. Toxicidade aguda de *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Baill., Cucurbitaceae, em. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 917–921, 2010.
- LOFTSSON, T. Cyclodextrins and the biopharmaceutics classification system of drugs. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 44, n. 1–4, p. 63–67, 2002.
- LORKE, D. A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 275–287, 1983.
- LÖSCHER, W. et al. Drug resistance in epilepsy: Clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 3, p. 606–638, 2020.
- MACDONALD, R. L.; KELLY, K. M. Antiepileptic Drug Mechanisms of Action. **Epilepsia**, v. 34, p. S1–S8, 1993.
- MARCHETTI, R. L. ; et al. Revisão de Literatura Transtornos mentais associados à epilepsia Mental disorders associated with epilepsy. **Rev. Psiqu. Clín**, v. 32, n. 3, p. 170–182, 2005.
- MARIATH, I. R.; LIMA, I. D. O.; LIMA, E. D. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia aromatica* B. contra fungos dematiceos. v. 87, n. 3, p. 81–84, 2006.

MARRETO, R. N. et al. Thermochemica Acta Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl-B-cyclodextrin inclusion complex containing Lippia gracilis essential oil. v. 475, p. 53–58, 2008.

MATOS, R. L. A. et al. The cannabidiol use in the treatment of epilepsy. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 786–814, 2017.

MENDES, J. F. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Eugenia brejoensis essential oil nanoemulsions against Pseudomonas fluorescens. **Lwt**, v. 93, n. December 2017, p. 659–664, 2018.

MICHELON, A. et al. Atividade Imunomodulatória De Extratos De Uvaia (Eugenia Pyriformis) Sobre Macrófagos Murinos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 57178–57184, 2020.

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

NÓBREGA, D. A. et al. ÓLEOS ESSENCIAIS COM PROPRIEDADES ANTICONVULSIVANTES. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 2, p. 3–6, 2003.

OYEDEJI, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of Leonotis leonurus and L. ocymifolia in the Eastern Cape, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 71, n. 1, p. 114–116, 2005.

PASSOS, C. S. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1a, p. 140–149, 2009.

PASSOS, G. History and Evolution of Epilepsy Surgery. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery**, v. 39, n. 01, p. 027–032, 2020.

PONTES, X. DE et al. Comparative study of alpha- and beta-pinene effect on PTZ-induced convulsions in mice. v. 33, p. 181–190, 2019.

POR, O. et al. Dieta Cetogénica na Epilepsia Refratária Ketogenic Diet in Refractory Epilepsy Fátima Raquel Gomes da Cunha Moreira. 2020.

POURGHOLAMI, M. H. et al. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of Eugenia caryophyllata in male mice. v. 64, p. 167–171, 1999.

QUEIROZ, M. G. et al. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de Eugenia como fitoterápico. **Revista Fitos**, v. 9, n. 2, p. 87–100, 2015.

ROY, S. Quality by design : A holistic concept of building quality in pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 3, n. 2, p. 100–108, 2012.

SILVA, Y. L. DA et al. TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO ALCOÓLICO DAS FOLHAS DE Eugenia pyriformis CAMBESS. (MYETACEAE). **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v. 19,

n. 3, p. 205–211, 2015.

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

SISODIYA, S. M. et al. Drug resistance in epilepsy: Expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. **Brain**, v. 125, n. 1, p. 22–31, 2002.

STEVELINK, R. et al. Epilepsy surgery in patients with genetic refractory epilepsy: A systematic review. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 21, n. 2, p. e17, 2017.

STIEVEN, A. C. ;; ET AL. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. v. 34, p. 7–16, 2009.

SUCHER, N. J.; CARLES, M. C. A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 52, p. 308–318, 2015.

SYLVESTRE, M.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. v. 103, n. July 2002, p. 99–102, 2006.

TAKAHASHI, A. I. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas. 2009.

URBAN, A. M. et al. Efetividade Antifúngica de Fármacos Complexados com Ciclodextrinas. **Revista Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 2, 2016.

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

VILAR, D. et al. Anticonvulsant Essential Oils and Their Relationship with Oxidative Stress in Epilepsy. **Biomolecules**, v. 9, p. 835, 2019.

WADHWA, G. et al. Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, n. 1–2, p. 39–58, 2017a.

WADHWA, G. et al. Essential oil – cyclodextrin complexes : an updated review. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 39–58, 2017b.

WUERGES, K. L.; GANDRA, E. A. Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial e Extratos de Folhas e Frutos de Pitanga (*Eugenia Uniflora* L.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 139, 2016.