

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

GRAZIELA CLAUDIA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COM O ÓLEO ESSENCIAL DE
***Eugenia brejoensis* MAZINE (Myrtaceae): ESTUDO TOXICOLÓGICO,**
GENOTÓXICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA

Recife

2022

GRAZIELA CLAUDIA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COM O ÓLEO ESSENCIAL DE
Eugenia brejoensis MAZINE (Myrtaceae): ESTUDO TOXICOLÓGICO,
GENOTÓXICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Profa. Dra. Ana Amélia Moreira Lira

Profa. Dra. Marcia Vanusa da Silva

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva, Graziela Claudia da.

Desenvolvimento de formulações com o óleo essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae) estudo toxicológico , genotóxico e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. /Graziela Claudia da Silva. – 2022.

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

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadora: Ana Amélia Moreira Lira.

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2022.

Inclui referências.

1. β -ciclodextrina. 2. Microemulsões . 3. Antinociceptivo - anti-inflamatório. 4. Segurança toxicológica. I. Correia, Maria Tereza dos Santos. (Orient.). II. Lira, Ana Amélia Moreira. III. Silva, Márcia Vanusa da. IV. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-127

GRAZIELA CLAUDIA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COM O ÓLEO ESSENCIAL DE
Eugenia brejoensis MAZINE (Myrtaceae): ESTUDO TOXICOLÓGICO,
GENOTÓXICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Data: 03/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Alisson Macário de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Kátia Alves Ribeiro
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Wesley Felix de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força, discernimento, persistência e sabedoria concedidas ao longo desta trajetória.

Aos meus pais, João Manoel e Claudicéia Silva pelas lições de vida, amor, confiança e por me apoiarem incondicionalmente. Tenho consciência de que me verem sair de casa, abdicando de uma carreira profissional, pode tê-los afligidos em algum momento, mas vibraram com cada conquista. O sonho que, inicialmente, era meu, passou a ser o deles também. Amo muito vocês! À minha estimada Dra. Alice Nascimento pelos momentos de descontração, carinho e por sempre oferecer o seu ombro nas horas mais difíceis. Obrigada por acreditar em mim quando eu já estava descrente.

Ao Dr. Heydrich pelo profissionalismo e sensibilidade em compartilhar comigo seus percalços do período de doutorando. Obrigada por me permitir enxergar com clareza os possíveis obstáculos que eu teria nessa jornada.

Ao meu amigo Márcio Henrique por me fazer sorrir quando eu mais queria chorar e voltar para casa. Quando precisei estar ausente, você foi o meu suporte em Garanhuns para com meus pais e Melzinha. Meus sinceros agradecimentos!

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Tereza Correia, por ser um exemplo de professora, orientadora e pesquisadora. Professora, muito obrigada pela confiança, incentivo, ensinamentos e fundamental contribuição na minha formação.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Marcia Vanusa, pela oportunidade e colaboração nesta trajetória.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Amélia Lira, pela ajuda, confiança, contribuições intelectuais e por ter despertado em mim novamente o interesse pela pesquisa e pela γ de farmácia.

Aos meus colegas George Souza, Lucas Alcantara, Maisa Fernanda e Talita Giselly. Obrigada pela amizade, carinho e pelos momentos de descontração e colaborações nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Alisson Macário e Prof. Dr. Cristiano Chagas pela parceria e contribuições.

Ao Prof. Dr. Antônio Gomes Souza Filho pela colaboração e presteza nas análises.

Aos bioteristas Sr. Edson e Dra. Maria Helena, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, pelo fornecimento dos animais, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Rayane Santos por todo auxílio com a parte de síntese e suporte nas solicitações das análises.

Aos colegas e colaboradores João Ricardo e Bruno Veras pela atenção e parcerias.

Aos técnicos Sócrates Golzio, do Laboratório de Multiusuário de Caracterização e Análises da UFPB; Adriana Campos e Gean Carlos, do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste; à Dra. Rosemayre Freire, da Central Analítica da UFC pela presteza nas análises das amostras.

Ao eterno técnico do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Sr. João Virgílio, sempre tão solícito e disposto a “inovar” com a mínimas condições para que os alunos pudessem executar seus experimentos. Muito obrigada, “Seu João”, por toda partilha no decorrer destes quatro anos de convivência.

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica de Fisiologia pelas contribuições intelectuais à minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica de Fisiologia, à Universidade Federal de Pernambuco e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco pelo apoio financeiro.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica que ajudaram e contribuíram para elucidar as dúvidas que surgiam no decorrer da pesquisa.

Por fim, a todos os que, porventura, não foram citados, mas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin.

RESUMO

Eugenia brejoensis é uma espécie utilizada na medicina tradicional para o tratamento de doenças inflamatórias, dores em geral e febre. Os óleos essenciais apresentam atividades biológicas interessantes, entretanto, o seu uso na indústria farmacêutica é limitado em virtude das suas propriedades físico-químicas. Sistemas microemulsionados e complexos de inclusão molecular têm sido utilizados para incrementar as atividades biológicas e aplicações farmacotécnicas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver complexos de inclusão e sistemas microemulsionados com o óleo essencial *E. brejoensis* (OEEb), avaliando o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e a segurança biológica. Procedeu-se à complexação do óleo essencial com β -ciclodextrina (por malaxagem e *slurry*) e à caracterização por técnicas espectroscópicas, calorimétricas, microscópicas e reologia. Sistemas microemulsionados foram formulados a partir de diagrama de fases, utilizando o óleo essencial (como fase oleosa), surfactantes e co-surfactantes (1:1) e água ultrapura. Os sistemas foram caracterizados por análise reológica, tamanho de gotículas, índice de polidispersividade, condutividade elétrica, microscopia de luz polarizada e pH. Os resultados da caracterização mostraram a complexação do óleo pelos métodos malaxagem e *slurry* sem grandes variações. Entretanto a eficiência de inclusão do complexo pelo método *slurry* mostrou-se mais interessante para os ensaios *in vivo*. A atividade antinociceptiva nos modelos de contorção abdominal evidenciou um aumento na inibição no número das contorções com a administração do OEEb+ β -CD (77,22%) em relação ao óleo livre (67,74%); no teste da formalina, o complexo atuou via sistema opioide com aumento significativo na inibição da dor nas fases neurogênica (78,60%) e inflamatória (91,15%) em relação ao óleo livre (53,60% e 75,21%, respectivamente). O tratamento em edema de pata com o óleo e com OEEb+ β -CD reduziu em 70,24% e 97,03%, que foi acompanhado também pela redução nos níveis de TNF- α (52,63% e 54%) e IL-1 β (65,76% e 74,10%) no modelo de peritonite aguda. A administração oral do óleo essencial e do complexo de inclusão não apresentou toxicidade aguda, assim como não indicaram potencial genotóxico no ensaio cometa e micronúcleo. A toxicidade de doses repetidas por 28 dias não revelou alterações histológicas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. O complexo OEEb+ β -CD mostrou atuar na prevenção do estresse oxidativos com elevação nos níveis de enzimas antioxidantes endógenas, e é seguro para administrações contínuas na dose de 250 mg/kg. O sistema microemulsionado desenvolvido e selecionado para avaliação das atividades biológicas (ME 2) foi classificado como fluido newtoniano (N=1) com viscosidade constante (K = 0,025), isotópico, com tamanho de gotículas de 18.69 \pm 0.04nm, PDI 0,181 \pm 0.06 e pH 6.4 \pm 0.04. A ME 2 promoveu a redução da citotoxicidade do óleo em 11% nos fibroblastos L929 e, na atividade anti-inflamatória tópica, em 87,5% do edema de orelha. Na contorção abdominal, a ME 2 e o óleo essencial mostraram-se promissores para analgesia tópica, com percentuais de inibição de 57,52% e 67,60% respectivamente. No teste de movimento de cauda, a morfina (8.75 \pm 0.20), o óleo (6.66 \pm 0.32) e ME 2 (6.33 \pm 0.33) apresentaram resultados relevantes em comparação com os valores do veículo ou microemulsão inerte. Os resultados obtidos validam o uso tradicional de *E. brejoensis* sendo relevantes as formulações desenvolvidas para aplicação em novas apresentações farmacêuticas.

Palavras-chaves: β -ciclodextrina. Microemulsões. Antinociceptivo. Anti-inflamatório. Segurança toxicológica

ABSTRACT

Eugenia brejoensis is a species used in traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases, pain in general and fever. The essential oils present interesting biological activities, however, their use in the pharmaceutical industry is limited due to their physicochemical properties. Microemulsion systems and molecular inclusion complexes have been used to enhance biological activities and pharmacotechnical applications. In this context, the aim of this study was to develop inclusion complexes and microemulsion systems with the *E. brejoensis* essential oil (OEEb), evaluating the antinociceptive, anti-inflammatory potential and biological safety. Complexation of the essential oil with β -cyclodextrin (by malaxation and *slurry*) and characterization by spectroscopic, calorimetric and microscopic techniques were carried out. Microemulsion systems were formulated from phase diagram using the essential oil (as the oil phase), surfactants and co-surfactants (1:1) and ultrapure water. The systems were characterized by rheological analysis, droplet size, polydispersity index, electrical conductivity, polarized light microscopy and pH. The characterization results showed the complexation of the oil by the malaxing and *slurry* methods without major variations. However, the inclusion efficiency of the complex by the *slurry* method proved to be more interesting for *in vivo* assays. The antinociceptive activity in abdominal writhing models showed an increase in the inhibition in the number of writhings with the administration of OEEb+ β -CD (77.22%) compared to free oil (67.74%); in the formalin test, the complex acted via opioid system with a significant increase in pain inhibition in neurogenic (78.60%) and inflammatory (91.15%) phases compared to free oil (53.60% and 75.21%, respectively). Treatment in paw edema with the oil and with OEEb+ β -CD reduced it by 70.24% and 97.03%, which was also accompanied by reduction in TNF- α (52.63% and 54%) and IL-1 β (65.76% and 74.10%) levels in the acute peritonitis model. Oral administration of the essential oil and inclusion complex showed no acute toxicity, as well as no genotoxic potential in the comet assay and micronucleus assay. Toxicity of repeated doses for 28 days did not reveal histological changes in hematological and biochemical parameters. The OEEb+ β -CD complex was shown to act in preventing oxidative stress with elevation in the levels of endogenous antioxidant enzymes, and is safe for continuous administrations at the dose of 250 mg/kg. The microemulsified system developed and selected for evaluation of biological activities (ME 2) was classified as a Newtonian fluid (N=1) with constant viscosity (K = 0.025), isotopic, with droplet size of 18. 69 \pm 0.04nm, PDI 0.181 \pm 0.06 and pH 6.4 \pm 0.04. ME 2 promoted the reduction of oil cytotoxicity by 11% in L929 fibroblasts and in topical anti-inflammatory activity by 87.5% in ear edema. In abdominal contortion, ME 2 and the essential oil showed promise for topical analgesia, with inhibition percentages of 57.52% and 67.60%, respectively. In the syrup movement test, morphine (8.75 \pm 0.20), oil (6.66 \pm 0.32) and ME 2 (6.33 \pm 0.33) showed relevant results compared to the values of the vehicle or inert microemulsion. The results obtained validate the traditional use of *E. brejoensis* and the formulations developed for application in new pharmaceutical presentations are relevant.

Key-words: β -cyclodextrin. Microemulsions. Antinociceptive. Anti-inflammatory. Toxicological safety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parque Nacional do Vale do Catimbau, área de predominância de vegetação de Caatinga	23
Figura 2 - <i>Eugenia brejoensis</i> Mazine.....	27
Figura 3 - Funções dos óleos essenciais nas plantas.....	29
Figura 4 - Estrutura do Isopreno	30
Figura 5 - Estrutura do ácido cinâmico (1) e ácido <i>p</i> -cumárico.....	31
Figura 6 - Estruturas das ciclodextrinas e processo de inclusão molecular.....	33
Figura 7 - Tipos de microemulsão	36
Figura 8 - Sistema de Classificação de Winsor (1948)	37
Figura 9 - Representação do mecanismo da transmissão da dor	41
Figura 10 - Classificação de danos no DNA da amostra submetida ao ensaio cometa.....	49

Artigo 1

Figura 1 - Fotomicrografias representativas do fígado, rim, baço e pulmão de camundongos dos grupos controle e tratados com dose única com o óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i>	74
Figura 2 - Teste de micronúcleo e ensaio cometa.....	77
Figura 3 - Efeito do óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> Mazine na contorção abdominal induzida por ácido acético.....	79
Figura 4 - Efeito do óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> Mazine no teste de formalina.....	81
Figura 5 - Atividade anti-inflamatória do óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> na redução do edema de induzido por carragenina.....	83

Figura 6 - Efeitos do óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> Mazine nos níveis de (A) TNF α e (B) IL-1 β	85
--	----

Artigo 2

Figura 1 - Diagrama de fases pseudoternários obtido com o óleo essencial de <i>E. brejoensis</i> 5% (fase oleosa)	106
Figura 2 - Imagens da microscopia de luz polarizada.....	109
Figura 3 - Perfis reológicos dos sistemas.....	110
Figura 4 - Citotoxicidade em fibroblastos L929 pelo método MTT.....	112
Figura 5 - Efeito antinociceptivo do óleo essencial de <i>E. brejoensis</i> Mazine (50mg/kg) e da Microemulsão (ME 2) na contorção abdominal induzida por ácido acético por administração tópica.....	116
Figura 6 - Efeito tópico do óleo essencial de <i>E. brejoensis</i> e da ME 2 no edema agudo induzido por óleo de cróton.....	117

Artigo 3

Figura 1 - Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial para o óleo essencial de <i>E. brejoensis</i> (OEEb), β -ciclodextrina (β -CD) e complexos de inclusão OEEb- β -CD (<i>slurry</i> e malaxagem).....	140
Figura 2 - Curvas de Termogravimetria para o óleo essencial de <i>E. brejoensis</i> (OEEb), β -ciclodextrina (β -CD) e complexos de inclusão OEEb- β -CD (<i>slurry</i> e malaxagem).....	142
Figura 3 - Difractogramas para β -ciclodextrina (β -CD) e complexos de inclusão OEEb- β -CD (<i>slurry</i> e malaxagem).....	143
Figura 4 - Microfotografias de microscopia eletrônica	145

Figura 5 - Efeito do complexo de inclusão óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> com β -ciclodextrina (OEEb- β -CD) na contorção abdominal induzida por ácido acético.....	147
Figura 6 - Efeito do complexo de inclusão óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> com β -ciclodextrina (OEEb- β -CD) (100mg/kg e 50mg/kg) no teste de formalina.....	149
Figura 7 - Efeito do complexo OEEb- β -CD (50mg/kg e 100mg/kg) no edema de pata induzido por carragenina.....	151
Figura 8 - Efeitos do complexo OEEb- β -CD e da indometacina nos níveis de (A) TNF α , (B) IL-1 β	152
Figura 9 - Fotomicrografias representativas dos fígados, rim, baço e pulmão de camundongos dos grupos controle e tratados com dose única com o OEEb- β -CD na dose de 2000mg/kg.....	159
Figura 10 - Avaliação da glicemia (A e B) e temperatura (C e D) em camundongos tratados diariamente com o OEEb- β -CD (250, 500 e 1000 mg/kg) e com solução salina 0,9% por 28 dias.....	162
Figura 11- Teste de micronúcleo e ensaio cometa	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas relatadas na literatura para <i>Eugenia</i> spp.....	24
---	----

Artigo 1

Tabela 1- Composição química do óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> Mazine.....	64
Tabela 2 - Atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> (OEEb).....	66
Tabela 3 - Atividade hemolítica do óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> (OEEb).....	68
Tabela 4 - Água, consumo alimentar e peso médio entre os grupos controle e tratado com óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> por 14 dias.....	69
Tabela 5 - Avaliação do peso do órgão de camundongos 14 dias após a administração do óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i>	70
Tabela 6 - Parâmetro hematológico de camundongos tratados com óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i> em toxicidade aguda.....	72
Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com o óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i>	73

Artigo 2

Tabela 1- Composição dos sistemas, diâmetro das gotículas, índice de polidispersividade (PDI), potencial hidrogeniônico (pH) e condutividade elétrica.....	108
Tabela 2 - Efeitos do OEEb, morfina e da ME 2 no teste de movimento de cauda em camundongos.....	118

Artigo 3

Tabela 1 - Acompanhamento do ganho de peso, consumo alimentar e hídrico em camundongos tratados com OEEb- β -CD ou com solução salina 0,9% para avaliação da toxicidade aguda (dose única) e toxicidade subaguda (doses repetidas por 28 dias).....	157
Tabela 2 - Massa (g) dos órgãos dos camundongos tratados com OEEb- β -CD ou solução salina 0,9% após 14 dias e 28 dias da administração.....	158
Tabela 3 - Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com OEEb- β -CD.....	160
Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com OEEb- β -CD.....	161

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O	Água em óleo
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
ANOVA	Análise de variância de uma única via
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COX	Ciclo-oxigenase
DFP	Diagrama de fases ternário
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DP	Desvio padrão
EE	Eficiência de encapsulação
DR-X	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GC	Gas Chromatography / Cromatografia Gasosa
IFN	Interferon
IL β	Interleucina beta
PDI	Índice de polidispersão
IR	Índice de refração
ME	Microemulsão
MLP	Microscopia de luz polarizada
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Espectrometria de Massa
NMDA	N-metil-D-aspartato
O/A	Óleo em água
pH	Potencial hidrogeniônico
TG	Termogravimetria
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UV-Vis	Ultravioleta visível
α -CD	Alfa-ciclodextrina
β -CD	Beta-ciclodextrina
γ -CD	Gama-ciclodextrina

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo geral	20
1.1.2 Objetivos específicos	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 <i>Eugenia brejoensis</i> Mazine (Myrtaceae): CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS CARACTERÍSTICAS	27
2.3 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA APLICADA AOS ÓLEOS ESSENCIAIS	31
2.3.1 Ciclodextrinas	32
2.3.2 Microemulsões	35
2.4 DOR E NOCICEPÇÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS	39
2.5 INFLAMAÇÃO	42
2.6 TOXICOLOGIA NÃO CLÍNICA DE PRODUTOS NATURAIS	46
2.6.1 Toxicidade aguda e Toxicidade de doses repetidas (subaguda)	46
2.6.2. Genotoxicidade	47
3 RESULTADOS.....	51
3.1 ARTIGO 1- ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eugenia brejoensis</i> (Mazine) PRODUZ ATIVIDADE ANTINOCIEATIVA, ANTI-INFLAMATÓRIA SEM EFEITOS TÓXICOS E GENOTÓXICOS EM CAMUNGONGOS.....	51
3. 2 ARTIGO 2 - DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÕES COM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eugenia brejoensis</i> Mazine PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA: ESTUDO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA EM CAMUNDONDOS.....	98

3.3 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eugenia brejoensis</i> MAZINE COMPLEXADO COM β-CICLODEXTRINA PRODUZ ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTINOCICEPTIVA E REVELA-SE SEGURO EM ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA, SUBAGUDA E GENOTOXICIDADE EM CAMUNDONGOS.....	127
4 CONCLUSÕES	178
REFERÊNCIAS	180
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL.....	200

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais e de produtos delas originados como fórmulas terapêuticos pela medicina popular é uma prática milenar, antecedendo, pois, a química moderna. Historicamente, está presente na sabedoria do senso comum, articulando cultura e saúde, uma vez que estes aspectos não ocorrem isoladamente, mas inseridos em um contexto histórico determinado (CRUZ; BRANDELLI, 2017; FREITAS et al., 2014). Foi a partir da experimentação e utilização de plantas medicinais na prevenção e no tratamento de doenças que foram descobertos os primeiros compostos químicos dotados de propriedades biológicas (TOMAZZONI et al., 2006; KARAM et al., 2013). Embora seja produzida uma larga escala de drogas para o tratamento de diversas patologias, o uso de produtos naturais tem intensificado-se em diversos países, principalmente no Brasil, por possuir uma flora rica e diversa (FIRMO et al., 2011). Este potencial tem atraído cada vez mais atenção para a realização de pesquisas que identifiquem novos compostos químicos presentes nos materiais vegetais.

De ocorrência exclusivamente brasileira, a Caatinga é um bioma que apresenta uma ampla biodiversidade, porém, ainda pouco conhecida e explorada. Composta por uma vegetação do tipo xerófito, as espécies vegetais que lá ocorrem são adaptadas ao clima seco e árido e à baixa disponibilidade de água, tendo adquirido mecanismos adaptativos que permitiram sua sobrevivência em condições tão adversas (DRUMOND, 2013).

Myrtaceae é uma das maiores famílias de plantas angiospérmicas do mundo, com 132 gêneros e 5.671 espécies (FARIAS et al., 2020). No Brasil, encontra-se distribuída geograficamente em todas as regiões, sendo representada por 29 gêneros e 1.1195 espécies (SILVA; MAZINE, 2016; BRASIL, 2022). Assim, a Myrtaceae constitui-se como uma família muito importante para a economia local das regiões brasileiras onde diferentes espécies são cultivadas. Adicionalmente, algumas espécies de Myrtaceae são popularmente utilizadas há décadas como agentes anti-hipertensivos, antimicrobianos, antioxidantes e anti-inflamatórios (CONSOLINI et al., 1999; CONSOLINI et al., 2002; OGUNWANDE et al., 2005).

Um dos gêneros da família Myrtaceae que possui o maior número de espécies - e, devido a esse fator, é um dos mais estudados - é o gênero *Eugenia*. No Brasil, o gênero *Eugenia* é representado por 407 espécies (MAZINE et al., 2022). Entre estas, destaca-se a *Eugenia brejoensis*, espécie endêmica da região Nordeste do Brasil e que foi primeiramente descrita no município pernambucano de Brejo da Madre de Deus (MAZINE; SOUZA, 2008). Além dos Estados nordestinos da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, a *E. brejoensis* está presente no Sudeste brasileiro, no Estado do Espírito Santo (GIARETTA; PEIXOTO, 2014).

Popularmente, *E. brejoensis* é conhecida como “cutia” e as suas folhas, frutos e caule são utilizados pela medicina popular para tratamento de diarreia, febre e reumatismo. Na literatura, são encontrados relatos sobre a ação antimicrobiana de extratos das folhas de *E. brejoensis* frente a algumas bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*) (AZEVEDO et al., 2012). Além disso, o óleo essencial extraído das folhas da *E. brejoensis* tem se destacado por apresentar atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, antibactericida em isolados de *Staphylococcus aureus* e ação tripanocida na linhagem de *Trypanosoma cruzi* (BEZERRA FILHO et al., 2020; SILVA et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Óleos essenciais são misturas de compostos voláteis produzidos no metabolismo secundário das plantas, cuja função está associada à defesa destas. Podem ser extraídos a partir das folhas, frutos, cascas e rizomas por meio de técnicas como arraste a vapor ou prensagem do pericarpo (FERRAZ et al., 2022a). Ao longo dos anos, os óleos são descritos na literatura como extraídos de diversas plantas e utilizados em variados seguimentos industriais como: perfumaria, cosméticos, alimentos e farmacêuticos (CIMINO et al., 2021; DAS et al., 2019; GALLUCCI et al., 2009). O uso destes óleos está associado ao seu potencial antibacteriano, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório, analgésicos e gastroprotetores, conferindo-lhes, assim, uma diversidade de aplicações (COSTA et al., 2022; ESTRELLA et al., 2021; SAMPAIO et al., 2019; SIEBERT et al., 2015).

A terapêutica com drogas analgésicas e anti-inflamatórias está, rotineiramente, associada à sua eficácia limitada ou efeitos adversos, tais como transtornos gastrointestinais e alterações cardiovasculares (PADOIN et al., 2018). Neste contexto, a pesquisa por novos compostos bioativos como alternativa terapêutica para tratamentos de dor, inflamação e outras doenças torna-se necessária (CAMPOS et al., 2019). Deste modo, novos agentes bioativos de origem vegetal têm sido investigados na tentativa de serem mais eficientes, mais benéficos, menos danosos e mais acessíveis à população (CABRAL et al., 2021; CHANG et al., 2011).

Diante das potencialidades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais, tem-se um entrave quanto à comercialização para a indústria farmacêutica. Por apresentarem características físico-químicas inerentes, são misturas complexas de moléculas lipofílicas altamente voláteis, podem se degradar quando expostos a determinadas condições ambientais (temperatura elevada, umidade e oxigênio), sendo também dependente das condições de armazenamento e processamento (PANDIT et al., 2016; KUMAR et al., 2020). Inúmeras estratégias com o uso da nanotecnologia são descritas para reverter as dificuldades técnicas para utilização dos óleos essenciais como matéria-prima para a indústria farmacêutica (WEISANY

et al., 2022). Dentre as alternativas utilizadas para criar um sistema de proteção, ou seja, promover a encapsulação dos óleos, destacam-se as ciclodextrinas, que são as mais utilizadas, seguidas de polímeros, principalmente o polietilenoglicol, carregadores nanolipídicos e sistemas microemulsionados (AGUIAR et al., 2014; SÁ et al., 2020; DHIMAN et al., 2021; GALVÃO et al., 2015; VIKAS et al., 2018).

As ciclodextrinas já são utilizadas como excipiente farmacêutico, principalmente para solubilizar fármacos com baixa solubilidade em água (BRASIL, 2015). Possuem características físico-químicas estáveis, capazes de proteger moléculas hóspedes da degradação pelo trato gastrointestinal: proporcionam estabilidade térmica, protegem da foto-oxidação, reduzem a volatilidade, efeitos fisiológicos - como a toxicidade - e características organolépticas indesejadas (CAMPOS et al., 2019; MENEZES et al., 2016).

As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, constituídas por uma associação de água e óleo e estabilizadas por um filme de tensoativos / co-tensoativos na interface óleo/ água. Comportam-se como reservatórios capazes de liberar e direcionar os bioativos para tecidos e células específicas, logo, proporcionam uma modificação da biodisponibilidade e, conseqüentemente, a diminuição da toxicidade de substâncias administradas em formas farmacêuticas convencionais (CALLENDER et al., 2017; MARIYATE; BERA, 2022).

Considerando os aspectos acima descritos, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar complexos de inclusão e sistemas microemulsionados com o óleo essencial das folhas de *E brejoensis*, a fim de viabilizar suas características físico-químicas, elaborando formulações capazes de melhorar a sua aplicação e possível candidatura à farmacológica. Inicialmente, foi investigado, a partir de modelos pré-clínicos, o potencial de nocicepção, anti-inflamatório e a segurança farmacológica do uso do óleo essencial de *E brejoensis*. Na sequência, procedeu-se às atividades investigatórias sobre a atuação sistêmica em modelos de avaliação da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e toxicológicas dos complexos de inclusão obtidos com o óleo essencial e β -ciclodextrina a partir do método de malaxagem. No que concerne aos sistemas microemulsionados, após a caracterização, procedeu-se à avaliação da citotoxicidade e do potencial anti-inflamatório em modelos *in vivo* para administração das formulações por via tópica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Desenvolver complexos de inclusão e sistemas microemulsionados com o óleo essencial *E. brejoensis* (OEEb), avaliando o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e a segurança biológica.

1.1.2 Objetivos Específicos

Artigo I

- Obter e caracterizar quimicamente o óleo essencial das folhas de *E. brejoensis* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massas.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos de redução de radical livre de DPPH, ABTS e formação do complexo de fosfomolibdênio.
- Investigar a toxicidade *in vitro* pelo teste de hemólise de eritrócitos de camundongos
- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* em camundongos por meio de análise bioquímicas e hematológica do sangue, e histológica dos órgãos.
- Investigar o potencial antinociceptivo *in vivo* do óleo essencial em modelos agudos de nociceção: dor induzida por ácido acético e por formalina.
- Verificar em modelos *in vivo* os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do óleo essencial, através da participação dos sistemas opioide, muscarínico e K^+_{ATP} .
- Investigar a atividade anti-inflamatória *in vivo* em modelos experimentais de indução de edema de pata e peritonite em camundongos Swiss.
- Avaliar a ação genotóxica *in vivo* do óleo essencial por meio dos testes de cometa e micronúcleo.

Artigo II

- Obter microemulsões com o óleo essencial de *E. brejoensis* como fase oleosa e diferentes surfactantes/co-surfactantes a partir de diagrama de fase pseudoternário.

- Caracterizar os sistemas microemulsionados por meio da Microscopia de luz polarizada, Espalhamento dinâmico de luz, Condutividade elétrica e Reologia.
- Investigar a toxicidade dos sistemas *in vitro* em células de fibroblastos murinos (L929).
- Verificar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva tópica das microemulsões com o óleo essencial em modelos experimentais de edema de orelha, contorção abdominal e movimento de calda em camundongos.

Artigo III

- Obter complexos de inclusão do óleo essencial de *E. brejoensis* em β -ciclodextrina por malaxagem e *slurry*.
- Analisar termicamente o óleo essencial de *E. brejoensis* e os complexos de inclusão por Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG).
- Investigar a morfologia e o perfil de cristalização dos complexos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio x (DRX).
- Verificar o potencial antinociceptivo *in vivo* do óleo essencial incluído com β -ciclodextrina em modelos agudos de nocicepção: dor induzida por ácido acético e por formalina e o mecanismo de ação por meio das vias opioide, muscarínica e K^+_{ATP} .
- Avaliar a ação anti-inflamatória *in vivo* do óleo essencial com β -ciclodextrina em modelos experimentais de peritonite e edema de pata.
- Investigar a toxicidade aguda e subaguda em camundongos tratados com óleo essencial incluído em β -ciclodextrina.
- Analisar a ação genotóxica determinando a frequência de dano no DNA e a frequência de micronúcleos em células sanguíneas de camundongos *Swiss* tratados com o óleo essencial incluído em β -ciclodextrina.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Eugenia brejoensis* Mazine: FAMÍLIA, GÊNERO E CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS

Myrtaceae é uma das mais importantes famílias das Angiospermas, compreendendo cerca de 142 gêneros e 6700 espécies, distribuídas mundialmente nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, Austrália, África e sudeste da Ásia (WILSON, 2011). De acordo com o sistema de classificação mais moderno, as espécies da família Myrtaceae são agrupadas em duas subfamílias: as Myrtoideae, distribuídas em quinze tribos (Backhousieae, Chamelaucieae, Eucalypteae, Kanieae, Leptospermeae, Lindsayomyrteae, Lophostemoneae, Melaleuceae, Myrteae, Osbornieae, Syncarpieae, Syzygieae, Tristanieae, Xanthostemoneae), e as Psiloxyleae, com apenas duas tribos, Heteropyxideae, Psiloxyleae (APG IV, 2016).

No Brasil, a família Myrtaceae é distribuída em todos os domínios fitogeográficos, tendo sido contabilizadas a identificação e catalogação de 29 gêneros e 1195 espécies, dos quais 4 gêneros e 788 espécies são endêmicos (PROENÇA et al., 2022). As mirtáceas estão entre as 10 famílias com maior riqueza de espécies que compõem a flora brasileira, sendo a Floresta Atlântica um de seus centros de diversidade, correspondendo à sexta maior família em níveis de diversidade. Na Caatinga, são encontrados 12 gêneros e 98 espécies pertencentes à família, englobando os gêneros *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Eugenia*, *Syzygium*, *Eucalyptus*, *Leptospermum* e *Melaleuca* (FORZZA et al., 2010).

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e predominante na região do Semiárido, abrigando fauna e flora endêmicas, devendo ser considerada patrimônio biológico de valor imensurável (DRUMOND, 2013). Ocupa uma área de cerca de 862.818 km², o equivalente a 10,1% do território nacional. Abrange os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (MMA, 2022). Esse bioma possui uma rica biodiversidade, com a fauna representada por 1.182 espécies e uma flora abrigando 4.963 espécies de plantas (MMA, 2022). Com precipitações anuais de 500 milímetros e temperaturas variando de 26°C a 28°C, com períodos de chuvas concentradas em três a quatro meses e seguidas de longos períodos de estiagem de oito a nove meses, a vegetação predominante em regiões de Caatinga são os bosques tropicais sazonalmente secos (SDTFWs), caracterizando-se por apresentar estratos herbáceas, arbustivas, arbóreas de pequeno porte, espécies xerófilas, caducifólias nos períodos de estiagem (Figura 1), e forrageiro no período chuvoso (ARAUJO et al., 2022; ARAÚJO FILHO, 2013; MACIEL, 2016; SILVA; MAZINE, 2016). Essas diferentes fitofisionomias da Caatinga

são oriundas das adaptações às variações climáticas, restrição hídricas, alta insolação, grandes oscilações diárias de temperatura, composição florísticas e ação indireta ou direta do homem (ARAÚJO FILHO, 2013; ARCOVERDE et al., 2014). A Caatinga tem um imenso potencial para bioprospecção que, se bem explorado, será decisivo para o desenvolvimento da região e do país. A biodiversidade da Caatinga ampara diversas atividades econômicas voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, de cosméticos, químico e de alimentos (PEREIRA et al., 2020). Diversos estudos etnobotânicos têm relatado o uso medicinal das plantas da Caatinga como alternativa no tratamento de doenças (ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2007; CARTAXO et al., 2010; SILVA et al., 2015), bem como a registrada a comprovação com cunho científico da indicação popular (ARAÚJO et al., 2021a; COSTA et al., 2022; TRENTIN et al., 2011).

Figura 1 – Parque Nacional do Vale do Catimbau, área de predominância de vegetação de Caatinga.



Fonte: Autor (2018)

Eugenia é o maior gênero neotropical circunscrito na família Myrtaceae. Estima-se que existem cerca de 1050 espécies, distribuídas na América do Sul, América Central, sudeste asiático e, com pequena representatividade, na África (MAZINE et al., 2022). É reconhecido como um dos mais importantes gêneros da família Myrtaceae, pois compreende espécies que são alvos de inúmeras pesquisas quanto à composição química e atividade biológica, sendo potenciais candidatos para utilização na área comercial, nutritiva e farmacológica (Tabela 1) (SILVA; MARINE, 2016). *E. brejoensis* é uma espécie com 1,6 a 11 metros de altura encontrada em regiões com predominância de vegetação de Caatinga (MAZINE et al., 2008), com períodos de floração e frutificação de outubro a março e dezembro a outubro, respectivamente. É encontrada principalmente nos Estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e

Nordeste do Espírito Santo (GIARETTA; PEIXOTO, 2014). Essa espécie é reconhecida por apresentar folhas elípticas ou elípticas-oblongas com nervuras marginal, inflorescência racemos, flores bractéolas persistentes e frutos elipsoides ou globosos de superfície lisa com glândulas de cor alaranjada a vermelho (Figura 2) (PINTO et al., 2021). Popularmente, é conhecida por “cutia”, sendo o uso medicinal de infusões de partes da planta de *E. brejoensis* sido apontado como antidiarreico, antirreumático e antitérmico (SILVA et al., 2015). Diversos trabalhos têm comprovado o potencial biológico de *E. brejoensis*, destacando-se, dentre eles: antimicrobiano (AZEVEDO et al., 2012), anticâncer (SANTANA et al., 2020), inseticida (SILVA et al., 2015) e antiparasitário (SOUZA et al., 2017).

Tabela 1 – Atividades biológicas relatadas na literatura para *Eugenia* spp.

ATIVIDADES	ESPÉCIES	REFERÊNCIAS
Anticonvulsivante	<i>E. caryophyllata</i>	(JEON et al., 2011)
Antidepressiva	<i>E. caryophyllata</i>	(MEHTA et al, 2013)
Antidiabética	<i>E. spp. (E. brasiliensis, E. dysenterica, E. uniflora, E. puniceifolia, E. stipitata, E. borinquensis, E. florida, E. calycina)</i> <i>E. florida DC</i>	(ARAUJO et al., 2021a) (BASTOS et al., 2019)
Anti-hipertensivo	<i>E. dysenterica</i>	(CONCEIÇÃO et al., 2011) (FIDELIS-DE-OLIVEIRA et al., 2020)
Anti-inflamatório	<i>E. brasiliensis</i> <i>E. puniceifolia (Kunth) DC</i> <i>E. umbelliflora O.Berg</i>	(LAZARINI et al., 2018) (BASTING et al., 2014) (MEYRE-SILVA et al., 2009)

	<i>E. stipitata</i> McVaugh <i>E. uniflora</i>	(COSTA et al., 2020) (FALCÃO et al., 2018)
Antimicrobiano	<i>E. brasiliensis</i> <i>E. brejoensis</i> <i>E. stipitata</i> McVaugh <i>E. calycina</i> Cambess <i>E. platysema</i> <i>E. uniflora</i> <i>E. pyriformis</i> Cambess	(LAZARINI et al., 2018) (AZEVEDO et al., 2012; BEZERRA FILHO et al., 2020) (COSTA et al., 2022) (SOUSA et al., 2015) (TENFEN et al., 2016) (FALCÃO et al., 2018) (ANGELA et al., 2014)
Antinociceptivo	<i>E. condolleana</i> <i>E. puniceifolia</i> (Kunth) DC <i>E. stipitata</i> McVaugh <i>E. involucrate</i> DC	(GUIMARÃES et al., 2009) (BASTING et al., 2014) (COSTA et al. 2020) (VECHI et al., 2018)
Antioxidante	<i>E. brasiliensis</i> <i>E. dysenterica</i> <i>E. puniceifolia</i> <i>E. uniflora</i>	(LIMA et al., 2017) (THOMAZ et al., 2018) (GALENO et al., 2014) (FALCÃO et al., 2018)
Antipirético	<i>E. condolleana</i> <i>E. stipitata</i> McVaugh	(GUIMARÃES et al., 2009) (COSTA et al., 2020)

Antiparasitário	<i>E. uniflora</i> <i>E. brejoensis</i>	(IBIKUNLE et al., 2011) (SOUZA et al., 2017)
Anticâncer	<i>E. rígida</i> <i>E. brejoensis</i>	(ZAKI et al., 2013) (SANTANA et al., 2020)
Cicatrizante	<i>E. pruniformis</i> Cambess <i>E. dysenterica</i>	(ALBUQUERQUE et al., 2016) (SILVA et al., 2018)
Gastroprotetora	<i>E. puniceifolia (Kunth) DC</i> <i>E. umbelliflora O.Berg</i> <i>E. mattosii</i> <i>E. involucrate DC</i> <i>E. jambolana Lam</i>	(BASTING et al., 2014) (MEYRE-SILVA et al., 2009) (SANTOS et al., 2018) (VECHI et al., 2018) (PAI et al., 2013)
Larvicida	<i>E. brejoensis</i> <i>E. candolleana D.C.</i> <i>E. piauhiensis</i>	(SILVA et al., 2015) (NEVES et al., 2017) (DIAS et al., 2015)
Laxativa	<i>E. dysenterica</i>	LIMA et al., 2010
Neuroprotetor	<i>E. uniflora</i> <i>E. dysenterica</i>	(FLORES et al., 2020) (THOMAZ et al., 2018)

Figura 2 - *Eugenia brejoensis* Mazine



Fonte: Autor (2018)

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS CARACTERÍSTICAS

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, lipofílicas, biosintetizados por plantas aromáticas. Podem ser obtidos por processos físicos, como hidrodestilação, destilação por arraste de vapor ou destilação a pressão reduzida (FALEIRO et al., 2013; ROOHINEJAD et al., 2017).

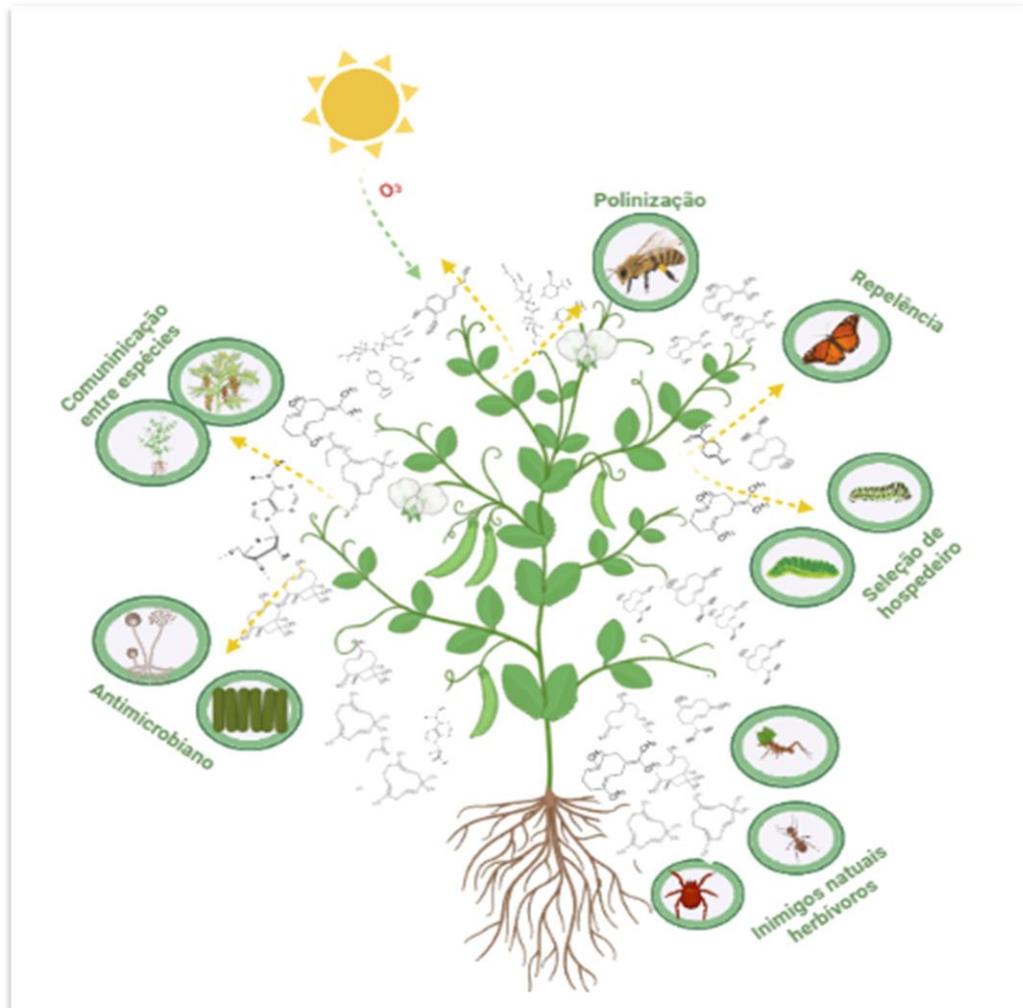
Os termos óleos voláteis, óleos éteros e essências também podem ser utilizados devido às características físico-químicas inerente dessas misturas, tais como: solubilidade em solventes orgânicos (entre eles o éter), apresentam-se líquidos com aspecto oleoso a temperatura ambiente, menor densidade que a água e, em sua maioria, com um acentuado aroma agradável (SIMÕES et al., 2018). Conjuntamente, são incolores e levemente amarelados, instáveis na

presença de luz, oxigênio atmosférico e metais, sofrem degradação, ciclalizações, dimerizações, oxidações e polimerização (DUSSAULT et al., 2014).

Os óleos essenciais são frequentemente produzidos por angiospermas dicotiledôneas e, esporadicamente, por gimnospermas (SIMÕES et al., 2018). Podem ser sintetizados por diversas partes das plantas, como folhas, caules, sementes, frutas, raízes, flores ou cascas, sendo armazenados em células secretoras, células epidérmicas e tricomas glandulares (FALEIRO et al., 2013). Desempenham algumas funções ecológicas para as plantas, agindo como inibidores de germinação, atração de polinizadores e conferindo proteção contra predadores, atuando, ainda, como inseticidas, antibacterianos, antivirais, antifúngicos e contra herbívoros, por redução do apetite (Figura 3) (FERRAZ et al., 2022b; SIMÕES et al., 2018).

São provenientes do metabolismo secundário da planta e, em sua maioria, compostos dos dois grandes grupos de origens bioenergética distintas, terpenoides e fenilpropanoides. Todavia, essa composição, assim como o rendimento, é determinada por fatores de variação genética, variação sazonal, localização geográfica e maturidade da espécie (HUSSAIN et al., 2011).

Figura 3 – Funções dos óleos essenciais nas plantas.

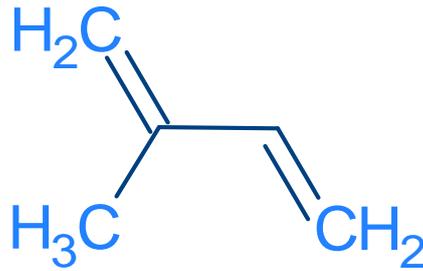


Fonte: Autor (2019)

Os terpenóides constituem um grupo diversificado de substâncias, sendo o termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética é o isopreno - 2-metil-1,3-butadieno (Figura 4) (SIMÕES et al., 2018). São sintetizados a partir do IPP (isopentenil-pirofosfato) e de seu isômero DMAPP (dimetilalil pirofosfato) por duas rotas biossintética distintas: a rota do ácido melavônico, a parte da ligação de três moléculas de acetil-CoA da rota, para formar este ácido e posteriormente, o IPP (isopentenil-pirofosfato), o qual originará terpenos maiores, e a rota do DXP (1-desoxilulose 5-fosfato), onde o gliceraldeído 3-fosfato e piruvato levam à formação do isopentenil-pirofosfato (IPP) e de diferentes terpenos (FELIPE et al., 2017; TAIZ e ZEIGER, 2013).

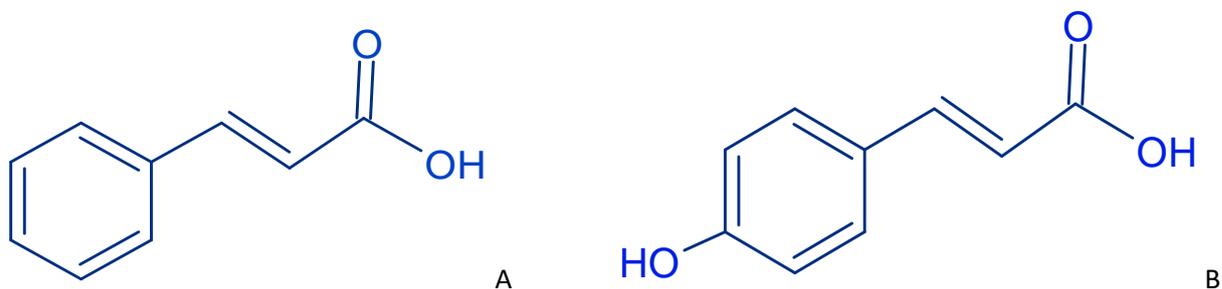
No entanto, as estruturas básicas dos terpenos podem ser modificadas por reduções, oxidações e ciclizações para biossíntese dos mais diversos terpenóides. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são monoterpenos, com C10 e sesquiterpenos, com C15 (SIMÕES et al., 2018).

Figura 4 - Estrutura do Isopreno



Fonte: Autor (2022)

Os fenilpropanoides são compostos aromáticos sintetizados a partir do ácido chiquímico, constituindo unidades menores de ácido cinâmico e ácido p-cúmarico (Figura 5). O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, fosfoenopiruvato e eritrose-4-fosfato, e, por várias reações, é convertido nos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Estes, pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (é ponto de ramificação entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário), perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e p-cumárico (SIMÕES et al., 2018; TAIZ e ZEIGER, 2013). Os fenilpropanoides são menos abundantes nos óleos essenciais quando relacionados aos terpenóides; caracterizam-se por possuírem em suas estruturas um anel benzênico com cadeia lateral composta de três carbonos, que apresentam uma dupla ligação, podendo ter um grupo funcional com oxigênio (SIMÕES et al., 2018).

FIGURA 5 – Estrutura do ácido cinâmico (A) e ácido *p*-cumárico (B)

Fonte: Autor (2022)

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para óleos essenciais devido à sua composição complexa, entre elas a antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antinoceptivo, anti-inflamatória, antitumoral, antiulcerogênica e cicatrizante (ALBUQUERQUE et al., 2016; COELHO et al., 2013; COSTA et al., 2022; MONTEIRO et al., 2019; LEMES et al., 2017; MIRANDA et al., 2016).

2.3 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA APLICADA AOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A nanotecnologia farmacêutica é uma ciência inovadora. Com o seu desenvolvimento, visa-se à criação de sistemas de liberação que se utilizam de estruturas nanométricas com dimensões entre 1 a 1000 nanômetros (nm) para desenvolvimentos de novos produtos, tendo como base estruturas atômicas, moleculares e supramoleculares. Estes sistemas, quando desenvolvidos, apresentam algumas vantagens, tais como: liberação controlada de fármacos, estabilidade cinética, maior solubilidade em água e maior biodisponibilidade (PORTO et al., 2020; IRACHE et al., 2011).

Devido à instabilidade físico-química apresentada pelos compostos voláteis, a aplicação das ferramentas fornecidas pela nanotecnologia torna-se atrativa no nicho de mercado dos óleos essenciais. Melhorar a sua solubilidade, prolongar o prazo de utilização, reduzir a toxicidade e controlar a liberação estão entre as vantagens fornecidas pela utilização dos nanosistemas e/ou nanoestrutura para entrega de óleos essenciais (KASHYAP et al., 2021; DUBEY et al., 2022). Dentre as ferramentas nanotecnológicas utilizadas para criar um sistema de proteção e entrega de óleos essenciais, destacam-se as ciclodextrinas (as mais utilizadas), seguidas de carregadores

poliméricos, dendrímeros, nanopartículas lipídicas, nanoemulsões, lipossomas, nanoesferas e sistemas microemulsionados (ALLAW et al., 2021; AGUIAR et al., 2014; ARAUJO et al., 2021b; CUI et al., 2021; SÁ et al., 2020; ZHAO et al., 2017; MOUNESAN et al., 2021; RAINA et al. 2020; DHIMAN et al., 2021).

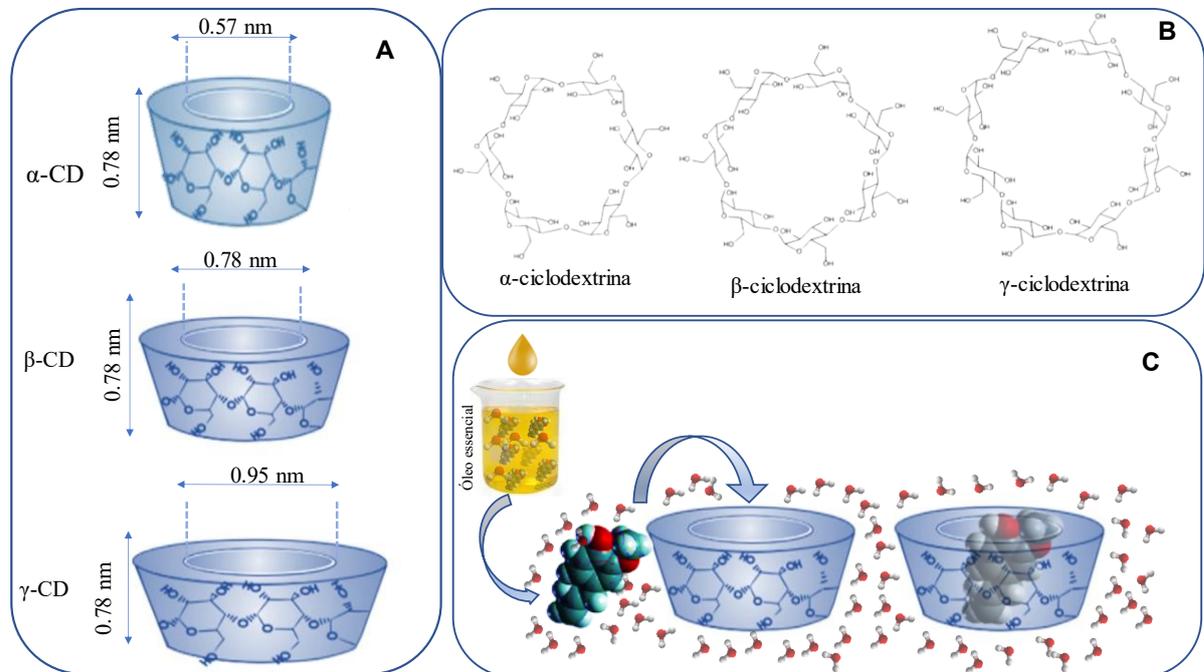
2.3.1 Ciclodextrinas: caracterização e formação de complexo de inclusão com óleos essenciais

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por unidades compostas de D-glicopiranosídicas (glicose), ligadas entre si por meio da α -1,4 glicosídicas. Existem três principais estruturas de ciclodextrinas: alfa-ciclodextrina (α -CD), beta-ciclodextrina (β -CD) e gama-ciclodextrina (γ -CD) constituídas de 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente (Figura 6 B). São biosintetizadas a partir da degradação do amido pelas enzimas glicosiltransferases produzidas por *Bacillus macerans* e *B. circulans* (CRINI et al., 2014; XIAO et al., 2021). As ciclodextrinas apresentam uma conformação tronco-cônica (Figura 6 A) com as configurações das suas cadeias de glicose, no qual as hidroxilas se projetam para o meio externo concedendo um caráter hidrofílico nessa região; já as cadeias carbônicas e radicais de oxigênio centralizam-se formando uma cavidade interior, sendo possível abrigar moléculas hidrofóbicas (CRINI et al., 2014; CID-SAMAMED et al., 2022; CRUMLING et al., 2017).

Em razão desta conformação estrutural, as ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com compostos apolares por meio de interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e dipolo-dipolo, entre a cavidade interior da ciclodextrina e moléculas hospedes (Figura 6 C). As condições favoráveis promovidas pelo complexo de inclusão devem-se à substituição de moléculas de água de elevada entalpia por moléculas hóspedes de menor entalpia; dessa forma, promovendo alterações favoráveis de entalpia, aumento da entropia e redução da energia total do sistema, com conseqüente estabilização do complexo (SUVARNA et al., 2017).

Contudo, é importante observar que, apesar de as ciclodextrinas (α , β e γ) apresentarem a mesma altura da cavidade interna (Figura 6 A), é o número de unidades de glicose que determina o volume e diâmetro interno da cavidade de cada uma das ciclodextrinas (α , β e γ). Assim, com base nessas dimensões, a α -ciclodextrina complexa moléculas de baixo peso molecular com cadeias laterais alifáticas; a β -ciclodextrina irá complexar aromáticos e heterocíclicos e a γ -ciclodextrina complexa moléculas maiores, como esteroides e macrocíclicos (CRINI; FOURMENTIN; LICHTFOUSE, 2020; DEL VALLIE, 2004).

Figura 6 – Estruturas das ciclodextrinas e processo de inclusão molecular. (A) Moléculas das ciclodextrinas (diâmetro interno e altura) α -CD, β -CD e γ -CD. (B) Estrutura química das α -CD, β -CD e γ -CD. (C) Representação do complexo de inclusão com o ligante (óleo essencial) com β -ciclodextrina e desvio das moléculas de água da cavidade hidrofóbica.



Fonte: Autor (2020).

A incorporação de moléculas apolares com dimensões adequadas à cavidade da ciclodextrina possibilita algumas melhorias, tais como o aumento da solubilidade em água, maior biodisponibilidade, permeabilidade celular, redução da toxicidade, estabilidade térmica e oxidativa (LIU et al., 2020; HO et al., 2017). Estas são características bastante atrativas por diferentes seguimentos indústrias. No campo agrícola, as ciclodextrinas são estudadas como estratégias para biorremediação de solos (VILLAVARDE et al., 2018) e como associação a pesticidas (GENG et al., 2021; SHUANG et al., 2019); também são destaque no seguimento alimentício (FENYVESI et al., 2016; MARQUES et al., 2019; MUÑOZ-SHUGULÍ et al., 2021) e, em especial, na indústria farmacêutica, sendo utilizadas e já comercializadas como carregadores de diversos fármacos, como, por exemplo, os medicamentos nimesulide e piroxicam (CRINI et al., 2018; OLIVEIRA MAKSON et al., 2015; MEDAREVIĆ et al., 2015; MENEZES et al., 2019).

Diversas metodologias para a complexação de moléculas hidrofóbicas com ciclodextrinas são relatadas, podendo ocorrer em soluções aquosas ou em fases sólidas (XIAO et al., 2021). Na fase aquosa, a metodologia consiste, inicialmente, em solubilizar as

ciclodextrinas em água ou em uma solução tampão sobre agitação e, na sequência, adiciona-se o composto hidrofóbico, mantendo-se sobre agitação até atingir estabilização do encapsulamento. Os métodos mais utilizados para a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas são: malaxagem, co-precipitação, co-evaporação, liofilização, spray drying, moagem, slurry, ultrassônico, e fluido supercrítico (LIMA et al., 2016; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013).

Na avaliação da formação dos complexos de inclusão de ciclodextrinas são empregadas algumas técnicas para a caracterização das novas estruturas formadas. Os principais métodos utilizados para caracterização compreendem espectroscopia de fluorescência e de ultravioleta visível (UV-Vis), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio-X (DR-X), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e Termogravimetria (TG), modelagem molecular (MM), ressonância magnética nuclear (RMN) e estudos de dissolução (KFOURY et al., 2018; XIAO et al., 2021).

A partir das técnicas acima elencadas, diversas pesquisas com a formação de complexos de inclusão de ciclodextrinas e óleos essenciais vêm evidenciando resultados promissores quanto à sua aplicabilidade e encapsulação. Um estudo realizado por Kavetsou et al. (2021) para complexar o óleo de cedro (*Juniperus phoenicea*) em β -ciclodextrina (β -CD) demonstrou, claramente, a eficiência da encapsulação, promovendo a solubilidade aquosa e potencializando a atividade inibitória de AChE. Hogenbom et al. (2021) apontaram que o complexo de inclusão de β -ciclodextrina (β -CD) aumentou o efeito do óleo essencial de catnip (*Nepeta cataria*) na repelência de carrapatos, sendo comparado ao produto comercializado DETT. Martins et al. (2021) avaliaram o efeito do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* e complexo de inclusão β -ciclodextrina (β -CD) nas vias de sinalização da dor na resposta antinociceptiva. Observaram que o complexo apresentou efeito mais significativo em dose menores, evidenciando a vantagem da encapsulação. As propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas do óleo essencial de *Hyptis pectinata* foram potencializadas com a complexação em β -ciclodextrina (β -CD), aumentando a biodisponibilidade oral quando comparada com a administração do óleo livre (MENEZES et al., 2015). Estudos da complexação de óleos essenciais com β -ciclodextrina (β -CD), espécies de *Eugenia spp.*, apontam resultados promissores em relação à estabilidade térmica e oxidativa dos óleos (ANAYA-CASTRO et al., 2017; SANTANA et al., 2020). Estas pesquisas motivaram o presente estudo no desenvolvimento de complexos de inclusão do óleo essencial de *E. brejoensis* com β -CD por dois métodos (malaxagem e *slurry*), investigando a ampliação do efeito farmacológico e a possível segurança de consumo do óleo a nível sistêmico.

2.3.2 Microemulsões

As microemulsões são sistemas dispersos, isotrópicos, transparentes, de baixa viscosidade, termodinamicamente estáveis e com tamanho de gotículas entre 10 - 200nm. São formadas por dois líquidos imiscíveis, estabilizadas por um filme interfacial de tensoativos juntamente com co-tensoativos, quando necessário, sendo este último capaz de diminuir a tensão interfacial (EL MAGHRABY, 2008; CALLENDER et al., 2017; MARIYATE; BERA, 2022). Uma vez que a entropia do sistema se torna muito alta, devido à quantidade de tensoativos utilizada, promove a redução da tensão interfacial entre o óleo e água, levando, conseqüentemente, a energia livre de Gibbs a valores negativos, permitindo de forma espontânea o desenvolvimento dos sistemas microemulsionados termodinamicamente estáveis (CHANG et al., 2019; RAO; MCCLEMENTS, 2011; SOUTO et al., 2022).

Surfactantes são definidos como compostos anfifílicos, ou seja, possuem em sua estrutura uma parte hidrofóbica, formadas por cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas, e uma parte hidrofílica, que pode ser anfótera, aniônica, catiônica ou não iônica. Em função dessas características estruturais, na presença de óleo e água, adsorvem-se nas interfaces de forma que o grupo polar fique voltado para fase aquosa e o grupo apolar para fase oleosa, formando um filme molecular ordenado nas interfaces que promove a redução da tensão interfacial e superficial (MANDAL et al., 2013; SILVA et al., 2015b; YANG et al., 2013). Deste modo, promovem a solubilização de moléculas polares e apolares em uma mesma mistura dentro de suas nanogotículas.

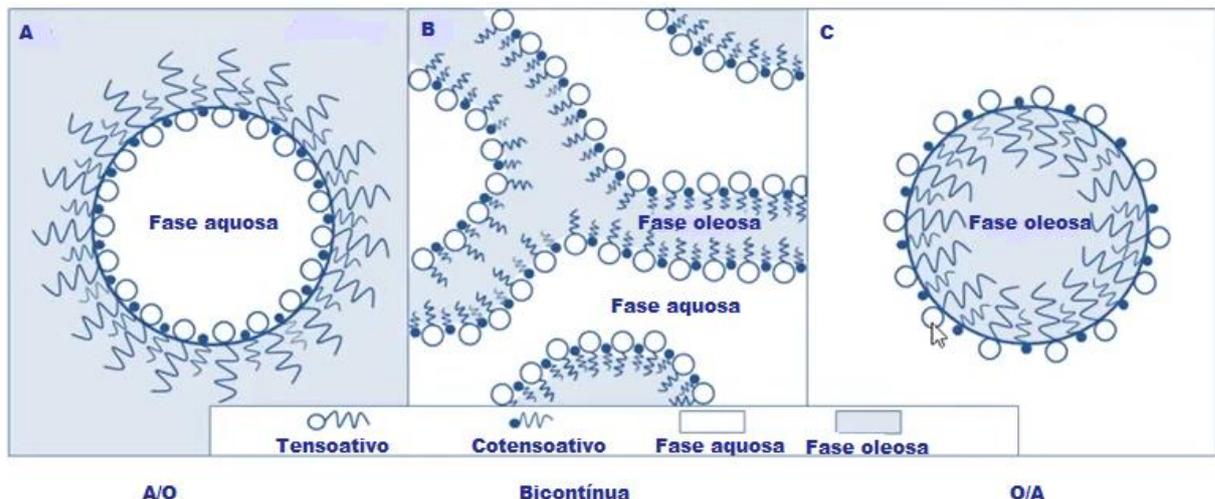
De acordo com Rajpoot e Tekade (2019), os surfactantes podem ser classificados de acordo com a carga do grupo polar da molécula. Neste quesito, podem ser classificados em: catiônicos, aniônicos, não iônicos e zwitteriônicos (anfóteros). Os tensoativos catiônicos e aniônicos são aqueles que apresentam vários grupos ionizáveis na fase aquosa, com cargas positivas e negativas, respectivamente. Os surfactantes não iônicos são formados por moléculas polares não ionizáveis em solução aquosa. E os tensoativos anfóteros compreendem moléculas orgânicas que podem não estar carregada, ou ser carregada negativamente e/ ou positivamente, dependendo do pH da solução.

Há uma ampla lista de surfactantes disponíveis no mercado que podem ser utilizados no processo de obtenção das microemulsões. Contudo, a aplicação no campo farmacêutico depende de fatores a serem considerados, tais como potencial de irritabilidade, mecanismo de ação e toxicidade (SOUTO et al., 2022; LAWRENCE et al., 2012). Os surfactantes não iônicos são mais utilizados para a formação de microemulsões para carregamento de fármacos por

apresentarem menor nível de toxicidade se comparado com os tensoativos iônicos. Comercialmente, destacam-se: polissorbitos (Tween®), sorbatos (Span®), óleo de rícino ou óleo de rícino hidrogenado (Cremophor® ou Cronduret®), éster de ácido isoesteárico de poli-gliceróis e oligômeros superiores (Plurol Isostearique®), éter monoetílico de dietilenoglicol (Transcutol®), mono, di e triglicerídeos de ácidos graxos C8 e C10, e mono- e diésteres de PEG (Labrasol®), alquilpoliglicosídeos ou ésteres de sacarose (SZUMALA;MACIERZANKA, 2022; KIM et al., 2018).

A associação entre os componentes da fase aquosa, fase oleosa, surfactantes e co-surfactantes permite a formação de diferentes estruturas internas, sendo influenciadas pelas características físico-química das substâncias utilizadas. Assim, as microemulsões podem apresentar três tipos de estruturas: microemulsões formadas por água e óleo (A/O), microemulsões de óleo em água (O/A) e sistemas bicontínuos (Figura 7). Nos dois primeiros sistemas A/O e O/A, ocorre a formação de gotículas circundadas por tensoativos, capazes de abrigar moléculas hidrossolúveis e lipossolúveis, respectivamente (Figura 8 A e B). Já nos sistemas bicontínuos, há a formação de canais adjacentes alongados com nanogotículas com proporções semelhantes entre as moléculas hidrofílicas e lipofílicas (Figura 8 C) (MANDAVI et al., 2018; MEHTA et al., 2015).

Figura 7 – Tipos de microemulsão: A) Microemulsão água e óleo; B) Microemulsão bicontínua; C) Microemulsão óleo e água.



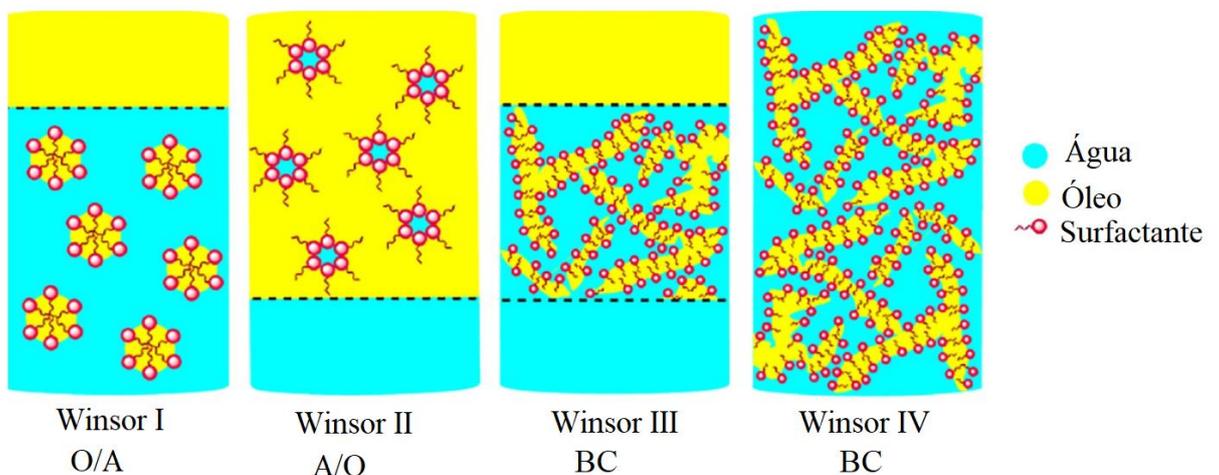
FONTE: Adaptado de O'DONNELL (2011); DAMASCENO et al.(2011)

As microemulsões também podem ocorrer em equilíbrio com fases em excesso, formando sistemas multifásicos entre a fase aquosa e a fase oleosa (AUM et al., 2021). Neste contexto, é utilizado o sistema de classificação de Winsor (1948), que descreve o equilíbrio de quatro fases (Figura 8). São elas:

- ✓ Winsor I - compreende microemulsões do tipo O/A com excesso da fase oleosa, apresentando uma densidade menor que a microemulsão, posicionando-se acima destas.
- ✓ Winsor II - são microemulsões do tipo O/A com o equilíbrio entre a microemulsão e a fase aquosa em excesso. Devido à densidade da microemulsão ser menor, posicionam-se acima da fase aquosa.
- ✓ Winsor III - são microemulsões bicontínuas, com excesso das fases oleosas e aquosa, ocorrendo o equilíbrio com os posicionamentos: intermediário da microemulsão, superior da fase oleosa e inferior da fase aquosa.
- ✓ Winsor IV – são microemulsões bicontínuas e visualmente monofásicas.

Uma ferramenta semiquantitativa ideal para a formação das microemulsões é o diagrama de fases; compreende uma representação gráfica em triângulo das três fases que constituem a microemulsão. Cada vértice do diagrama retrata um dos componentes da microemulsão sendo construído a partir de dados obtidos por titulação, com conseqüente variações nas concentrações na faixa de 1-100%. Mediante o diagrama, é possível observar as fases de transição, estruturas, e escolher qual a região com propriedades físico-químicas desejadas para incorporação de moléculas de interesse para encapsulação (PALIWAL et al., 2019; SILVA et al., 2015b; SOUTO et al., 2022).

Figura 8 - Sistema de Classificação de Winsor (1948)



Fonte: Adaptado de HEJAZIFAR et al. (2020)

Diferentes técnicas são utilizadas para a caracterização das microemulsões com intuito de obter dados sobre a dinâmica e estruturas desses sistemas. Entre elas, têm-se: a microscopia de luz polarizada, para verificar a isotropia do sistema; o espalhamento dinâmico de luz, para verificar o diâmetro da gotícula ou fase dispersa; métodos espectroscópicos, como o RMN, para determinar a estrutura interna; reologia, para analisar propriedades como elasticidade, viscosidade e plasticidade; métodos tradicionais, que tornam possível determinar o tipo de microemulsão e caracterizá-las fisicamente, como a condutividade elétrica, sendo possível acompanhar transições entre as estruturas de O/A e A/O através do aumento da condutividade; caracterização macroscópica e densidade (ACHARYA;HARTLEY, 2012; CHIAPPISI et al., 2016; GARAVAND et al., 2021; LAWRENCE et al., 2012; MADHAV, 2011).

As microemulsões têm revelado uma excelente alternativa para a incorporação de fármacos, controlando a sua liberação, aumentando a biodisponibilidade e solubilização. Callender et al. (2017) realizaram um levantamento de publicações científicas no intervalo de cinco anos e contabilizaram 431 publicações relatando a aplicação das microemulsões como sistema de entrega de fármacos, com destaque para drogas lipofílicas representando 79,4%, seguido da classe de drogas hidrofílicas, com 15,9%, drogas anfifílicas e outras drogas sensíveis ao pH, representando 1,2% e 3,5%, respectivamente. Este cenário também tem sido observado no campo de produtos naturais.

O emprego das microemulsões como sistemas de entrega de compostos lipofílicos pode atuar melhorando características físico-química, conferindo uma maior estabilidade e ampliando a atividade biológica dos óleos essenciais (ALHASSO et al., 2022; SAHU et al., 2017). Arellano et al. (2021) observaram o potencial antibacteriano de microemulsões carregada com os óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Cinnamomum cassia* e *Cymbopogon flexuosus*, sendo sugerida uma nova estratégia para descontaminação de produtos alimentares. Microemulsões desenvolvidas com timol, eugenol e tensoativo não iônico permitiram estabilidade física da formulação, aumento na atividade antiparasitária e redução da toxicidade em cães (MONTEIRO et al., 2021). Neves e colaboradores (2018) desenvolveram sistemas microemulsionados de O/A para entrega de β -cariofileno atuando de forma mais eficiente sobre as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana. Microemulsões bicontínuas carregadas com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contribuíram para o processo de cicatrização de feridas cutâneas (ASSIS et al., 2020).

2.4 DOR E NOCICEPÇÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Segundo a Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP, 2020), dor e nocicepção são fenômenos diferentes. A dor é definida com uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada ou semelhante a um dano real ou potencial do tecido. Sua função é proteger o organismo de estímulos nocivos e essa percepção pode variar entre os indivíduos (RAJA et al., 2020). Portanto, a dor é uma experiência altamente complexa e pessoal, visto que é influenciada por inúmeros fatores, tais como experiências prévias e estado emocional, ou seja, as variações inter e intra-individual podem interferir na percepção de dor pelo indivíduo (BRAND, 2022). Já nocicepção, entende-se como a atividade que ocorre no sistema nervoso em resposta a um estímulo nocivo (RAJA et al., 2020). Neste contexto, a nocicepção pode ser compreendida com uma manifestação de eventos neurológicos por via de ativação dos nociceptores por um estímulo externo.

A dor pode ser classificada quanto a período de duração e tipo de lesão. Em relação ao período de duração, é definida como dor aguda, quando ocorre a ativação dos nociceptores seguida do restabelecimento do tecido lesionado, e dor crônica, quando resulta de uma lesão ou patologia que se prolonga por sucessivos ciclos de cura e injúria do tecido, geralmente superior a três meses (APKARIAN et al., 2009; FARMER et al., 2012). A dor também pode ser categorizada, sob ponto de vista do tipo de lesão ou mediadores envolvidos, em: neurogênica, quando ocorre lesão no tecido neuronal; neuropática, quando ocorre a disfunção de um nervo; nociceptiva, desencadeada pela estimulação excessiva dos nociceptores; inflamatória, em consequência de um processo inflamatório; e psicogênica, que ocorre por fatores psicológicos (MILLAN, 1999). Recentemente, uma nova categoria de dor passou a ser descrita para dor crônica, a dor nociplástica. Consiste em dor multifocal mais disseminada ou intensa da observada em casos de dor inflamatória ou dor neuropática. Sabe-se que este tipo de dor ocorre em algumas fisiopatologias, como fibromialgia e cefaleia tensional (FITZCHARLES et al., 2021). Para fins de conceituação, a IASP (2021) definiu dor nociplástica como sendo “dor que surge de nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara de dano tecidual real ou ameaçado, causando a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial que causa a dor”.

Os nociceptores são receptores do sistema nervoso central somatossensorial com função de traduzir e codificar estímulos nocivos mecânicos, químicos e térmicos. Encontram-se localizados nas inervações da pele, músculos, articulações e órgãos internos. Os nociceptores são formados por três tipos de fibras, C, A δ e A β , categorizadas quanto à mielinização,

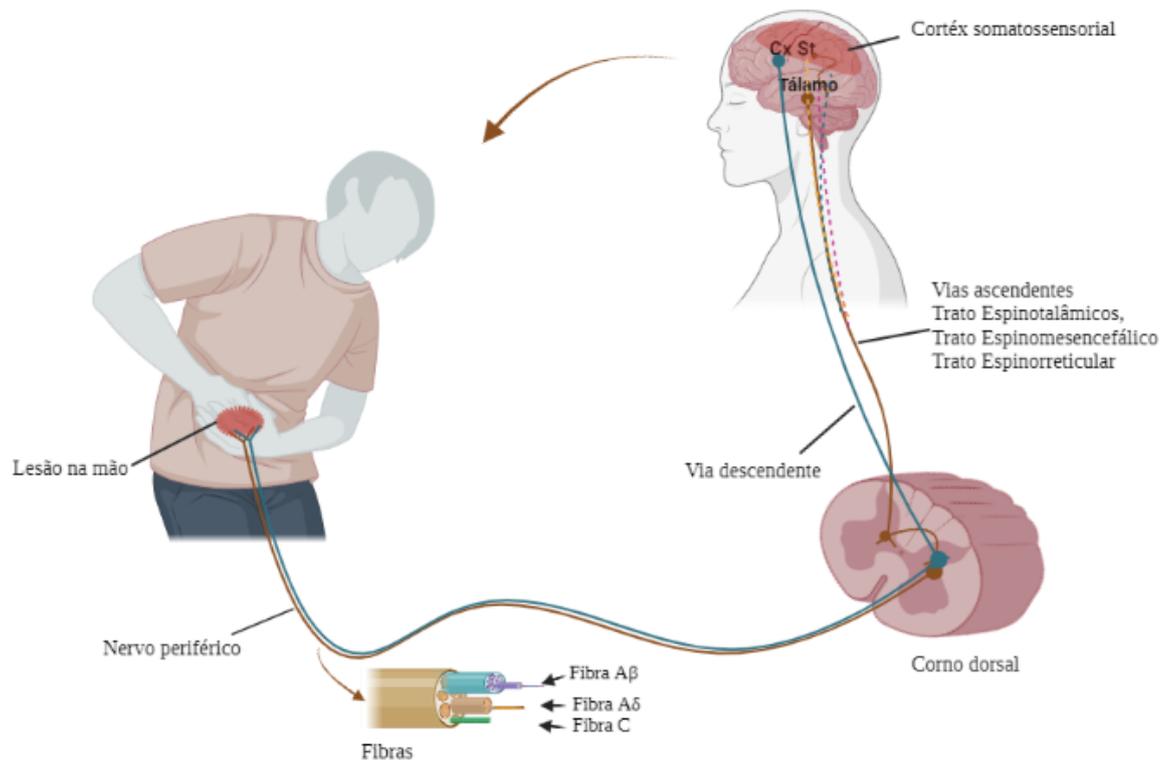
estrutura, diâmetro e velocidade de condução do estímulo (Figura 10) (TRINDADE; BATISTA; SILVA, 2013).

As fibras C não são mielinizadas, apresentam pequeno diâmetro (0,4-1,2 μm), têm velocidade de condução nervosa de 0,4-1,4m/s. Constituem os nociceptores polimodais, capazes de transmitir uma dor profunda, difusa e em queimação. As fibras A δ são levemente mielinizadas, com diâmetro médio (2-6 μm), velocidade de condução de 5-30 m/s. Presente em nociceptores mecano-térmicos, estas fibras transmitem a dor aguda localizada e são subdivididas em duas classes: A δ do Tipo I, com limiares de calor relativamente alto >50-53°C; e as fibras A δ do Tipo II, apresentando um limiar de calor um pouco inferior a 47°C e limiar mecânico muito alto se comparado com as fibras do Tipo I; Já as fibras A β , são mielinizadas, apresentam diâmetro de 10 μm , com velocidade de condução de 35-75 m/s. O reconhecimento de estímulos leves e sensações táteis sobre a pele é atribuído às fibras A β (GE et al., 2020; JULIUS; BASBAUM, 2001; RANG et al., 2012; VERDUGO et al., 2022).

Os nociceptores podem ser sensibilizados após um estímulo nocivo (térmico ou mecânico) por ação de mediadores algio gênicos atuando como excitatório ou inibitório no processo de nocicepção. Tais substâncias incluem bradicinina, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, neurotrofinas, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetário, prostaglandinas, tromboxano, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- α), entre outros (OLIVEIRA et al., 2017). Estes mediadores são responsáveis pela propagação do sinal nociceptivo por via de interação com receptores específicos (MILLAN,1999).

Inicialmente, quando o tecido sofre um estímulo nocivo, um potencial de ação é detectado por fibras aferentes que convertem em sinais eletrofisiológicos por via dos canais iônicos de sódio e cálcio. As fibras C e A δ propagam esse o potencial de ação até o sítio das sinapses na medula espinhal, com a conseqüente liberação de neurotransmissores, dentre eles glutamato e neuropeptídeos (CURY et al., 2011). Na sequência, o sinal nociceptivo é transmitido e codificado pelos axônios dos neurônios de segunda geração para regiões encefálicas (formação reticular, tálamo e hipotálamo), por vias ascendentes nos tratos espinotalâmicos, espinomesencefálico e espinorreticular. Nestas regiões, neurônios de terceira geração transmitem o estímulo para o córtex cerebral, resultando na percepção sensorial da dor (Figura 9) (ALVES et al., 2017; MERTENS et al., 2015; SCHNITZLER; PLONER, 2000).

Figura 9 – Representação do mecanismo da transmissão da dor.



Fonte: Autor (2022)

O processo de atenuação ou diminuição da percepção sensorial da dor ocorre após a sensibilização dos núcleos do tálamo, com transmissão dos sinais para diferentes áreas do córtex, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo. A modulação analgésica transcorre a partir da conexão de um mediador endógeno com a substância cinzenta periaquedutal ventral, que se liga ao bulbo raquiano ventromedial, com liberação de neurotransmissores (serotonina e encefalina), que se projetam para o corno dorsal da medula promovendo a redução da resposta à dor (FELICE et al., 2011; CIARAMELLA et al., 2019; VITOR et al., 2008). Dentre os receptores relacionados com a inibição da nocicepção, tem-se: os receptores opioides μ/δ e κ , alfa2-adrenérgicos, ácido gama aminobutírico (GABA), neurocininas 1 e 5HT, AMPA, adenosina, 5HT1b, NMDA, um e GABA a,b (SILVA et al., 2021; CIARAMELLA et al., 2019; ELLISON et al., 2017; LIN et al., 2018).

Os receptores opioides δ , μ e κ apresentam relevância clínica cientificamente comprovada, abrangendo via inibitórias noradrenérgicas e serotoninérgicas e ações fisiológicas de endorfinas (CIARAMELLA et al., 2019). A ação analgésica desencadeada pelos opioides é resultante do bloqueio da transmissão central e periférica da via aferente. A morfina e codeína são dois opioides mais difundidos na terapêutica da dor, pois atuam na liberação de

neurotransmissores simulando a função de opioides endógenos (OLIVEIRAALVES et al., 2017; PASTERNAK et al., 2013). Todavia, estudos evidenciam os opioides com baixo limiar na modulação de dores neuropáticas, sendo necessária a associação com outras substâncias para obter um efeito sinérgico com uma melhor eficácia no tratamento (XING et al., 2021).

Esch e colaboradores (2020) relataram a atuação dos receptores opioides em processos imunoregulatórios no sistema imune a partir da identificação de novos receptores γ , δ , μ e κ em células inflamatórias, com consequente degradação e regulação enzimática. A modulação nociceptiva também ocorre por ação de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) por inibição da atividade das enzimas ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, com decorrente inibição da produção de prostaglandinas a nível periférico e central (PARK et al., 2014; ULLAH et al., 2022).

Os analgésicos opioides e os AINEs são mais usados atualmente, contudo o uso por longos períodos podem causar sérios efeitos colaterais (GOMES et al., 2022). A maioria desses analgésicos são derivados de plantas ou sintetizados a partir de produtos naturais. Plantas medicinais são utilizadas para tratar diversos quadros álgicos, existindo muitos estudos descrevendo os potenciais usos analgésicos dessas plantas (COSTA et al., 2022; ALBERGARIA et al., 2019). Diante do exposto, torna-se relevante buscar novos compostos com ação analgésica que seja eficaz, com poucos efeitos colaterais e com segurança de uso.

2. 5 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo que envolve diversos processos fisiológicos em resposta à exposição do tecido decorrente de estímulos nocivos incluindo, infecções microbianas (biológico), lesão tecidual (físico) ou componentes celulares tóxicos (químico) (HERZOG et al., 2019). O processo inflamatório é caracterizado por cinco sinais cardeais: rubor (vermelhidão, em decorrência do aumento da hiperemia arterial), tumor (representado pelo edema causado pela microcirculação e migração de proteínas para o espaço intersticial), calor (promovido pelo aumento do fluxo sanguíneo e atividade metabólica de mediadores), dor (desencadeada por estímulos ou lesão direta nas fibras nervosas) e perda da função (quando o sistema imunológico é insuficiente em resposta à inflamação, a doença passa a ser crônica, podendo resultar na perda de função do tecido). Exemplo, em quadros clínicos de articulações inflamadas). (ROSAS, 2017; VERGNOLLE, 2008; SANTOS JUNIOR, 2003).

O processo inflamatório pode ser observado em fases distintas, sendo estas classificadas de acordo com as manifestações sintomatológicas e com o período de duração do quadro clínico

em inflamação aguda ou inflamação crônica. A fase aguda é caracterizada por ser de curta duração, ocorrendo imediatamente após um dano no tecido devido a um trauma, invasão microbiana ou presença de compostos nocivos (PAHWA et al., 2018; RANG et al., 2012). Nesta fase, ocorre o aumento da permeabilidade capilar, vasodilatação, migração de leucócitos, a fim de evitar a disseminação do agente nocivo, liberação de mediadores pró inflamatórios e reparação tecidual. Já a fase crônica, prolonga-se por longos períodos de exposição ao agente nocivo, com consequente aparecimento de fatores autoimunes (PAHWA et al., 2018; RANG et al., 2012). Caracteriza-se por ocorrência de eventos fisiológicos como infiltração tissular de células do sangue periférico, proliferação de células com degeneração tecidual e fibrose (HSU et al., 2017; KUMAR et al., 2013).

Nos processos inflamatórios, o reconhecimento dos agentes nocivos ocorre por via de receptores do tipo Toll (TRLs) presente da membrana de células, que reconhecem substâncias produzidas por patógenos, conhecidas como PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) ou substâncias produzidas por inflamação não infecciosa, as DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos) e ativam fatores de transcrição NF- κ B, induzindo a transcrição de genes pró inflamatórios no núcleo celular (PEREIRA, 2019; ASHLEY et al., 2012).

Os agentes nocivos induzem a síntese e liberação de mediadores lipídicos, mediadores pró inflamatórios e anti-inflamatórios, conduzindo uma série de eventos celulares que norteiam a inflamação, dentre eles a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular desencadeada por aminas vasoativas, serotonina e histamina; a ativação de quimiocinas, selectinas e integrinas presentes no endotélio, propiciando a aderência e migração celular com consequente extravasamento vascular para o foco da inflamação por fatores quimiotáticos; ademais, decorre a ativação do sistema de coagulação, complemento e citocinas pró inflamatórias (FEEHAN; GILROY, 2019). Também é observada a produção de mediadores lipídicos, derivados da via do ácido araquidônico, estimulando a produção de prostaglandinas, prostaciclina e eicosanoides, via ciclo-oxigenase (COX); e síntese de leucotrienos via lipo-oxigenase. As prostaglandinas desempenham um papel importante no processo inflamatório, causando febre, hiperalgesia e vasodilatação (MADDIPATI, 2020; RANG et al., 2012; SERHAN, 2014).

As citocinas são mensageiros moleculares que conduzem a amplificação de mecanismos efetores em células alvo, regulando respostas fisiológicas e imunes do processo inflamatório (STASSI et al., 2022). São peptídeos ou polipeptídeos, variando entre 8 e 30kDa, hidrossolúveis, produzido por células inflamatórias no local da lesão e por células do sistema imunológico por ativação de proteinoquinases. Desempenham função parácrina, autócrina e

endócrina, quando em consequência de infecções severas, desencadeiam uma produção exhaustiva com ação sistêmica (OLIVEIRA et al., 2019; MAGALHÃES, 2020). Níveis elevados de citocinas e quimiocinas no sistema circulatório podem levar a danos teciduais, acompanhados por hemorragias espontâneas, trombocitopenia, inflamação sistêmica e consequente falência múltipla dos órgãos (ATTIQ et al., 2021).

As citocinas atuam como sinalizadores na ativação de receptores específicos das células alvo, por exemplo, os receptores do tipo Toll-like presente na membrana de diversas células, e na ativação intermediária de receptores citoplasmáticos, a exemplo de receptores do tipo NOD (domínio de regularização de nucleotídeos). (DIAS; CRUZ, 2017; OLIVEIRA et al., 2019; VILVERT, 2018). Modulam as respostas dos processos inflamatórios ou imunológicos por uma série de eventos. Ao ligarem-se com os receptores celulares, as citocinas têm a capacidade de influenciar nos processos de proliferação, diferenciação, quimiotaxia e sobrevivência celular; na regulação da síntese de outras citocinas e mediadores inflamatórios (STASSI et al., 2022).

De acordo com o papel que desempenham no processo inflamatório, as citocinas podem ser agrupadas em pró inflamatórias e anti-inflamatórias. As citocinas pró inflamatórias são aquelas que atuam no início estimulando a liberação de outras citocinas e amplificando o processo inflamatório. Compreende as interleucinas (IL-1, IL-3, IL-12, IL-18), interferon gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Já as citocinas anti-inflamatórias atenuam a resposta inflamatória. Dentre elas, as interleucinas (IL-4, IL-10, IL-13), interferon-alfa (IFN- α) e fator de crescimento transformador- β (FTC- β) (OLIVEIRA et al., 2019; RAO et al., 2017).

Neste trabalho, foi abordada a investigação das citocinas pró inflamatórias a fim de acompanhar a amplificação do processo inflamatório promovido por um agente logístico. Assim, foram selecionadas as citocinas TNF α , IFN- γ e IL-1 α com base nos protocolos aplicados na investigação da atividade anti-inflamatória de novas drogas em experimentação animal.

A TNF α é uma citocina pluripotente liberada por monócitos, macrófagos e linfócitos T, sendo abundantes no peritônio e no tecido esplâncnico. Exerce uma diversidade de atividades biológicas, incluindo estimulação da secreção de proteínas de fase aguda (PGE2), aumento da permeabilidade vascular, ativação de células inflamatória apoptose, formação de espécies reativas de oxigênio e necrose celular (VILVERT, 2018).

As IL-1 β são citocinas moduladoras centrais do processo inflamatório. Produzidas por um percussor citosólico e clivada proteoliticamente na forma bioativa nos inflamassomos, são dependentes de sinais de ativação, tais como ATP e efluxo de K⁺. São mediadoras da inflamação sistêmica, ativando a Ciclo-oxigenase-2, com síntese de PGE-2 no hipotálamo; produzindo substância P, óxido nítrico, moléculas de adesão edotelial e induz a ativação de

citocinas IL-6 (relacionada com a fase inflamatória aguda e outras fisiopatologias) (YANG et al., 2022).

Ainda que a resposta ao processo inflamatório seja uma estratégia de defesa do organismo, o aparecimento de sintomas clínicos incômodos ou o progresso do quadro inflamatório, resultando em outras fisiopatologias, torna-se imprescindível à intervenção medicamentosa. Ao longo dos anos, duas classes de medicamentos vêm sendo utilizadas para modular as respostas inflamatórias: os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os glicocorticoides (ETIENNE et al., 2021; FREITAS et al., 2019).

Os glicocorticoides são anti-inflamatórios que atuam em receptores glicocorticoides, modulando a expressão de genes inflamatórios, inibindo a ativação de genes de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, ou estimulando a transcrição de genes anti-inflamatórios, como os inibidores de fosfolipases A2, interferindo diretamente na liberação de ácido araquidônico e consequente, na produção de mediadores lipídicos. Apresentam efeitos fisiológicos pleiotrópicos, sendo utilizados nas terapias de doenças autoimunes, asma, alergias e distúrbios inflamatórios (BRUNTON et al., 2017; RICCIOTTI et al., 2021; FREITAS et al., 2019; FONSECA et al., 2016).

Os AINEs são agentes analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios amplamente utilizados na modulação de quadros clínicos de dores musculares, reumatismos, dismenorreia, gota, enxaqueca, pirexia ou traumas agudos quando associado com opioides (NUGRAHANI; PARWATI, 2021). Atuam na inibição da síntese de prostaglandinas, mediante a inativação das isoformas da ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2). A COX-1 é expressa de forma constitutiva em diversos tecidos (células endoteliais, gastrointestinais e plaquetas) e as prostaglandinas sintetizadas por essa via são importantes para manutenção das funções fisiológicas normais. A COX-2 é induzida em resposta a estímulos no processo inflamatório, como por exemplo, citocinas. E as prostaglandinas sintetizadas via COX-2 são responsáveis pelos sinais clínicos da inflamação (KAUR; SINGH, 2022; BRUNTON et al., 2017; RICCIOTTI et al., 2021).

Contudo, o tratamento por longos períodos com AINEs podem danificar a mucosa gastrointestinal, elevar a pressão arterial, prejudicar a função renal e causar eventos cardiovasculares adversos, incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca, decorrentes da inibição não seletiva das isoforma de COX (BJARNASON et al., 2018; SODANO et al., 2022). Desta forma, a busca por novos compostos com atividades anti-inflamatórias tem motivado estudos etnofarmacológicos a partir de plantas medicinais, evidenciado propriedades anti-inflamatórias por várias vias mecanicistas e com menos efeitos colaterais (VERAS et al., 2021; SANTOS et al., 2020).

2.6 ESTUDO DA TOXICOLOGIA NÃO CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS

2.6.1 Toxicidade aguda e Toxicidade de doses repetidas (subaguda)

O estudo da toxicidade é fundamental para garantir a segurança de novas alternativas terapêuticas e no processo de desenvolvimento de medicamentos a partir das descobertas de novos compostos (DI; KERNS, 2015). Os ensaios toxicidade pré-clínica em sistemas biológicos revelam os efeitos tóxicos específicos na espécie, órgão e dose de um produto natural ou droga em estudo (PARASURAMAN, 2011). A toxicidade das substâncias pode ser observada através da análise de exposições acidentais a uma substância, ensaios *in vitro* sobre várias linhagens celulares ou exposição *in vivo* em animais de experimentação (DONATO; TOLOSA, 2021; PARASURAMAN, 2011; JOHANSSON et al., 2019).

Neste contexto, ao avaliar a toxicidade de plantas medicinais em modelos animais é possível observar os efeitos adversos, sendo um preditivo da toxicidade em humanos no consumo de tais produtos (RIBEIRO et al., 2020). Embora alguns estudos relatem a eficácia dos produtos naturais no tratamento de diversas doenças, é essencial que sejam reconhecidos como seguros (SOUZA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2018). Inúmeros fatores podem influenciar na toxicidade ocasionada pelo uso destes produtos, incluindo a ausência de um controle de qualidade, identificação botânica incorreta, sazonalidade e contaminações externas (CARVALHO et al., 2010; PEDROSO et al., 2021; GAIOLA et al., 2021).

Ao longo dos anos, estudos multidisciplinares vêm sendo implementados para validar a segurança de uso de produtos de origem natural (BEDNARCZUK et al., 2010). Dentre os testes realizados para avaliar a segurança tem-se: a toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, estudos de toxicidade reprodutiva, estudos de tolerância local, estudos de carcinogenicidade, estudos de toxicocinética e toxicidade genética (Ensaio cometa e Micronúcleo) (SIMÕES et al., 2018).

Nos ensaios de toxicidade *in vivo* é possível analisar parâmetros bioquímicos, hematológicos, histológico e histomofométricos dos órgãos, bem como acompanhar o consumo de alimentos, água, ganho/perda de massa corpórea e não menos importante, a mortalidade dos indivíduos (ROCHA et al., 2019).

A toxicidade aguda é definida como efeitos adversos que ocorrem imediatamente, ou em um curto intervalo de tempo após a administração em dose única ou múltiplas de uma substância, sendo possível predizer uma dose segura para administração oral (CHINEDU et al., 2013). A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) estabelece em

seu guia nº 423 o protocolo para análise da toxicidade aguda de compostos químicos, em experimentos realizado com a administração por via oral de uma dose única de 2000mg/kg ou máxima de 5000mg/kg, a fim de classificação e avaliação de perigos químicos. Inicialmente, os animais são observados quanto aos sinais clínicos de toxicidade nas quatro primeiras horas e diariamente por 14 dias (OECD, 2001).

Em seguida, com dados preliminares obtidos na toxicidade aguda pode-se realizar o teste de toxicidade oral de doses repetidas. Este teste segue o protocolo estabelecido no documento nº 407 da OECD, cujo ensaio consiste na administração de dosagens da droga em estudo diária em curto (14 ou 28 dias) ou longo prazo (90 a 180 dias) em grupos de roedores de ambos os sexos e no mínimo 10 vezes a concentração pretendida para aplicação terapêutica. Por meio deste, é possível analisar os riscos à saúde por exposição prolongada, incluído eventos adversos sobre o sistema endócrino, imunológico, reprodutivo e nervoso central (BRASIL, 2019; OECD, 2008). Para Simões et al (2018), os efeitos tóxicos promovidos por produtos naturais podem não promover reações imediatas por ser difícil estima as suas origens, tornam-se extensivamente crônicos. A biotransformação de diversos compostos químicos obtidos de plantas medicinais por oxidases hepáticas pode promover instabilidade genômicas, alterações epigenéticas que traduzem uma variedade de doenças, resultando em carcinogêneses (FRAGOSO-SERRANO et al., 2012). Neste aspecto, estudos não clínicos de toxicidade genética de plantas utilizadas na medicina tradicional são imprescindíveis para endossar a segurança de uso destes produtos.

2. 6. 2 Genotoxicidade

As plantas medicinais caracterizam-se como uma importante fonte de novos compostos químicos, podendo servir como candidatas à síntese de novos fármacos (SPONCHIADO et al., 2016). Extratos ou produtos obtidos a partir de plantas medicinais são extensivamente difundidas na medicina popular. Contudo, não se deve conjecturar que são biologicamente seguros, isentos de riscos à saúde humana (TARONCHER et al., 2021). Avaliar a genotoxicidade de novos compostos químicos ou preparações medicinais na fase pré-clínica é vital para garantir a segurança do usuário. Substâncias genotóxicas tem a capacidade de interagir com os ácidos nucleicos em baixas concentrações, podendo levar a aberrações cromossômicas ou interferências na estrutura do DNA, promovendo alterações irreversíveis na célula (DEL RE et al., 2017). Atuam propiciando alterações em células somáticas resultando

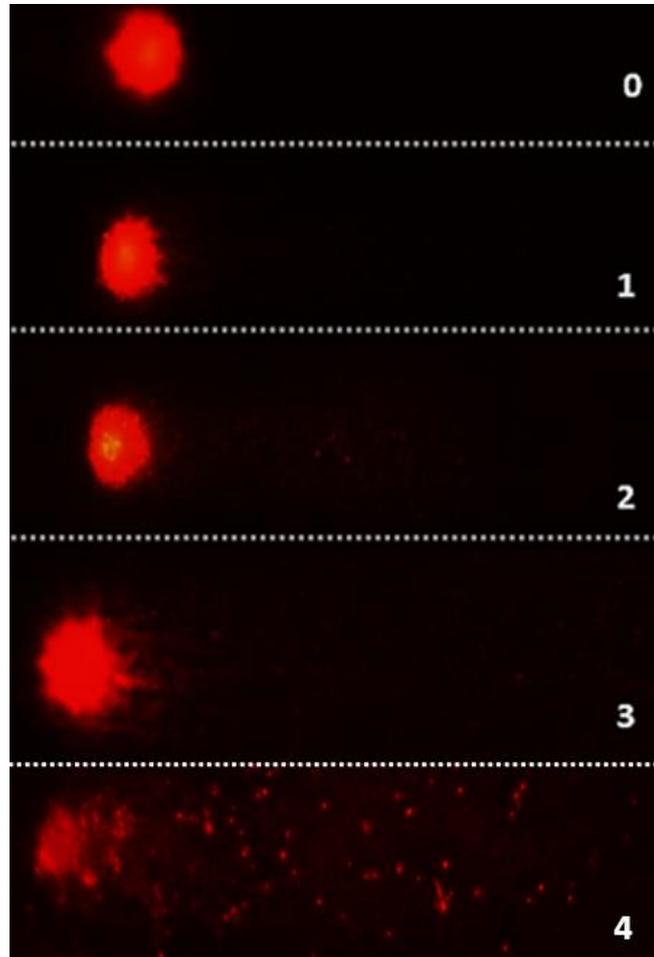
em carcinogênese e/ou em células germinativas dispendo em mutações hereditárias com predisposição a doenças, incluído cardiopatias, fibrose cística e diminuição da capacidade reprodutiva (CHOUDHURI et al., 2021; SPONCHIADO et al., 2016).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019), para o desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais são necessários ensaios não clínicos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* a fim de investigar o potencial de causar mutações gênicas ou alterações cromossômicas. Tais ensaios incluem: teste de *Ames*, ensaio de linfoma em camundongos, teste de Micronúcleo *in vivo*. Além disso, o ensaio cometa (OECD, 2016) é uma ferramenta fundamental na avaliação da segurança de novos produtos naturais, incluindo candidatos a novos fármacos como extratos e óleos vegetais com ação farmacológica já validadas (CHEN et al., 2022; MACHADO et al., 2021; SOUZA et al., 2021)

Neste estudo, foram utilizados os protocolos de ensaio cometa e teste de micronúcleo para avaliar a segurança genética do óleo essencial de *E. brejoensis*.

O ensaio cometa é um biomarcador de genotoxicidade na mensuração os danos genômicos (BANKOGLU et al., 2022). Consiste em uma técnica com alta sensibilidade, podendo ser realizada com pequenos números de células, sendo possível identificar danos no DNA, incluindo quebra de fita simples e dupla de DNA, sítios álcali-lábeis, danos oxidativos, ligações cruzadas entre fitas e sítios de reparo (TICE et al., 2000). Esta técnica envolve a incorporação das células em gel de agarose, submetidas à lise, seguida de uma desespiralização e fragmentação do DNA com soluções alcalinas em uma corrida eletroforética. Os fragmentos de DNA migram para o ânodo positivo, sendo visualizada em microscópico a imagem de uma calda semelhante à de um cometa (COLLINS, 2004). A mensuração do dano é realizada pelo tamanho do material que constitui a calda em relação à cabeça do cometa (Figura 10). Esta análise pode ser feita visualmente em um microscópio de fluorescência ou com auxílio de softwares de imagens (BANKOGLU et al., 2022; OECD, 2016; ROCHA et al., 2019).

Figura 10. Classificação de danos no DNA submetido ao ensaio cometa: 0(nenhum dano aparente); 1(pouco dano); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) ; 4 (dano máximo).



Fonte: Adaptado Rocha et al. (2019)

O teste de Micronúcleo é amplamente utilizado na triagem de compostos com potenciais atividades genotóxicas. Os micronúcleos são biomarcadores na identificação de substâncias clastogênicas, aquelas que induzem a quebra, perda de cromossomos por interações com DNA, ou aneugênicas, as que promovem a perda cromossômica por ruptura do aparelho do fuso mitótico (REN et al., 2017). São pequenas estruturas em que os fragmentos cromossômicos que ficaram para trás após a anáfase e não foram incorporados ao núcleo primário na finalização da mitose ou meiose são envolvidos por um envelope nuclear formando núcleos secundários no citoplasma, a exemplo dos eritrócitos policromáticos, que podem ser visualizados na medula óssea ou no sangue periférico (KRUPINA et al., 2021; OBIAKOR et al., 2014). O teste de micronúcleo é uma ferramenta relevante na triagem de compostos químicos para uso humano,

visto que perda de cromossomos ou mutações são pontos característico para o desenvolvimento de câncer (NAI et al., 2015).

Diversos estudos com produtos naturais têm utilizado as técnicas de ensaio cometa e micronúcleo associadas para validar a segurança toxicológica de produtos naturais. Souza et al. (2021) relataram a segurança genética do óleo de *Syagrus coronata*, comumente utilizado em preparações alimentação de comunidades no nordeste brasileiro, por meio do ensaio cometa e teste de micronúcleo. O teste de micronúcleo foi utilizado para assegurar a ausência de toxicidade no extrato de *Platycodon grandiflorus* na aplicação como produto anti-inflamatória tópico (JUNG et al., 2021). Estas técnicas também foram aplicadas para relatar a genotoxicidade de óleos essenciais e seus constituintes. Contini et al. (2020) avaliaram os efeitos genotóxicos de sete óleos essenciais, incluído das espécies *Rosmarinus officinalis*, *Salvia somalensis*, *Thymus vulgaris*, *Achillea millefolium*, *Helichrysum italicum*, *Pistacia lentiscus* e *Myrtus communis*, os quais foram considerados moderadamente genotóxicos induzindo a frequência de micronúcleos em células do sangue humano. Alguns compostos dos óleos essenciais quando analisados isoladamente produzem danos oxidativos, seguido de quebra da fita dupla do DNA (DORSAM et al., 2015). Monoterpenos, como o nerol, geraniol e β -mirceno produzem danos significativos no DNA, efeitos clastogênicos e aneugênicos em células humanas PBMC e HepG2 (ORLANDO et al., 2019; QUEIROZ et al., 2017; SILVA et al., 2021). Entretanto é a composição química que defini o nível de toxicidade genética dos óleos essenciais. O óleo essencial de *Annona leptopetala* constituído majoritariamente por sesquiterpenos não apresenta indícios de genotoxicidade em células do sangue periférico de mamíferos (BRITO et al., 2018). Machado et al. (2021) mostraram através do ensaio cometa que o óleo essencial com 30,52% de cariofileno não produz efeitos genotóxico. Em um estudo com sementes de *Aleurites moluccana*, utilizada na terapia medicinal para perda de peso, mostrou-se não causar danos genotóxicos nem mutagênicos nas análises do teste de micronúcleo, ensaio cometa e teste de Ames. Machado et al. (2021) utilizaram o ensaio cometa para avaliar a toxicidade genética do óleo essencial de *Achyrocline flaccida* (Weinm) DC, validando a segurança sem danos genéticos na concentração de 6000 $\mu\text{g/mL}$.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1 - ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia brejoensis* (Mazine) PRODUZ ATIVIDADE ANTINOCIEATIVA, ANTI-INFLAMATÓRIA SEM EFEITOS TÓXICOS E GENOTÓXICOS EM CAMUNGONGOS

Artigo a ser traduzido e submetido ao Journal of Ethnopharmacology

(ISSN: 0378-8741)



Óleo essencial de *Eugenia brejoensis* (Mazine) produz atividade antinociceptiva, anti-inflamatória sem efeitos tóxicos e genotóxicos em camundongos

Graziela Claudia da Silva^{a,b}, Alisson Macário de Oliveira^b, Bruno Oliveira de Veras^b, Cristiano Aparecido Chagas^c, João Ricardhis Saturnino de Oliveira^{a,b}, Márcia Vanusa da Silva^b, Talita Giselly dos Santos Souza^c, Thiago Henrique Napoleão^b, Vera Lúcia de Menezes Lima^b, Wêndeo Kennedy Costa^b, Ana Amélia Moreira Lira^d, Maria Tereza dos Santos Correia^b

^a Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

^d Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 Aracajú, Sergipe, Brasil

Resumo

Relevância etnofarmacológica

Eugenia brejoensis é a espécie da família Myrtaceae popularmente conhecida por cutia, utilizada na medicina tradicional para tratar inflamação, febre, dores reumáticas e infecções. Laboratorialmente, já foi comprovada sua ação antimicrobiana, espermostática, citotóxica, parasitária e inseticida. Porém, ainda não há relatos sobre sua segurança farmacológica.

Objetivo do estudo

Este estudo teve como objetivo obter, caracterizar e determinar o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório, antioxidante e a segurança toxicológica após administração oral em camundongos.

Materiais e Métodos

O óleo essencial foi obtido das folhas por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa. A atividade antinociceptiva foi avaliada com o teste de contorção (ácido acético 0,8%), teste de formalina (solução de formalina 2,5%) e avaliados os mecanismos de ação com antagonistas. A atividade anti-inflamatória foi investigada com os modelos de edema de pata e peritonite com dosagens de citocinas (TNF- α e IL-1 β) após a administração do agente flogístico carragenina (2%). A segurança toxicológica foi realizada com o ensaio de toxicidade aguda com as análises de parâmetros bioquímico, hematológicos e histológico dos órgãos; a genotoxicidade foi avaliada com o teste de micronúcleo e ensaio cometa. Por sua vez, a atividade do óleo foi mensurada pelo teste de DPPH, ABTS e TAC.

Resultados

A composição química do óleo foi, majoritariamente, de sesquiterpenos, sendo δ -cadineno e biciclogermacreno os principais. O tratamento com OEEb (100 mg/kg) reduziu significativamente as contorções abdominais em 68%. No modelo de nocicepção induzida por formalina (fase neurogênica e inflamatória) o OEEb (100 mg/kg) reduziu o número de lambidas da pata em 54% e 75%, respectivamente. Em relação à atividade anti-inflamatória, o óleo (100 mg/kg) reduziu o edema de pata (89%) e os níveis de citocinas pró inflamatórias em TNF- α (52,96%) e IL-1 β (65,76%). Na toxicidade aguda, a administração de 2000mg/kg do óleo não proveu efeitos adversos nos animais nem alterações nas análises histológica dos órgãos e parâmetros hematológicos. Na análise bioquímica, foi observada uma elevação das enzimas ALT e AST. Nenhum sinal de genotoxicidade foi observado no teste de micronúcleo e ensaio

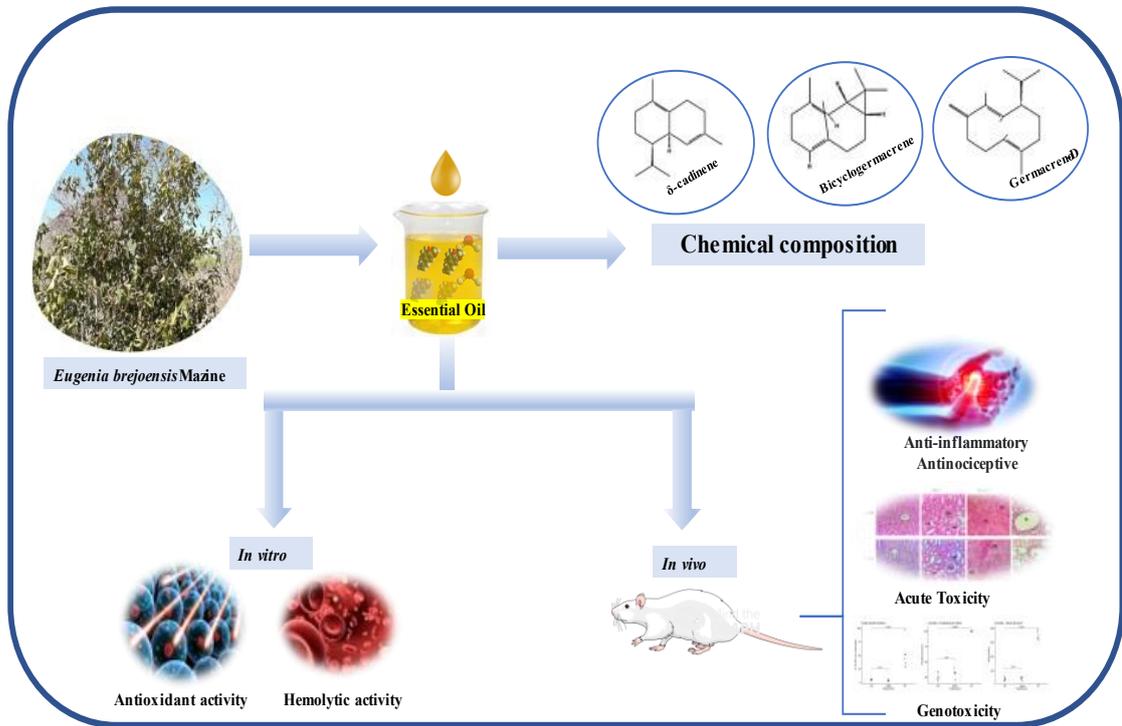
cometa nos animais tratados com 2000mg/kg do óleo. O óleo apresentou atividade antioxidante e não foi tóxico aos eritrócitos.

Conclusão

O uso tradicional para tratamento de dor e inflamação atribuídos à *E. brejoensis* foi validado pelos testes desenvolvidos neste trabalho com o óleo essencial da planta. O óleo não apresentou efeitos tóxicos significativos ou danos genéticos após administração oral. Além disso, o óleo tem considerável atividade antioxidante *in vitro* o que pode ser importante na prevenção de danos celulares causados pelo estresse oxidativo.

Palavras-chave: Óleo essencial. Avaliação toxicológica. Inflamação. Dor. Ensaio do cometa.

Resumo Gráfico



1.Introdução

As plantas medicinais são interessantes alternativas terapêuticas ao desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de estágios dolorosos ou inflamatórios de determinadas doenças (Quintans et al., 2017). A produção de compostos químicos em resposta a uma condição de estresse sofrida pela planta pode fornecer produtos naturais com potenciais efeitos terapêuticos (Silva et al., 2020). O uso de plantas medicinais em práticas tradicionais de cura tem sido determinado por fatores benéficos à saúde humana, fácil acessibilidade, baixo custo de aquisição e, principalmente, busca por novas alternativas terapêuticas com menos efeitos colaterais (Brito et al., 2018; Simões et al., 2018). Contudo, são necessários vários estudos para validar esse conhecimento popular, comprovando a segurança de uso e a aplicação farmacológica (Oliveira et al., 2019).

O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae e tribo Myrteae, com cerca de 1050 espécies de regiões neotropical (Mazine et al., 2018). Uma das características marcantes é a presença de estruturas secretoras de óleos voláteis, ferramenta útil na identificação taxonômica entre as espécies (Padovan et al., 2014). Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis que configuram uma fonte promissora para descoberta de novas drogas (Sampaio et al., 2021). Várias espécies de *Eugenia* com amplo uso medicinal obtiveram a sua aplicação comprovada, destacando-se: ação antinociceptiva (Vechi et al., 2018), anti-inflamatória (Costa et al., 2019), antidepressiva (Mehta et al., 2013), neuroprotetora (Thomaz et al., 2018; Flores et al., 2020), anticonvulsivante (Jeon et al., 2011), gastroprotetora (Santos et al., 2018) e antidiabética (Araújo et al., 2021).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, abrigando um verdadeiro *hotspot* de plantas com potencial valor econômico ainda desconhecido (Barbosa et al., 2020). Dentre os seus domínios fitogeográficos, a Caatinga (região semiárida) é um bioma exclusivamente brasileiro, sendo visto como um verdadeiro celeiro de plantas com potencial etnofarmacológico (Albergaria et al., 2019; Silva et al., 2015).

Entre *Eugenia* spp., a *E. brejoensis* é conhecida popularmente por “cutia”, tendo ocorrências em regiões semiáridas do Nordeste brasileiro (Mazine et al., 2018). Na medicina tradicional, infusões com partes aéreas (folhas) da planta são usadas como anti-inflamatórios, antidiarreicos, antipiréticos e antirreumáticos (Silva et al., 2015). Quanto ao óleo essencial *E. brejoensis*, algumas atividades biológicas já foram validadas, destacando-se atividade antimicrobiana (Bezerra-Filho et al., 2020), espermostática (Júnior-Nascimento et al., 2018),

larvicida (Silva et al., 2015), tripanomicida (Souza et al., 2017) e anticancer (Santana et al., 2021).

Apesar das diversas atividades já relatadas para o óleo essencial de *E. brejoensis*, os estudos sobre a segurança toxicológica e aplicação farmacológica *in vivo* são escassos. Assim, o presente estudo teve como objetivos determinar o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório, antioxidante e analisar a segurança biológica do óleo essencial de *E. brejoensis* através da administração por via oral em camundongos.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

As partes aéreas (folhas) de *E. brejoensis* Mazine foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau, Buíque, Pernambuco, Brasil, coordenadas 8°32'29"(S) e 37°15'5"(W). As amostras foram coletadas em novembro de 2018, identificada pelo botânico Dr. Alexandre Gomes da Silva e um exemplar foi depositado no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) com o número de registro 84033.

2.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir das folhas frescas (300g) por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 4h. Foi utilizado o sulfato de sódio anidro para remover a água do óleo e armazenado em vidro âmbar a 4° C para análises posteriores. O rendimento (%) foi calculado com base no peso do material fresco.

2.3 Composição química

A caracterização química do óleo essencial foi realizada em aparelho GC-MS/QP2010 Ultra-Shimadzu equipado com uma coluna RTX-5ms (5% difenil/95% dimetilpolisiloxano) (30 m x 0,25mm x 0,25 µm). Os experimentos foram realizados sob as seguintes condições: ionização por impacto de elétrons com 70 eV; hélio como gás de arraste e fluxo de 1,7 mL/min; injetor de modo fracionado (1:100); gradiente de temperatura crescente de 4 °C/min, de 40 a 180 °C e 20 °C/min de 180 a 280 °C. As temperaturas dos injetores e detectores foram de 250 e 290 °C, respectivamente. Os espectros foram obtidos em um intervalo m/z 10 - 460 Da. A

identificação dos constituintes foi feita com base no índice de retenção (IR, determinado com referência de séries homólogas de n-alcenos C8–C24) e espectros de massa com os de alguns compostos padrão, biblioteca NIST 05, Wiley 6 e dados da literatura.

2.4. Atividade antioxidante

2.4.1 Ensaio de eliminação do 1,1 – difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *E. brejoensis* (OEEb) foi avaliada pelo método de doação de hidrogênio utilizando o radical livre DPPH (Manssouri et al., 2020). O ensaio foi desenvolvido com concentrações do OEEb (0,062mg/mL a 2mg/mL) em triplicata e a atividade de inibição mensurada com base na porcentagem de DPPH removido, detectado por espectrofotometria UV-Vis a 517nm. Um análogo da vitamina E (Trolox) foi utilizado com padrão. A porcentagem de inibição(I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac e As são a absorbância da amostra de controle e teste, respectivamente. (Blouis, 1958; Kose et al., 2010). O resultado foi expresso em IC₅₀ com base na regressão linear das porcentagens de inibição.

2.4.2 Ensaio 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)

A atividade antioxidante do óleo essencial de *E. brejoensis* (OEEb) também foi avaliada pelo ABTS, na qual consiste na geração do radical cromóforo a partir da oxidação do ABTS por persulfato (Re et al., 1999). O OEEb foi avaliado nas concentrações (0,062 a 2mg/mL) e o experimento realizado em triplicata, sendo a atividade calculada com base na porcentagem de ABTS removido. O Trolox foi usado como padrão. A inibição percentual (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. O resultado foi expresso em valores de IC₅₀.

2.4.3 Capacidade antioxidante total (TAC)

A atividade antioxidante total (TAC) do OEEb foi investigada com o teste de fosfomolibênio, determinando a redução de Mo⁴⁺ para Mo⁵⁺ pela substância em estudo, com subsequente formação de fosfato de molibdênio (Prieto et al., 1999). Ácido ascórbico (AA) foi

usado como substância padrão. A CAT foi calculada com base na seguinte equação: $CAT (\%) = [(Aa - Ab \cdot 100) / (As - Ab)]$, onde Aa é a absorbância na presença da amostra, Ab é a absorbância do controle e As é a absorbância de padrão. O Resultado foi apresentado em valores de IC₅₀ a partir da regressão linear da porcentagem da redução do íon pelo óleo.

2.5 Teste hemolítico

O ensaio hemolítico foi realizado em placa de 96 poços com uma suspensão de eritrócitos de camundongos a 2% em solução salina 0,9% de acordo com método descrito por Costa-Lotuf et. al (2002). O óleo essencial foi testado nas concentrações (0,06mg/mL a 2mg/mL) e o Triton-X usado como controle positivo considerando 100% de hemólise. Após a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante removido para dosagem de hemoglobina liberada em espectrofotômetro UV-Vis a 540nm.

2.6 Ensaio *in vivo*

2.6.1 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos machos (*Mus musculus*) Swiss pesando de 35 ± 10 g, com 8 a 10 semanas obtidos do Laboratório Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). Os animais foram distribuídos em grupos aleatoriamente, sendo mantidos em caixas plásticas em temperatura ambiente controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12:12h) com livre acesso a água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, conforme protocolos nº 0018/2019, nº 0095/2019.

2.6.2 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda do óleo essencial de *E. brejoensis* (OEEb) foi avaliada de acordo com a Diretriz 423 da OCDE (OECD, 2001). Seis animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: o grupo experimental recebeu por gavagem uma única dose do óleo na concentração de 2.000mg/kg e o grupo controle recebeu solução salina 0,9%. Após a

administração, os animais foram observados durante as primeiras 3h e, em seguida, a cada 24h durante 14 dias. Neste período, os parâmetros de ingestão de alimentos, ingestão de água, peso corporal e comportamento do animal foram observados (Malone, 1983). Ao final do experimento, os animais foram sacrificados com altas doses de anestésicos (cetamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg). O sangue periférico foi obtido por punção da via cava inferior após laparotomia exploratória para análises hematológica e bioquímica. Os parâmetros hematológicos foram determinados em um analisador automático MaxCell Vet 500 D e microscópio óptico Olympus, considerando contagem de eritrócitos (RBC), hemoglobina (HB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e diferenciada dos leucócitos. Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 3,500 rpm por 10 min para obtenção de soro e avaliação dos seguintes parâmetros: albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), proteínas totais, ureia, creatinina, colesterol total e triglicerídeos usando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) em analisador automático COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics).

Os órgãos fígado, rim, baço, pulmão de animais dos grupos controle e tratados com o óleo essencial foram pesados e a análise histológica foi realizada por microscopia óptica. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%, v / v) e em seguida desidratadas através de uma série gradual de etanol (70-100%), diafanizado em xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (5 µm) foram corados com hematoxilina-eosina e montados usando lamínulas com resina Entellan (Merck, Alemanha) (Kiernan, 1999). As amostras foram observadas usando um microscópio Nikon Eclipse E100 (Japão) acoplado a um Moticam 1.000 1.3 MP câmera digital (Motic Incorporação Ltd, Causeway Bay, Hong Kong).

2.6.3 Testes de genotoxicidade

Para investigar se o OEEb produz efeitos genotóxico e mutagênicos, foram realizados o ensaio cometa e o teste de micronúcleo com sangue periférico (Tice et al., 2000). Os animais foram divididos em três grupos (n=5): o grupo controle negativo (CN) recebeu 0,5 mL de água deionizada por gavagem e o segundo grupo recebeu o óleo essencial de *E. brejoensis* a 2.000 mg/kg de peso corporal por gavagem. O outro grupo - o controle positivo (CP) - recebeu ciclofosfamida (Sigma-Aldrich, C0768) por via intraperitoneal a 25 mg/kg de peso corporal (Oliveira et al., 2016). Transcorridas 48h do tratamento, os animais foram anestesiados

com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg) por via intraperitoneal e o sangue periférico foi coletado por punção retro-orbital para realização dos ensaios cometa e micronúcleo (Souza et al., 2021).

2.6.3.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000). Uma amostra de 15 μ L de sangue de cada animal foi homogeneizada com 100 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5% LM). Essa mistura foi depositada em lâminas previamente revestidas com agarose padrão 0,5%, cobertas com lamínulas e expostas a 4°C por 10 minutos. Após o resfriamento, as lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise (cloreto de sódio [NaCl] 2,5M, ácido etilenodiaminotetracético [EDTA] 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%, pH13) por 48 horas. Em seguida, as lâminas foram expostas a tampão de eletroforese alcalino (NaOH 1M e sal dissódico de EDTA 200 mM, pH 13) por 20 minutos e submetidas a eletroforese em uma câmara horizontal por 20 min a \pm 300 mA e 32 V. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas por 15 minutos em tampão (Tris-HCL 0,4M / pH 7,5) e fixadas em etanol absoluto por 5 min. As lâminas foram coradas com 30 μ L de uma solução de brometo de etídio (0,0002% p/v) e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-imager M2) com objetiva de aumento de 40x e filtro AlexaFluor 546 nm. Duas lâminas foram coradas para cada animal, sendo contabilizados 100 nucleóides para a análise quanto ao dano no DNA. Cada núcleo foi classificado visualmente de acordo com a proporção de DNA na cabeça e cauda do cometa, sendo considerado 0 (nenhum dano), 1 (pouco dano aparente), 2 (dano médio), 3 (dano médio alto) e 4 (alto dano) (Collins et al., 2008; Souza et al., 2021). Os valores obtidos 0 (nenhum dano) a 400 (dano máximo) foram utilizados para avaliar o Índice de Dano (ID) e o percentual da Frequência de Dano (FD) em relação ao número total de núcleo quantificados (Collins et al., 2008; Moura et al., 2020).

2.6.3.2 Teste de micronúcleo

Para o teste de micronúcleo, foi utilizado o protocolo descrito por Hayashi et al., (1990). O sangue periférico de cada animal foi depositado em três lâminas previamente revestidas com laranja de acridina e cobertas com lamínulas. A presença de micronúcleos foi investigada em 2000 eritrócitos policromáticos utilizando o microscópio de fluorescência (Zeiss-imager, M2) com objetiva de ampliação de 40x e filtro AlexaFluor 488 (OECD, 2016).

2.6.4 Atividade antinociceptiva

2.6.4.1 Contorção abdominal induzida por ácido acético

A atividade antinociceptiva do óleo essencial foi investigada por indução da dor abdominal com administração via intraperitoneal de ácido acético 0,8% (Oliveira et al., 2018). Os camundongos foram divididos em quatro grupos (N=6), sendo previamente tratados 60 min antes da indução. Os tratamentos foram realizados por via oral em dois grupos com o óleo essencial (100 mg/kg e 50 mg/kg), um grupo com solução salina 0,9% (controle) e outro grupo com indometacina (20 mg/kg). A contabilização das contorções foi registrada nos intervalos 5-15 min após a injeção do ácido acético.

2.6.4.2 Teste da formalina e mecanismo de ação

Para investigar a atividade antinociceptiva do óleo nesse ensaio, foi utilizado o protocolo descrito por Hunskaar e Hole (1985) com adaptações. Inicialmente, os camundongos foram divididos em cinco grupos (n=6), sendo pré-tratados por via oral com: solução salina 0,9% (controle), óleo essencial (100 mg/kg e 50 mg/kg), morfina (10 mg/kg) e indometacina (20 mg/kg). Após 1h, foi administrada a solução de formalina (2,5% em solução salina 0,9%, 20 µL / pata) na área subplatar da pata traseira direita. Em seguida, os camundongos foram observados no tempo gasto para lambe a pata injetada, o que foi utilizado com indicativo de dor. A observação dos cinco 5 primeiros minutos foi considerada como primeira fase (dor neurogênica) e o intervalo entre 15 e 30 minutos após a injeção do indutor da dor como a segunda fase (dor inflamatória)

Para avaliar o envolvimento das vias da ação antinociceptiva do óleo, os camundongos foram tratados com antagonistas do sistema opioide (naloxona 5 mg/kg) e receptor muscarínico (atropina 5mg/kg), e um bloqueador do canal de K⁺ sensível ao ATP (glibenclamida 5mg/kg) 30 minutos antes da administração do óleo essencial (100mg/kg), morfina (10mg/kg) e solução salina 0,9%. Todas as administrações foram realizadas por via oral antes da injeção intraplantar de formalina 2,5% (Tjolsen et al., 1992; Veras et al., 2020).

2.6.5 Atividades anti-inflamatórias

2.6.5.1 Peritonite induzida por carragenina

A inflamação foi induzida por carragenina de acordo com o protocolo descrito por Veras et al., (2021). Os animais foram divididos em quatro grupos (n= 6). Os tratamentos foram realizados por gavagem com as seguintes soluções: o óleo essencial diluído em solução salina 0,9% (100 mg/kg e 50 mg/kg), controle negativo (solução salina 0,9%) e controle positivo com indometacina (20 mg/kg) 60 min antes da indução da peritonite. Após esse tempo, a carragenina (0,25 mL, 0,75% p / v em solução salina 0,9%) foi injetada por via intraperitoneal. Quatro horas após a indução, os animais foram eutanasiados e 2mL de solução salina tamponada 0,9% foi injetada na cavidade peritoneal. Posteriormente, uma leve massagem foi realizada e coletado o líquido peritoneal em condições assépticas. O líquido foi centrifugado a 12.000xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante acondicionado a -70°C até a análise. Amostras de 100 µL do líquido foram utilizadas para dosagens de citocinas TNF- α e IL-1 β usando o kit Elisa, High Sensitivity in Elisa, Thermo Fisher (Waltham, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

6.5.2 Edema de pata induzida por carragenina

A atividade anti-inflamatória também foi investigada pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina, conforme descrito por Winter et al., (1962) com modificações. Os animais foram divididos em quatro grupos (n = 6): um grupo tratado com solução salina 0,9% (grupo controle), dois grupos receberam o óleo essencial (100 mg/kg e 50 mg/kg em solução salina 0,9%) e outro grupo foi tratado com indometacina (20 mg/kg). Todos os tratamentos foram realizados por via oral 60 min antes da indução do edema com 15µL de carragenina 2% na região subplantar da pata traseira direita dos camundongos. O mesmo volume de solução salina 0,9% foi injetado na pata traseira esquerda. O volume do edema foi avaliado com um paquímetro (Mitutiyo Corporation, Digmatic Caliper, Kanagawa, Japão) nos intervalos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a indução. A inibição do edema foi calculada pela diferença entre as patas traseiras direitas e esquerdas, conforme relatado por Santos et al., (2020).

2.6.6 Análise Estatística

Os resultados (ensaios *in vitro*, antinociceptivo e anti-inflamatório) foram expressos em média desvio padrão e analisados por ANOVA seguido por Tuckey no software GraphPad Prisma, EUA. Por fim, os resultados dos ensaios de genotoxicidade foram analisados de forma independente usando o teste de Wilcoxon (software R). Os resultados foram considerados significantes em $p < 0,05$ e $p < 0,001$.

3 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização química

As folhas de *E. brejoensis* foram coletadas em Buíque, no estado de Pernambuco, Brasil. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e, posteriormente, a composição química avaliada em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) (Silva et al., 2020). O rendimento da extração do óleo foi de 0,77% (v/p). Foram detectados 33 compostos, que representam 96,61% da composição total, dentre eles: δ -cadineno (19,49 \pm 0,02 %), biciclogermacreno (13,74 \pm 0,04%) definidos como os principais, seguidos do α -cadinol (9,43 \pm 0,03%), germacreno – D (8,36 \pm 0,03%) e trans-cariofileno (7,16 \pm 0,01%), conforme Tabela 1.

Inicialmente, Silva et al. (2015) descreveram a primeira caracterização para o óleo essencial de *E. brejoensis*, compreendendo os seguintes compostos majoritários: δ -cadineno (22,6%), β -cariofileno (14,4%), α -muurolol (9,34 %) α -cadinol (8,49 %). Outros estudos também sinalizam a composição química de óleos essenciais de *E. brejoensis*, constituído, majoritariamente, por sesquiterpenos, sobressaindo-se o biciclogermacreno, trans-cariofileno, α -muurolol e germacreno- D (Mendes et al., 2018; Souza et al., 2017).

Ainda que os mesmos compostos químicos tenham sido identificados neste trabalho, a quantificação e os majoritários diferiram. Silva et al. (2021) afirmam que variações sazonais, condições de estresse, termorregulação da planta e coletas em diferentes estações do ano podem influenciar na composição e quantificação de compostos detectados na amostra. Os sesquiterpenos são compostos predominantes na composição química dos óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia* (Santos et al., 2018b). Um estudo com óleo essencial de *Eugenia gracilima*, uma espécie localizada em regiões de Caatinga, assim como *E. brejoensis*,

identificou os constituintes germacreno- D (16,10%), α -muuroleno (15,60%), biciclogermacreno (8,53%), germacrene B (7,43%), e δ -elemene (6,06%) como sendo mais abundantes (Sampaio et al., 2021). Silva et al. (2017) analisaram a composição química dos óleos essenciais de quatro espécies de *Eugenia* ssp. Provenientes das áreas de Mata Atlântica. Entre elas, o óleo essencial *Eugenia polystachya* revelou germacreno-D (18,4%), ishwarane (15,7%) e biciclogermacreno (5,1%) como constituintes majoritários.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* (OEEb)

	Compostos	RI Cal	RI Lit	OEEb	
				(%)	S.D.
1	δ -Elemene	1337	1335	1.73	0.01
2	α -Cubebene	1345	1348	0.71	0.02
3	α -Copaene	1374	1374	0.59	0.01
4	β -Bourbonene	1385	1387	0.51	0.06
5	β -Elemene	1392	1390	0.83	0.02
6	α -Gurjunene	1409	1409	1.68	0.04
7	Trans-caryophyllene	1421	1417	7.16	0.01
8	β -Gurjunene	1430	1431	0.31	0.02
9	Aromadendrene	1439	1439	0.35	0.01
10	Cis-muurola-3,5-diene	1448	1448	0.01	0.01
11	Trans-muurola-3,5-diene	1451	1451	0.12	0.01
12	α -Humulene	1454	1452	1.02	0.03
13	Alloaromadendrene	1458	1458	2.46	0.01
14	Trans-cadina-1(6),4-diene	1451	1451	1.05	0.92
15	γ -Muurolene	1478	1478	2.09	0,04
16	Germacrene – D	1483	1484	8.36	0.03
17	Trans-muurola-4(14),5diene	1493	1493	0.01	0.01
18	Bicyclogermacrene	1500	1500	13.74	0.04
19	α -Muurolene	1501	1500	1.58	0.02
20	Germacrene-A	1507	1508	3.09	0.01
21	γ -Cadinene	1514	1514	1.05	0.03
22	δ-Cadinene	1522	1522	19.49	0.02
23	Trans-cadina-1,4-diene	1533	1533	0.61	0.01

24	α -Cadinene	1537	1537	0.61	0.01
25	α -Calacorene	1544	1544	0.27	0.02
26	Spathulenol	1577	1577	3.63	0.04
27	Caryophyllene Oxide	1582	1582	2.93	0.29
28	Carotol	1594	1594	4.10	0.02
29	Guaiol	1602	1602	1.44	0.04
30	Cubenol<1-epi->	1627	1627	0.92	0.07
31	Muurolol <epi- α ->	1640	1640	1.13	0.03
32	α -Muurolol	1644	1644	3.65	0.01
33	α-Cadinol	1652	1652	9.43	0.03
Hydrocarbon sesquiterpenes (SH)				61.54	
Oxygenated sesquiterpenes (SO)				35.12	
Total (%)				96.66	

3.2 Atividades antioxidantes

Estudos com novos antioxidantes naturais vêm sendo impulsionados por uma crescente tendência de substituição de antioxidantes sintéticos por naturais, visto que antioxidantes sintéticos - como BHT (hidroxitolueno butilado) e o BHA (hidroxianisol butilado) - são empregados com restrições por apresentarem toxicidade e carcinogenicidade (Ahmed et al., 2019). Os antioxidantes naturais são de interesse em diversas áreas, incluindo a farmacêutica (Manssouri et al., 2020). A ação farmacológica destes tem demonstrado uma relevante atuação sobre radicais livres, com consequente prevenção de patologias neurodegenerativas, cardiovasculares, bem como cancerígenas. (Hou et al., 2022; Lins; Santori, 2014).

Em razão da complexa reatividade dos constituintes químicos de óleos essenciais e extratos de plantas, a capacidade de eliminação de radicais livres não pode ser mensurada por apenas um único método. Deste modo, é necessária a aplicação de diferentes ensaios e mais de um protocolo para validação da atividade antioxidante de uma amostra vegetal (Amorati et al., 2013; Shan et al., 2019). No presente estudo, diferentes métodos foram aplicados para analisar a atuação do OEEb na redução de íons e sequestro de radicais livres. Os resultados são expressos em valores de IC₅₀ sendo apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* (OEEb)

Amostras	DPPH IC₅₀ (µg/mL)	ABTS IC₅₀ (µg/mL)	TAC IC₅₀ (µg/mL)
OEEb	120,88± 0,12	287,10±0,10	563,63±0,02
Trolox	57,91±0.08	210,39±0.05	NT
Ácido ascorbico	NT	NT	504,79±0.05

DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS: Radical 2',2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato); TAC: Capacidade antioxidante Total. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (n=3).

O resultado da atividade de sequestro de radicais livres de DPPH revelou um valor com IC₅₀ 120,88± 0,12 µg/mL, correspondente a 2,1 vezes ao valor apresentado no ensaio com o Trolox (IC₅₀ 57,91±0.08 µg/mL). A eliminação de radicais pelo método de ABTS, o OEEb expressou um valor de IC₅₀ 287,10±0,10 µg/mL, mais próximo ao valor apresentado no ensaio com o Trolox (IC₅₀ 210,39±0.05 µg/mL). Para avaliar a ação antioxidante do OEEb sobre a redução de íons metálicos, foi empregado o teste de capacidade antioxidante total (TAC) pelo método do fosfomolibdênio. Neste ensaio, o resultado demonstrou a atividade do OEEb com valor de IC₅₀ 563,63±0,02 µg/mL similar ao padrão frequentemente utilizado para fins de comparação neste teste, o ácido ascórbico (IC₅₀ 504,79±0.05 µg/mL). Estes resultados apontam que o OEEb possui um significativo potencial antioxidante, principalmente se alinhado com ação antioxidante de óleos essenciais de outras espécies, como *Psidium sobralianum*, *Psidium laruotteanum* e *Psidium salutare*, que apresentaram no ensaio de eliminação de radicais DPPH valores de IC₅₀ 5,99 mg/mL, 52,33mg/mL e 54,34mg/mL, respectivamente (Macedo et al., 2022).

No decorrer dos anos, tem-se evidenciado a atividade antioxidante de diversas espécies do gênero *Eugenia* (Magina et al., 2010). Sampaio et al. (2021) estudaram a ação antioxidante do óleo essencial de *Eugenia gracilima* usando os métodos DDPH (IC₅₀15.67 mg/mL), ABTS (IC₅₀15.16 mg/mL) e TAC (62.29%) encontrando resultados similares aos relatados neste trabalho. A atividade antioxidante revelada por óleos essenciais de *Eugenia* spp. nos mesmos métodos aplicados em nosso trabalho têm sido atribuída a componentes químicos também presentes na assinatura do OEEb, incluindo δ-cadineno (Oliveira et al., 2018a), derivados de cariofileno (Silvestri et al., 2010), germacrene-D (Carneiro et al., 2017), biciclogermacreno

(Sampaio et al., 2021), germacrene -B (Figueiredo et al., 2019) e γ -elemeno (Ferreira et al., 2021).

3.3 Ensaio de hemólise

A citotoxicidade em eritrócitos foi avaliada pelo ensaio de hemólise que permite analisar a toxicidade de compostos químicos sobre a membrana plasmática através da capacidade de causar danos estruturais, incluindo formação de poros ou rupturas com a consequente liberação da hemoglobina que é mensurada por densidade óptica a 540nm (Deng et al., 2016). O óleo essencial de *E. brejoensis* demonstrou baixa atividade de hemólise *in vitro* em eritrócitos de camundongos. Nas concentrações analisadas, as taxas hemolíticas variaram de 1,04% a 2,53% (Tabela 3). Na análise estatística, os resultados mostraram-se significativos ($p < 0,05$) quando comparados com os percentuais do controle positivo (Triton-x) com as concentrações testas do OEEb. Foi relatado que óleos essenciais com taxas inferiores a 5% de hemólise podem ser aceitáveis e potencialmente seguros para aplicação como conservantes de alimentos ou candidatos a drogas (Veras et al., 2020; Chen et al., 2016).

Estudos com espécies do gênero *Eugenia* utilizados na medicina tradicional têm revelado segurança toxicológica a partir de testes hemolíticos. Oliveira et al. (2022a) empregaram o ensaio hemolítico para comprovar que o extrato de *Eugenia biflora* L não promove hemólise em eritrócitos de camundongos. Costa et al. (2020) estudaram a toxicidade do óleo essencial de *Eugenia stipitata* revelando a baixa atividade sobre as membranas de eritrócitos de camundongos. Contudo, o óleo essencial de *Eugenia uniflora* com potencial atividade leshimanicida revelou ser tóxico em eritrócitos humanos, promovendo 63,22% de hemólise na concentração de 400 μ g/mL, e relativamente seguro em concentrações abaixo de 50 μ g/mL. Devido à baixa atividade hemolítica, o OEEb demonstrou interagir fracamente com a membrana seguro para prosseguirmos com os ensaios toxicológicos *in vivo*.

Tabela 3. Atividade hemolítica do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* (OEEb)

Amostras (n=3)	Atividade Hemolítica (%)
Controle negativo	1.21±0.12
Triton-X	100±0.01
OEEb 0,062 mg/mL	1.04±0.03
OEEb 0,125 mg/mL	1.26±0.15
OEEb 0,25 mg/mL	1.30±0.12
OEEb 0,5 mg/mL	1.47±0.41
OEEb 1 mg/mL	2.13±0.10
OEEb 2 mg/mL	2.53±0.12

Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). A ANOVA-Tukey revelou que não foram encontradas diferenças significativas em comparação com o controle ($p > 0,05$).

3.4 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda é imprescindível na triagem de plantas medicinais como fonte de novos candidatos a medicamentos para a aplicação terapêutica, pois torna possível mensurar as possíveis interações entre dose, resposta e efeitos adversos em sistemas biológicos similares, garantindo, assim, a segurança de uso em humanos (Arome;Chinedu, 2013; Deyno et al., 2021; Strickland et al., 2018). Todos os animais tratados por via oral com 2000mg/kg do OEEb não apresentaram sinais clínicos de alterações sensoriais ou motoras, não tendo havido mortalidade durante os 14 dias de experimento. Ademais, não foram identificadas diferenças significativas na ingestão alimentar e hídrica nem no peso corporal médio dos animais ao final

do experimento entre o grupo tratado com 2000mg/kg de OEEb em comparação com o grupo controle tratado com solução salina 0,9% (Tabela 4). Estes resultados indicam uma DL₅₀(dose letal para 50% do grupo testado) superior a 2000mg/kg, classificando o OEEb como seguro e atóxico. De acordo com as diretrizes da OECD (2001), produtos químicos com DL₅₀<5000mg/kg são considerados seguros e classificados na categoria de perigo 5 (atóxico) do Sistema Global Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). O acompanhamento do peso corporal relacionado com o peso dos órgãos ao final do experimento é índice simples e sensível de monitoramento de toxicidade após a exposição a xenobióticos (Bomonini et al., 2017). Nas análises macroscópicas, não foram observados sinais de fibrose, isquemia, sangramento ou outras lesões. Não houve diferenças significativas entre os pesos dos órgãos (fígados, rins, baços, estômagos, pulmões e corações) do grupo tratado em comparação com o grupo controle (Tabela 5). Contudo, apenas a ausência de sinais clínicos e análises macroscópica dos órgãos não asseguram a isenção de efeitos toxicológicos, fazendo-se necessário avaliar outros parâmetros (bioquímico, hematológicos, genotoxicidade e mutagenicidade), deslindando de forma extensiva e garantindo a segurança na utilização do OEEb com fins medicinais (Bomonini et al., 2017; Moura et al., 2020).

Tabela 4. Água, consumo alimentar e peso médio entre os grupos controle e tratado com óleo essencial de *Eugenia brejoensis* por 14 dias.

Parâmetros	Controle	OEEb 2000mg/kg
Consumo de água (mL)	31,44±1.22	30,96±1.47
Consumo de alimento (g)	24,43±0.85	23,24±0.51
Pesos dos animais (g)	33.4±0.05	32.3±0.03

Os dados são expressos como média ± DP de n = 3 animais por grupo. A ANOVA-Tukey revelou que não foram encontradas diferenças significativas em comparação com o controle ($p > 0,05$).

Tabela 5. Avaliação do peso do órgão de camundongos 14 dias após a administração do óleo essencial de *Eugenia brejoensis*

Parâmetro	Controle	OEEb 2000mg/kg
Fígado	1.6±0.13	1.41±0.06
Rim	0.32±0.01	0.35±0.01
Baço	0.14±0.01	0.15±0.02
Pulmão	0.21±0.19	0.19±0.01
Estômago	0.31±0.05	0.31±0.06
Coração	0.16±0.02	0.14±0.01

Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3). Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

As alterações nos parâmetros do sistema hematopoiético correspondem ao estado fisiológico ou patológico como resposta da toxicidade após a administração de uma substância teste (Kumar et al., 2022). Estas alterações hematológicas podem ser rápidas ou estende-se por longos períodos, promovendo alterações estruturais e funcionais em outros tecidos (Ramesh et al., 2018). Os resultados da análise dos parâmetros hematológicos (Tabela 6) revelaram que o tratamento com o OEEb (2000mg/kg) não produziu alterações estatisticamente significativas quando comparados com os dados do grupo controle.

A análise dos parâmetros bioquímicos mostrou aumento significativo nos níveis séricos das enzimas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) no grupo tratado com OEEb em comparação com o grupo controle. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabela 7). O fígado é o principal órgão com maior atividade metabólica, sendo responsável pela biotransformação química de fármacos ou pró fármacos antes de alcançarem circulação sistêmica (Almazroo et al., 2017). Variações elevadas nos níveis séricos dos biomarcadores hepáticos ALT e AST podem ser um indicativo de lesões nos hepatócitos, resultando na liberação destas enzimas (Derosa;Maffioli, 2017). Porém, para inferir um diagnóstico de dano hepático, é necessário analisar os resultados em conjunto com outros biomarcadores mais sensíveis, como a fosfatase alcalina e a GGT (mais específica, com meia vida de aproximadamente 28 dias em quadros de lesão hepática) (Giannini et al., 2005). Além disso, os níveis normais de ureia - um importante biomarcador de dano renal - indicam que o metabolismo de amoníaco para ureia, as funções de

desintoxicação e excreção do fígado não foram alteradas com tratamento com o OEEb (Bononimi et al., 2017). A Tabela 7 mostra que o tratamento com OEEb não promoveu aumento estatisticamente significativo nos níveis de GGT e fosfatase alcalina em relação ao grupo controle. Oluyele et al. (2022) relatam que níveis elevados de biomarcadores hepáticos e renais no plasma podem ser resultantes de um efeito estimulador do composto em células Kupffer e células mesangiais. Costa et al. (2019) estudaram a toxicidade aguda do óleo essencial *Eugenia stipitata* e observaram nos parâmetros bioquímicos elevação nos níveis de ALT ($81,9 \pm 0,06$) e AST ($134,7 \pm 0,35$); contudo, o óleo não foi classificado como tóxico considerando os demais parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos dos órgãos. Assim, pode-se inferir que o OEEb não exerce efeitos tóxicos em dose única de 2000mg/kg.

Tabela 6. Parâmetro hematológico de camundongos tratados com óleo essencial de *Eugenia brejoensis* em toxicidade aguda.

Parâmetro	Controle	OEEb 2000mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	5.35±0.15	5.22±0.34
Hematócrito (%)	39.15±1.23	40.11±2.06
Hemoglobina (g/dL)	12.67±0.76	12.09±0.71
VMC (fL)	51.11±1.49	51.77±1.72
HCM (pg)	18.22±0.47	17.88±0.60
CHCM (%)	34.28±0.55	35.03±0.63
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	9.08±0.31	9.44±0.82
Segmentado (%)	70.25±2.22	72.01±2.37
Linfócitos (%)	24.24±0.18	23.68±0.31
Monócitos (%)	3.22±0.11	3.03±0.37
Basófilos (%)	0.02±0.01	0.04±0.02
Eosinófilos (%)	1.58±0.22	1.46±0.31

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular. Os valores representam a média \pm SD (n=3/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com o óleo essencial de *Eugenia brejoensis*

Parâmetro	Controle	OEEb 2000mg/kg
Albumina (g/dL)	38.24±1.48	37.58±1.65
ALT (U/L)	58.70±1.22	79.7±2.20*
AST (U/L)	134.52±6.31	159.5±5.25*
GGT (U/L)	14.62±0.36	15.18±0.34
Fosfatase alcalina (U/L)	13.85±0.18	13.53±0.21
Proteína total (g/dL)	62.44±1.18	63.01±1.46
Creatinina (mg/dL)	3.45±0.37	3.50±0.48
Ureia	0.30±0.09	0.33±0.12
Colesterol Total (mg/dL)	98.76±2.41	96.3±2.73
Triglicérides (mg/dL)	64.2±1.52	63.78±1.77

ALT : Alanina aminotransferase; AST : Aspartato aminotransferase; GGT : gama-glutamil transferase; Os valores representam a média \pm SD ($n = 3$ /grupo para toxicidade aguda). * Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle.

As análises histológicas dos órgãos dos grupos não apresentaram morfologias com indicativos de processos patológicos (Figura 1). O fígado dos animais tratados com OEEb apresentou rede vascular composta de veias centrolobulares de calibres variados com ausência de congestão, parênquima bem desenvolvido e hepatócitos com morfologia característica. Nos rins, foram visualizadas estruturas preservadas, glomérulos bem desenvolvidos com cápsula de Bowman e espaço capsular bem definidos. Adicionalmente, o baço apresentou arquitetura normal, sendo possível visualizar, externamente, uma cápsula constituída de tecido conjuntivo denso não modelado e células musculares lisas e, estruturas internas sem alterações (Kiernan, 1999).

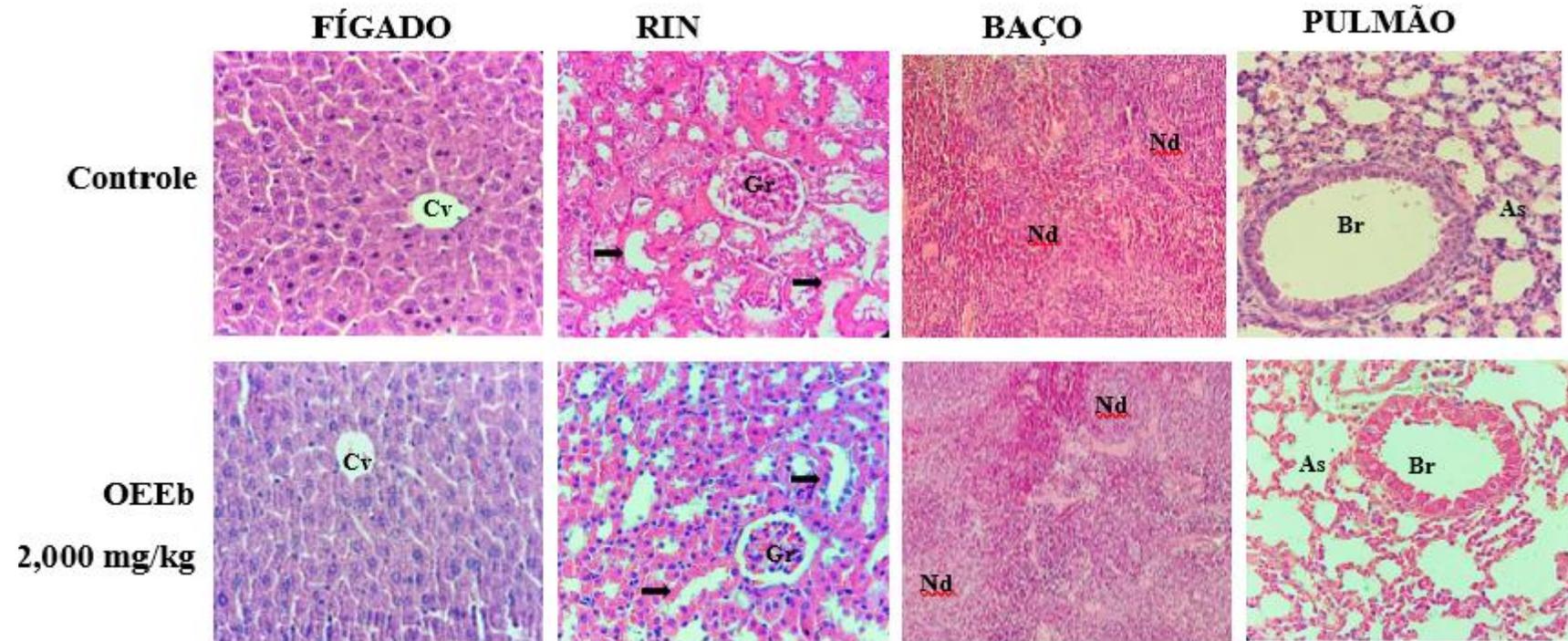


Figura 1. Fotomicrografias representativas do fígado, rim, baço e pulmão de camundongos fêmeas dos grupos controle e tratados com dose única com o óleo essencial de *E. brejoensis* (OEEb) na dose de 2000mg/kg. Fígados: a veia centrolobular (cv) é vista em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e os tubos contorcidos pontas de seta) são preservados e ordenados. Baço: Os linfonodos (Nd) são bem definidos nos grupos de controle e tratados. Pulmão: Podem ser visualizados bronquíolos (Br) e cavidade alveolar (As) com arquitetura preservada no controle e tratamento. Foi utilizada coloração com hematoxilina e eosina. Ampliação: 400x.

3.5 Genotoxicidade

O ensaio cometa e teste de micronúcleo são considerados métodos imprescindíveis na avaliação do potencial genotóxico em estudos não clínicos de novos candidatos terapêuticos (Oliveira et al., 2016; OECD, 2016). Estes testes são, frequentemente, utilizados para investigar a capacidade de produtos naturais causarem possíveis mutações ou danos no DNA (Machado et al., 2021; Oliveira et al., 2022; Souza et al., 2021).

Neste trabalho, a administração oral de 2000 mg/kg do óleo essencial de *E. brejoensis* (OEEb) não promoveu danos genéticos ou mutagênicos, conforme mostra Figura 2. No ensaio cometa, ao calcular o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD), não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o grupo controle (CN) - que recebeu solução salina 0,9% (ID: $41 \pm 13,9$ e FD: $25,8 \pm 6,9$) - e o grupo que recebeu a dose do OEEb (ID: $44,8 \pm 12,1$ e FD: $31,4 \pm 7,2$), exceto quando comparados como grupo tratado com a droga ciclofosfamida ($p < 0,05$).

Da mesma forma, no teste de micronúcleo não houve aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos do sangue periférico dos animais tratados com OEEb ($3,4 \pm 1,14$) em relação ao grupo controle (CN) ($4,6 \pm 1,14$). Verificou-se o aumento significativo de eritrócitos policromáticos no grupo tratado com ciclofosfamida (CP), validando este experimento.

A identificação de micronúcleo nas células é um importante biomarcador, amplamente utilizado na epidemiologia molecular para investigar danos citogenéticos em células expostas a substâncias genotóxicas (Araldi et al., 2015). O teste de micronúcleo fornece a informação de como se formam os micronúcleos, seja por mutações no genoma (aneugênese) ou quebras cromossômicas (clastogênese) (Samanta; Dey, 2012). Já o ensaio cometa é uma técnica considerada padrão ouro em estudos de toxicologia genética, pode ser executado com um pequeno número de células, e permitindo a identificação de pequenos danos no DNA, tais como quebra de fita simples e dupla de DNA, sítios alcalilábeis, danos oxidativos, ligações cruzadas entre as fitas e sítios de reparo (Gajski et al., 2019; Obiakor et al., 2021).

Um estudo recente avaliou os efeitos toxicológicos *in vivo* do óleo essencial de *Allium sativum* L, revelando que este não interfere na formação de micronúcleos em células do sangue periférico de camundongos (Lin et al., 2022). Não há relatos na

literatura da avaliação de genotoxicidade da espécie de *E. brejoensis*; porém, há estudos com espécies do gênero e com os constituintes do óleo essencial. Moreira et al. (2017) verificaram através do ensaio de micronúcleo que a espécie *Eugenia dysenterica* não apresenta potencial genotóxico em células HepG2. O óleo essencial de *Annona leptopetala* possui os mesmos constituintes químicos encontrados no OEEb (biclogermacreno, germacreno-D e δ -cadineno) e não apresenta indícios de genotoxicidade em células do sangue periférico de mamíferos (Brito et al., 2018). Machado et al. (2021) mostraram através do ensaio cometa que o óleo essencial com 30,52% de cariofileno não produz efeitos genotóxico.

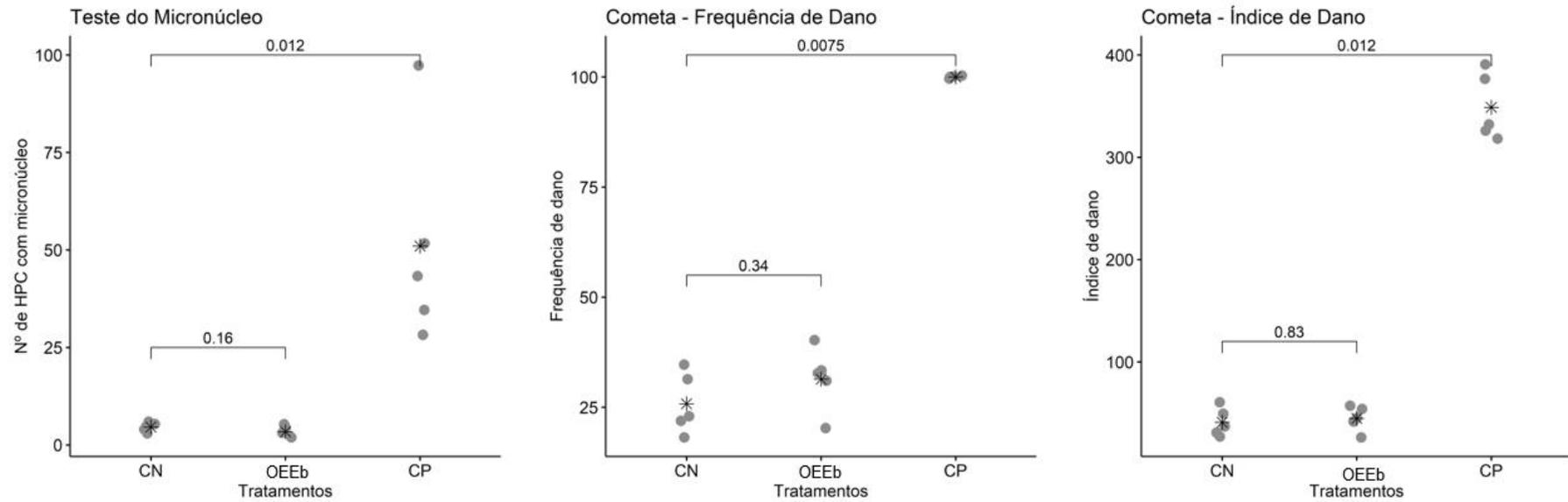


Figura 2. Resultados dos testes de micronúcleo e ensaio cometa. HPCE: eritrócitos policromáticos; CN: controle negativo (água deionizada); CP: controle positivo (ciclofosfamida - 25 mg/kg); OEEb: óleo essencial de *E. brenjoensis* (2000 mg/kg). Os asteriscos representam a média; os valores de p são apresentados em barras.

3.6 Atividade antinociceptiva

3.6.1 Contorção induzida por ácido acético

A contorção abdominal induzida por ácido acético causa uma dor visceral inflamatória, com ativação de nociceptores quimiossensíveis e consequente inflamação nas camadas subcutâneas e musculares da parede abdominal e órgãos viscerais subdiafragmáticos (Meymandi, Keyhanfar, 2013). Portanto, trata-se de um modelo amplamente utilizado na avaliação de novas drogas analgésicas de via periférica, pois promove a liberação de mediadores inflamatórios com prostaglandinas, bradicininas e citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) que estimulam os nociceptores periféricos (Oliveira et al., 2018; Silva et al., 2013).

O tratamento com OEEB em todas as doses inibiu significativamente ($p < 0,001$) o número de contorções induzidas pela administração intraperitoneal do ácido acético em comparação com o grupo controle (Figura 3). Os grupos tratados com o óleo essencial com doses 50mg/kg e 100mg/kg apresentaram redução no número de contorções de 63% e 68% respectivamente. A indometacina, medicamento de referência, também reduziu as contorções em 75% conforme esperado.

Diferentes óleos essenciais de espécies de *Eugenia* demonstram atividade antinociceptiva, como o óleo essencial de *Eugenia stipitata* (40, 100 e 250mg/kg), exibindo redução nas contorções em 54%, 55% e 56,6% respectivamente (Costa et al., 2019). A administração do óleo essencial de *Eugenia uniflora* na concentração 200mg/kg promoveu 48% de inibição das contorções provocadas por ácido acético (Amorim et al., 2009). O óleo essencial de *Eugenia candolleana* apresentou inibição nas contorções abdominais em 70,9% a partir da administração de 50mg/kg (Guimarães et al., 2009). Os óleos essenciais com germacrene D, delta cadinene e biciclogermacrene em sua composição química são descritos como potenciais candidatos analgésicos pelo ensaio de contorção abdominal (Veras et., 2020).

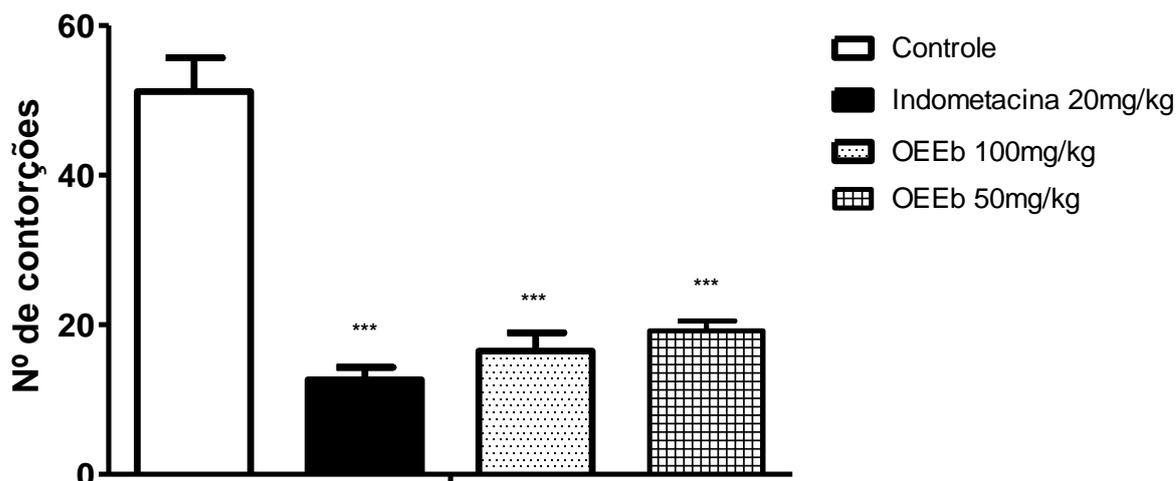


Figura 3. Efeito do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine (100mg/kg e 50mg/kg) na contorção abdominal induzida por ácido acético. Os asteriscos (***) $P < 0,001$ indicam significância em comparação com o grupo controle.

3.6.2 Teste da formalina e mecanismo de ação

No teste de formalina, verificou-se que o óleo essencial de *E. brejoensis* apresentou atividade antinociceptiva significativa em todas as concentrações testadas, reduzindo o tempo em lambedura das patas na fase neurogênica em 34% a 54% e, na fase inflamatória, reduzindo em 65,5% a 75% (Figura 4). Os medicamentos utilizados como referência exerceram ação esperada, tendo sido a indometacina eficaz na segunda fase e a morfina eficaz em ambas as fases. A administração de naloxona promoveu o bloqueio do efeito analgésico do óleo essencial na primeira fase e inibiu parcialmente na segunda fase, sugerindo que o seu mecanismo de ação está relacionado com ativação de receptores opioides. Tal inibição não foi observada por receptores muscarínicos nem por canal de K^+ ATPase.

Ademais, a segunda fase do teste de formalina mostrou que o óleo essencial de *E. brejoensis* reduziu a nocicepção também por vias inflamatórias, sendo observada uma redução de 75% no tempo de lambedura das patas de animais tratados com 100mg/kg de óleo (10% mais que a indometacina) em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram observados no óleo essencial de *Xylopia laevigata* - que tem γ -muurolene, δ -cadinene, bicyclogermacrene como constituintes majoritários - sendo eficaz nas duas fases de nocicepção induzida por formalina (Queiroz et al, 2014). A

participação do sistema opioide também foi atribuída para o efeito analgésico do óleo essencial de *Citrus limon* em protocolos semelhantes a este ensaio (Campelo et al., 2011).

A Associação Internacional para Estudos de Dor considera dor com “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada com dano real ou potencial do tecido”. Sua função é proteger o organismo de estímulos nocivos e essa percepção pode variar entre os indivíduos (Raja et al., 2020). Nesse contexto, métodos que avaliem respostas do sistema nervoso central a estímulos nocivos são verdadeiros aliados na busca por novos fármacos analgésicos (Quintans et al., 2017).

O teste de formalina é um modelo de dor associada à lesão tecidual provocada pela injeção intraplantar de formalina diluída na pata traseira do animal (Silva et al., 2013). Este teste segue um padrão bifásico, com fases distintas, que podem inferir diferentes estágios de dor. A primeira fase, uma dor neurogênica (0-5 min) desencadeada por uma estimulação direta das fibras C seguida da liberação da substância P no sistema nervoso central; na segunda fase, uma dor inflamatória (15-30min) caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios e hiperalgesia (Fonseca et al., 2021; Shibata et al., 1989). Este teste tem sido um excelente recurso para avaliação de óleos essenciais com efeitos analgésicos, sendo capaz de quantificar e converter em valores numéricos a nocicepção em modelo animal (Braga et al., 2021; Lenardão et al., 2016).

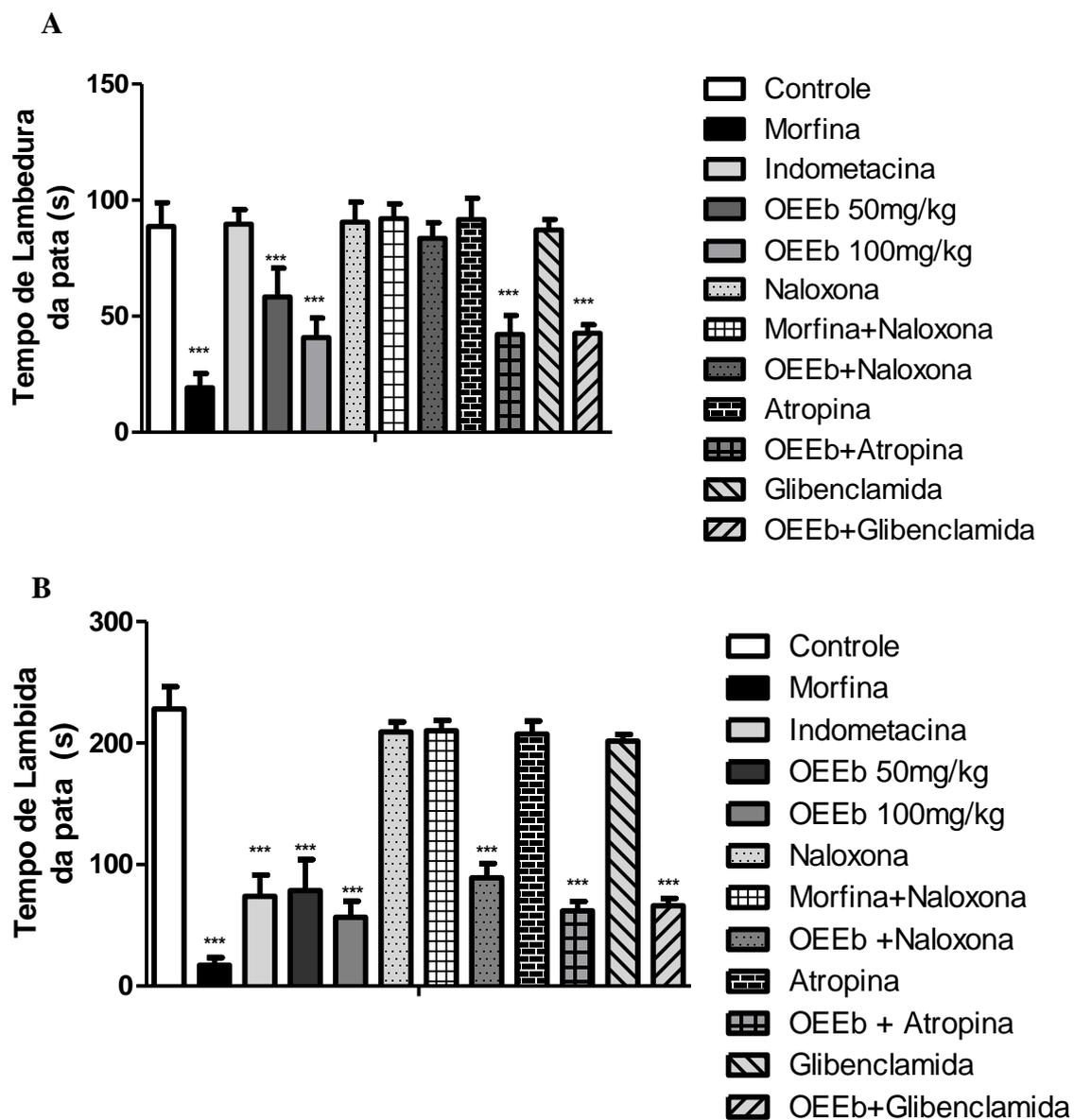


Figura 4. Efeito do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine no teste de formalina. Figura A, fase neurogênica 0 – 5 minutos de teste; Figura B, fase inflamatória 15-20 minutos de teste. Os asteriscos (***) indicam significância em comparação com o grupo controle, $P < 0,001$.

3.6 Atividade anti-inflamatória

3.6.1 Edema de pata induzido por carragenina

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é largamente utilizado para investigar efeitos anti-inflamatórios de novas moléculas com potenciais atividades farmacológicas (Cavalcante et al., 2021). Este método produz uma inflamação aguda com resposta bifásica, inicialmente, com a liberação de histamina, serotonina, quininas e citocinas nas primeiras horas, seguido da liberação de prostaglandinas, ativação da COX-2 e liberação de óxido nítrico nas 2-3h após a injeção do agente flogístico (Amdekar et al., 2012; Adedayo et al., 2019).

A injeção de carragenina 2% na pata dos camundongos induziu o edema esperado, conforme observação do grupo controle. O pré-tratamento com o óleo essencial de *E. brejoensis* reduziu significativamente ($p < 0,001$) os edemas (Figura 5). Após 4h de indução do edema, foi observada a redução de 87% e 89,1% (10% menos que o grupo indometacina) nos grupos tratados com óleo essencial nas concentrações de 50mg/kg e 100mg/k respectivamente. Esse efeito anti-edematogênico também foi observado em outros estudos com espécies do mesmo gênero. *Eugenia punicifolia* (Kunt) reduziu o edema na pata a partir da dose de 250mg/kg (Basting et al., 2014). O tratamento agudo com *Eugenia brasiliensis* (100mg/kg) promoveu a diminuição do edema na pata e nos níveis de citocinas IL-6 e TNF- α (Simões et al., 2018). Trans-cariofileno, biciclogermacrene e germacrene D foram relatados por promover a redução edematogênica em 97% a partir da administração de dose de 200mg/kg do óleo essencial de *Croton campestris* (Tintino-Oliveira et al., 2018).

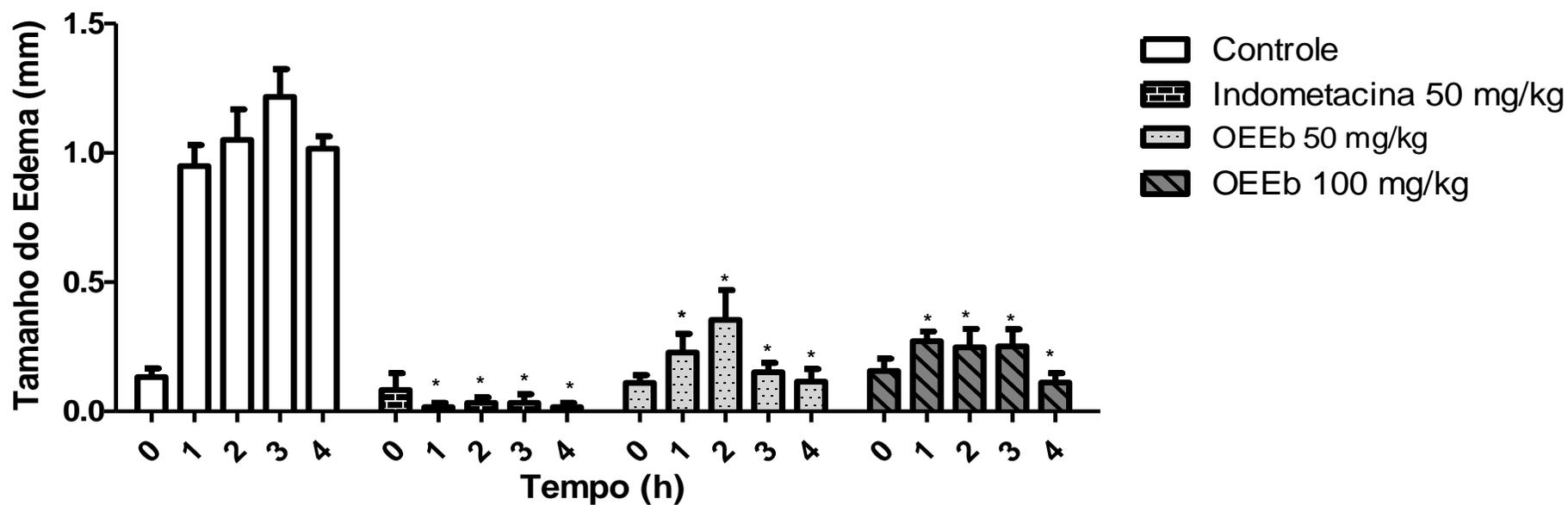


Figura 5. Atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine na redução do edema de induzido por carragenina. Os resultados foram expressos em média aritmética e desvio padrão \pm desvio padrão (DP) (n=6). A análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA e Bonferroni post test. (*) $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

3.6.2 Peritonite induzida por carragenina

A injeção intraperitoneal de carragenina desencadeia uma série de eventos caracterizando uma inflamação aguda com a liberação de histamina, serotonina, prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-8 (Piva et al., 2021), óxido nítrico, migração leucocitária e moléculas resultantes da resposta ao estresse oxidativo (Sousa-Neto et al., 2022). O efeito anti-inflamatório do óleo essencial de *E. brejoensis* também foi observado no modelo de peritonite aguda induzida por carragenina. A pré-administração reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatória TNF- α em 38,74%, 52,96% e IL-1 β em 55,9%, 65,76% nas concentrações de 50mg/kg e 100mg/kg respectivamente (Figura 6). Todas as doses promoveram uma redução significativa ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$) nos níveis de citocinas em comparação como controle. O medicamento indometacina proporcionou a redução de TNF- α e IL-1 β esperada de 66,35%, e 82,19% .

Resultados semelhantes foram observados em ensaios com *Eugenia uniflora*, inibição da migração celular e diminuição nos níveis citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em todas as doses (50,10 e 250mg/kg) testadas no modelo de peritonite induzida por carragenina (Falcão et al., 2018). O tratamento com trans-cariofileno na dose 10mg/kg, um dos componentes do óleo de *E. brejoensis* (OEEb), reduziu significativamente os níveis de IL-1 β em camundongos (Paula-Freire et al., 2014). O óleo essencial de *Verbesiana macrophyla* com componentes químicos majoritários germacrene-D, δ -cadineno e biciclogermacrene possui atividade anti-inflamatória e promoveu a redução dos níveis de citocinas IL-1 β e TNF- α no mesmo modelo induzido por carragenina (Veras et al., 2021).

A imunomodulação de citocinas pró-inflamatórias é considerada uma das etapas mais relevantes na terapêutica de doenças inflamatórias (Yang et al., 2021). Nesse contexto, a complexidade química conferida aos óleos essenciais permite que seus compostos possam atuar simultaneamente e sinergicamente sobre diversos mecanismos do processo inflamatório, sendo fortes candidatos para o desenvolvimento biotecnológico de produtos anti-inflamatórios (Silva et al., 2020; Takenaka et al., 2021).

Vários compostos podem atuar na regulação dos níveis de citocinas, α -bisabolol, biciclogermacrene, δ -cadineno e spathulenol constituintes do óleo essencial de *Stachys lavandulifolia* Vahl promoveram sinergicamente o controle nos níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α do fluido pleural (Barreto et al., 2016). Além disso, Germacrene D, constituinte químico do óleo essencial de *Eugenia piauhiensis*, também está relacionado com a imunomodulação de citocinas (Lima Nunes et al., 2021).

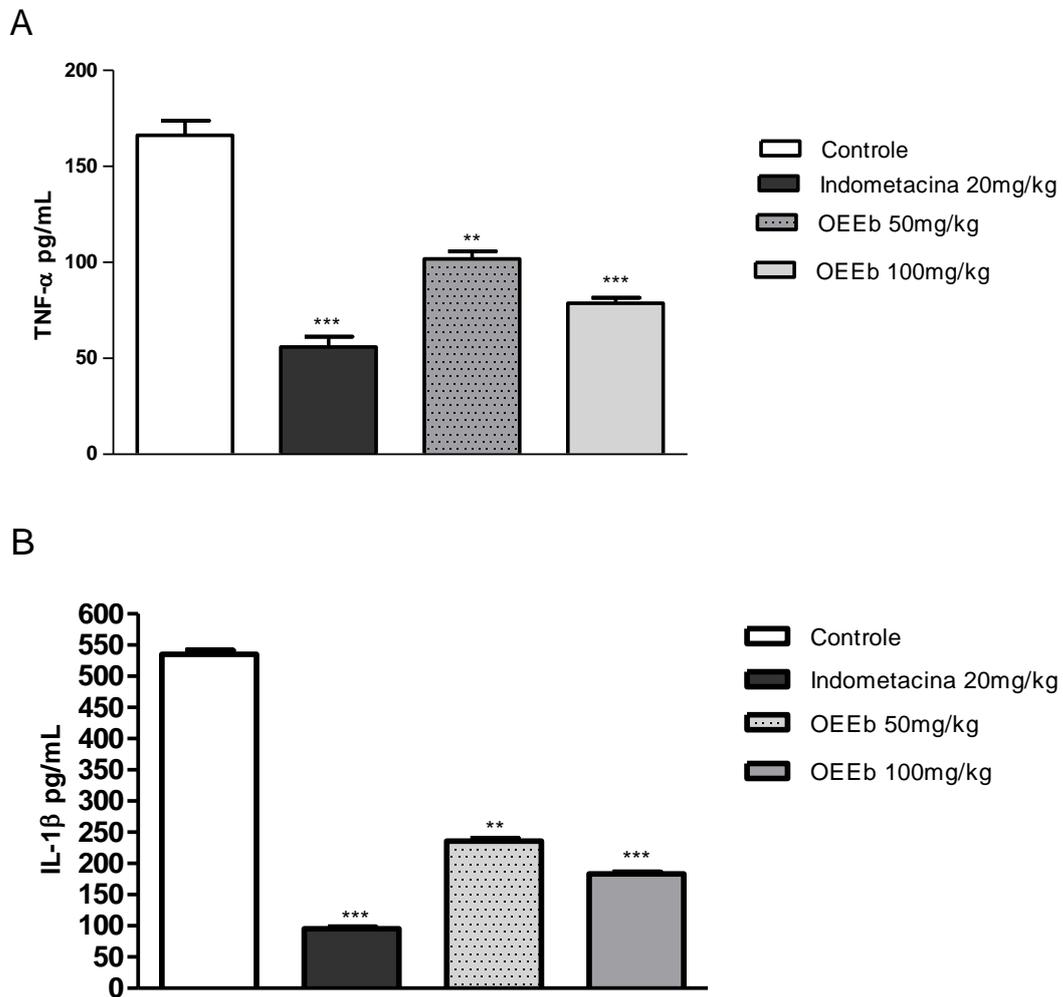


Figura 6. Efeitos do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine nos níveis de (A) TNF α e (B) IL-1 β . Os valores foram expressos em média aritmética \pm desvio padrão (DP) (n=6). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida de teste de Tukey. (***) P <0,001 e (**) P <0,05 em relação ao grupo controle.

4. Conclusões

Em conclusão, o óleo essencial de *E. brejoensis* Mazine, constituído majoritariamente de δ -cadineno e biciclogermacreno, apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva com mecanismo de ação pela via opioide. A administração oral de 2000mg/kg não demonstrou toxicidade aguda nem toxicidade genética. Os resultados validam o uso tradicional da espécie, sendo o óleo essencial uma fonte promissora natural para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos com baixo efeitos colaterais.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências financiadoras: Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Agradecem também ao apoio técnico do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise da Universidade Federal da Paraíba (LMCA-UFPB).

Referências

- Adams RP, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, US (United States), Allured Publ Corp CarolStream, IL, USA, 2017.
- Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E., 2016. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry* 196, 968–975. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.023>
- Adane, F., Asres, K., Ergete, W., Woldekidan, S., Abebe, A., Lengiso, B., Seyoum, G., 2021. Composition of the Essential Oil *Thymus schimperi* and Evaluation of Its Acute and Subacute Toxicity in Wistar Albino Rats: In Silico Toxicity Studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2021, e5521302. <https://doi.org/10.1155/2021/5521302>
- Adedayo, L.D., Ojo, A.O., Awobajo, F.O., Adeboye, B.A., Adebisi, J.A., Bankole, T.J., Ayilara, G.O., Bamidele, O., Aitokhuehi, N.G., Onasanwo, S.A., 2019. Methanol extract of *Cola nitida* ameliorates inflammation and nociception in experimental animals. *Neurobiology of Pain* 5, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.nypai.2019.100027>
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)

- Ait Atmane, S., Ait Eldjoudi, D., Aksoylu Özbek, Z., Günç Ergönül, P., Khettal, B., 2022. Acute and 28-day repeated dose toxicity evaluations of cold pressed *Pinus halepensis* Mill. seed oil in mice and rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 132, 105191. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105191>
- Anaya-Castro, M.A., Ayala-Zavala, J.F., Muñoz-Castellanos, L., Hernández-Ochoa, L., Peydecastaing, J., Durrieu, V., 2017. β -Cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: Preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. *Food Packaging and Shelf Life* 14, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.09.002>
- 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., Menezes, I.R.A., Nunes, P.S., Araújo, A.A.S., Costa, M.S., Campina, F.F., Santos, A.T.L., Silva, A.R.P., Coutinho, H.D.M., 2017. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in β -cyclodextrin. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.158>
- Araújo, F.F., Neri-Numa, I.A., de Paulo Farias, D., da Cunha, G.R.M.C., Pastore, G.M., 2019. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. *Food Research International* 121, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.018>
- Bars, D.L., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev* 53, 597–652.
- Basting, R.T., Nishijima, C.M., Lopes, J.A., Santos, R.C., Lucena Périco, L., Laufer, S., Bauer, S., Costa, M.F., Santos, L.C., Rocha, L.R.M., Vilegas, W., Santos, A.R.S., dos Santos, C., Hiruma-Lima, C.A., 2014. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 157, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.041>
- Beserra-Filho, J.I.A., de Macêdo, A.M., Leão, A.H.F.F., Bispo, J.M.M., Santos, J.R., de Oliveira-Melo, A.J., Menezes, P.D.P., Duarte, M.C., de Souza Araújo, A.A., Silva, R.H., Quintans-Júnior, L.J., Ribeiro, A.M., 2019. *Eplingiella fruticosa* leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin produces a superior neuroprotective and behavioral profile in a mice model of Parkinson's disease. *Food and Chemical Toxicology* 124, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.056>
- Bezerra Filho, C.M., da Silva, L.C.N., da Silva, M.V., Løbner-Olesen, A., Struve, C., Krogfelt, K.A., Correia, M.T.D.S., Vilela Oliva, M.L., 2020. Antimicrobial and Antivirulence Action of *Eugenia brejoensis* Essential Oil in vitro and in vivo Invertebrate Models. *Front Microbiol* 11, 424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00424>
- Bingham, S., Beswick, P.J., Blum, D.E., Gray, N.M., Chessell, I.P., 2006. The role of the cylooxygenase pathway in nociception and pain. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Pain* 17, 544–554. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2006.09.001>

- Bonomini, T.J., Holzmann, I., Thiesen, L.C., Fratoni, E., Muller, A.F.F., Lucinda-Silva, R.M., Yunes, R.A., Malheiros, A., Gonçalves, A.E., Dalmagro, A.P., da Silva, K.A.B.S., de Souza, M.M., Santin, J.R., 2017. Neuropharmacological and acute toxicological evaluation of ethanolic extract of *Allamanda cathartica* L. flowers and plumieride. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 91, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.005>
- Bradford, M.M., n.d. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding 7.
- Braga, R.M., de Andrade, H.H.N., Neto, H. de C.A., da Cruz, R.M.D., Assis, D.B., Cavalcante-Silva, L.H.A., Rodriguez-Mascarenhas, S., Pordeus, L.C. de M., Quintans-Junior, L.J., de Almeida, R.N., 2021. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Lippia pedunculosa* Hayek essential oil and its β -cyclodextrin inclusion complex. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*; Vol. 20 No. 2: March 2021; 162-176. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.2.13>
- Brewster, M.E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 645–666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>
- Brito, W.A., Ferreira, M.R.A., de Sousa Dantas, D., Soares, L.A.L., 2022. Biological activities of *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) extracts in oxidative stress-induced pathologies: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *PharmaNutrition* 20, 100290. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100290>
- Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J.C., Simal-Gandara, J., Astray, G., 2022. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chemistry* 384, 132467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132467>
- Cimino, C., Maurel, O.M., Musumeci, T., Bonaccorso, A., Drago, F., Souto, E.M.B., Pignatello, R., Carbone, C., 2021. Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. *Pharmaceutics* 13, 327. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030327>
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
- Costa, W.K., Oliveira, J.R.S. de, Oliveira, A.M. de, Santos, I.B. da S., Cunha, R.X. da, Freitas, A.F.S. de, Silva, J.W.L.M. da, Silva, V.B.G., Aguiar, J.C.R. de O.F. de, Silva, A.G. da, Navarro, D.M. do A.F., Lima, V.L. de M., Silva, M.V. da, 2020. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Industrial Crops and Products* 144, 112059. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112059>
- Das, S., Gazdag, Z., Szente, L., Meggyes, M., Horváth, G., Lemli, B., Kunsági-Máté, S., Kuzma, M., Kőszegi, T., 2019. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin – captured essential oils. *Food Chemistry* 278, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.047>

- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M.J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Leblanc, J.-C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Parent-Massin, D., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R.A., Wright, M., Younes, M., Boon, P., Chrysafidis, D., Gürtler, R., Tobback, P., Arcella, D., Rincon, A.M., Lambré, C., 2016. Re-evaluation of β -cyclodextrin (E 459) as a food additive. *EFSA Journal* 14, e04628. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4628>
- Food and Drug Administration, HHS, 2012. International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice. Fed Regist 77, 33748–33749.
- Goh, C.F., Lane, M.E., 2022. Advanced structural characterisation of pharmaceuticals using nano-thermal analysis (nano-TA). *Advanced Drug Delivery Reviews* 180, 114077. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114077>
- Gomes Vidal Sampaio, M., Bezerra Dos Santos, C.R., Cortez Sombra Vandesmet, L., Souza Dos Santos, B., Bianca Da Silva Santos, I., Correia, M.T.D.S., Lima de Berrêdo Martins, A., Nascimento da Silva, L.C., De Alencar Menezes, I.R., Veja Gomez, M.C., Da Silva, M.V., 2021. Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil. *Nat Prod Res* 35, 1914–1918. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644506>
- Gratieri, T., Pinho, L.A.G., Oliveira, M.A., Sa-Barreto, L.L., Marreto, R.N., Silva, I.C., Gelfuso, G.M., de Souza Siqueira Quintans, J., Quintans-Junior, L.J., Cunha-Filho, M., 2020. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-complexed naringenin by solvent change precipitation for improving anti-inflammatory effect in vivo. *Carbohydrate Polymers* 231, 115769. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115769>
- Hadžiabdić, J., Kopjar, N., Želježić, D., Špirtović-Halilović, S., Završnik, D., 2017. Cytogenotoxicity of Inclusion Complexes of Diazepam with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Res (Stuttg)* 67, 661–672. <https://doi.org/10.1055/s-0043-115123>
- Halahlah, A., Kavetsou, E., Pitterou, I., Grigorakis, S., Loupassaki, S., Tziveleka, L.-A., Kikionis, S., Ioannou, E., Detsi, A., 2021. Synthesis and characterization of inclusion complexes of rosemary essential oil with various β -cyclodextrins and evaluation of their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 65, 102660. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102660>
- Hassanpour, S., Rezaei, H., Razavi, S.M., 2020. Anti-nociceptive and antioxidant activity of betaine on formalin- and writhing tests induced pain in mice. *Behavioural Brain Research* 390, 112699. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112699>
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M., 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 245, 245–249. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-b](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-b)
- Herrera, A., Rodríguez, F.J., Bruna, J.E., Abarca, R.L., Galotto, M.J., Guarda, A., Mascayano, C., Sandoval-Yáñez, C., Padula, M., Felipe, F.R.S., 2019. Antifungal and physicochemical properties of inclusion complexes based on β -cyclodextrin and

- essential oil derivatives. *Food Research International* 121, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.026>
- Jisha, N., Vysakh, A., Vijeesh, V., Latha, M.S., 2019. Anti-inflammatory efficacy of methanolic extract of *Muntingia calabura* L. leaves in Carrageenan induced paw edema model. *Pathophysiology* 26, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2019.08.002>
- John de Oliveira Melo, A., Heimarh, L., Maria dos Santos Carvalho, A., de Souza Siqueira Quintans, J., Serafini, M.R., Antunes de Souza Araújo, A., Alves, P.B., Ribeiro, A.M., Shanmugam, S., Quintans-Júnior, L.J., Duarte, M.C., 2020. *Eplingiella fruticosa* (Lamiaceae) essential oil complexed with β -cyclodextrin improves its anti-hyperalgesic effect in a chronic widespread non-inflammatory muscle pain animal model. *Food and Chemical Toxicology* 135, 110940. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110940>
- Junior, J.A.A. do N., Filho, C.M.B., Oliveira, T.H.F. de, Silva, A.G. da, Bezerra-Silva, P.C., Paiva, P.M.G., Silva, M.V. da, Navarro, D.M. do A.F., Silva, L.C.N. da, Correia, M.T. dos S., 2018. Spermostatic activity of *Eugenia brejoensis* and *Myroxylon peruiferum* essential oils toward human spermatozoa. *JMPR* 12, 264–269. <https://doi.org/10.5897/JMPR2018.6614>
- Kavetsou, E., Pitterou, I., Katopodi, A., Petridou, G., Adjali, A., Grigorakis, S., Detsi, A., 2021. Preparation, Characterization, and Acetylcholinesterase Inhibitory Ability of the Inclusion Complex of β -Cyclodextrin–Cedar (*Juniperus phoenicea*) Essential Oil. *Micro* 1, 250–266. <https://doi.org/10.3390/micro1020019>
- Kiernan, J.A., 1999. HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL METHODS:THEORY AND PRACTICE, 3rd EDITION. Shock 12, 479.
- Kissinger, H.E., 1957. Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis. *Anal. Chem.* 29, 1702–1706. <https://doi.org/10.1021/ac60131a045>
- Kotronia, M., Kavetsou, E., Loupassaki, S., Kikionis, S., Vouyiouka, S., Detsi, A., 2017. Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. *Bioengineering* 4, 74. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030074>
- Kurkov, S.V., Loftsson, T., 2013. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 453, 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>
- Li, J., Zhang, S., Zhou, Y., Guan, S., Zhang, L., 2016. Inclusion complexes of fluconazole with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in aqueous solution: preparation, characterization and a structural insight. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 84, 209–217. <https://doi.org/10.1007/s10847-016-0598-z>
- Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J., Chen, J., 2007. γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 245–255. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1166-7>
- Lima, B. dos S., Campos, C. de A., da Silva Santos, A.C.R., Santos, V.C.N., Trindade, G. das G.G., Shanmugam, S., Pereira, E.W.M., Marreto, R.N., Duarte, M.C., Almeida, J.R.G.

- da S., Quintans, J. de S.S., Quintans, L.J., Araújo, A.A. de S., 2019. Development of morin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology* 126, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.038>
- Lin, Y., Huang, R., Sun, X., Yu, X., Xiao, Y., Wang, L., Hu, W., Zhong, T., 2022. The p-Anisaldehyde/ β -cyclodextrin inclusion complexes as a sustained release agent: Characterization, storage stability, antibacterial and antioxidant activity. *Food Control* 132, 108561. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108561>
- Liu, C., Zhang, W., Yang, H., Sun, W., Gong, X., Zhao, J., Sun, Y., Diao, G., 2014. A Water-Soluble Inclusion Complex of Pedunculoside with the Polymer β -Cyclodextrin: A Novel Anti-Inflammation Agent with Low Toxicity. *PLOS ONE* 9, e101761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101761>
- Luo, L., Schomaker, S., Houle, C., Aubrecht, J., Colangelo, J.L., 2014. Evaluation of Serum Bile Acid Profiles as Biomarkers of Liver Injury in Rodents. *Toxicological Sciences* 137, 12–25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft221>
- Luo, X., Zeng, L., Li, Q., Wang, Z., Kong, F., Bi, Y., 2022. β -cyclodextrin inclusion complex containing essential oil from wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] fruit pericarp: Synthesis, characterization, and evaluation of antioxidant activity. *Journal of Molecular Structure* 133525. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133525>
- Machado, V.S., Verdi, C.M., Somacal, S., Rossi, G.G., Machado, M.L., Klein, B., Roos, V.C., Urquhart, C.G., Dalcol, I.I., Sagrillo, M.R., Machado, A.K., Campos, M.M., Wagner, R., Santos, R.C.V., 2021. *Achyrocline flaccida* essential oil from Brazil: phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditis elegans*, and antimycobacterial activity. *Natural Product Research* 35, 5899–5903. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1802269>
- Magalhães, T.S.S., de Oliveira Macedo, P.C., da Costa, É.C.P., de Aragão Tavares, E., da Silva, V.C., Guerra, G.C.B., Pereira, J.R., de Araújo Moura Lemos, T.M., de Negreiros, M.M.F., de Oliveira Rocha, H.A., Converti, A., de Lima, Á.A.N., 2021. Increase in the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Euterpe oleracea Martius Oil Complexed in β -Cyclodextrin and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 11524. <https://doi.org/10.3390/ijms222111524>
- Magalhães, T.S.S., de Oliveira Macedo, P.C., Kawashima Pacheco, S.Y., Silva, S.S. da, Barbosa, E.G., Pereira, R.R., Costa, R.M.R., Silva Junior, J.O.C., da Silva Ferreira, M.A., de Almeida, J.C., Rolim Neto, P.J., Converti, A., Neves de Lima, Á.A., 2020. 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* 21, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms21030942>
- Malone, M.H., 1983. The pharmacological evaluation of natural products -. Genebal and specific approachbs to screening ethnopharmaceuticals 21.

- Maronpot, R.R., 2015. Toxicological assessment of Ashitaba Chalcone. *Food and Chemical Toxicology* 77, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.021>
- Marreto, R.N., Almeida, E.E.C.V., Alves, P.B., Niculau, E.S., Nunes, R.S., Matos, C.R.S., Araújo, A.A.S., 2008. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochimica Acta* 475, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.06.015>
- Meira, E.F., Oliveira, N.D., Mariani, N.P., Porto, M.L., Severi, J.A., Siman, F.D.M., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Gava, A.L., 2020. *Eugenia uniflora* (pitanga) leaf extract prevents the progression of experimental acute kidney injury. *Journal of Functional Foods* 66, 103818. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103818>
- Mendes, J.F., Martins, H.H.A., Otoni, C.G., Santana, N.A., Silva, R.C.S., Da Silva, A.G., Silva, M.V., Correia, M.T.S., Machado, G., Pinheiro, A.C.M., Piccoli, R.H., Oliveira, J.E., 2018. Chemical composition and antibacterial activity of *Eugenia brejoensis* essential oil nanoemulsions against *Pseudomonas fluorescens*. *LWT* 93, 659–664. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.015>
- Menezes, P., A. de S. Araujo, A., Anne A. Doria, G., J. Quintans-Junior, L., G.B. de Oliveira, M., R.V. dos Santos, M., F. de Oliveira, J., do R. Matos, J., M. de S. Carvalho, F., B. Alves, P., L. de Matos, I., A. dos Santos, D., N. Marreto, R., F. da Silva, G., R. Serafini, M., 2015. Physicochemical Characterization and Analgesic Effect of Inclusion Complexes of Essential Oil from *Hyptis pectinata* L. Poit Leaves with β -Cyclodextrin. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 16, 440–450.
- Messelmani, T., Morisseau, L., Sakai, Y., Legallais, C., Goff, A.L., Leclerc, E., Jellali, R., 2022. Liver organ-on-chip models for toxicity studies and risk assessment. *Lab on a Chip*. <https://doi.org/10.1039/D2LC00307D>
- Mura, P., 2015. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 113, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.058>
- Nair, A.B., Jacob, S., 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7, 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Neto, A.C.R., de Oliveira da Rocha, A.B., Maraschin, M., Di Piero, R.M., Almenar, E., 2018. Factors affecting the entrapment efficiency of β -cyclodextrins and their effects on the formation of inclusion complexes containing essential oils. *Food Hydrocolloids* 77, 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>
- Nguyen, N.H., Tran, G.-B., Nguyen, C.T., 2020. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *J Mol Med* 98, 59–69. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01845-2>
- Nunes, T.A. de L., Costa, L.H., De Sousa, J.M.S., De Souza, V.M.R., Rodrigues, R.R.L., Val, M. da C.A., Pereira, A.C.T. da C., Ferreira, G.P., Da Silva, M.V., Da Costa, J.M.A.R., Vêras, L.M.C., Diniz, R.C., Rodrigues, K.A. da F., 2021. *Eugenia piauhiensis* Vellaff.

essential oil and γ -elemene its major constituent exhibit antileishmanial activity, promoting cell membrane damage and in vitro immunomodulation. *Chemico-Biological Interactions* 339, 109429. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109429>

- OECD, 2016a. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2016b. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2008. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2002. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Okereke, G., Emmanuel, O., Ude, V.C., Ekweogu, C.N., Ikpeazu, V.O., Ugbogu, E.A., 2020. Physicochemical characteristics, acute and subacute toxicity of cashew nut shell oil in Wistar rats. *Scientific African* 8, e00391. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00391>
- Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, A., Correia de Oliveira, M.R., Alcântara, I.S., Rodrigues, L.B., Cesário, F.R.A.S., da Silva, M.S.A., Castro, F.F. e, Nascimento, E.P. do, Albuquerque, T.R. de, Quintans Júnior, L.J., Araújo, A.A. de S., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A. de, Wanderley, A.G., 2021. Effect of the Croton rhamnifolioides Essential Oil and the Inclusion Complex (OEFC/ β -CD) in Antinociceptive Animal Models. *Macromol* 1, 94–111. <https://doi.org/10.3390/macromol1020008>
- Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, A., Wanderley, A.G., Alcântara, I.S., Rodrigues, L.B., Cesário, F.R.A.S., Correia de Oliveira, M.R., Castro, F.F. e, Albuquerque, T.R. de, da Silva, M.S.A., Ribeiro-Filho, J., Coutinho, H.D.M., Menezes, P.P., Quintans-Júnior, L.J., Araújo, A.A. de S., Iriti, M., Almeida, J.R.G. da S., Menezes, I.R.A. de, 2020. Anti-Inflammatory and Physicochemical Characterization of the Croton rhamnifolioides Essential Oil Inclusion Complex in β -Cyclodextrin. *Biology* 9, 114. <https://doi.org/10.3390/biology9060114>
- Oliveira, A.M., da Silva, W.A.V., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., de Medeiros, P.L., Soares, L.A.L., Carvalho, B.M., Napoleão, T.H., 2019. Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 234, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.036>
- Oliveira, A.M., de Freitas, A.F.S., Costa, W.K., Machado, J.C.B., Bezerra, I.C.F., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Soares, L.A.L., 2022. Flavonoid-rich fraction of *Croton blanchetianus* Baill. (Euphorbiaceae) leaves: Chemical profile, acute and subacute toxicities, genotoxicity and antioxidant potential. *South African Journal of Botany* 144, 238–249. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.040>

- Quintans-Júnior, L.J., Araújo, A.A.S., Brito, R.G., Santos, P.L., Quintans, J.S.S., Menezes, P.P., Serafini, M.R., Silva, G.F., Carvalho, F.M.S., Brogden, N.K., Sluka, K.A., 2016. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced antihyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. *Life Sciences* 149, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.049>
- Quintans-Júnior, L.J., Barreto, R.S.S., Menezes, P.P., Almeida, J.R.G.S., Viana, A.F.S.C., Oliveira, R.C.M., Oliveira, A.P., Gelain, D.P., de Lucca Júnior, W., Araújo, A.A.S., 2013. β -Cyclodextrin-complexed (–)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (–)-linalool in experimental pain protocols. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 113, 167–172. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12087>
- R, K., 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 18, 412.
- Research, C. for D.E. and, 2020. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use [WWW Document]. U.S. Food and Drug Administration. URL <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/s2r1-genotoxicity-testing-and-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use> (accessed 6.17.22).
- Rodrigues, 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., Quintans Júnior, L.J., Araújo, A.A. de S., Menezes, P. dos P., Nunes, P.S., Matos, I.G., Coutinho, H.D.M., Goncalves Wanderley, A., de Menezes, I.R.A., 2017. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice. *Food and Chemical Toxicology* 109, 836–846. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.027>
- Saheed, S., Oladipipo, A.E., Abdulazeez, A.A., Olarewaju, S.A., Ismaila, N.O., Emmanuel, I.A., Fatimah, Q.D., Aisha, A.Y., 2015. Toxicological evaluations of *Stigma maydis* (corn silk) aqueous extract on hematological and lipid parameters in Wistar rats. *Toxicology Reports* 2, 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.001>
- Santana, D.V.S., Trindade, I.A.S., Carvalho, Y.M.B.G., Carvalho-Neto, A.G., Silva, E.C.D., Silva-Júnior, E.F., Leite, R.F.S., Quintans-Júnior, L.J., Aquino, T.M., Serafini, M.R., Guterres, S.S., Scotti, L., Scotti, M.T., Araújo, A.A.S., Frank, L.A., Menezes, P.P., 2021. Analytical techniques to recognize inclusion complexes formation involving monoterpenes and cyclodextrins: A study case with (–) borneol, a food ingredient. *Food Chemistry* 339, 127791. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127791>
- Santos, I.B. da S., Santos dos Santos, B., Oliveira, J.R.S. de, Costa, W.K., Zigmignan, A., da Silva, L.C.N., Ferreira, M.R.A., Lermen, V.L., Lermen, M.S.B. de S., da Silva, A.G., Ximenes, R.M., Soares, L.A.L., Paiva, P.M.G., Lima, V.L. de M., Correia, M.T. dos S., da Silva, M.V., 2020. Antioxidant Action and In Vivo Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of *Myrciaria floribunda* Fruit Peels: Possible Involvement of Opioidergic System. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences* 2020, e1258707. <https://doi.org/10.1155/2020/1258707>

- Sawant, S.G., Fielden, M.R., Black, K.A., 2014. Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.06.005>
- Sebai, E., Abidi, A., Serairi, R., Marzouki, M., Saratsi, K., Darghouth, M.A., Sotiraki, S., Akkari, H., 2021. Essential oil of *Mentha pulegium* induces anthelmintic effects and reduces parasite-associated oxidative stress in rodent model. *Experimental Parasitology* 225, 108105. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108105>
- Silva, A.G., Alves, R.C.C., Filho, C.M.B., Bezerra-Silva, P.C., Santos, L.M.M. dos, Foglio, M.A., Navarro, D.M. do A.F., Silva, M.V. da, Correia, M.T. dos S., 2015. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 18, 1441–1447. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.1000390>
- Silva Júnior, W.F., Bezerra de Menezes, D.L., de Oliveira, L.C., Koester, L.S., Oliveira de Almeida, P.D., Lima, E.S., de Azevedo, E.P., da Veiga Júnior, V.F., Neves de Lima, Á.A., 2019. Inclusion Complexes of β and HP β -Cyclodextrin with α , β Amyrin and In Vitro Anti-Inflammatory Activity. *Biomolecules* 9, 241. <https://doi.org/10.3390/biom9060241>
- Siqueira-Lima, P.S., Brito, R.G., Araújo-Filho, H.G., Santos, P.L., Lucchesi, A., Araújo, A.A.S., Menezes, P.P., Scotti, L., Scotti, M.T., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Zengin, G., Aktumsek, A., Antonioli, A.R., Quintans-Júnior, L.J., Quintans, J.S.S., 2017. 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 & Pharmacotherapy* 91, 739–747. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.009>
- Souza, C.R.F., Ferraz-Freitas, P.N., Oliveira, W.P., 2016. COMPLEXOS DE INCLUSÃO BINÁRIOS, TERNÁRIOS E QUATERNÁRIOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides*. *Quím. Nova* 39, 979–986. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160108>
- Souza, L.I., Bezerra-Silva, P.C., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., da Silva, A.G., dos Santos Correia, M.T., da Silva, M.V., de Figueiredo, R.C.B.Q., 2017. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96, 1055–1064. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121>
- Souza Sampaio, R., Petícia do Nascimento, E., Alencar de Menezes, I.R., Sales, V. dos S., Brito Pereira, A.O., Mendes de Lacerda, G., Santos, E.S., Pereira Lopes, M.J., Gomes da Silva, L., de Araújo Delmondes, G., Vieira, N.B., Zaia, V.M., Bezerra, D.S., Martins da Costa, J.G., Bezerra Felipe, C.F., Kerntopf, M.R., 2020. Antinociceptive activity of the *Psidium brownianum* Mart ex DC. leaf essential oil in mice. *Food and Chemical Toxicology* 135, 111053. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111053>
- Souza, T.G. S., da Silva, M.M., Feitoza, G.S., de Melo Alcântara, L.F., da Silva, M.A., de Oliveira, A.M., de Oliveira Farias de Aguiar, J.C.R., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., de Aguiar Júnior, F.C.A., da Silva, M.V., Chagas, C.A., 2021. Biological safety of

Syagrus coronata (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. *Journal of Ethnopharmacology* 272, 113941. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113941>

Quintans, J. S. S, Menezes, P.P., Santos, M.R.V., Bonjardim, L.R., Almeida, J.R.G.S., Gelain, D.P., Araújo, A.A. de S., Quintans-Júnior, L.J., 2013. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine* 20, 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.009>

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j)

Tietje, C., Brouder, A. (Eds.), 2010. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, in: *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*. Brill | Nijhoff, pp. 1041–1053. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>

Van Hees, T., Piel, G., de Hassonville, S.H., Evrard, B., Delattre, L., 2002. Determination of the free/included piroxicam ratio in cyclodextrin complexes: comparison between UV spectrophotometry and differential scanning calorimetry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 347–353. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00018-0](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00018-0)

Vechi, G., Campos, A., Rosa, R.L. da, Capistrano, K., Zermiani, T., Buzzi, F. de C., Andrade, S.F. de, Filho, V.C., 2018. Analyses of chemical composition and gastroprotective and antinociceptive properties of *Eugenia involucrate* DC. leaves -. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8, 79–83.

Veras, B.O., de Oliveira, J.R.S., de Menezes Lima, V.L., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., de Oliveira Farias de Aguiar, J.C.R., de Medeiros Moura, G.M., da Silva, J.W., de Assis, C.R.D., Gorch-Lira, K., de Assis, P.A.C., de Souza Barbosa, J.I., de Melo, M.R.C.S., de Oliveira, M.B.M., da Silva, M.V., de Souza Lopes, A.C., 2021. The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology* 265, 113248. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248>

Veras, B.O., Melo de Oliveira, M.B., Granja da Silva Oliveira, F., Queiroz dos Santos, Y., Saturnino de Oliveira, J.R., Lúcia de Menezes Lima, V., Guedes da Silva Almeida, J.R., Maria do Amaral Ferraz Navarro, D., Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar, J.C., Aguiar, J. dos S., Gorch-Lira, K., Dias de Assis, C.R., Vanusa da Silva, M., Catarina de Souza Lopes, A., 2020. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 247, 112265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265>

- Vinegar, R., Schreiber, W., Hugo, R., 1969. Biphasic Development of Carrageenin Edema in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 166, 96–103.
- Viscardi, D.Z., Arrigo, J. da S., Correia, C. de A.C., Kassuya, C.A.L., Cardoso, C.A.L., Maldonado, I.R., Argandoña, E.J.S., 2017. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. *PLOS ONE* 12, e0157107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157107>
- Wadhwa, G., Kumar, S., Chhabra, L., Mahant, S., Rao, R., 2017. Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 89, 39–58. <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0744-2>
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111, 544–547. <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27849>
- Wüpper, S., Lüersen, K., Rimbach, G., 2021. Cyclodextrins, Natural Compounds, and Plant Bioactives—A Nutritional Perspective. *Biomolecules* 11, 401. <https://doi.org/10.3390/biom11030401>
- Xiao, Z., Hou, W., Kang, Y., Niu, Y., Kou, X., 2019. Encapsulation and sustained release properties of watermelon flavor and its characteristic aroma compounds from γ -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Hydrocolloids* 97, 105202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105202>

3. 2 ARTIGO 2 - DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÕES COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia brejoensis* Mazine PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA: ESTUDO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA EM CAMUNDONDOS

Artigo a ser traduzido e submetido ao AAPS PharmaScitech
ISSN Eletrônico 1530-9932



Desenvolvimento de microemulsões com óleo essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine para administração tópica: estudo preliminar da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em camundongos

Graziela Claudia da Silva^{a,b}, Alice Maria da Silva do Nascimento^c, João Ricardhis Saturnino de Oliveira^{a,b}, Márcia Vanusa da Silva^b, Vera Lúcia de Menezes Lima^b, Guilherme Rodolfo de Azevedo^d, Ana Amélia Moreira Lira^d, Maria Tereza dos Santos Correia^b

^a Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Universidade Federal do Ceará, 60440-900, Fortaleza, Ceará, Brasil

^d Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, Aracajú, Sergipe, Brasil

Resumo

Este estudo teve como objetivo elaborar microemulsões com diferentes surfactantes e co-surfactantes utilizando óleo essencial de *Eugenia brejoensis* como fase oleosa para avaliação da ação analgésica e anti-inflamatória tópica. Foram obtidos quatro sistemas microemulsionados na razão de 1:1 de surfactantes e co-surfactante e 5% do óleo essencial. Os sistemas foram classificados como isotópicos, transparentes e com diâmetro de gotículas menores que 20 nm e PDI < 0.500. Três sistemas foram classificados como newtonianos com viscosidade constante e um sistema apresentou perfil não newtoniano do tipo pseudoplástico. *E. brejoensis* é espécie endêmica brasileira, popularmente conhecida como “Cutia”, utilizada na etnomedicina por habitantes da região semiárida de Pernambuco no tratamento de dores em geral, infecções, cicatrização, inflamações e problemas intestinais. A microemulsão ME2 foi selecionada para avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva tópica. Inicialmente, não apresentou citotoxicidade em fibroblastos murinos sendo capaz de reduzir o efeito sobre viabilidade celular promovida pelo óleo. ME 2 promoveu redução significativa do edema na orelha do camundongo nos intervalos de 2h e 4h de avaliação. Na avaliação da resposta ao tratamento com ME 2 na dor aguda (contorção abdominal) e na ação central (movimento de cauda), revelou resultados promissores em comparação com o controle negativo e com a microemulsão inerte. Por fim, as microemulsões desenvolvidas do tipo O/A e bicontínuas podem ser utilizadas como carregadores de outros fármacos que, por sinergismos, podem potencializar a atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas já validadas.

Palavras- chave: Óleo essencial. Analgesia. Fluido newtoniano. Cutia. Inflamação.

1 Introdução

Drogas opioides e anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), rotineiramente estão associados à sua eficácia limitada ou efeitos adversos na administração sistêmica a longo prazo, tais como náuseas, transtornos gastrointestinais, sedação, insuficiência renal e hepática, alterações cardiovasculares e dependência (Gias et al., 2020; Padoin et al., 2018). Neste contexto, a pesquisa por novos compostos bioativos como uma alternativa mais eficaz no tratamento de dor, inflamação e outras doenças torna-se necessária (Campos et al., 2019), principalmente considerando que dois dos analgésicos (morfina) e anti-inflamatórios (ácido acetil salicílico) mais utilizados foram, inicialmente, derivados de fontes naturais (Woode; Abotsi, 2011). Deste modo, novos agentes bioativos de origem vegetal têm sido investigados com a tentativa de serem mais eficientes, mais benéficos, menos danosos e acessível a população (Cabral et al., 2022; Chang et al., 2011).

O gênero *Eugenia* é reconhecido com um dos mais importantes da família Myrtaceae, com espécies com potencial utilização, comercial, nutritiva e farmacológica (Araújo et al., 2019). Encontram-se distribuídas entre a América do Sul, América Central, Sudeste asiático e com pequena representatividade na África (Mazine et al., 2022). Estudos etnofarmacológicos tem validado o uso medicinal de algumas espécies do gênero, destacando-se: antioxidante, anti-inflamatório (Dametto et al., 2017; Costa et al., 2020), gastroprotetora (Santos et al., 2018), hipolipemiantes (Lima et al., 2017), neuroprotetores (Thomaz et al., 2018), antinociceptiva (Vechi et al., 2018), leishmanicida (Sampaio et al., 2021) e tripanossomicida (Souza et al., 2017).

Dentre os metabolitos secundários produzidos por plantas, os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, a qual configuram uma excelente fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos (Hou et al., 2022). São armazenados em estruturas secretoras presentes em diversas partes da planta, como folhas e frutos (Abrão et al., 2022; Zhang et al., 2021). A identificação destas estruturas é um diferencial na classificação taxionômica das espécies da família Myrtaceae (Padovan et al., 2014).

E. brejoensis é uma espécie popularmente conhecida por cutia, muito utilizada na medicina tradicional em comunidades da região semiárida do Nordeste brasileiro, para o tratamento de dores, inflamação, diarreia, reumatismo e antipiréticas (Silva et al., 2015). O óleo essencial das folhas de *E. brejoensis* é composto majoritariamente por sesquiterpenos, os quais destacam-se δ -cadineno, *trans*-caryofileno, β -(E)-Cariofileno, Spathulenol, α -muurolol e biciclogermacreno (Junior-Nascimento et al., 2018; Mendes et al., 2017; Souza et al., 2017). Devido à instabilidade

físico-química apresentada pelos óleos essenciais, o desenvolvimento de sistemas a fim de otimizar a solubilidade, ampliar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade, controlar a liberação e facilitar a adesão ao tratamento estão entre as vantagens fornecidas para na entrega de óleos essenciais (Kashyap et al., 2021; Dubey et al., 2022).

Uma das estratégias utilizadas para reverter as limitações conferidas aos óleos essenciais é o uso de sistemas microemulsionados (Sá et al. 2020). As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, isotópicos, formuladas a partir de óleo, água, surfactante e geralmente, um co-surfactante (Ita, 2020; Tartaro et al., 2020). Elas têm propriedades que possibilitam aumentar a capacidade de solubilização e incorporação cutânea de drogas hidrofílicas e lipofílicas (Lv et al., 2018). Com tamanho de gotículas inferiores a 100nm, propriedades adesivas e umectantes, as microemulsões têm sido sugeridas como sistema de liberação de drogas para a administração tópica, por promoverem o aumento da absorção de fármacos no tratamento de tipos específicos da dor, como dor localizada (inflamatória) ou neurogênica (Benbow et al., 2019; Tiwari et al., 2020; Murthy; Shivakumar, 2010).

Portanto, este estudo teve como objetivo desenvolver sistemas microemulsionados utilizando o óleo essencial de *E. brejoensis* Mazine como fase oleosa e uma avaliação preliminar da sua citotoxicidade, anti-inflamatória e antinociceptiva na administração tópica em camundongos Swiss albinos, para estudos futuros de liberação transdérmica do óleo no sistema de escolha.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material

O ácido de rícino hidrogenado PEG-40 (Cremophor 40) comercializado como Croduret™ 40 foi adquirido da Croda (Campinas, Brasil). O propilenoglicol foi comprado da Isofar (Rio de Janeiro, Brasil) e o polisorbato 80 (Tween 80) da Neon Comercial (Suzano, Brasil). O óleo essencial de *E. brejoensis* (OEEb) foi obtido das folhas frescas coletadas no Município de Buíque, em Pernambuco, Brasil e previamente caracterizado em outro estudo (dados não mostrados). A carragenina, indometacina, dexametasona, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foram obtidos da Sigma -Aldrich (Steinheim, Alemanha).

2.2 Construção dos Diagramas de Fase Pseudoternários (DFP)

Foram obtidos dois diagramas pseudoternários utilizando diferentes proporções de água (fase aquosa), surfactantes e co-surfactantes (Tween 80+propilenoglicol ou Cremophor 40+Tween80, 1:1) e o óleo essencial de *E. brejoensis* a 5% (fase oleosa). Cada diagrama foi desenvolvido com a técnica de titulação. Inicialmente, foi manipulado uma mistura de surfactante e co-surfactante, na proporção de 1:1, que permaneceu sob agitação magnética por 24h. Após a estabilização do sistema, o óleo essencial de *E. brejoensis* foi adicionado sob agitação magnética à mistura. Em seguida, as misturas da fase oleosa com os surfactantes foram tituladas com 200 µL de água sob agitação magnética suave. Foi definido o intervalo de 30 minutos para o equilíbrio do sistema antes da próxima titulação. Os sistemas foram caracterizados visualmente, onde as formulações que apresentaram transparência e baixa viscosidade foram classificadas como microemulsões. Todo o experimento foi realizado a temperatura ambiente. Após 5 dias, estas formulações foram examinadas visualmente para serem caracterizadas (Sá et al., 2020; Ferreira et al., 2015; Tabosa et al., 2018).

2.3 Caracterização dos sistemas microemulsionados

2.3.1 Determinação do tamanho das gotículas e Polidispersividade

Os tamanhos de gotículas e o Índice de polidispersividade (PDI) das microemulsões foram realizados pela técnica do espalhamento dinâmico da luz (DLS) utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvem Instruments, UK). Aproximadamente 1000µL das microemulsões foram inseridos, com diluição (1:10), em cubeta de quartzo própria para o equipamento. O índice de refração do meio dispersante, água ($n_D = 1,33$) foi utilizado como referência. Todas as análises foram realizadas em triplicata e em temperatura ambiente.

2.3.2 Microscopia de Luz Polarizada

O comportamento isotrópico das microemulsões foi avaliado por microscopia de luz polarizada, utilizando microscópio Olympus acoplado a câmera digital Evolution LC Color (PL-A662) e Software analisador de Imagem (Pixel Link). Para isso, uma microgota de cada formulação foi depositada sobre lâminas de microscopia e em seguida coberta por lamínula de forma que permita a criação de bolhas de ar na formulação (Carvalho et al., 2016).

2.3.4 Condutividade elétrica

A condutividade as microemulsões foi realizada em condutivímetro (Mettler Toledo InLab 731) previamente calibrado a temperatura ambiente de 25°C. O pH das formulações foi determinado utilizando pHmetro digital (modelo Analion PM 608) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura previamente calibrado com solução tampão (pH 4,0 e 7,0) à temperatura de 25 °C.

2.3. 5 Análise reológica

O comportamento reológico dos sistemas foi determinado em Reômetro Modular Compacto (MCR 302, Anton Paar, Áustria), com geometria do tipo cone (ângulo de 1°, 49,97 mm de diâmetro). A tensão de cisalhamento foi avaliada aplicando-se uma taxa de cisalhamento entre 0,1 e 200 s⁻¹. Todas as análises ocorreram a temperatura ambiente e em triplicata, e os dados foram analisados pelo modelo Power law (Machado et al., 2020).

2.4 Ensaio *in vitro*

2.4.1 Citotoxicidade

A atividade citotóxica foi avaliada pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio) em linhagem celular de fibroblastos murinos (ATCC L929). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) sendo incubadas a 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO₂. As células consideradas em crescimento exponencial foram distribuídas em placas de 96 poços (2×10⁴ células/poço) e incubadas por 24h nas mesmas condições de temperatura anteriormente citadas. Após a fixação das células nas placas, o meio foi removido e diferentes diluições do OEEb, ME 2 e ME inerte (12,5µg/mL, 25,0µg/mL, 50 µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL e 400µg/mL) foram adicionadas e incubadas por 48h. Em seguida, foram adicionadas as células foram tratadas com 25µl da solução de MTT (5mg/mL) e as placas foram novamente incubadas por 4h. Transcorrido este período, o sobrenadante foi removido e adicionado 100µL de DMSO para dissolver os cristais de formazam. A densidade óptica (OD) foi mensurada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 570nm. A citotoxicidade foi expressa como viabilidade celular (Abs da população

de células tratadas x 100/Abs da população de células não tratadas) (Moura et al., 2020). Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

2.5 Ensaio in vivo

Os experimentos foram realizados com camundongos (*Mus musculus*) Swiss pesando de 35 ± 10 g, com 8 a 10 semanas obtidos do Laboratório Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Após uma semana de adaptação em condições laboratoriais padrão ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, em ciclos claro/escuro de 12/12h, com livre acesso a água e comida *ad libitum*) foram divididos aleatoriamente de acordo com os ensaios a serem realizados (antinociceptiva e anti-inflamatória). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, conforme protocolo nº 0018/2019.

2.5.1 Atividade antinociceptiva

2.5.1.1 Contorção induzida por ácido acético

A atividade antinociceptiva tópica foi, inicialmente, investigada pelo modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,8% (0,1mL, i.p) (Lira et al., 2008; Gupta et al., 2002). Os camundongos foram divididos em cinco grupos (N=6) sendo tratados previamente 60 minutos antes da administração do agente indutor. Os tratamentos foram realizados topicamente na região do dorso (área = 3 x 2cm), tendo sido administrado no grupo controle de veículo (DMSO 1% em água ultrapura), grupo tratado com OEEb (50 mg/mL), grupo ME 2 OEEb 5%, ME inerte (soluções de surfactante: co-surfactante e água). O diclofenaco (30 mg/mL) foi utilizado como medicamento padrão no teste. Cinco minutos após a administração intraperitoneal do ácido acético, as contorções foram contabilizadas no intervalo de 5 a 15 minutos.

2.5.1.2 Teste de retirada de cauda (*Tail flick*)

Para avaliar a atividade antinociceptiva tópica das formulações, também foi aplicado o protocolo descrito por Yesilyurt et al. (2003) com adaptações. Os camundongos machos foram selecionados por triagem na exposição da região semiterminal da cauda (terço medial) a

uma fonte de calor (50 ± 3 °C). Aqueles que apresentaram a retirada da cauda em 5 segundos foram selecionados para o ensaio. O teste foi realizado com cinco grupos (n=6), incluindo o grupo controle de veículo (DMSO 1% em água ultrapura), grupo com o OEEb (50mg/mL), grupo morfina (20mg/mL), ME 2 OEEb 5% e ME inerte (solução com surfactante: co-surfactante e água). A aplicação de 100µL foi realizada na região média da cauda do animal e o período de latência foi determinado em 0,15, 30, 45 e 60 minutos sendo mensurada em um analgesiômetro (Ugo Basile Tail Flick, EUA). O tempo de corte foi considerado 15 segundos para evitar lesões na cauda do animal (D' Aumor e Smith, 1941).

2.5.2 Edema de orelha induzida por óleo de cróton

Para investigar a atividade anti-inflamatória tópica da microemulsão foi utilizado o protocolo descrito por Oliveira-Tintino et al. (2018) com modificações. Os camundongos foram distribuídos em cinco grupos (n = 6) sendo realizada o pré-tratamento tópico das orelhas com um volume de 20 µL, com controle de veículo (DMSO 1% em água ultrapura), dexametasona (4 mg/mL), o óleo essencial (50 mg/mL), ME 2 OEEb 5% e ME inerte (solução dos surfactantes/co-surfactante e água). Após uma hora do tratamento, o edema foi induzido com aplicação de 20 µL do óleo de cróton (5% diluído em acetona v/v) na orelha direita e o veículo (20 µL acetona) foi administrado na orelha esquerda. O progresso do edema foi acompanhado nos intervalos de 0h, 2h, 4h e 6h após a indução, com um paquímetro digital (Digimess).

3 Resultados e Discussões

3.1 Construção dos Diagramas de fases pseudoternários

Foram obtidos dois diagramas de fases pseudoternários utilizando o OEEb 5% como fase oleosa, diferentes surfactantes e co-surfactantes na razão (1:1) e água ultrapura como fase aquosa (Figura 1). No diagrama I, constituído com os surfactantes Cremophor 40:Tween 80 (1:1) foi possível observar duas fases distintas, uma líquida transparente e outra viscosa transparente. Já no diagrama II, formulado com Tween80 e propilenoglicol (1:1) foi observado a predominância de sistemas líquidos transparentes (Figura 1). Dois pontos de cada diagrama na razão 1:5 e 1:9 (fase oleosa e surfactantes) foram designados para caracterização por condutividade elétrica, reologia, tamanho de gotículas, polidispersividade e microscopia óptica de luz polarizada. (Tabela 1).

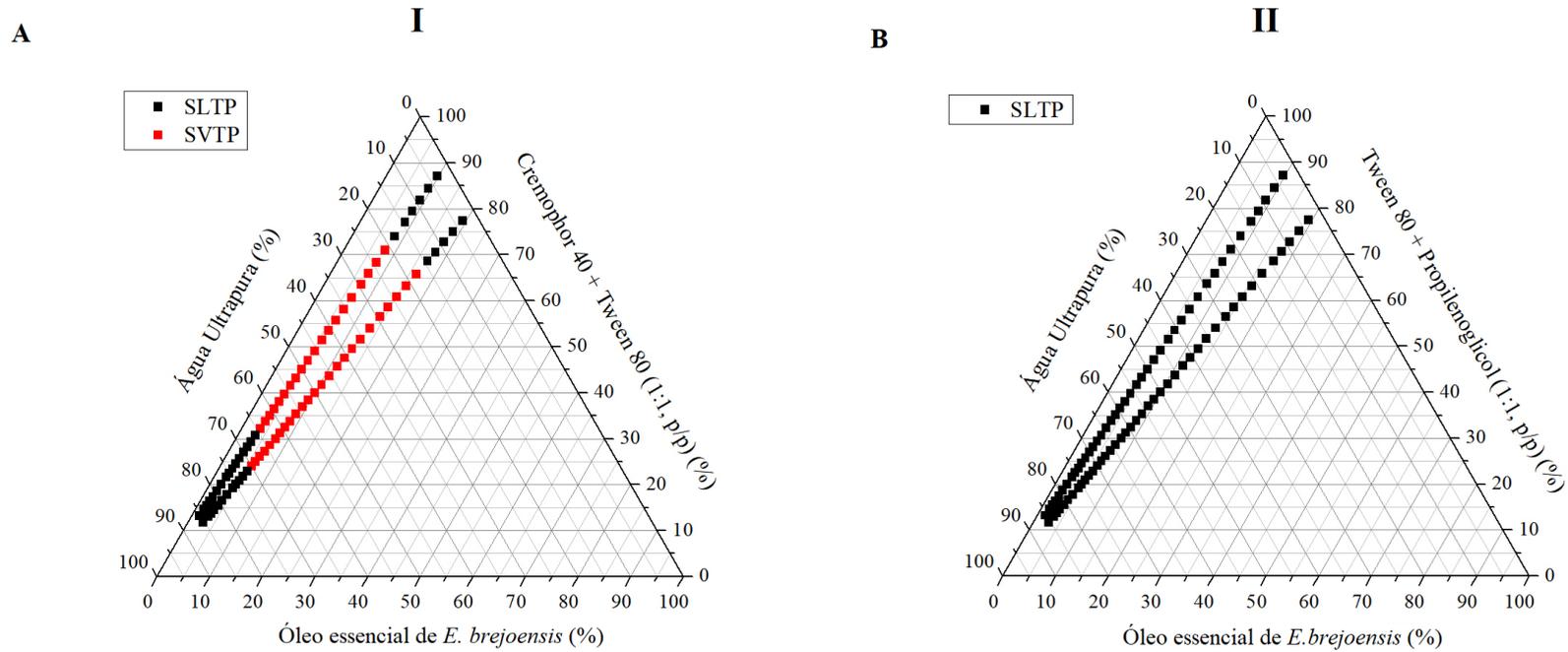


Figura 1. Diagrama de fases pseudoternários obtido com o óleo essencial de *E. brejoensis* 5% (fase oleosa): A) Diagrama I contendo Cremophor 40 e Tween 80 (1:1); B) Diagrama II contendo Tween 80 e propilenoglicol (1:1). SLTP – Sistema Líquido Transparente; SVTP – Sistema Viscoso Transparente.

3.2 Caracterização das formulações

As formulações revelaram comportamento isotrópico, quando submetidas a feixe de luz em microscópio de luz polarizada, característicos de microemulsões (Figura 2). As análises por espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostraram ME1, ME2 e MCR2 com tamanhos de gotículas inferiores a 20nm, faixa de pH entre 5,9 e 6,4 e índice de polidispersividade de 0.405, 0.182 e 0.181, respectivamente. Embora tenha apresentado comportamento isotópico (Figura 2 C), na formulação MCR1 não foi possível mensurar o tamanho de gotícula e PDI; entretanto a MCR1 apresenta pH fisiológico adequado para uso tópico 6,5. Além disso, a condutividade elétrica das formulações variou entre 57,66 e 151,96 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$, confirmando a formação de microemulsões do tipo O/A (Tabosa et al., 2018). (Tabela 1).

Os dados das análises reológicas são apresentados na figura 3. As formulações ME1, ME2 e MCR2 mostraram comportamento newtoniano ($N = 1$) e valores de K (0,063; 0,025; e 0,012 respectivamente) com relação linear entre a tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento, e viscosidade constante ($R^2 > 0,99$). Este é um comportamento característico das microemulsões por não apresentarem algum tipo de estrutura organizada que possa ser influenciada pela tensão de cisalhamento (Longo, 2006). A formulação MCR1 apresentou comportamento não newtoniano, pseudoplástico, com $N < 1$ (0,9879) e $K = 8.920$, sendo a viscoelasticidade sugestiva de sistemas cristalinos. Neste caso é calculada apenas uma viscosidade aparente, considerando que pode ser afetada com o aumento da taxa de cisalhamento (Marcotte et al., 2001; Metzner; Otto, 1957; Zeynalli et al., 2021).

A Microemulsão ME2 foi selecionada para avaliar as atividades biológicas por revelar índices de polidispersividade menores, que é um indicativo de homogeneidade entre os tamanhos das gotículas (Khan et al., 2016). Também foi classificada como newtoniana, apresentando uma viscosidade constante. Além disso, a condutividade elétrica foi de 151.96 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ indicativo de microemulsão do tipo O/A, sendo um fator favorável para a permeação do óleo na administração tópica. Estudos revelam que o aumento da fase aquosa em sistemas microemulsionados favorecem na permeação de ativos com diferentes polaridades (Machado et al., 2020; Zang et al., 2018).

Tabela 1. Composição dos sistemas, diâmetro das gotículas, índice de polidispersividade (PDI), potencial hidrogeniônico (pH) e condutividade elétrica

Sistemas	Composição (% p/p)				Diâmetro de gotícula (nm)	PDI	pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$)
	OEEb	Tween 80: Propilenoglicol	Cremophor 40 :Tween 80	Água				
ME 1	5	45	-	50	12.93±0.04	0.405±0.01	6.2±0.12	61.83±0.08
ME 2	5	20	-	75	18.69±0.37	0.181±0.01	6.4±0.04	151.96±0.30
MCR 1	5	-	45	50	-	-	6.5±0.02	57,66±1.01
MCR 2	5	-	20	75	15.30±0.13	0.186±0.06	5.9±0.07	130.23±0.40

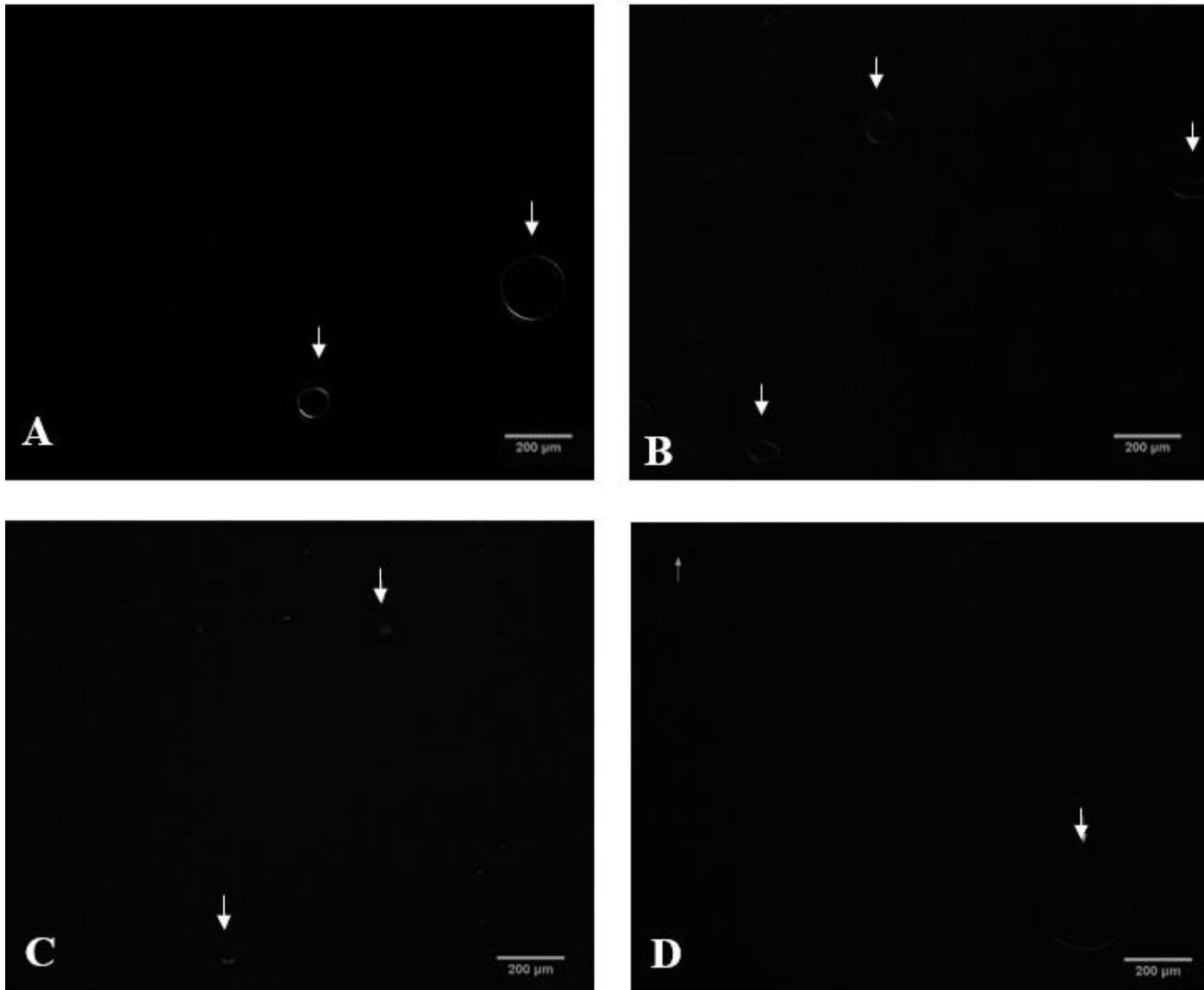


Figura 2. Imagens de microscopia de luz polarizada: A - ME 1; B - ME 2; C - MCR1; D – MCR2. As setas indicam a presença de bolhas de ar, em que é possível visualizar e confirmar a predominância de sistemas isotrópicos.

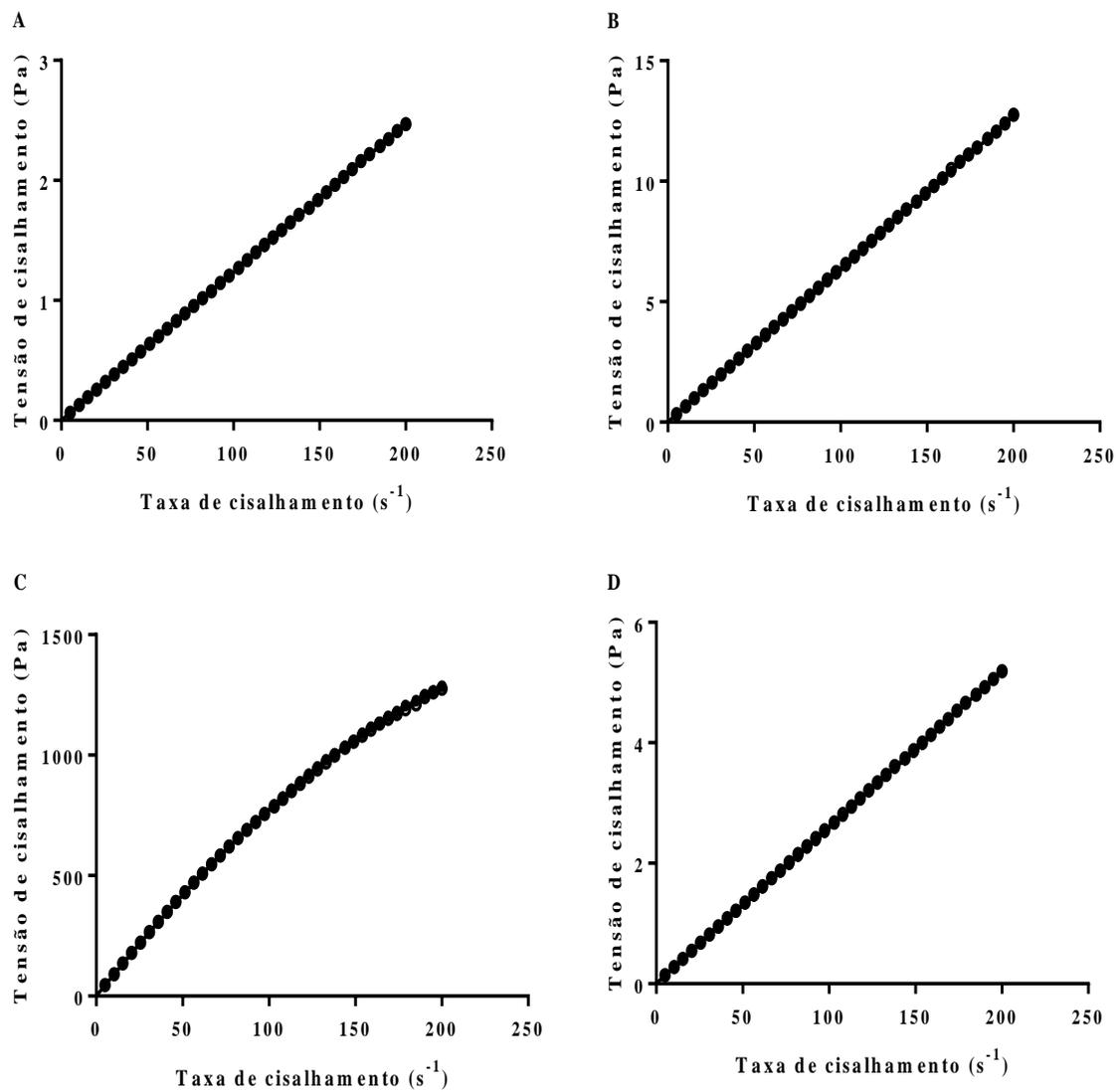


Figura 3. Perfis reológicos dos sistemas microemulsionados: A) MCR 2 B) ME1 C) MCR1 e D) ME 2. A, B e D perfil de sistemas newtonianas; C – perfil de sistema não newtoniana (pseudoplástico)

3.3 Citotoxicidade

O óleo essencial de *E. brejoensis* diminuiu significativamente a viabilidade das células (L929) pelo método MTT, principalmente nas concentrações mais altas de 400 e 200µg/mL em relação ao controle. Contudo, a viabilidade não foi inferior a 50% em nenhuma das concentrações testadas, sugerindo que o IC₅₀ é superior a 400µg/mL. As microemulsões com óleo (ME 2) e sem o óleo (ME inerte) apresentaram baixa citotoxicidade na maior concentração (400µg/mL), com inibição na viabilidade celular de 8,33% e 11,45%, respectivamente (Figura 4). Enquanto o óleo essencial reduziu a viabilidade celular em 22,91%. Zainuddin et al. (2021) também avaliaram a citotoxicidade de microemulsões carregadas com curcumina para entrega tópica em linhagens de fibroblastos L929. Sistemas microemulsionados desenvolvido com Tween80:propilenoglicol promoveram a redução da citotoxicidade óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume em fibroblastos L929 (Sá et al., 2020). Um estudo de microemulsão formuladas com 10 % do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, Tween 20 e água mostrou-se levemente tóxica em macrófagos murinos (21,71 ± 4,03%) (Mektriat et al., 2016). Para Moura et al. (2020) resultados de testes citotoxicidade com valores de IC₅₀ superiores 100µg podem ser considerados para ensaios de toxicidade inespecífica. Assim, os resultados mostram que a incorporação do OEEb como fase oleosa de uma microemulsão constituído de Tween 80, propilenoglicol (1:1) e água, tornou-o menos tóxico em fibroblastos murinos, sendo seguro para prosseguirmos com ensaio *in vivo* para administração dérmica.

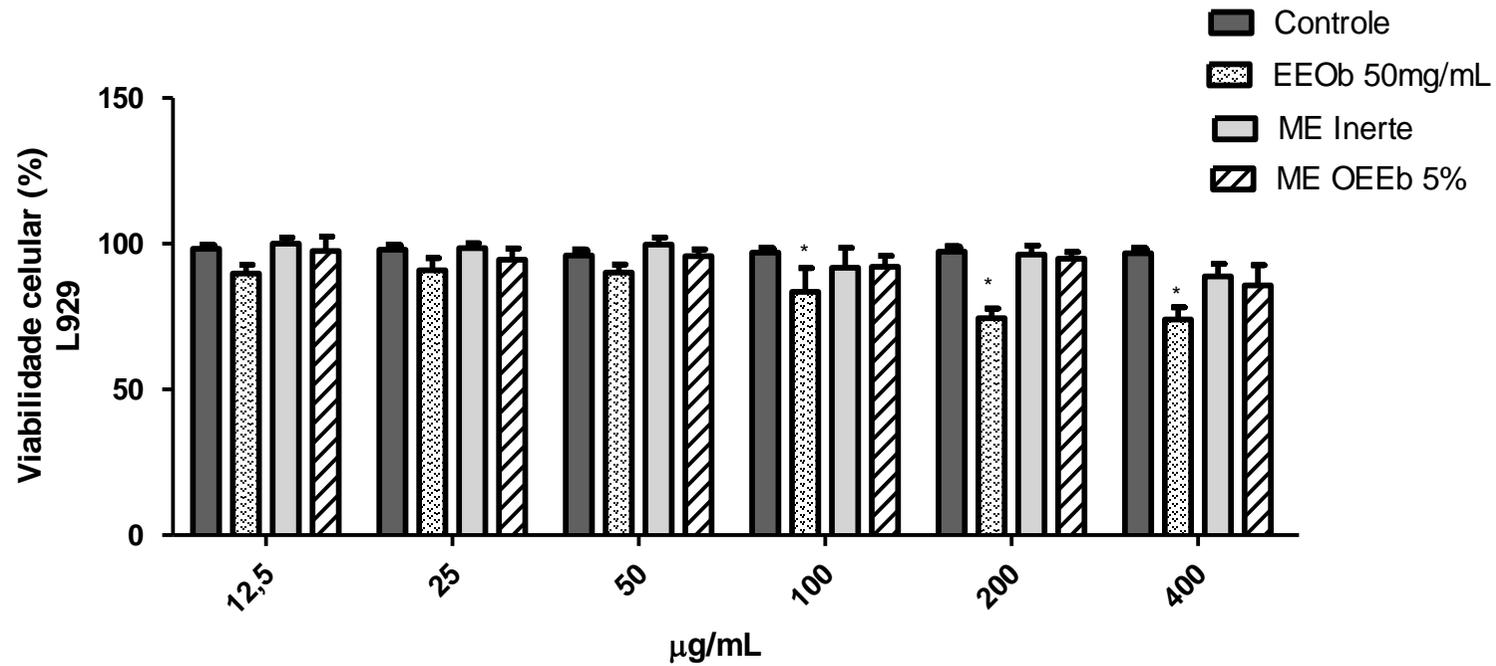


Figura 4– Citotoxicidade do OEEb, microemulsão com OEEb e sem o óleo em fibroblastos L929 pelo método MTT. Cada valor representa a média \pm SD (barras) de quatro experimentos independentes. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controles foram determinadas usando ANOVA seguida do teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ vs controle.

3.4 Atividade antinociceptiva

3.4.1 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

O tratamento tópico com OEEb (50mg/kg) e com a ME 2 OEEb 5% inibiram significativamente ($p < 0,001$) o número das contorções abdominais induzidas com a injeção intraperitoneal do ácido acético em comparação com o veículo (Figura 5). Os grupos tratados com o óleo essencial (OEEb) 50 mg/mL ou com a ME 2 OEEb 5% reduziram o número de contorções em 57,57% e 61,74%, respectivamente. A ME inerte não apresentou resultado estatisticamente significativo no número de redução das contorções. O grupo tratado com o diclofenaco (30 mg/mL) reduziu a frequência das contorções em 62,43% em comparação como controle, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,001$). Os resultados indicam que o sistema microemulsionado foi eficiente na entrega do óleo, com percentuais de redução no número de contorções similares ao fármaco utilizado como controle positivo. Compostos químicos obtidos a partir de plantas são frequentemente utilizados por apresentarem potenciais atividades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas (Emom et al., 2021). Todavia, a baixa solubilidade em água, lipofilicidade ou efeitos tóxicos são fatores que dificultam a absorção destes compostos por via oral, impulsionando o desenvolvimento de formulações para administração por via tópica, a fim de reverter estes entraves e aumentar a eficácia farmacológica (Chang et al., 2012; Abdallah et al., 2021; Rei et al., 2013).

A contorção abdominal induzida por ácido acético 0,8% promove a sensibilização dos nociceptores periféricos e centrais por estimulação dos mediadores inflamatórios endógenos (histamina, bradicininas e citocinas) e produtos da degradação do ácido araquidônico, como prostaglandinas (Dai et al., 2021; Almeida et al., 2012; Ikeda et al., 2001). Este teste é aplicado na triagem inicial de novos compostos com possíveis ação antinociceptiva (Costa et al., 2020; Conegundes et al., 2021) e na validação de novas formas farmacêuticas com ativos que já possuem a atividade analgésica comprovada, a exemplo o óleo de copaíba em microemulsão para administração tópica (Lima et al., 2018; Maciel et al., 2017). Lima et al. (2008) mostraram que uma formulação tópica com naftaquina a 0,5% promoveu a redução no número de contorções abdominais em 77,30%, sendo mais eficiente que o controle positivo. A formulação de um alcaloide de *Strychnos nux-vomica* propicia a redução da permeabilidade vascular no modelo de contorção abdominal, elevando em 33% a atividade antinociceptiva em comparação com o alcaloide não formulado (Abdallah et al., 2021).

3.4.2 Teste de retirada de cauda (*Tail flick*)

No teste de retirada de cauda verificou-se o aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de resposta dos camundongos tratados com o OEEb e com a ME OEEb 5% em comparação com o grupo controle após exposição a fonte de calor de $50^{\circ}\text{C} \pm 3$ (Tabela 2). O tratamento com a morfina (20 mg/mL) exerceu o aumento exponencial no tempo de resposta, no decorrer das 2 horas de avaliação, tendo início a partir do tempo 0. Os resultados apontam uma média de resposta para o OEEb (5.04 ± 0.08) e para ME 2 OEEb 5% (5.15 ± 0.07) com redução no tempo de resposta ao estímulo térmico (19,9% e 23,47% a menos comparado com o efeito promovido pela morfina). Esses dados corroboram com os resultados do teste de contorção abdominal, em que a formulação mostrou resultados promissores nas reduções das contorções, quando comparado com a droga anti-inflamatória, atuando assim por mecanismos neurogênicos.

O teste de retirada de cauda avalia uma resposta nociceptiva reflexa mediada na medula após a exposição a uma fonte de calor (Malmberg; Bannon, 1999). É amplamente utilizado para avaliar novas drogas analgésicas que atuem via central, com mecanismos similares aos opioides (Lopes et al., 2013). Wang et al. (2020) aplicaram o teste de retirada de cauda para avaliar a administração tópica de uma formulação com cetamina 5% e hidrogel com óxido de grafeno e cetamina 5%. Observou-se o aumento no efeito analgésico com consequente aumentando no tempo de resposta a estímulo nociceptivo térmico em 6,51s e 5,72s nas 2 horas de avaliação (Wang et al., 2020). Resultados similares a este estudo, são mostrados na Tabela 2 a relação do tempo de redução nos grupos tratados com morfina, OEEb e ME OEEb5%.

3.5 Atividade anti-inflamatória

A avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do óleo e da microemulsão foi observada a redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na progressão do edema em relação ao grupo controle (veículo) (Figura 6). O controle positivo (dexametasona 4mg/mL) promoveu a redução no transcorrer das 6h de avaliação do teste, com percentual de inibição variando entre 80% e 89,56%, com valores de $p < 0,001$, validando o experimento. A ME inerte (solução de surfactante: co-surfactante : água) mostrou redução de 20% do edema nas 2 primeiras horas em relação ao grupo veículo, decaindo o efeito inibidor a partir de 4h. A ME 2 promoveu redução média de 80,73% do edema. Já a administração do óleo (50 mg/mL) foi possível promover a redução média do edema em 58,66%.

O edema inflamatório induzido por óleo de cróton é caracterizado pela ação do acetato de tetradecaniol-forbol (TPA), o principal composto do óleo de *Croton tiglium* L, que atua estimulando a liberação de histaminas, bradicidinas, serotonina, proteína quinase C e na via do ácido araquidônico resultando na expressão de prostaglandinas, leucotrienos, IL-1 β , TNF- α . A resposta correspondente, é uma vasodilatação intensa, dor e formação do edema acompanhada por infiltração celular neutrófilos e macrófagos (Favacho et al., 2011; Veras et al., 2021).

A atividade anti-inflamatória tópica dos óleos essenciais é frequentemente avaliada pelo protocolo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Martins et al (2017) validaram o efeito anti-inflamatório do óleo essencial da espécie *Croton rhamnifolioides* com a redução do edema de orelha em 42,10% na administração tópica de 20 mg/mL. A aplicação tópica do óleo essencial de *Croton campestris* a 25 mg/kg promoveu uma redução de 30% do edema inflamatório na orelha de camundongos no decorrer de 9 dias de administração (Oliveira-Tintino et al.,2018). Este protocolo também foi aplicado para investigar a atividade anti-inflamatória do óleo e da microemulsão contendo óleo de *Pterodon emarginatus*, apresentando resultados significativos ($p < 0,05$) em comparação com administração tópica do óleo livre (Pascoa et al., 2015). Reis et al (2017) também desenvolveram microemulsões com um óleo utilizado por comunidades do Nordeste brasileiro para tratar doenças inflamatórias e validaram a indicação popular através do ensaio de edema de orelha, em que se observou um aumento significativo em relação à aplicação tópica do óleo puro. Estudos apontam que microemulsões com tamanho de gotícula menores aumentam absorção de seus compostos carregados por mecanismos mais rápido no local de ação, em comparação com compostos livres do sistema, pois penetram diretamente na epiderme por via dos folículos pilosos (Liu et al., 2020; Roberts et al., 2017). Neste contexto, a elevada ação anti-inflamatória promovida pela microemulsão contendo o OEEb sugere -se pelo aumento na permeabilidade do óleo em pequenas gotículas envolvidas pelos surfactantes que constituem o sistema. Contudo, é relevante a investigação dos mecanismos em protocolos de permeação cutânea.

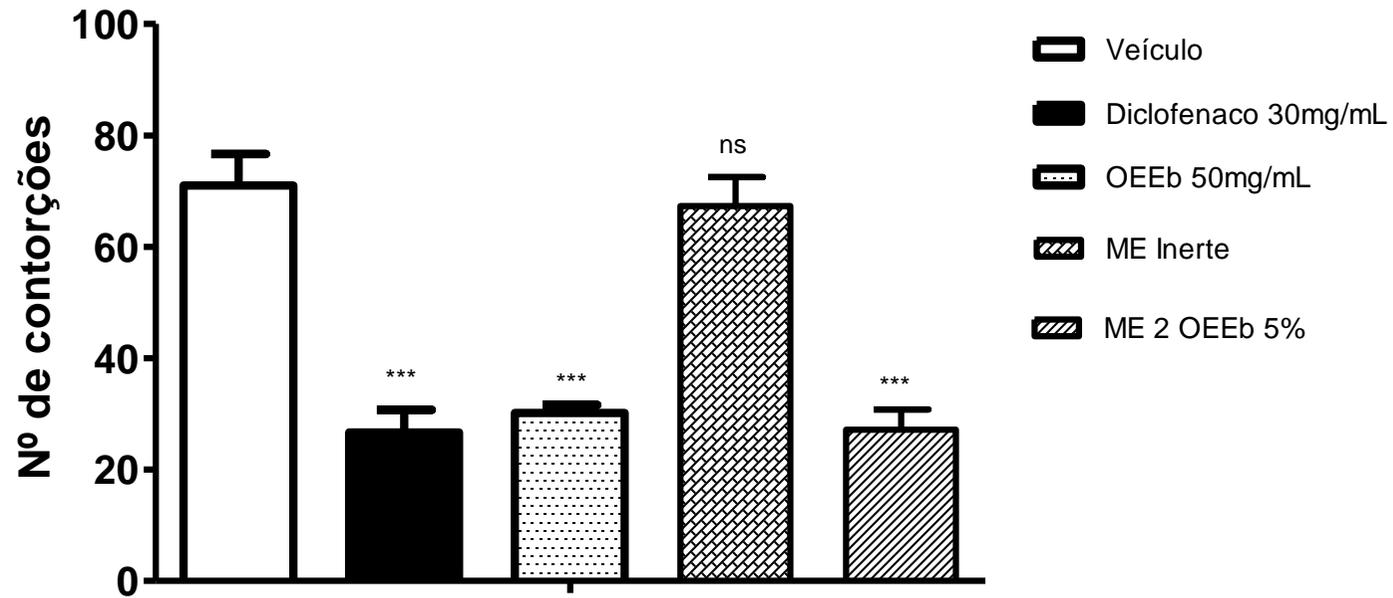


Figura 5. Efeito antinociceptivo do óleo essencial de *E. brejoensis* Mazine (50mg/kg) e da Microemulsão com 5% de óleo (ME 2) na contorção abdominal induzida por ácido acético, por administração tópica. Os asteriscos (***) $P < 0,001$ indicam significância em comparação com o grupo controle; *ns* – não estatisticamente significante.

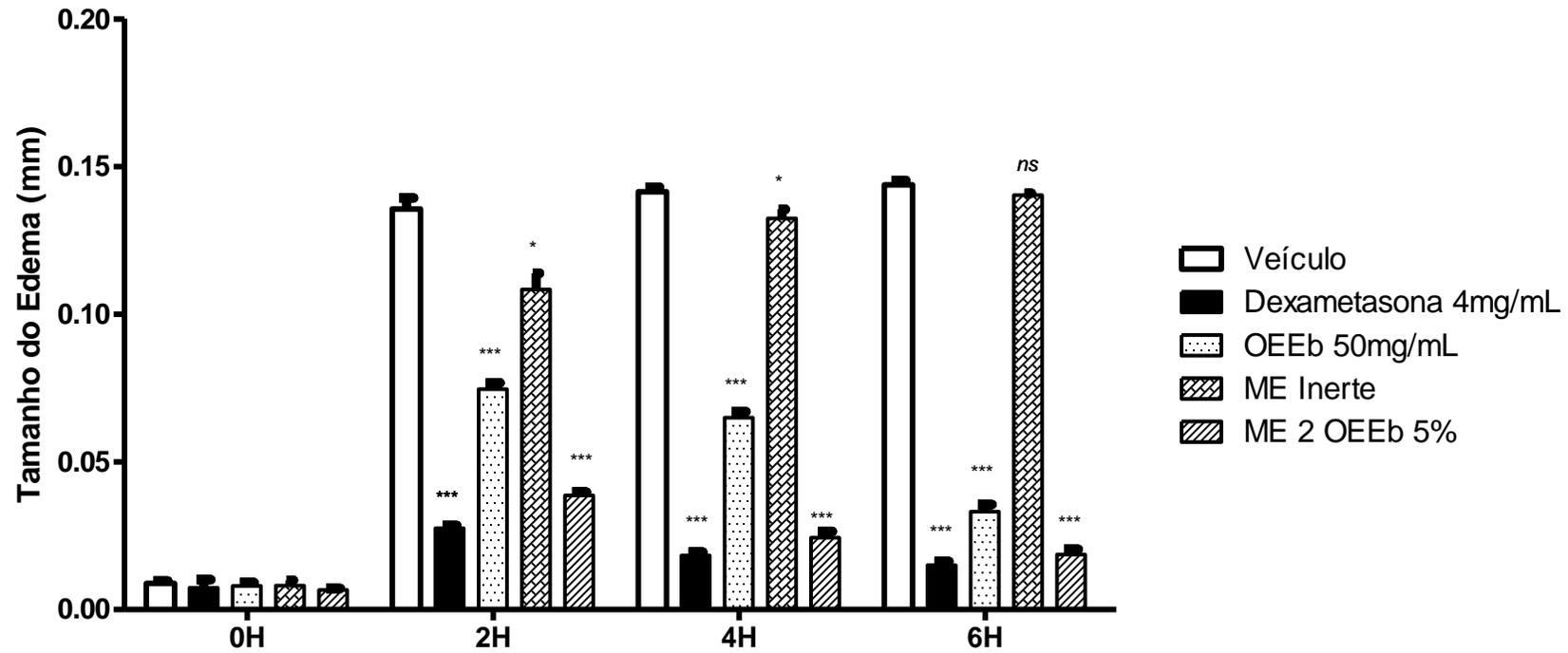


Figura 6. Efeito tópico do óleo essencial de *E. brejoensis* e da ME 2 no edema agudo induzido por óleo de cróton. Os valores representam a média aritmética \pm desvio padrão seguida da análise de Bonferroni: * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) e *ns* - não significativo.

Tabela 2. Efeitos do OEEb, morfina e da ME 2 no teste de movimento de cauda em camundongos.

Tratamentos	Tempos da reação (s)					Média de resposta
	0	30	60	90	120	
Veículo	2.50±0.04	2.51±0.05	2.54±0.02	2.51±0.03	2.52±0.02	2.51±0.01
Morfina 20mg/mL	4.68±0.15*	5.83±0.10*	6.74±0.21*	7.64±0.18*	8.75±0.20*	6.73±0.03
OEEb 50mg/mL	3.76±0.10*	3.95±0.08*	4.92±0.20*	5.91±0.15*	6.66±0.32*	5.04±0.08
ME inerte	2.87±0.11	2.63±0.05	2.66±0.02	2.47±0.04	2.48±0.03	2.62±0.03
ME 2+OEEb 5%	3.91±0.11*	4.15±0.08*	5.16±0.21*	6.21±0.16*	6.33±0.33*	5.15±0.07

Os dados são expressos como média ± desvio padrão do tempo de reação em segundos (s). *(p<0,05) diferença significativa em relação ao veículo.

Conclusão

Microemulsões foram desenvolvidas contendo o óleo essencial de *E. brejoensis*, Tween 80 e propilenoglicol (1:1) e água; óleo essencial de *E. brejoensis*, Tween 80 e Cremophor 40 (1:1). Quatro microemulsões apresentaram comportamento isotópico, em que três apresentaram perfil newtoniana e uma microemulsão, com características de não newtoniana, tipo pseudoplástico, sugestiva de sistema cristalino. A ME 2 não influenciou na viabilidade celular de fibroblastos L929. As atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foram potencializadas pela incorporação do óleo no sistema constituído por Tween 80, propilenoglicol e água. Em conclusão, nos estudos preliminares a microemulsão ME 2 pode ser uma formulação promissora para o tratamento de dor aguda e inflamatória.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências financiadoras: Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Agradecem também ao apoio técnico da Central Analítica da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético da Universidade Federal de Pernambuco (NUDFAC – UFPE).

Referências

- Abdallah, M. H., Lila, A. S. A., Unissa, R., Elsewedy, H. S., Elghamry, H. A., & Soliman, M. S. (2021). Preparation, characterization and evaluation of anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of brucine-loaded nanoemulgel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 205, 111868. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111868>
- Abrão, F. Y., da Costa, H. M., de Sousa Fiuza, T., Ramada, M. H. S., dos Santos, A. H., Romano, C. A., ... & de Paula, J. R. (2022). Volatile oils from *Psidium guineense* Swartz leaves: Chemical seasonality, antimicrobial, and larvicidal activities. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.039>
- Almeida, J. R. G. D. S., Araújo, E. C. D. C., Ribeiro, L. A. D. A., de Lima, J. T., Nunes, X. P., Lúcio, A. S. S. C., ... & Barbosa Filho, J. M. (2012). Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/859210>
- Araujo, F. F., Neri-Numa, I. A., de Paulo Farias, D., da Cunha, G. R. M. C., & Pastore, G. M. (2019). Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food

and pharmacological purposes. *Food research international*, 121, 57-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.018>

Benbow, T., & Campbell, J. (2019). Microemulsions as transdermal drug delivery systems for nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): a literature review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(12), 1849-1855. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1680996>

Cabral, B., Goncalves, T. A. F., Abreu, L. S., Andrade, A. W. L., de Castro, F. D., Tavares, J. F., ... & Zucolotto, S. M. (2022). Cardiovascular Effects Induced by Fruit Peels from *Passiflora edulis* in Hypertensive Rats and Fingerprint Analysis by HPLC-ESI-MSn spectrometry. *Planta Medica*, 88(05), 356-366.

Cabral, B., Goncalves, T. A. F., Abreu, L. S., Andrade, A. W. L., de Castro, F. D., Tavares, J. F., ... & Zucolotto, S. M. (2022). Cardiovascular Effects Induced by Fruit Peels from *Passiflora edulis* in Hypertensive Rats and Fingerprint Analysis by HPLC-ESI-MSn spectrometry. *Planta Medica*, 88(05), 356-366. DOI: 10.1055/a-1385-8863

Campos, C. A., Lima, B. S., Trindade, G. G., Souza, E. P., Mota, D. S., Heimfarth, L., ... & Thangaraj, P. (2019). Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. *Life sciences*, 229, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.026>

Carvalho, A. L. M., da Silva, J. A., Lira, A. A. M., Conceição, T. M. F., de Souza Nunes, R., de Albuquerque Junior, R. L. C., ... & de Santana, D. P. (2016). Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal zidovudine delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(7), 2188-2193. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.013>

Chang, R. K., Raw, A., Lionberger, R., & Yu, L. (2013). Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *The AAPS journal*, 15(1), 41-52. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9411-0>

Chang, R., de Moraes, S. A., Napolitano, D. R., Duarte, K. C., Guzman, V. B., & Nascimento, E. A. D. (2011). A new approach for quantifying furanodiene and curzerene: a case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (pitangueira) leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 392-396. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000042>

Conegundes, J. L. M., da Silva, J. M., de Freitas Mendes, R., Fernandes, M. F., Pinto, N. D. C. C., de Almeida, M. A., ... & Scio, E. (2021). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Siparuna guianensis* Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113344. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113344>

Costa, W. K., de Oliveira, J. R. S., de Oliveira, A. M., da Silva Santos, I. B., da Cunha, R. X., de Freitas, A. F. S., ... & da Silva, M. V. (2020). Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Industrial Crops and Products*, 144, 112059. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112059>

Costa, W. K., de Oliveira, J. R. S., de Oliveira, A. M., da Silva Santos, I. B., da Cunha, R. X., de Freitas, A. F. S., ... & da Silva, M. V. (2020). Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh

leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Industrial Crops and Products*, 144, 112059. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112059>

Dametto, A. C., Agustoni, D., Moreira, T. F., Plaza, C. V., Prieto, A. M., Silva, T. G., ... & Soares, C. P. (2017). Chemical composition and in vitro chemoprevention assessment of *Eugenia jambolana* Lam.(Myrtaceae) fruits and leaves. *Journal of Functional Foods*, 36, 490-502. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.013>

D'Amour, F. E., & Smith, D. L. (1941). A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*, 72(1), 74-79. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.929.3008&rep=rep1&type=pdf>

Dubey, S. K., Dey, A., Singhvi, G., Pandey, M. M., Singh, V., & Kesharwani, P. (2022). Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112440. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112440>

Favacho, H. A., Oliveira, B. R., Santos, K. C., Medeiros, B. J., Sousa, P. J., Perazzo, F. F., & Carvalho, J. C. T. (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1), 105-114.

Ferreira, S. G., Conceição, V. S., Gouveia, N. S., Santos, G. S., Santos, R. L. C., Lira, A. A. M., ... & Nunes, R. S. (2015). An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. *Journal of colloid and interface science*, 456, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.06.012>

Gias, Z. T., Afsana, F., Debnath, P., Alam, M. S., Ena, T. N., Hossain, M. H., ... & Reza, H. M. (2020). A mechanistic approach to HPLC analysis, antinociceptive, anti-inflammatory and postoperative analgesic activities of panch phoron in mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02891-x>

Gupta, S. K., Bansal, P., Bhardwaj, R. K., Jaiswal, J., & Velpandian, T. (2002). Comparison of analgesic and anti-inflammatory activity of meloxicam gel with diclofenac and piroxicam gels in animal models: pharmacokinetic parameters after topical application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(2), 105-111. <https://doi.org/10.1159/000049397>

Hou, T., Sana, S. S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V. R., & Zhang, Z. (2022). Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Bioscience*, 101716. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101716>

Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., & Oh-Ishi, S. (2001). Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life sciences*, 69(24), 2911-2919. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01374-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01374-1)

Ita, K. (2020). *Transdermal Drug Delivery: Concepts and Application*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822550-9.00006-5>

Junior-Nascimento, J.A. A, Bezerra Filho, C. M., de Oliveira, T. H. F., da Silva, A. G., Bezerra-Silva, P. C., Paiva, P. M. G., da Silva, M. V., ... & dos Santos Correia, M. T. (2018). Spermstatic activity of *Eugenia brejoensis* and *Myroxylon peruiferum* essential oils toward

human spermatozoa. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(19), 264-269.. <https://doi.org/10.5897/JMPR2018.6614>

Kashyap, N., Kumari, A., Raina, N., Zakir, F., & Gupta, M. (2021). Prospects of essential oil loaded nanosystems for skincare. *Phytomedicine Plus*, 100198. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100198>

Khan, M. F., Singh, M. K., & Sen, S. (2016). Measuring size, size distribution, and polydispersity of water-in-oil microemulsion droplets using fluorescence correlation spectroscopy: comparison to dynamic light scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(5), 1008-1020. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b09920>

Lima, A. B., Delwing-de Lima, D., Vieira, M. R., Poletto, M. Z., Delwing-Dal Magro, D., Barauna, S. C., ... & Siebert, D. A. (2017). Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 642-649. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.047>

Lima, M. P. D., Lopes, E. M., Gomes, L. D. S., França, A. R. D. S., Acha, B. T., Carvalho, A. L. M., & Almeida, F. R. D. C. (2018). Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 28(9), 691-702. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1519025>

Lira, A. A. M., Sester, E. A., Carvalho, A. L. M., Strattmann, R. R., Albuquerque, M. M., Wanderley, A. G., & Santana, D. P. (2008). Development of lapachol topical formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. *AAPS PharmSciTech*, 9(1), 163-168. DOI: 10.1208/s12249-007-9002-z

Liu, X., Xu, L., Liu, X., Wang, Y., Zhao, Y., Kang, Q., ... & Wu, Q. (2020). Combination of essential oil from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. and a microemulsion system: Permeation enhancement effect on drugs with different lipophilicity and its mechanism. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55, 101309.

Lopes, S. C., da Silva, A. V. L., Arruda, B. R., Morais, T. C., Rios, J. B., Trevisan, M. T. S., ... & Santos, F. A. (2013). Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: role of endogenous opioids, KATP-channels and adenosine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 110, 19-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.05.016>

Longo, D. P. (2006). Obtenção, caracterização e estudo de liberação in vitro e permeação in vivo de sistemas microestruturados contendo cafeína.

Lv, X., Cong, Z., Liu, Z., Ma, X., Xu, M., Tian, Y., ... & Tang, Z. (2018). Improvement of the solubility, photostability, antioxidant activity and UVB photoprotection of trans-resveratrol by essential oil based microemulsions for topical application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 48, 346-354. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.017>

Machado, M., Dantas, I. L., Galvao, J. G., Lima, A. D., da Cunha Gonsalves, J. K. M., Almeida, E. D. P., ... & Lira, A. A. M. (2020). Microemulsion systems to enhance the transdermal permeation of ivermectin in dogs: A preliminary in vitro study. *Research in Veterinary Science*, 133, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.009>

Malmberg, A. B., & Bannon, A. W. (1999). Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current protocols in neuroscience*, 6(1), 8-9. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0809s06>

Marcotte, M., Hoshahili, A. R. T., & Ramaswamy, H. S. (2001). Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Research International*, 34(8), 695-703. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00091-6)

Mazine, F.F.; BÜNGER, M.; Faria, J.E.Q.; Fernandes, T.; Giaretta, A.; Valdemarin, K.S.; Santana, K.C.; Souza, M.A.D.; Sobral, M. 2022. *Eugenia in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10338>>.

MCF, Veiga-Junior VF, Medeiros MIT. Formulados a base de óleo de copaíba biodisponibilizados para uso oral e tópico associado com aplicações terapêuticas na analgesia, inflamação e cicatrização. BR1020170148009.

Mektrirat, R., Janngoon, K., Pikulkaew, S., & Okonogi, S. (2016). Evaluation of cytotoxic and inflammatory properties of clove oil microemulsion in mice. *Asian J Pharm Sci*, 11(1), 231-232. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.11.020>

Mendes, J. F., Martins, H. H. A., Otoni, C. G., Santana, N. A., Silva, R. C. S., Da Silva, A. G., ... & Oliveira, J. E. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of *Eugenia brejoensis* essential oil nanoemulsions against *Pseudomonas fluorescens*. *LWT*, 93, 659-664. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.015>

Metzner, AB, & Otto, RE (1957). Agitação de fluidos não newtonianos. *Revista AIChE*, 3 (1), 3-10. <https://doi.org/10.1002/aic.690030103>

Moura, D. F., Rocha, T. A., de Melo Barros, D., da Silva, M. M., de Lira, M. A. D. C., dos Santos Souza, T. G., ... & da Silva, M. V. (2020). Evaluation of the cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of the latex extracted from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112567. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112567>

Murthy, S. N., & Shivakumar, H. N. (2010). Topical and transdermal drug delivery. In *Handbook of non-invasive drug delivery systems* (pp. 1-36). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10001-0>

Oliveira-Tintino, C. D.M., Pessoa, R. T., Fernandes, M. N. M., Alcântara, I. S., da Silva, B. A. F., de Oliveira, M. R. C., ... & de Menezes, I. R. A. (2018). 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*, 41, 82-95. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.02.004>

Padoin, K., Comarella, L., & Solda, C. (2018). Medicamentos comumente prescritos na odontologia e suas principais interações medicamentosas: revisão de literatura. *Journal of Oral Investigations*, 7(1), 62-76. DOI: <https://doi.org/10.18256/2238-510X.2018.v7i1.2014>

Padovan, A., Keszei, A., Külheim, C., & Foley, W. J. (2014). The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. *Phytochemistry reviews*, 13(3), 695-716. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9331-3>

Pascoa, H., Diniz, D. G. A., Florentino, I. F., Costa, E. A., & Bara, M. T. F. (2015). Microemulsion based on Pterodon emarginatus oil and its anti-inflammatory potential. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, 117-125.

Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British journal of clinical pharmacology*, 75(3), 588-602. https://doi.org/10.1111/j.1365_2125.2012.04425.x

Reis, M. Y., Santos, S. M. D., Silva, D. R., Silva, M. V., Correia, M. T. S., Navarro, D., ... & Saraiva, K. L. (2017). Anti-inflammatory activity of babassu oil and development of a microemulsion system for topical delivery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.

Roberts, M. S., Mohammed, Y., Pastore, M. N., Namjoshi, S., Yousef, S., Alinaghi, A., ... & Grice, J. E. (2017). Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of controlled release*, 247, 86-105.

Sá, A. Á. M., dos Santos, E. W. P., Santana, M. H. D. S., Santos, A. D. J., de Araujo, G. R. S., Santana, D. G., ... & Lira, A. A. M. (2020). Evaluation of the incorporation of essential oils in microemulsions as a promising formulation in the inhibition of tyrosinase. *Industrial Crops and Products*, 154, 112654. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112654>

Sampaio, M.G V, Bezerra Dos Santos, C. R., Cortez Sombra Vandesmet, L., Souza Dos Santos, B., Bianca Da Silva Santos, I., Correia, M. T. D. S., ... & Da Silva, M. V. (2021). Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of Eugenia gracillima Kiaersk. leaves essential oil. *Natural Product Research*, 35(11), 1914-1918. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644506>

Santos, L. D., Campos, A., Cechinel Filho, V., & Nesello, L. A. N. (2018). Phytochemical profile and gastroprotective activity of Eugenia mattosii fruits. *Arquivos de Gastroenterologia*, 55, 138-141. <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.201800000-24>.

Silva, A. G., Alves, R. C. C., Filho, C. M. B., Bezerra-Silva, P. C., Santos, L. M. M. D., Foglio, M. A., ... & Correia, M. T. D. S. (2015). Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from leaves of Eugenia brejoensis Mazine (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(6), 1441-1447. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.1000390>

Silva, A. G.; Alves, R. C. C.; Filho, C. M. B.; Bezerra, P. C. S.; Santos, L. M. M.; Foglio, M. A.; Navarro, D. M. A. F.; Silva, M. V.; Correia, M. T. S. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil froml of *E. brejoensis* (OEEb) Mazine (Myrtaceae). *Journal of Essencial Oil Bearing Plants*. 2015; 18 (6): 1441 – 1447. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.1000390>

Souza, L. I. O., Bezerra-Silva, P. C., Navarro, D. M. D. A. F., da Silva, A. G., dos Santos Correia, M. T., da Silva, M. V., & de Figueiredo, R. C. B. Q. (2017). The chemical composition

and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1055-1064. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121>

Souza, L. I. O., Bezzera-Silva, P. C., Navarro, D. M. D. A. F., da Silva, A. G., dos Santos Correia, M. T., da Silva, M. V., & de Figueiredo, R. C. B. Q. (2017). The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1055-1064. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121>

Tabosa, M. A. M., de Andrade, A. R. B., Lira, A. A. M., Sarmento, V. H. V., de Santana, D. P., & Leal, L. B. (2018). Microemulsion formulations for the transdermal delivery of lapachol. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1837-1846. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0995-2>

Tartaro, G., Mateos, H., Schirone, D., Angelico, R., & Palazzo, G. (2020). Microemulsion microstructure (s): A tutorial review. *Nanomaterials*, 10(9), 1657. <https://doi.org/10.3390/nano10091657>

Thomaz, D. V., Peixoto, L. F., de Oliveira, T. S., Fajemiroye, J. O., da Silva Neri, H. F., Xavier, C. H., ... & Ghedini, P. C. (2018). Antioxidant and neuroprotective properties of *Eugenia dysenterica* leaves. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/3250908>.

Tiwari, P., Sinha, V. R., & Kaur, R. (2020). Clinical considerations on micro-and nanodrug delivery systems. In *Drug Delivery Trends* (pp. 77-101). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817870-6.00004-3>

Vechi, G., Campos, A., da Rosa, R. L., Capistrano, K., Zermiani, T., de Campos Buzzi, F., ... & Cechinel Filho, V. (2018). Analyses of chemical composition and gastroprotective and antinociceptive properties of *Eugenia involucrate* DC. leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(04), 079-083. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8411>

Veras, B. O., de Oliveira, J. R. S., de Menezes Lima, V. L., Navarro, D. M. D. A. F., de Oliveira Farias, J. C. R., de Medeiros Moura, G. M., ... & de Souza Lopes, A. C. (2021). The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) SF Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113248.

Wang, R., Gan, J., Li, R., Duan, J., Zhou, J., Lv, M., & Qi, R. (2020). Controlled delivery of ketamine from reduced graphene oxide hydrogel for neuropathic pain: In vitro and in vivo studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 101964. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101964>

Woode, E., & Abotsi, W. K. (2011). Antinociceptive effect of an ethanolic extract of the aerial parts of *Hillieria latifolia* (Lam.) H. Walt. (Phytolaccaceae). *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(3), 384. doi: [10.4103/0975-7406.84445](https://doi.org/10.4103/0975-7406.84445)

Yesilyurt, O., Dogrul, A., Gul, H., Seyrek, M., Kusmez, O., Ozkan, Y., & Yildiz, O. (2003). Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception. *Pain*, 105(1-2), 303-308. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(03\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00245-8)

Zainuddin, N., Ahmad, I., Zulfakar, M. H., Kargarzadeh, H., & Ramli, S. (2021). Cetyltrimethylammonium bromide-nanocrystalline cellulose (CTAB-NCC) based

microemulsions for enhancement of topical delivery of curcumin. *Carbohydrate Polymers*, 254, 117401. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117401>

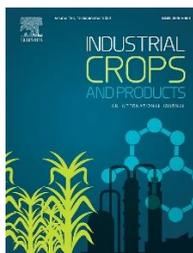
Zhang, Y., Long, Y., Yu, S., Li, D., Yang, M., Guan, Y., ... & Peng, W. (2021). Natural volatile oils derived from herbal medicines: a promising therapy way for treating depressive disorder. *Pharmacological Research*, 164, 105376. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105376>

Zhang, J., & Michniak-Kohn, B. B. (2018). Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole. *International journal of pharmaceutics*, 536(1), 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.041>

Zeynalli, M., W Al-Shalabi, E., & AlAmeri, W. (2021, September). An Extended Viscoelastic Model for Predicting Polymer Apparent Viscosity at Different Shear Rates. In *SPE Annual Technical Conference and Exhibition*. OnePetro. <https://doi.org/10.2118/206010-MS>

3.3 ARTIGO - ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia brejoensis* MAZINE COMPLEXADO COM β -CICLODEXTRINA PRODUZ ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTINOCICEPTIVA E REVELA-SE SEGURO EM ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA, SUBAGUDA E GENOTOXICIDADE EM CAMUNDONGOS

Artigo a ser traduzido e submetido ao Industrial Crops and Products



(ISSN: 9266-690)

Óleo essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine complexado com β -ciclodextrina produz atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e revela-se seguro em estudos de toxicidade aguda, subaguda e genotoxicidade em camundongos

Graziela Claudia da Silva^{a,b}, Alisson Macário de Oliveira^b, Cristiano Aparecido Chagas^c, George Souza Feitosa^b, João Ricardhis Saturnino de Oliveira^{a,b}, Márcia Vanusa da Silva^a, Rayane Cristine dos Santos Silva^d, Talita Giselly dos Santos Souza^c, Thiago Henrique Napoleão^b, Vera Lúcia de Menezes Lima^b, Ana Amélia Moreira Lira^e, Maria Tereza dos Santos Correia^b

^a Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

^d Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, 50.740-540, Recife, Pernambuco, Brasil

^e Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, Aracajú, Sergipe, Brasil

Resumo

A formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas é uma abordagem interessante para as limitações físico-químicas conferidas aos óleos essenciais. *Eugenia brejoensis* é uma espécie com diversas aplicações na medicina tradicional, incluído o tratamento de dor e inflamação. O óleo essencial das folhas *E. brejoensis* (OEEb) é composto, majoritariamente, por sesquiterpenos e diversas atividades biológicas têm sido relatadas. Objetivou-se com o presente estudo complexar OEEb com β -ciclodextrina por dois métodos (malaxagem e *slurry*) e investigar as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, toxicidades aguda, subaguda, genética e ação sobre o estresse oxidativo. A formação dos complexos foi confirmada com as técnicas de calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimétrica (TG), difração de Raio-X (DR-X) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O Estudo da ação antinociceptiva foi validado com os testes de contorção abdominal (ácido acético 0,8%) e formalina (2,5%) após a administrações das doses de 50 e 100 mg/kg. A atividade anti-inflamatória (doses 50 e 100 mg/kg) foi avaliada por dois modelos de inflamação aguda, edema de pata e peritonite aguda (carragenina 2%) com as dosagens de citocinas pró inflamatórias, TNF- α e IL-1 β . A toxicidade aguda (dose única 2000 mg/kg) foi avaliada por 14 dias e a genotoxicidade (dose única 2000 mg/kg) foi avaliada pelo teste de micronúcleo e ensaio cometa. A toxicidade subaguda foi avaliada (doses diárias 250, 500 e 1000 mg/kg) por 28 dias com avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. A administração de 2000 mg/kg não promoveu efeitos tóxicos ou danos genéticos. Na toxicidade subaguda por 28 dias, não foram verificadas alterações significativas entre os grupos no consumo hídrico, alimentar, ganho de peso, temperatura, parâmetros hematológicos, bioquímicos e nos pesos relativos dos órgãos. O complexo OEEb- β -CD apresenta potencial farmacológico para o tratamento de dor e inflamação atuando por vias do sistema opioide. Além disso, atua na prevenção do estresse oxidativo promovendo o aumento nos níveis de antioxidantes endógenos e, é seguro para administração de 250 mg/kg a curto prazo, sendo um ativo promissor para o desenvolvimento de novas aplicações farmacêuticas.

Palavras-chaves: Cutia. *Eugenia brejoensis*. β -ciclodextrina. Segurança toxicológica. Estresse oxidativo.

1. Introdução

Espécies do gênero *Eugenia* (Myrtaceae) são utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas ou atuando como moduladores com anti-inflamatórios e antiglicêmicos (Araújo et al., 2019). Diversas espécies de *Eugenia* com atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias foram descritas na literatura (Basting et al., 2014; Costa et al., 2020; Brito et al., 2022; Vechi et al., 2018).

A espécie *E. brejoensis*, popularmente conhecido por cutia, é uma árvore arbustiva encontrada em regiões semiáridas do Brasil. Na medicina popular, partes da planta são utilizadas como anti-inflamatórios, antipiréticos, antidiarreicos e analgésicos (Silva et al., 2015). O óleo essencial de *E. brejoensis* é composto majoritariamente por δ -cadineno, *trans*-caryofileno, espatulenol, α -muurolol e biciclogermacreno (Junior et al., 2018). Estudos com o óleo essencial de *E. brejoensis* identificaram algumas atividades biológicas, incluindo espermostática, tripanossomicida, antibacteriana, inseticida (Bezerra Filho et al., 2020; Silva et al., 2015; Junior et al., 2018; Mendes et al., 2018; Oliveira de Souza et al., 2017). Ensaio realizados em nossos laboratórios mostram que o óleo essencial de *E. brejoensis* possui potencial atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (dados não mostrados).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis de baixo peso molecular provenientes do metabolismo secundário das plantas aromáticas, constituídos principalmente, de terpenóides e derivados fenólicos (Sampaio et al., 2021; Halahlah et al., 2021). Entretanto, os óleos essenciais apresentam como características alta volatilidade, baixa estabilidade físico-química (causada por oxidação ou hidrólise) e baixa solubilidade aquosa, que são consideradas como limitações nas áreas de interesse da indústria alimentícia, cosmética ou farmacêutica (Cimino et al., 2021; Das et al., 2019). Uma das abordagens utilizadas para superar essas limitações é a associação dos óleos essenciais com ciclodextrinas (Andrade et al., 2017).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos produzidos a partir do amido ou de seus derivados pela enzima bacteriana ciclodextrina glicosiltransferases (CGTase) (Li et al., 2007). As ciclodextrinas dispõem de uma cavidade hidrofóbica e superfície hidrofílica em formato de cone truncado. Em virtude da presença das unidade de glicose em forma de cadeia, as ciclodextrinas são solúveis em água e podem formar complexos

de inclusão com drogas lipofílicas, incluindo óleos essenciais (Kurkov and Loftsson, 2013; Wadhwa et al., 2017; Wüpper et al., 2021).

A β -ciclodextrina é utilizada na indústria farmacêutica como excipiente de alguns medicamentos, destacando-se por promover o aumento na estabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e, conseqüentemente, a ação farmacológica de fármacos lipofílicos. Além disso, a disponibilidade na forma pura possui um custo relativamente mais baixo em relação as demais ciclodextrinas naturais (Lima et al., 2019; Yurtdaş et al., 2011). Atualmente, a associação com ciclodextrinas tem demonstrado excelentes resultados na ampliação dos efeitos farmacológicos dos óleos essenciais (Braga et al., 2021; Martins et al., 2021; Melo et al., 2020; Oliveira; Siqueira-Lima et al., 2017).

É importante ressaltar que nenhum estudo sobre atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e de segurança no uso envolvendo o complexo de inclusão do óleo essencial de *E. brejoensis* e β -ciclodextrina foi relatado na literatura. Assim, o presente estudo desenvolveu e caracterizou complexos de inclusão do óleo essencial de *E. brejoensis* com β -ciclodextrina por dois métodos (malaxagem e *slurry*) e investigou a ação anti-inflamatória, antinociceptiva, toxicidade aguda, toxicidade subaguda e toxicidade genética na administração por via oral em camundongos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O óleo essencial foi obtido a partir da hidrodestilação das folhas de *E. brejoensis* coletadas no Parque Nacional do Catimbau, Buíque, Pernambuco, Brasil, coordenadas 8°32'29"(S) e 37°15'5"(W) e previamente caracterizado por CG/MS sendo identificados como compostos majoritários δ -cadineno e biciclogermacreno. Carragenina, β -ciclodextrina (97% de pureza), formalina, indometacina, laranja de acridina, morfina e Tris HCl foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Ácido acético foi adquirido da Vetec (Brasil). Naloxona (Cristalia, Brasil), cetamina e Xilazina (Vetnil, Brasil). EDTA e NaOH (Fagron, Brasil). DMSO (Synth, Brasil).

2.2 Preparação dos complexos

Os complexos de inclusão do OEEb com β -ciclodextrina (OEEb - β -CD) foram obtidos por dois métodos, malaxagem e *slurry*, usando a razão molar de 1:1 (OEEb: β -

CD). Foi considerado o peso molecular do composto majoritário do OEEb, δ -*cadineno* (204, 35g.mol⁻¹) e o peso molecular de β -ciclodextrina (1134,98 g.mol⁻¹).

Para a manipulação do complexo de inclusão por malaxagem (MX) seguiu-se o protocolo descrito por Magalhães et al. (2020) com adaptações. Inicialmente, homogeneizou-se o OEEb e β -CD em um gral a temperatura ambiente, com adição de 2 mL de água destilada até obter-se uma pasta. A amostra (pasta) foi armazenada em um frasco de vidro ambar no dessecador até a total secagem do material para efetuar as análises.

A obtenção do complexo pelo método de *slurry* (SL) foi realizado de acordo com descrito por (Quintans-Júnior et al., 2016) com modificações. O complexo foi preparado homogeneizando o OEEb com β -CD e adicionando, gradualmente, 20 mL de água destilada. A solução foi mantida sob agitação durante 36 horas em um agitador magnético operando a 400rpm. Em seguida, foi submetida a liofilização (a -45 °C e 0 Pa) e acondicionadas em frasco de vidro ambar no dessecador. Uma mistura física (MF) foi obtida a partir da homogeneização manual o OEEb e β -CD na mesma razão molar (1:1).

2.3 Caracterização dos complexos de inclusão

2.3.1 Eficiência de inclusão de OEEb- β -CD por UV-Vis

Para determina a eficiência de inclusão (EI%) do óleo essencial de *E. brejoensis* nos complexos OEEb- β -CD (malaxagem e *slurry*), foi utilizado o protocolo proposto por Halahlah et al. (2021) com modificações. Inicialmente, 50mg dos complexos OEEb- β -CD foram diluídos em 4 mL de água destilada e 2 mL de hexano em um vidro de penicilina selado. A solução foi sonicada por 20 min. A fase orgânica foi separada da fase aquosa e seca com sulfato de sódio anidro. O hexano foi separado da fase orgânica em evaporador rotativo a temperatura abaixo de 40°C por 30 minutos. Adicionalmente, foi utilizado 3 mL de acetato de etila para a dissolução do óleo dos complexos e realizado a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Tecan Infinite M200) na absorbância de 251nm. A eficiência de inclusão foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Eficiência de Inclusão (\%)} = \frac{\text{massa do óleo complexado}}{\text{massa do óleo não complexado}} \times 100$$

2.3.2 Análises térmicas

Para a análise de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Termogravimetria (TG), foi utilizado o analisador térmico simultâneo (NETZSCH STA 449 F3 Jupiter). Amostras de 2mg dos complexos de inclusão, MF, OEEb e β -CD foram colocadas em um cadinho de alumina hermeticamente fechado e submetidas à faixa de temperatura de 40° C a 600°C sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e taxa de aquecimento de 10°C/min (Van Hees et al., 2002).

2.3.3 Difração de Raio-X (DR-X)

A caracterização cristalina da β -CD, MF e dos complexos OEEb- β -CD (MX e SL) foram obtidos a partir de um difratômetro Bruker D8 Advance (Alemanha) com um tubo de radiação Cuk- α no intervalo angular de 3 – 65° (2 θ) e 1 s de tempo de passagem (Quintans-Júnior et al., 2016).

2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras dos complexos OEEb- β -CD (MX e SL), β -CD e MF foram montadas em stubs de alumínio sob uma fita de carbono, revestidas com uma fina camada de ouro e visualizadas em microscópio Quanta 450 FEG (FEI Company®), a uma voltagem acelerada de 10 kv.

2.4 Atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, toxicidade aguda, toxicidade subaguda, genotoxicidade e estresse oxidativo

2.4.1 Animais

Os protocolos experimentais foram realizados utilizando camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) de ambos os sexos, como 8 a 12 semanas de idade, pesando 35± 10 g. Os camundongos foram adquiridos do Laboratório Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/ UFPE), distribuídos em grupos de acordo com o experimento a ser realizado, e mantido em caixas plásticas sobre as condições laboratoriais padrão (25 ± 3 °C, fotoperíodos de claro/escuro de 12 h), sendo alimentados com ração *ad libitum* e água potável. Todos os experimentos foram previamente

aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, conforme protocolo nº 0018/2019.

2.4.2 Atividade antinociceptiva

2.4.2.1 Contorção abdominal induzida por ácido acético

A atividade antinociceptiva do complexo (OEEb- β -CD) foi avaliada de acordo como método descrito por Quintans et al. (2013) com adaptações. Os camundongos foram divididos em cinco grupos ($n = 6$), sendo previamente tratados 1 hora antes administração intraperitoneal do ácido acético 0,8% (0,1ml/10g). Os tratamentos foram realizados por administração por gavagem, dois grupos com o complexo OEEb- β -CD (50mg/kg, 100mg/kg), um grupo com indometacina (20mg/kg), um grupo com o veículo (solução salina 0,9%) e um outro grupo com β -CD (100mg/kg). O número de contorções abdominais foi registrado entre 5 e 15 minutos após a injeção do ácido acético.

2.4.2.2 Teste da formalina e mecanismo de ação

No teste de formalina foi utilizado o protocolo descrito por Hunskaar et al. (1985) com adaptações. Os camundongos foram divididos em seis grupos ($n = 6$) sendo pré-tratados por gavagem com: o complexo OEEb- β -CD (50mg/kg, 100mg/kg), indometacina (20mg/kg), a morfina (10mg/kg), o veículo (solução salina 0,9%) e β -CD (100mg/kg). Decorrido 1h, foi induzida a dor pela administração intraplantar de formalina a 2,5% (20 μ L / pata). Os animais foram observados para mensuração da nocicepção de acordo com o tempo gasto para lambear ou morder a pata após receber o agente indutor. A observação ocorreu nos 5 primeiros minutos (fase neurogênica) e entre 15 a 30 minutos (fase inflamatória) (Santos et al., 2020).

Para investigação do envolvimento do sistema opioide, receptores muscarínicos ou canal K^+ sensível ao ATP no possível efeito antinociceptivo do complexo OEEb- β -CD, os camundongos foram tratados com os antagonistas naloxona (5mg/kg), atropina (5mg/kg) e glibenclamida (5mg/kg). Após 30 minutos foram realizadas as administrações do OEEb- β -CD (100mg/kg), morfina (10mg/kg) e veículo (solução salina 0,9%). Todas as administrações foram realizadas por gavagem antes da injeção intraplantar de formalina 2,5% (20 μ L / pata) (Veras et al., 2020).

2.4.3 Atividade anti-inflamatória

2.4.3.1 Edema de pata

A atividade anti-inflamatória do complexo OEEb- β -CD foi avaliada pelo edema de pata induzido por carragenina conforme descrito por (Winter et al., 1962). Para isso, os camundongos foram divididos em cinco grupos ($n = 6$), recebendo os seguintes tratamentos por gavagem: dois grupos, o complexo OEEb- β -CD (50mg/kg, 100mg/kg), um grupo a indometacina (20mg/kg), um grupo o veículo (solução salina 0,9%) e outro grupo a β -CD (100mg/kg). Após uma hora, foi injetado na região subplantar da pata traseira direita dos camundongos carragenina 2% (15 μ L), e solução salina 0,9% (15 μ L) na pata traseira esquerda. O volume do edema foi acompanhado nos intervalos de 0, 1, 2, 3, e 4 horas após a indução com auxílio de um paquímetro (Mitutiyo Corporation, Digmatic Caliper, Kanagawa, Japão). A inibição do edema foi calculada pela diferença entre as patas traseiras direita e esquerda (Costa et al., 2020).

2.4.3.2 Peritonite induzida por carragenina

Neste modelo foi aplicado o protocolo semelhante ao descrito por Veras et al.(2021). Os camundongos foram divididos em cinco grupos ($n = 6$), sendo pré-tratados por gavagem com: complexo OEEb- β -CD (50mg/kg, 100mg/kg), indometacina (20mg/kg), veículo (solução salina 0,9%) e β -CD (100mg/kg) uma hora antes da indução da peritonite com a administração intraperitoneal de carragenina 2% (0,25 mL, p / v em solução salina 0,9%). Transcorrido quatro horas da indução, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e 2 mL de solução tampão fosfato (PBS) foi injetada na cavidade peritoneal. Após uma leve massagem, o líquido peritoneal foi coletado em condições assépticas, centrifugado a 12.000xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante acondicionado a -70°C até as análises. Foram realizadas as dosagens de TNF- α e IL-1 β usando o kit Elisa, High Sensitivity in Elisa, Thermo Fisher (Waltham, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

2.4.4 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda do complexo OEEb- β -CD foi investigada de acordo com o protocolo descrito na Diretriz 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento

Econômico (OECD, 2002). Os camundongos foram distribuídos em dois grupos ($n = 3$), sendo tratados por gavagem: um grupo com 2000mg/kg de OEEb- β -CD e outro grupo com solução salina 0,9%. Alterações comportamentais foram observadas nas 3 primeiras horas e a cada 24 horas por 14 dias. Foi realizado o acompanhamento de ingestão hídrica, de ração e peso de cada animal (Malone, 1983). Ao final do experimento, os camundongos foram submetidos a jejum de 8 horas e eutanasiados. O sangue periférico foi coletado para avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos (Oliveira et al., 2022), e os órgãos para avaliação histológica (Kiernan, 1999).

2.4.5 Toxicidade subaguda (Doses repetidas por 28 dias)

Para a avaliação da toxicidade subaguda do OEEb- β -CD, foi utilizado o protocolo 407/2008 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2008). Os camundongos de ambos os sexos foram distribuídos em quatro grupos ($n = 10$, sendo 5 machos e 5 fêmeas), recebendo o tratamento diário por gavagem das seguintes concentrações: três grupos OEEb- β -CD (1000 mg/kg, 500 mg/kg e 250 mg/kg) e um grupo solução salina 0,9% durante 28 dias. Foi realizado o acompanhamento de peso, consumo de ração e água a cada 7 dias, e observações de alterações comportamentais diariamente (Malone, 1983.). Além disso, no 1º, 7º, 14º e 28º dia de experimento foi realizado o monitoramento da temperatura retal dos camundongos com auxílio de um termômetro (Animed, Brasil) previamente lubrificado com Vaseline® (Sigma Aldrich, Brasil), e dos níveis séricos de glicose utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche Diagnóstica, Brasil Ltda).

Ao final do experimento, os camundongos foram submetidos a jejum de 8 horas e eutanasiados. O sangue foi coletado para análises hematológica e bioquímica em analisadores automáticos Coulter STKS (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA) e COBAS (Roche Diagnostics, Suíça) (Oliveira et al., 2022; Kiernan, 1999).

2.4.6 Estresse oxidativo

2.4.6.1 Homogenatos dos fígados

Fragmentos dos fígados dos camundongos foram coletados para investigação da atuação do OEEb- β -CD (nas doses 250, 500 e 1000 mg/kg) sobre o estresse oxidativo conforme protocolo descrito por Oliveira et al. (2019) com adaptações. Inicialmente, 250 μ g dos fígados foram homogeneizados com Tris-HCL (25mM, pH 7,4), EDTA (1mM) e ortovanadato de sódio(1mM) e fluoreto de fenilmetanossulfonil (1mM). Em seguida, foram centrifugados a 3.800xg por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para determinação do teor total de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.4.6.2 Ensaio da peroxidação lipídica

Para avaliar a peroxidação lipídica foi mensurado os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa et al., 1979). Alíquotas de 100 μ L dos homogenatos foram misturadas com ácido acético 30% (10 μ L), Tris-HCL 10nM (190 μ L, pH 7,4) e centrifugados a 3500xg por 15 min. Os sobrenadantes foram coletados, adicionado o ácido tiobarbitúrico 0,8% (10 μ L) e aquecidos em banho maria (37°C) por 30 min. As absorbâncias foram obtidas a 535nm em espectrofotômetro (Tecan Infinite M200). Os resultados foram expressos na concentração de malondialdeído (nmol/mg de proteína) conforme calculado por Oliveira et al. (2019).

2.4.6.3 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para determinar a atividade da enzima SOD foi aplicado o protocolo de Oliveira et al.(2022). Alíquotas de 120 μ L dos homogenatos foram misturadas com 180 μ L de solução de carbonato de cálcio 0,05% com 0,1mM de EDTA (pH 9,0). As misturas foram incubadas em banho-maria a 37°C por 30 min. Transcorrido o período de incubação foi adicionado 20 μ L de epinefrina (30mM em ácido acético 0,05%). A atividade da SOD foi medida em espectrofotômetro (Tecan Infinite M200) na absorbância de 480nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

2.4.6.4 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada misturando alíquotas de 80 μ L dos homogenatos com 220 μ L de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4) e centrifugando a 3000rpm por 15 min. Na sequência, 100 μ L dos sobrenadantes foram misturados com 900 μ L de peróxido de hidrogênio e 1mL de água destilada. A atividade da enzima foi acompanhada entre 0 e 6 minutos com leituras em espectrofotômetro (Tecan Infinite M200) na absorbância de 240nm (Aebi, 1984). A atividade enzimática da CAT foi expressa com mU/mg de proteína.

2.4.7 Genotoxicidade

O potencial genotóxico ou mutagênico do OEEb- β -CD foi investigado através do ensaio cometa e do teste de micronúcleo com sangue periférico (Hayashi et al., 1990; Tice et al., 2000). Camundongos machos foram divididos em três grupos (n=5), incluindo o grupo controle negativo (CN) que recebeu 0,5 mL de solução salina 0,9% e o segundo grupo recebeu OEEb- β -CD (2.000 mg/kg) por gavagem; e como controle positivo, o terceiro grupo recebeu ciclofosfamida (25mg/kg) por via intraperitoneal. Após 48h do tratamento, os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (100mg/kg e 10mg/kg) e o sangue periférico foi coletado por punção retro-orbital para realização dos ensaios cometa e micronúcleo (Souza et al., 2021).

2.4.7.1 Ensaio Cometa

Uma amostra de 15 μ L de sangue de cada camundongo foi homogeneizada com 100 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5% LM). Essa mistura foi depositada em lâminas previamente revestidas com agarose padrão 0,5%, cobertas com lamínulas e expostas a 4°C por 10 minutos. Após o resfriamento, as lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise (cloreto de sódio [NaCl] 2,5M, ácido etilenodiaminotetracético [EDTA] 100mM, Tris 10mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%, pH13) por 48 horas (Tice et al., 2000). Após a lise, as lâminas foram submetidas a uma corrida de eletroforese alcalina (NaOH 1M e sal dissódico de EDTA 200 mM, pH 13) por

20 minutos a \pm 300 mA e 32 V. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com solução de Tris-HCL (0,4M / pH 7,5) por 15 minutos, fixadas em etanol absoluto por 5 min, coradas com 30 μ L de brometo de etídio (0,0002%p/v) e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-imager M2) com objetiva de aumento de 40x e filtro AlexaFluor 546 nm. Duas lâminas foram coradas para cada animal para a contagem de 100 nucleoides com finalidade de avaliar o dano no DNA considerando o tamanho da cauda do cometa em relação ao diâmetro da cabeça. Assim, foi considerado 0 (nenhum dano), 1 (pouco dano aparente), 2 (dano médio), 3 (dano médio alto) e 4 (alto dano). Os valores obtidos foram utilizados para determinar o Índice de Dano (ID) e o percentual da Frequência de Dano (FD) em relação ao número total de núcleo quantificados (Collins et al., 2008; Souza et al., 2021)

2.4.7.2 Teste de Micronúcleo (MN)

Para o teste de micronúcleo foi utilizado o protocolo descrito por (Hayashi et al., 1990). O sangue periférico (5 μ L) de cada camundongo foi depositado em três lâminas pré-revestidas com laranja de acridina e cobertas com lamínulas. A presença de micronúcleos foi investigada em 2000 eritrócitos policromáticos utilizando o microscópio de fluorescência (Zeiss-imager, M2) com objetiva de ampliação de 40x e filtro AlexaFluor 488 (OECD, 2016a).

2.5 Análises estatísticas

Os resultados das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, toxicidade aguda e subaguda foram expressos em média desvio padrão e analisados por ANOVA seguido por Tuckey ou Bonferroni para comparações múltiplas utilizando o software GraphPad Prisma, EUA. Por fim, os resultados dos ensaios de genotoxicidade foram analisados de forma independente usando o teste de Wilcoxon (software R). Os resultados foram considerados significantes em $p < 0,05$ e $p < 0,001$.

3. Resultados e Discussões

3.1 Caracterização físico-química dos complexos

3.1.1 Eficiência de Inclusão

A eficiência de inclusão dos complexos OEEb- β -CD pelos métodos de malaxagem e *slurry* foram 30% e 50 % respectivamente. A eficiência de inclusão é um dos parâmetros mais críticos para mensurar a efetividade do processo, visto que inúmeros fatores afetam a eficiência de inclusão, incluindo teor de água na β -ciclodextrina, composição química do óleo essencial, concentração e ordem em que são adicionados à mistura; além do tipo de processo de secagem e o solvente utilizado para extrair o óleo essencial dos complexos formados (Rocha Neto et al., 2018; Kavetsou et al., 2021).

3.1.2 Análises térmicas

As técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) são extensivamente utilizadas no estudo de complexos de inclusão com fins comparativos sobre a estabilidade térmica entre óleos essenciais, mistura física e novos complexos formados, o que pode revelar as potencialidades no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas (Goh; Lane, 2022; Marreto et al., 2008).

As curvas das análises de DSC do óleo essencial *E. brejoensis*, β -ciclodextrina, mistura física e os complexos OEEb- β -CD pelos métodos de malaxagem e *slurry* são ilustradas na figura 1. Foram verificados picos endotérmicos em todas as amostras, logo uma fonte de calor é necessária para a degradação parcial ou total dos analitos (Kissinger, 1957). Nos parâmetros analisados, o óleo essencial de *E. brejoensis* mostrou evento endotérmico em 208 °C e eventos exotérmicos. Observa-se um pico exotérmico em 133°C relacionado à liberação de compostos do óleo de baixo peso molecular, e outro pico exotérmico em 543° C, representando completa volatilização do óleo. A β -ciclodextrina mostrou três picos endotérmico, um na faixa de 98°C, sugestivo de desidratação; o segundo pico na faixa de 323°C, relacionado a fusão molecular; e o terceiro pico a 418°C, correspondente à degradação da β -ciclodextrina (Beserra-Filho et al., 2019; Rodrigues et

al., 2017). A mistura física seguiu o perfil endotérmico similar à β -ciclodextrina. Os complexos revelaram comportamentos endotérmicos: o complexo OEEb- β -CD (slurry) mostrou um pico endotérmico em 313°C e o desaparecimento do pico observado na curva da análise do óleo; já o OEEb- β -CD (malaxagem) apresentou um comportamento resistente, com três picos endotérmicos, um extenso pico no intervalo entre 80-110°C e dois picos, um em 308°C e outro em 408°C. A redução dos picos endotérmicos característicos β -CD em complexos de inclusão também foi observada por Herrera et al. (2019) na complexação com derivados de óleos essenciais. Magalhães et al. (2020) citam que variações na entalpia, como o desaparecimento ou redução dos picos endotérmicos, estão relacionadas com a redução de cristalinidade da β -CD, sendo um indicativo de formação de complexos de inclusão.

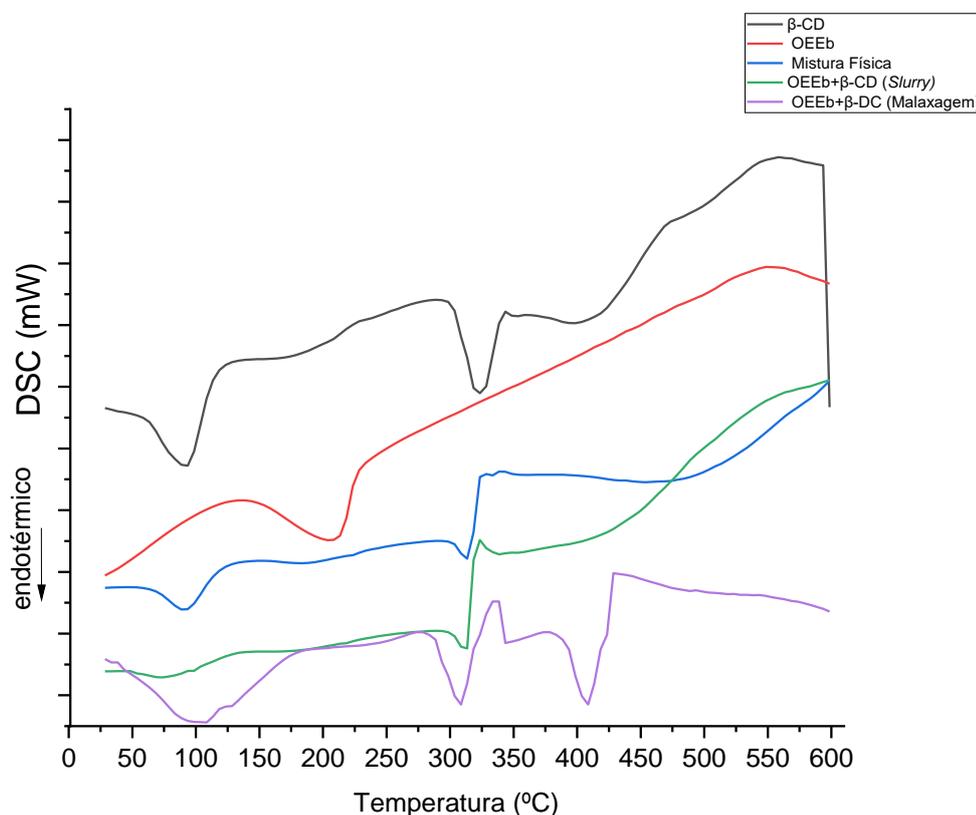


Figura 1. Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial para o óleo essencial de *E. brejoensis* (OEEb), β -ciclodextrina (β -CD) e complexos de inclusão OEEb- β -CD (*slurry* e malaxagem).

As curvas das análises de TG do óleo essencial *E. brejoensis*, β -ciclodextrina, mistura física e os complexos OEEb- β -CD pelos métodos de malaxagem e *slurry* são

mostrados na figura 2. O óleo essencial exibiu uma única perda de massa que pode estar associada ao seu perfil de volatilidade. A perda de massa (97,39%) ocorreu na faixa de temperatura de 223°C (Figura 2). Na amostra de β -ciclodextrina, são observadas duas perdas de massa, uma inicial de 13,37% na faixa de 113°C, seguida de uma perda de 68,7% a 348°C. Segundo Magalhães et al. (2020), perdas de massa em β -ciclodextrina na faixa de 40-200°C estão associada a liberação de moléculas de água e perdas de massa na faixa de 200-400°C a ponto de fusão ou completa degradação da ciclodextrina. A mistura física apresenta características do óleo e da β -ciclodextrina. Os complexos OEEb- β -CD (*slurry* e malaxagem) mostraram perdas de massa iniciais de 5,8% e 8% nas faixas de temperatura de 113°C e 168°C, respectivamente. O complexo obtido pelo método de malaxagem mostrou-se mais resistente, ocorrendo a sua completa degradação na faixa de temperatura de 313-443°C. Estes resultados indicam que a complexação com a β -ciclodextrina promoveu estabilidade térmica do óleo, visto que a perda de massa ocorreu na faixa de temperatura esperada para a β -ciclodextrina e os percentuais de perda foram inferiores ao observado no termograma do óleo. Assim, sugere-se que não houve perda significativa dos compostos voláteis complexados na β -CD. Estudos mostram a estabilidade térmica conferida na complexação de óleos essenciais com β -ciclodextrina. Halahlah et al., (2021) analisaram as perdas de massas na complexação do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* com β -ciclodextrina e seus derivados. Observou-se que a complexação com β -ciclodextrina exibiu menor perda de massa (4% a 120°C) entre os complexos com derivados da ciclodextrinas, o que foi atribuído ao deslocamento das moléculas de água da superfície da β -ciclodextrina para a acomodação das moléculas do óleo na sua cavidade. Outrossim, maiores perdas iniciais de massas as relatadas em nosso estudo foram observadas em complexos de inclusão de β -ciclodextrina com óleo essencial de *Origanum onites* L, com valores iniciais de 27% e 18% entre 60 - 120°C e degradação completa na faixa de 320°C (Kotronia et al., 2017).

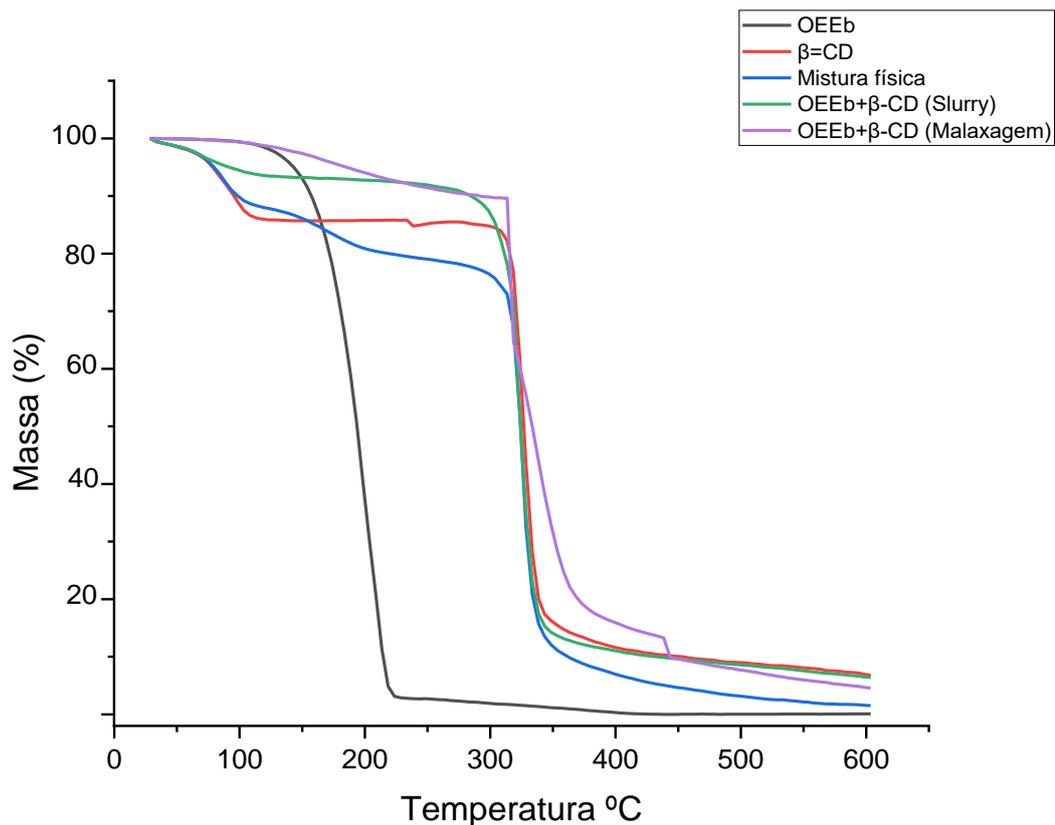


Figura 2. Curvas de Termogravimetria para o óleo essencial de *E. brejoensis* (OEEb), β -ciclodextrina (β -CD) e complexos de inclusão OEEb- β -CD (*slurry* e malaxagem).

3.1.2 Difratoograma de Raio-X (DR-X)

Os difratogramas das amostras da β -CD, OEEb- β -CD (Malaxagem e Slurry) e mistura física podem ser observados na figura 3. Foram verificados picos definidos característicos de substâncias cristalinas na linha da β -CD, incluindo nos intervalos $4,53^\circ$; $8,98^\circ$; $10,7^\circ$; $12,5^\circ$ e $22,6^\circ$ (20). A mistura física apresentou espectros nos intervalos angulares similares à linha da β -CD. Já os difratogramas dos OEEb- β -CD (malaxagem e slurry) mostraram uma diminuição e deslocamento nos picos $8,98^\circ$ a $10,7^\circ$; o desaparecimento dos picos de β -CD em $4,53^\circ$ e $8,98^\circ$ e aparecimento de um novo pico na faixa angular $16,96^\circ$. Apesar dos complexos mostrarem características semelhantes, apenas na amostra slurry observa-se uma linearização com supressão em relação ao pico $22,6^\circ$ da β -CD. O desaparecimento de picos característicos da substância inicial e o surgimento de novas reflexões angulares após os processos de inclusão estão relacionadas com organização molecular para o acoplamento do óleo essencial na cavidade da β -CD, sendo uma forte evidência de formação de complexos de inclusão (Abarca et al., 2016; Luo et al., 2022). Estudos têm revelado que a técnica de DR-X é uma excelente alternativa

na caracterização de complexos de inclusão formados por produtos naturais e β -CD (Silva Júnior et al., 2019; Magalhães et al., 2020; Lin et al., 2022).

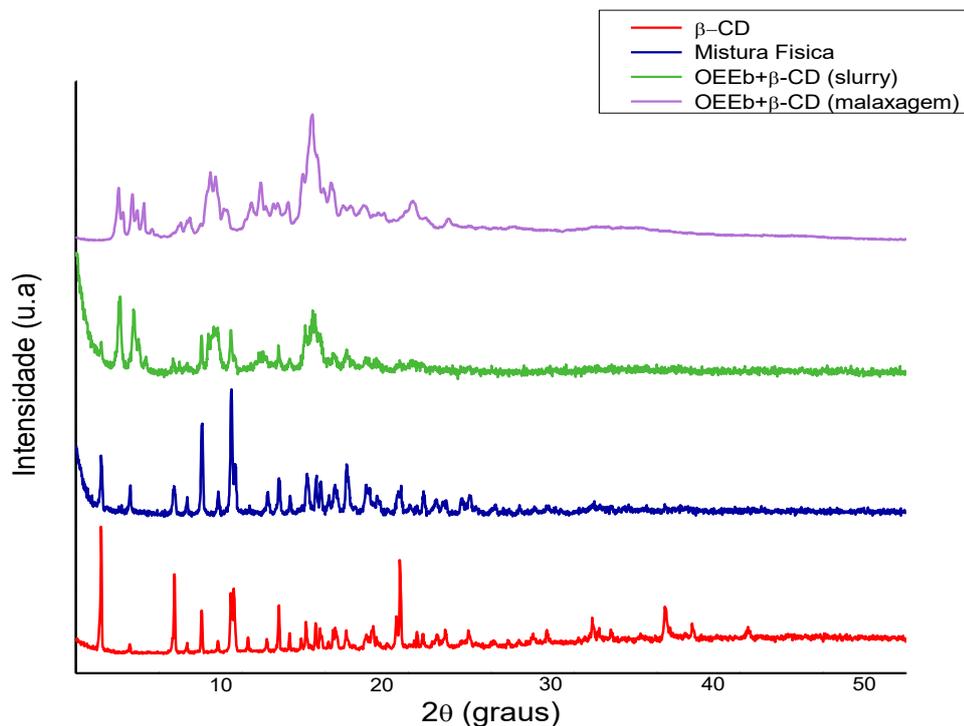


Figura 3. Difratogramas para β -ciclodextrina (β -CD) e complexos de inclusão OEEb- β -CD (*slurry* e *malaxagem*).

3.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microfotografias foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura com magnitude 13.000X e 5 μ m. Conforme pode ser observado na figura 4, β -CD mostrou estruturas compactas em forma de placas de cristais retangulares com tamanhos variáveis (Fig. 4 A). A mistura física (Fig.4 B) apresentou semelhanças com as características citadas anteriormente, sendo possível distinguir o óleo sobre a superfície da β -CD. Contudo, os complexos OEEb- β -CD (Fig.4 C e D) mostraram-se em partículas menores, estruturas roboides ou agregados amorfos, confirmando que houve a formação de um novo composto. Estas características morfológicas também foram observadas em

complexos de inclusão com óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* com β -CD por Anaya-Castro et al.(2017).

Vale ressaltar que o complexo *slurry* (Fig.4 C) também apresentou modificações morfológicas mais acentuadas em relação ao complexo obtido pelo método de malaxagem na análise por MEV. Durante a homogeneização das moléculas pelo método de *slurry*, a intensa cavitação ou cisalhamento proporcionado por a agitação magnética durante 36h, pode ter contribuído para entrada do óleo na cavidade hidrofobia da β -CD (Souza et al., 2016). Outrossim, estas mudanças morfológicas também podem ser resultantes do processo de liofilização(Mura, 2015). Alguns estudos relatam que a liofilização pode ser mais efetiva na formação de complexos de inclusão (Cid-Samamed et al., 2022; Santana et al., 2021; Xiao et al., 2019).

Para realização dos ensaios biológicos in vivo escolheu-se apenas o sistema obtido pelo método de *slurry* por apresentar melhor complexação, justificada pelo percentual da eficiência de inclusão e amorfização visualizada na análise de DR-X e MEV.

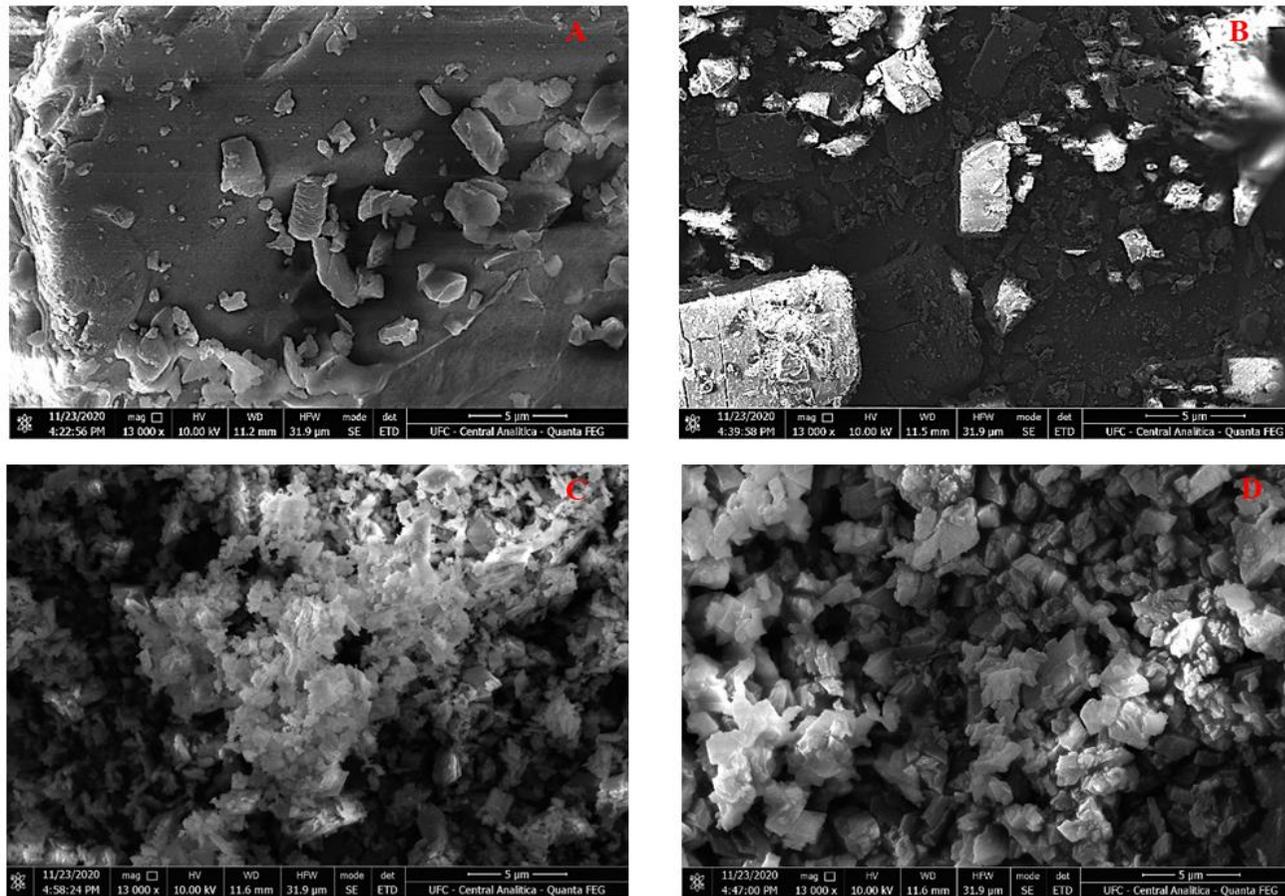


Figura 4. Microfotografias de microscopia eletrônica na magnitude 13.000X: (A) β -CD; (B) Mistura física; (C) OEEb- β -CD *slurry* e (D) OEEb- β -CD Malaxagem.

3.2 Atividade antinociceptiva

Todos os grupos tratados com OEEb- β -CD (50 e 100mg/kg) apresentaram redução no número das contorções estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). As duas concentrações 50mg/kg e 100mg/kg mostraram diminuição no número de contorções em 63,35% e 77,21%, resultados semelhantes ao observado no grupo de camundongos tratados com indometacina (Figura 5). O grupo tratado com a β -CD (100mg/kg) mostrou uma redução nas contorções inferior a 10%, conforme esperado, não sendo estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($P > 0,05$). A administração oral de complexos de inclusão com monoterpenos e β -ciclodextrina (40mg/kg) também promoveu a diminuição nas respostas nociceptivas no modelo de contorção abdominal em camundongos (Quintans et al., 2013; Quintans-Júnior et al., 2013). Este teste é amplamente utilizado na triagem de substâncias com potenciais efeitos analgésicos (Koster et al., 1959). O ácido acético atua na sensibilização dos nociceptores periféricos com a liberação de mediadores endógenos, incluindo bradicinas, prostaglandinas, serotonina, histamina, noradrenalina e citocinas (Sampaio et al., 2020). Além disso, promove a ativação de canais catiônicos não seletivos localizados nas vias aferentes primárias (Bars et al., 2001).

A indometacina é um fármaco que atua como antinociceptivo e anti-inflamatório, com a inibição da síntese de prostaglandinas e consequente redução na sensibilização de neurônios aferentes primários e na medula espinhal (Bingham et al., 2006). Os resultados mostraram que OEEb- β -CD atuou de forma semelhante à indometacina, sugerindo que a sua ação analgésica está atrelada com à redução da sensibilização neuronal.

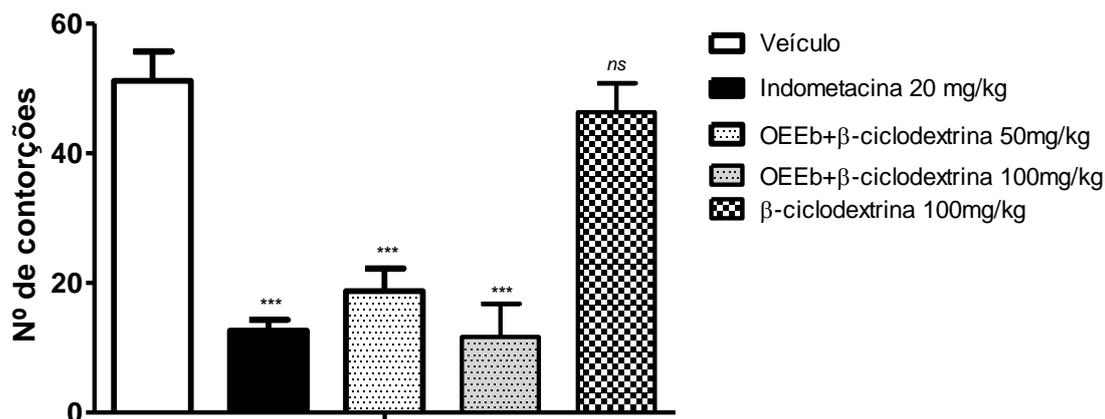


Figura 5. Efeito do complexo de inclusão óleo essencial de *Eugenia brejoensis* com β-ciclodextrina (OEEb-β-CD) (100mg/kg e 50mg/kg) na contorção abdominal induzida por ácido acético. Os asteriscos (***) $P < 0,001$ indicam significância em comparação com o grupo controle.

Verificou-se no teste da formalina que OEEb-β-CD promove efeitos nas vias centrais e periféricas estatisticamente significativos. Conforme observado na Figura 6A, o OEEb-β-CD na concentração de 100 mg/kg reduziu a dor central em 78,38%, sendo similar à ação da morfina na concentração de 10 mg/kg (78,70%). Além disso, a administração da naloxona (5 mg/kg) bloqueou o efeito analgésico exercido pelo OEEb-β-CD na fase 1 (Figura 6A) e, parcialmente, na fase 2 (Figura 6B), sugerindo que o seu mecanismo de ação é por vias opioides. Esta inibição não foi observada nos tratamentos com os antagonistas atropina e glibenclamida. Na fase 2, também foi observado uma ação por vias inflamatórias, visto que, após o tratamento com naloxona OEEb-β-CD (100 mg/kg) permaneceu exercendo efeito de 65% na redução do tempo de lambadura das patas dos camundongos em comparação com o grupo veículo ($p < 0,001$). A indometacina, o fármaco anti-inflamatório utilizado como controle, produziu redução no tempo de lambadura em 67,61%; e a morfina (10 mg/kg) exerceu uma diminuição no tempo em 95,54%, ambos resultados validam a fase 2 do experimento. Estudos mostram que o uso de β-ciclodextrina tem possibilitado aumentar a biodisponibilidade e a eficácia da atividade antinociceptiva de óleos essenciais ou de seus constituintes majoritários (Quintans et al., 2013; Menezes et al., 2015; Siqueira-Lima et al., 2017).

Martins et al. (2020) validaram a ação antinociceptiva do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* com β -ciclodextrina com resultados mais significativos, com doses menores as já relatadas para o óleo não complexado, utilizando o modelo do teste de formalina.

O teste da formalina possibilita analisar duas respostas de forma independente, uma resposta neurogênica (fase 1) e uma resposta inflamatória (fase 2) (Oliveira et al., 2022a). Com a administração da injeção da formalina, na fase neurogênica (primeira fase) ocorre estimulação direta de nociceptores via fibras C ao corno dorsal da medula espinhal após a substância P ser secretada e atuar como neurotransmissor (Hassanpour et al., 2020). Já na segunda fase, a dor é induzida com a liberação de mediadores inflamatórios desencadeando uma resposta inflamatória periférica (Santos et al., 2020). Substâncias com ação analgésica central permite a inibição em ambas as fases; enquanto anti-inflamatórios não esteroidais, como por exemplo a indometacina, exibem ação periférica com inibição apenas na segunda fase do teste da formalina (Viscardi et al., 2017). Os camundongos tratados com o complexo OEEb- β -CD (100 mg/kg) mostraram redução no tempo de lambadura das patas em ambas as fases do teste de formalina, sugerindo uma ação analgésica central, que corroboram com os resultados obtidos no ensaio de contorção abdominal.

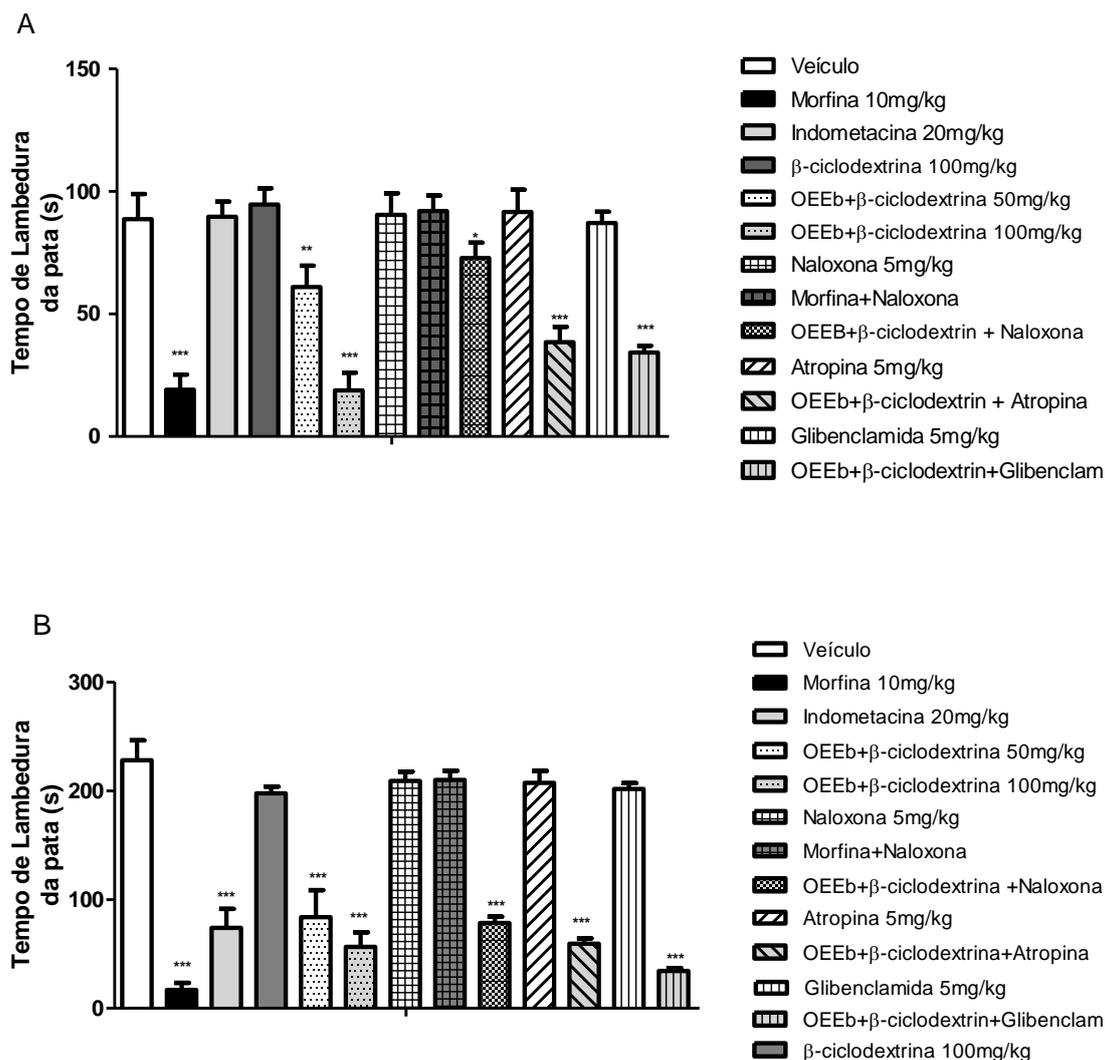


Figura 6. Efeito do complexo de inclusão óleo essencial de *Eugenia brejoensis* com β-ciclodextrina (OEEb-β-CD) (100mg/kg e 50mg/kg) no teste de formalina. A - fase neurogênica 0 – 5 minutos de teste; B - fase inflamatória 15-20 minutos de teste. Os asteriscos (***) indicam significância em comparação com o grupo controle (P < 0,001).

3.2 Atividade anti-inflamatória

Na avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzida pela injeção de carragenina, foram observadas reduções significativas ($p < 0,001$) do edema da pata nos grupos tratados com o OEEb-β-CD, quando comparado com o grupo do veículo (Figura 7). A atividade máxima do OEEb-β-CD na inibição do edema (90%) foi observada a partir das 2 horas de avaliação no grupo tratado com a concentração de 100 mg/kg. O tratamento com 50mg/kg de OEEb-β-CD promoveu o efeito máximo a

partir de 4 horas de avaliação (88,5%). O grupo tratado com a indometacina mostrou efeito máximo (98,57%) após 3 horas de tratamento. Em um estudo realizado por Rodrigues et al. (2017), verificou-se que 2 horas após o tratamento com óleo essencial de *Ocimum basilicum* complexado com a β -CD (10 mg/kg) foi possível observar a diminuição da permeabilidade vascular com consequente redução significativa (68%; $p < 0,05$) do edema da pata dos camundongos. Por sua vez, o óleo *Euterpe oleracea* Martius complexado com β -CD reduziu 66% do volume do edema da pata em camundongos tratados com concentrações de 300 mg/kg (Magalhães et al., 2021). Estes resultados evidenciam a atrativa ação anti-inflamatória demonstrada pelo complexo OEEb- β -CD na concentração de 100 mg/kg (redução de 88,5% do edema).

A inflamação aguda induzida pela injeção da carragenina é um modelo bifásico (Jisha et al., 2019). Inicialmente, entre 0-3 horas, ocorre o aumento de 40 % do edema promovido pela liberação de histamina, bradicinina, serotonina (Vinegar et al., 1969); na segunda fase do edema (3 a 4 h), ocorre a síntese da ciclo-oxigenase 2, com consequente liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (Adedayo et al., 2019). O complexo OEEb- β -CD atuou na redução do edema em ambas as fases em relação ao grupo tratado apenas com o veículo, sendo ativo em processos inflamatórios agudos.

Este efeito anti-inflamatório revelado por OEEb- β -CD também foi observado no ensaio de peritonite aguda induzida por injeção intraperitoneal da carragenina. A administração oral de OEEb- β -CD (50 e 100 mg/kg) reduziu os níveis das citocinas pró inflamatórias TNF- α (54% e 54,41%) e IL-1 β (74,09% e 75,14%), sendo estatisticamente significativos ($p < 0,001$) em relação ao grupo tratado com solução salina 0,9% (Figura 8). Resultados similares foram expressos no grupo tratado com o fármaco indometacina (20 mg/kg), que promoveu a redução nos níveis de TNF- α e IL-1 β em 66,30% e 82,20%, respectivamente. Os efeitos dos óleos essenciais na imunomodulação da inflamação atrelada à diminuição da expressão de citocinas pró inflamatórias podem ser observados em alguns estudos (Veras et al., 2021; Nunes et al., 2021). Braga et al. (2021) mostraram que o pré-tratamento com o óleo essencial de *Lippia pedunculosa* Hayek complexado com β -CD (400 mg/kg) antes da indução da peritonite pode reduzir a migração de leucócitos na cavidade peritoneal e os níveis de IL-1 β . Além disso, outros compostos naturais quando complexados com ciclodextrinas exercem uma maior ação na modulação de citocinas pró-inflamatória. A narigenina e morina, por exemplo, quando complexadas com ciclodextrinas promoveram a redução significativa de TNF- α , assim como aumentaram biodisponibilidade das substâncias acarretando na diminuição da dosagem

para obter o efeito anti-inflamatório esperando em relação a forma não complexada (Gratieri et al., 2020; Lima et al., 2019).

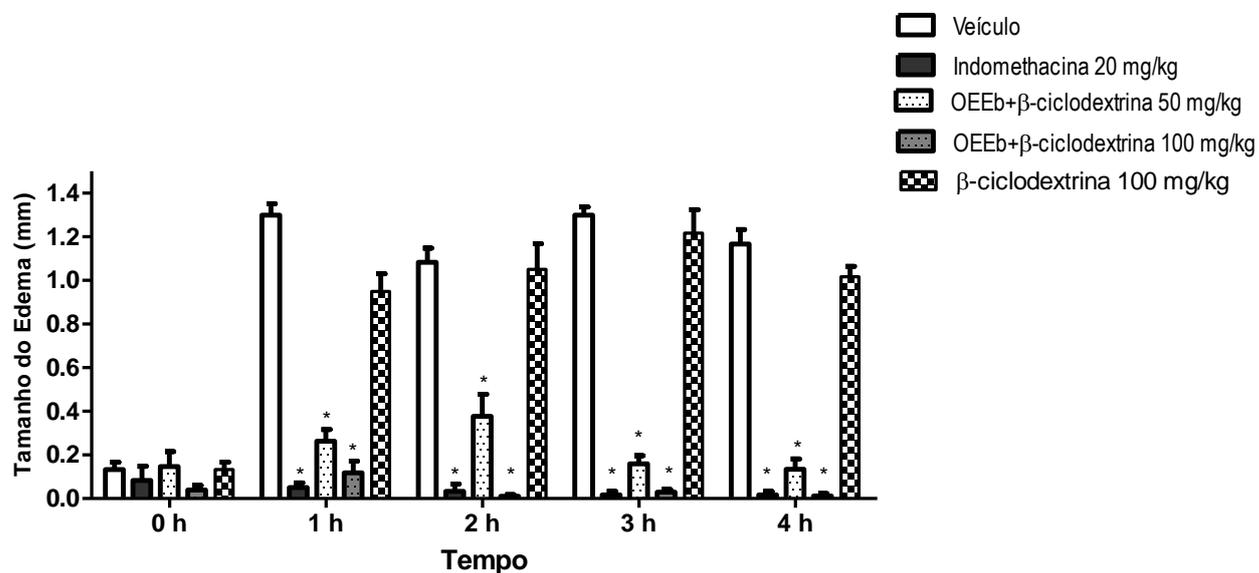


Figura 7. Efeito do complexo OEEb-β-CD (50mg/kg e 100mg/kg) no edema de pata induzido por carragenina. Cada barra representa a média e o desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados por two-way ANOVA seguida do teste de bonferroni. * indicam $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle (veículo).

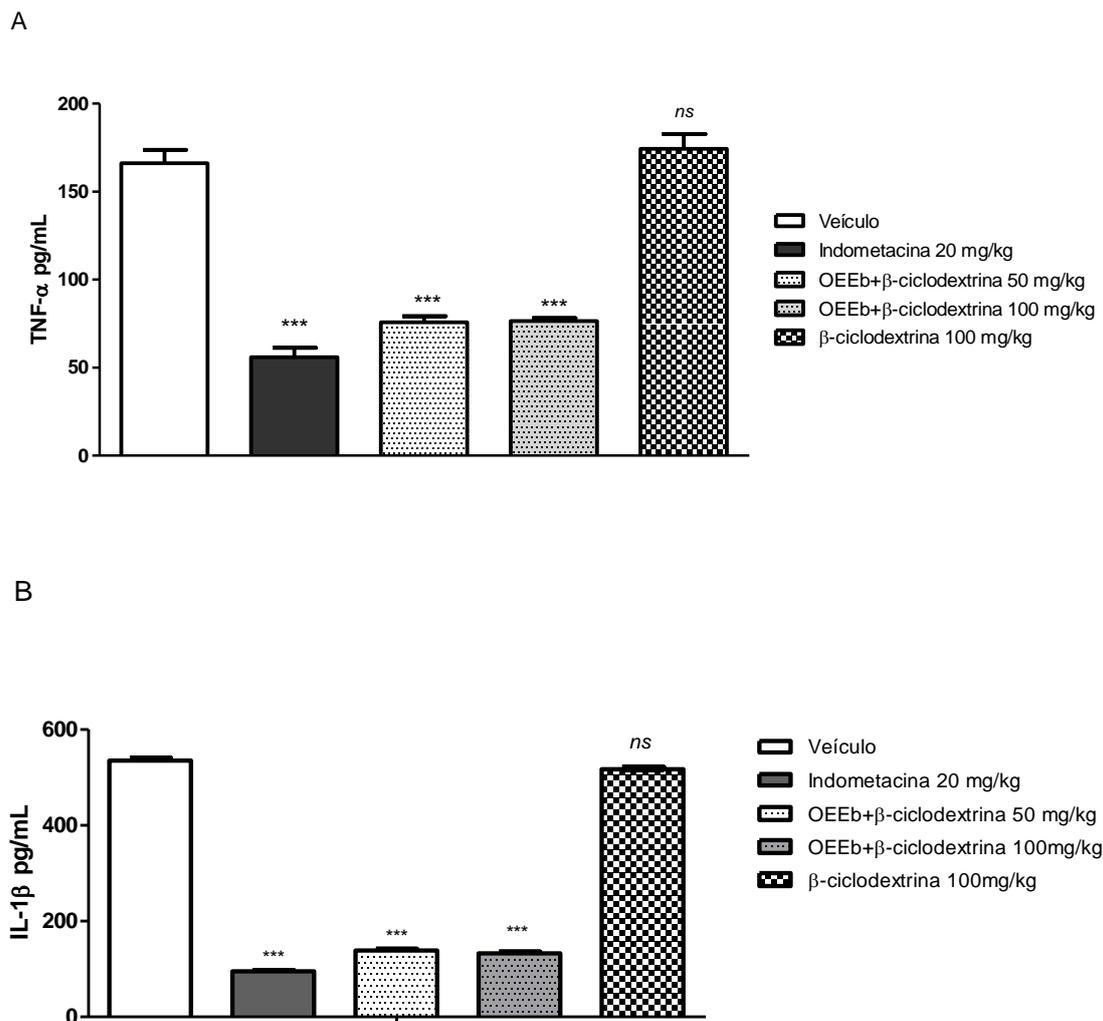


Figura 8. Efeitos do complexo OEEb- β -CD e da indometacina nos níveis de (A) TNF α , (B) IL-1 β . Os valores foram expressos em média aritmética \pm desvio padrão (DP) (n=6). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida de teste de Tukey. (***) P <0,001 em relação ao grupo controle.

3.3 Toxicidade aguda, Toxicidade subaguda e Toxicidade genética

A β -ciclodextrina é um oligossacarídeo utilizado como aditivo alimentar, com uma LD₅₀ superior a 3000mg/kg. Recentemente, recebeu o status GRAS (Generally Recognized as Safe) da FDA. Além disso, é comercializado como excipientes de alguns fármacos anti-inflamatórios (a exemplo o Brexin® - piroxicam) (Brewster and Loftsson, 2007; EFSA et al., 2016; Halahlah et al., 2021).

Assim, considerando esses aspectos, foi desprezada a inclusão de um grupo com β -ciclodextrina nos ensaios de toxicidade pré-clínica a fim de minimizar o uso de animais no estudo. Dessa forma, foram incluídos nestes ensaios apenas um grupo com o complexo OEEb- β -CD e outro grupo com o seu diluente para fins de investigação de alguns efeitos tóxicos em modelos pré-clínicos discutidos subsequentemente.

3.3.1 Toxicidade aguda e subaguda

Sabe-se que uma das principais limitações do emprego de alguns óleos essenciais como alternativa terapêutica é a toxicidade (Cimino et al., 2021). Assim, a formação de complexos de inclusão molecular configuram uma alternativa terapêutica interessante, visto que as ciclodextrinas podem aumentar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e efeitos adversos de fármacos acomodados em sua cavidade hidrofóbica (Li et al., 2016; Martins et al., 2020).

Na avaliação da toxicidade aguda, a administração oral de 2000 mg/kg do OEEb- β -CD não causou mortalidade e nem promoveu alterações comportamentais sensoriais ou motoras nos camundongos. Não houve diferenças significativas no ganho de peso, consumo de ração ou água, no decorrer dos 14 dias de acompanhamento, quando alinhado com o grupo controle tratado com solução salina 0,9% (Tabela 1). Além disso, não foram identificadas diferenças nos pesos dos órgãos dos camundongos tratados com o complexo ou tratados com solução salina 0,9%.

As análises histológicas dos órgãos (fígado, rins, baço e pulmão) dos camundongos não revelou lesões ou indícios associados a patológicas no grupo tratado como complexo OEEb- β -CD. A figura 9 mostra as fotomicrografias histológicas, onde se observou o fígado com a veia centrotubular definida nos grupos controle e OEEb- β -CD; os glomérulos renais e tubos contorcidos apresentaram-se preservados e ordenados; o baço revelou uma arquitetura normal com visualização de uma cápsula constituída de tecido conjuntivo denso não modelado e células musculares lisas; e no pulmão foram visualizados os bronquíolos e a cavidade alveolar também com morfologias conservadas em ambos os grupos analisados. Estas observações morfológicas em órgãos de animais tratados com óleo essencial de *E. stipitata* também foram relatadas por Costa et al. (2020).

A análise dos parâmetros hematológicos é uma ferramenta analítica extremamente útil para determinar a segurança e estimar os efeitos de novos compostos químicos sobre

o sistema hematopoiético em humanos e animais (Ait Atmane et al., 2022). Verificou-se no ensaio de toxicidade aguda que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) nos parâmetros analisados (eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, VCM, CHMC, entre outros) no sangue de camundongos tratados com OEEb- β -CD e tratados com solução salina 0,9% (Tabela 2). Estes resultados revelam, por exemplo, que capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos não foi alterada e o tratamento não predisps os animais a quadros clínicos de anemias (Saheed et al., 2015).

Os níveis dos parâmetros bioquímicos no soro dos camundongos tratados com OEEb- β -CD em dose única e com solução salina são expostos na Tabela 4. A análise bioquímica mostrou que não houve alterações significativas entre os grupos em nenhum dos analitos avaliados ($p>0,05$). Estes resultados estão em concordância com as análises histológicas dos órgãos (fígado e rim), visto que os níveis dos biomarcadores hepáticos e renais (ALT, ALP, AST, creatina e ureia) se encontram em conformidade com os níveis observados no grupo controle. A análise desses resultados em conjunto com os parâmetros hematológicos, avaliação comportamental, acompanhamento de ganho de peso, consumo hídrico e alimentar sugerem que o complexo não foi tóxico na administração de 2000mg/kg em dose única no decorrer de 14 dias. Assim, não foi possível determinar a LD_{50} do complexo OEEb- β -CD conforme preconizado pela OEDC (2001), uma vez que está se encontra acima da concentração avaliada no presente ensaio. Dessa forma, o complexo OEEb- β -CD pode ser categorizado na classificação 5 (não tóxico) do Sistema Global Harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS) (OECD, 2001).

O estudo da toxicidade oral subaguda para avaliar os efeitos tóxicos no tratamento diário com o complexo OEEb- β -CD por 28 dias, não foram observadas anormalidades comportamentais, incluindo irritabilidade, alteração na resposta ao toque, ou óbito dos camundongos no decorrer do experimento. Na avaliação de ganho de peso, consumo de ração ou água não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com o complexo; também não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos (machos e fêmeas) com o tratamento na mesma dosagem (Tabela 1). Além disso, os níveis de glicose e temperatura retal foram registrados no decorrer do tratamento (Figura 10). Na avaliação da temperatura retal não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que receberam o tratamento e o grupo controle. Verificou-se nos grupos (fêmeas e machos)

tratados com as doses (250, 500 e 1000 mg/kg) do complexo a diminuição da glicemia quando comparados com o grupo controle, sendo verificada redução gradativa de acordo com o progresso do tratamento (Figura 10 A e B).

Bonomini et al. (2017) afirmam que a redução do peso corporal ou do peso relativos dos órgãos de animais expostos a uma substância teste são indicativos de efeitos tóxicos. Conforme mostra a Tabela 2 não foram observadas diferenças significativas no peso dos órgãos entre os grupos avaliados. Além, disso na avaliação macroscópica dos órgãos (rim, baço, pulmão coração e estômago) não mostrou indícios de hemorragias, lesões, fibrose.

Um estudo realizado por Okereke et al.(2020) mostrou que a administração diária do óleo de *Anacardium occidentale* L por 14 dias é tóxico para o consumo humano, pois promove consideráveis alterações nos parâmetros hematológicos, incluindo diminuição dos eritrócitos, hemoglobinas e plaqueta, elevando os níveis de colesterol total, triglicerídeos e os biomarcadores enzimáticos hepáticos e renais. Adane et al. (2021) mostraram que a administração oral de 260mg/kg do óleo essencial de *Thymus schimperi* por 28 dias compromete o ganho de massa corporal, os parâmetros bioquímicos e hematológicos, sem promover alterações significativas na estrutura dos órgãos.

O fígado é o órgão que desempenha a biotransformação de xenobióticos e, por isso, pode apresentar alterações fisiológicas mais acentuadas em comparação com outros órgãos (Messelmani et al., 2022). Biomarcadores hepáticos, como AST e ALT, em níveis elevados no soro de animais tratados com uma substância teste são indicativos de danos hepáticos em diferentes graus (Luo et al., 2014). Em nosso estudo, a elevação da ALT, mesmo não sendo estatisticamente significativo, foi consistente com a avaliação histopatológica do fígado dos camundongos tratados com doses de 500mg/kg e 1000mg/kg do complexo. Além disso, a dose de 250mg/kg mostrou ser mais segura no estudo de toxicidade subaguda. Considerando o algoritmo de conversão de dosagens utilizada nos testes de toxicidade, a dose de 250mg/kg administrada nos camundongos equivalente 15 vezes a dose efetiva em humanos, sendo considerada segura para o tratamento farmacológico como analgésico e anti-inflamatório proposto em nosso estudo (Nair and Jacob, 2016).

Adicionalmente, foi avaliada a atuação do complexo OEEb- β -CD sobre o estresse oxidativo no fígado dos animais tratados por 28 dias com as doses 250, 500 e 1000 mg/kg. Não houve diferenças significativas nos níveis de CAT entre os grupos que receberam tratamento e o grupo controle. Foi observado a redução significativa nos níveis de MDA

nos grupos dos machos tratados com as doses de 500 e 1000 mg/kg. Além disso, os níveis de SOD aumentaram significativamente nos grupos dos camundongos fêmeas e machos em todos os tratamentos quando analisados com os níveis de SOD dos camundongos do grupo controle. Esses resultados mostram que o complexo OEEb- β -CD pode exercer atividade antioxidante com aumento dos níveis de enzimas antioxidantes, como a SOD que é considerada uma opção terapêutica em doenças mediadas por espécies reativas de oxigênio, visto que, atua catalisando a dismutação de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio; e assim, promove a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio e modula alguns sinais celulares (Nguyen et al., 2020; Karmakar et al., 2022).

Estudos mostram que compostos químicos obtidos a partir de plantas, entre eles terpenos e compostos fenólicos, podem reduzir o estresse oxidativo no organismo por via do aumento da atividade de enzimas antioxidantes endógenas (Meira et al., 2020). O óleo essencial de *Mentha pulegium*, por exemplo, constituído por sesquiterpenos, incluindo o transcariofileno e óxido de cariofileno que são compostos também descritos para o óleo essencial de *E. brejoensis*, promove a redução do estresse oxidativo provocado por patogênese a partir da elevação dos níveis de enzimáticos de SOD no intestino dos camundongos tratados com o óleo por via oral (Sebai et al., 2021).

Tabela 1. Acompanhamento do ganho de peso, consumo alimentar e hídrico em camundongos tratados com OEEb- β -CD ou com solução salina 0,9% para avaliação da toxicidade aguda (dose única) e toxicidade subaguda (doses repetidas por 28 dias)

Parâmetros	Toxicidade Aguda		Toxicidade subaguda 28 dias							
			Fêmeas				Machos			
	Veículo	2000mg/kg	Veículo	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	Veículo	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
Consumo de ração (g)	14.65±0.85	12.68±0.05	30.04±0.10	30.92±0.76	30.54±0.43	30.88±0.70	31.43±0.64	30.57±0.29	31.73±0.83	31.92±0.69
Consumo de água (mL)	30.21±0.15	27.46±0.07	50.36±0.24	52.79±1.4	51.78±0.51	51.0±0.06	50.37±0.21	51.18±0.20	52.50±0.07	52.15±0.05
Ganho de peso do animal (g)	3.12±0.54	2.98±1.01	9.50±0.04	9.4±0.08	9.6±0.74	10.2±0.08	9.43±0.26	9.20±0.24	10.4±0.61	10.6±0.26

Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (n = 3) para toxicidade aguda e (n = 10) para toxicidade subaguda. Foi avaliado por ANOVA seguida do teste de Tukey . (p> 0,05) .

Tabela 2. Massa (g) dos órgãos dos camundongos tratados com OEEb- β -CD ou solução salina 0,9% após 14 dias e 28 dias da administração.

Parâmetro	Toxicidade aguda		Toxicidade subaguda 28 dias							
			Fêmeas				Machos			
	Veículo	2000mg/kg	Controle	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	Veículo	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
Fígado	1.6±0.13	1.43±0.14	2.05±0.02	1.96±0.17	1.95±0.22	1.97±0.38	2.25±0.10	2.23±0.14	2.24±0.37	2.16±0.23
Rim	0.32±0.01	0.36±0.03	0.22±0.01	0.21±0.01	0.20±0.01	0.20±0.00	0.26±0.14	0.28±0.03	0.28±0.01	0.24±0.04
Baço	0.14±0.01	0.15±0.02	0.19±0.06	0.18±0.01	0.20±0.02	0.20±0.03	0.19±0.02	0.18±0.16	0.20±0.01	0.17±0.03
Pulmão	0.21±0.19	0.19±0.02	0.23±0.05	0.24±0.05	0.22±0.03	0.21±0.01	0.20±0.01	0.24±0.05	0.21±0.02	0.20±0.01
Estômago	0.31±0.05	0.28±0.04	0.30±0.03	0.33±0.05	0.32±0.01	0.31±0.05	0.34±0.00	0.35±0.03	0.32±0.06	0.31±0.08
Coração	0.16±0.02	0.13±0.02	0.19±0.02	0.16±0.01	0.14±0.01	0.155±0.01	0.18±0.02	0.19±0.02	0.18±0.02	0.17±0.01

Os valores correspondem à média \pm desvio padrão. Não foi encontrada diferenças significativas (ANOVA- teste de Tukey, $p>0,05$) em relação com o grupo controle.

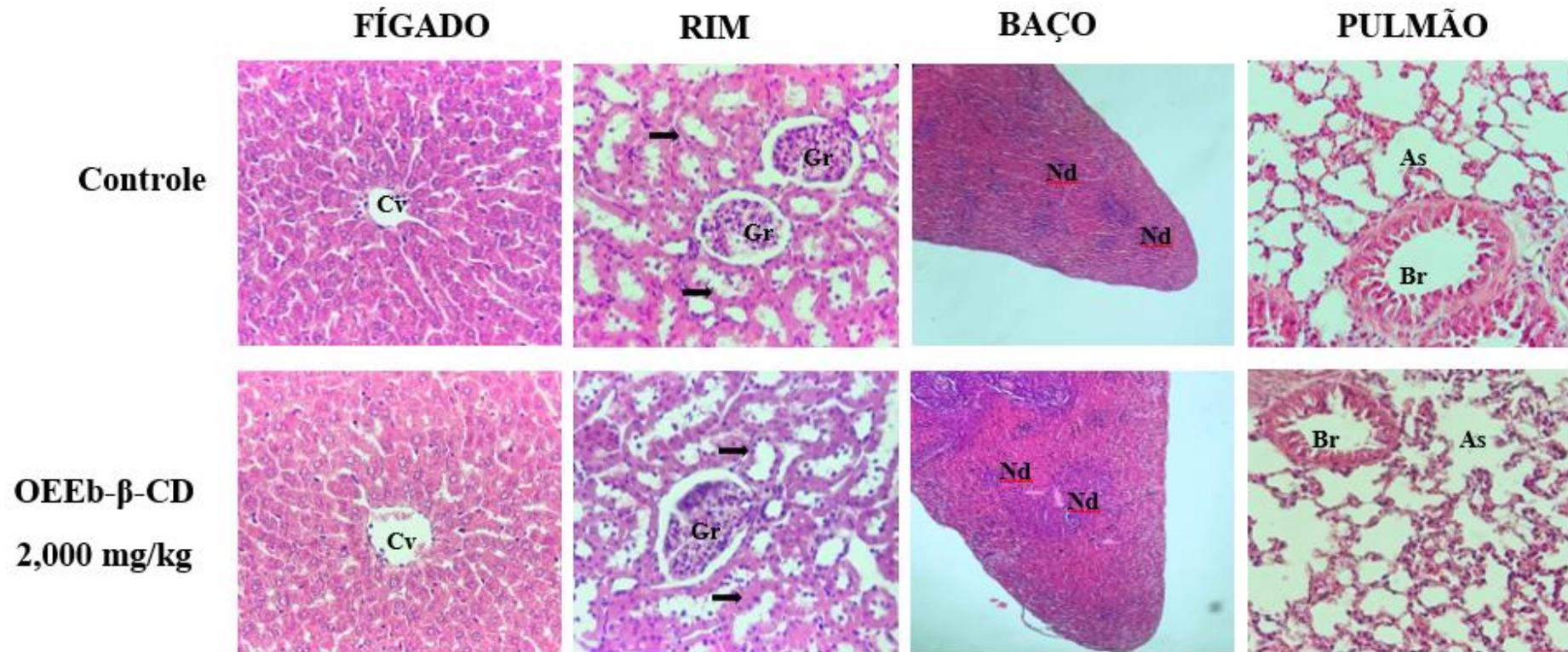


Figura 9. Fotomicrografias representativas dos fígados, rim, baço e pulmão de camundongos fêmeas dos grupos controle e tratados com dose única com o OEEb- β -CD na dose de 2000mg/kg. Fígados: a veia centrolobular (cv); Rins: Glomérulos renais (Gr).Baço: Os linfonodos (Nd). Pulmão: bronquíolos (Br) e cavidade alveolar (As). Foi utilizada coloração com hematoxilina e eosina. Ampliação: 400x.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com OEEb- β -CD

Parâmetro	Toxicidade aguda		Toxicidade subaguda 28 dias							
			Fêmeas				Machos			
	Veículo	2000mg/kg	Controle	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	Veículo	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
Eritrócitos (10^6 /mm ³)	5.35±0.15	5.51±0.52	5,32±0,80	5,72±0,77	5,60±0,82	5,21±0,93	5,44±0,30	5,28±0,45	5,30±0,52	5,24±0,31
Hematócrito (%)	39.15±1.23	39.58±1.35	40,10±0,53	40,66±1,84	41,03±1,41	40,32±1,35	42,10±0,43	43,40±1,24	41,87±1,34	42,26±1,33
Hemoglobina (%)	12.67±0.76	12.28±0.52	14,11±0,50	14,27±0,65	14,38±0,73	14,35±0,63	14,39±0,32	14,18±0,36	13,99±0,45	14,47±0,68
VCM (%)	51.11±1.49	52.03±1.63	42,22±0,56	42,43±0,72	42,33±0,90	42,73±1,03	42,76±0,56	43,07±0,79	43,01±0,79	42,31±0,92
HCM(%)	18.22±0.47	17.64±0.79	17,08±0,82	17,15±0,83	17,29±0,75	17,30±1,00	16,37±0,35	17,71±0,31	17,09±0,88	17,21±0,70
CHCM (%)	34.28±0.55	35.28±1.25	38,29±0,77	38,37±1,01	37,98±1,32	37,76±1,14	38,64±0,80	37,99±1,13	38,27±1,75	38,07±1,69
Leucócitos (10^3 /mm ³)	9.08±0.31	8.93±0.74	8,01±1,05	8,19±1,26	8,26±1,07	8,14±1,20	8,21±0,88	8,32±1,20	8,17±1,35	8,22±1,47
Segmentado (%)	70.25±2.22	71.55±2.01	61,65 ±0,74	62,04 ±0,90	61,90 ±1,12	62,17 ±1,64	62,45 ±1,41	62,54 ±1,16	62,40 ±1,84	62,20 ±2,07
Linfócitos (%)	24.24±0.18	23.24±0.29	28,19 ±0,68	27,60 ±0,95	27,73 ±0,95	27,52 ± 1,01	27,20 ±0,30	27,02 ±0,34	27,37 ±0,50	27,45 ± 1,05
Monócitos (%)	3.22±0.11	3.41±0.27	9,06±0,70	9,20±0,81	9,25±0,96	9,14±0,91	9,15±0,51	9,21±0,43	9,03±0,89	9,11±0,94
Eosinófilos (%)	0.02±0.01	0.04±0.03	1,08±0,12	1,12±0,07	1,09±0,11	1,15±0,12	1,15±0,10	1,18±0,12	1,86±0,10	1,20±0,11
Basófilos (%)	1.58±0.22	1.40±0.30	0,02±0,01	0,03±0,01	0,03±0,02	0,02±0,01	0,04±0,02	0,05±0,02	0,04±0,02	0,04±0,01

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3/grupo) para toxicidade aguda e (n=10/grupo) para toxicidade subaguda. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com OEEb- β -CD.

Parâmetro	Toxicidade aguda		Toxicidade subaguda 28 dias							
			Fêmeas				Machos			
	Veículo	2000mg/kg	Veículo	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	Veículo	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
Albumina (g/dL)	38,24 \pm 1,48	36,71 \pm 2,05	34,30 \pm 1,28	35,12 \pm 1,30	35,49 \pm 1,13	35,78 \pm 1,84	36,70 \pm 1,22	36,90 \pm 1,05	36,01 \pm 1,76	35,90 \pm 1,49
ALT (U/L)	58,70 \pm 1,22	57,60 \pm 2,11	60,10 \pm 1,03	60,34 \pm 1,35	60,65 \pm 1,44	61,02 \pm 1,56	60,92 \pm 0,44	61,10 \pm 0,66	61,22 \pm 1,06	61,46 \pm 1,31
AST (U/L)	134,52 \pm 6,31	130,82 \pm 5,46	132,22 \pm 4,11	131,67 \pm 4,25	133,91 \pm 5,32	134,03 \pm 4,82	131,54 \pm 2,72	129,94 \pm 2,64	130,44 \pm 2,09	131,02 \pm 3,18
ALP (IU/L)	13,85 \pm 0,18	13,14 \pm 0,64	13,27 \pm 0,73	13,40 \pm 0,65	13,29 \pm 0,81	13,74 \pm 0,91	13,82 \pm 0,31	13,01 \pm 0,72	13,09 \pm 0,65	13,51 \pm 0,89
GGT (U/L)	14,62 \pm 0,36	14,6 \pm 0,16	9,83 \pm 0,80	9,52 \pm 0,72	9,41 \pm 0,61	9,99 \pm 0,83	14,29 \pm 0,42	14,11 \pm 0,93	14,58 \pm 0,73	14,52 \pm 0,91
PT (g/dL)	62,44 \pm 1,18	61,02 \pm 1,79	62,64 \pm 1,54	62,86 \pm 1,26	63,01 \pm 1,22	63,73 \pm 1,43	65,82 \pm 0,75	65,29 \pm 0,21	65,57 \pm 0,93	65,70 \pm 1,06
BUN (mg/dL)	0.30 \pm 0.09	0.33 \pm 0.06	0,37 \pm 0,16	0,41 \pm 0,22	0,40 \pm 0,34	0,35 \pm 0,17	0,41 \pm 0,19	0,35 \pm 0,10	0,40 \pm 0,15	0,36 \pm 0,11
CREAT (mg/dL)	3,45 \pm 0,37	3,19 \pm 0,37	4,27 \pm 0,41	4,38 \pm 0,43	4,30 \pm 0,51	4,39 \pm 0,62	4,47 \pm 0,12	4,65 \pm 0,13	4,40 \pm 0,16	4,36 \pm 0,19
BILI (mg/dL)	-	-	0,29 \pm 0,07	0,25 \pm 0,05	0,31 \pm 0,09	0,32 \pm 0,09	0,35 \pm 0,03	0,32 \pm 0,05	0,31 \pm 0,04	0,30 \pm 0,05
CT (mg/dL)	98,76 \pm 2,41	97,46 \pm 2,55	98,94 \pm 8,50	97,86 \pm 5,74	96,30 \pm 6,13	95,64 \pm 5,22	99,37 \pm 7,85	97,72 \pm 6,50	96,79 \pm 5,25	95,88 \pm 7,83
TG (mg/dL)	64,2 \pm 1,52	66,58 \pm 2,83	69,54 \pm 4,19	67,73 \pm 4,10	66,93 \pm 6,11	67,46 \pm 5,18	65,36 \pm 4,12	64,28 \pm 5,12	65,43 \pm 5,33	65,36 \pm 4,30

ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; ALP: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamil transferase; PT: Proteína total; BUN: nitrogênio ureico no sangue; CREAT: Creatinina; BILI: Bilirrubina; CT: Colesterol Total; TG: Triglicerídeos. Os valores representam a média \pm SEM (n=3/grupo) para toxicidade aguda e (n=10/grupo) para toxicidade subaguda. Não foram encontradas diferenças significativas (p > 0,05) em comparação com o controle

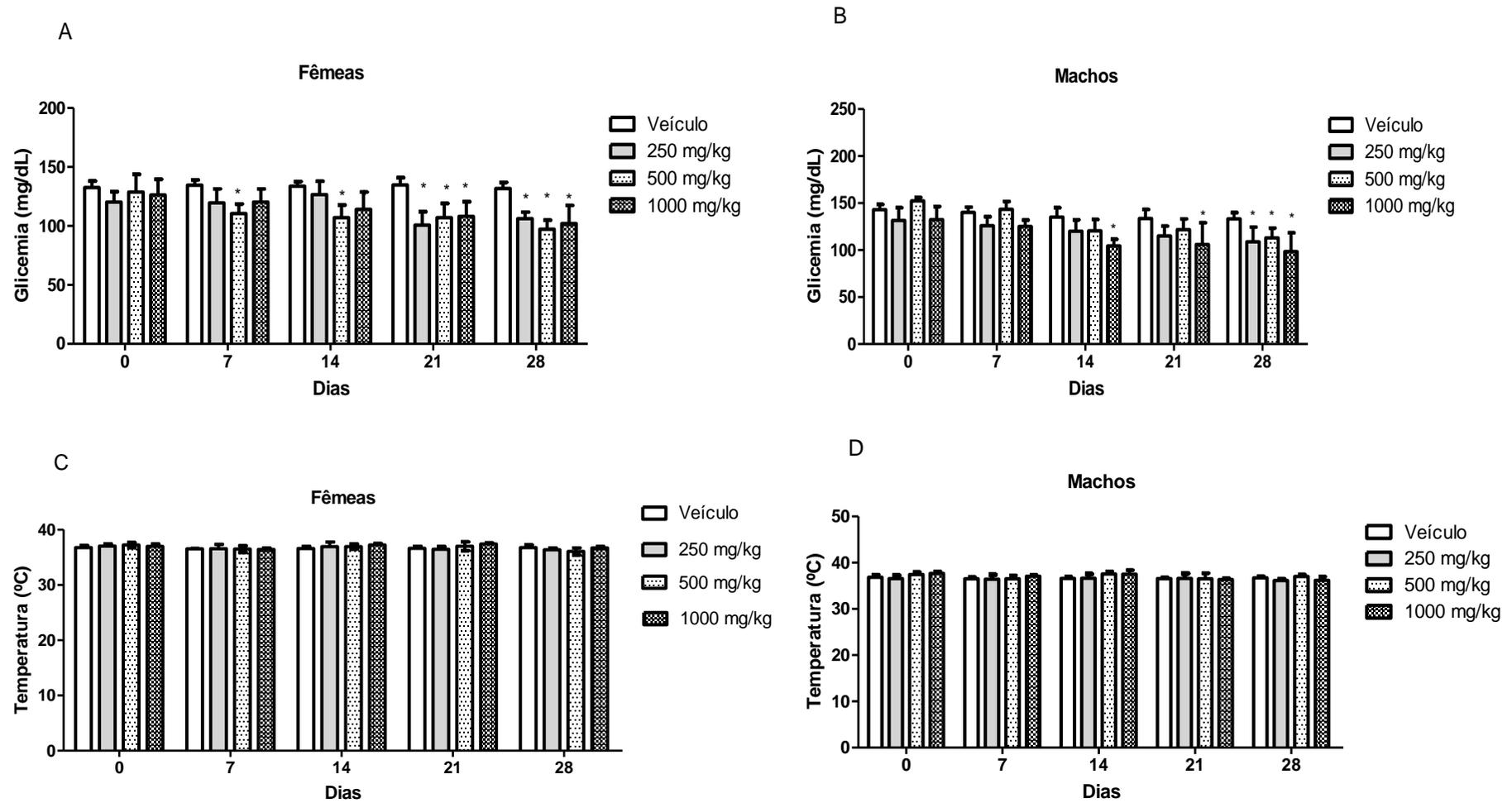


Figura 10. Avaliação da glicemia (A e B) e temperatura (C e D) em camundongos tratados diariamente com o OEEb- β -CD (250, 500 e 1000 mg/kg) e com solução salina 0,9% por 28 dias. * corresponde à diferença estatística em relação com o grupo controle ($p < 0,05$).

3.4 Genotoxicidade

O ensaio cometa e teste de micronúcleo são sistematicamente utilizados para estudar a capacidade de substâncias de causar possíveis mutações ou danos no DNA (Oliveira et al., 2022; Souza et al., 2021; OECD, 2016a, 2016b). Estes testes foram utilizados para investigar a capacidade genotóxica do complexo OEEb- β -CD. Não foi observado diferenças significativas ($p = 1$) na contagem de micronúcleos em eritrócitos policromáticos do sangue dos camundongos tratados com OEEb- β -CD (2000mg/kg) ou com o veículo (solução salina 0,9%). Por outro aspecto, os camundongos tratados com a ciclofosfamida (25mg/kg) apresentaram elevado número de micronúcleos, sendo estatisticamente significativos em relação ao grupo veículo, ($p < 0,05$). Igualmente, os resultados do ensaio cometam não revelaram aumento no ID e FD nas células analisadas. A análises estatística dos dados obtidos na avaliação do grupo tratado com OEEb- β -CD mostrou o ID e FD ($p > 0,05$) em relação as células nucleadas dos animais tratados com solução salina 0,9% (Figura 11). No grupo CP (ciclofosfamida 25mg/kg), houve o efeito genotóxico esperado, promovendo o aumento no ID e FD ($p < 0,05$) validando o experimento.

Os testes de genotoxicidade fornecem informações sobre o potencial de um possível novo fármaco causar danos genéticos, incluindo mutações no DNA, danos nos cromossomos ou interferência na capacidade reparação do DNA, indicadores preliminares do desenvolvimento de carcinogenicidade (Machado et al., 2021; Sawant et al., 2014).

Conquanto, a β -ciclodextrina e alguns óleos essenciais, a exemplo o óleo de uma espécie de *Eugenia* (*Eugenia caryophyllata*), sejam, geralmente, reconhecidos como seguros (GRAS) pela FDA, a aplicação de um processo de complexação molecular com o óleo essencial de *E. brejoensis* possibilita que compostos entrem livremente na célula ou no núcleo, sendo possível atuarem de forma sinérgica ou isolada no desenvolvimento de danos genéticos (Cimino et al., 2021; Sawant et al., 2014; Wüpper et al., 2021). Neste contexto, agências regulamentadoras recomenda a investigação sobre a toxicologia genética de novos aditivos para formulações farmacêutica (FDA, HHS, 2012; OECD, 2016; Tietje and Brouder, 2010). Assim, mesmo fármacos comercialmente consolidados e com eficácia comprada, após passar por processos de complexação molecular com ciclodextrinas são submetidos a análise de genotoxicidade a fim de confirmar a segurança de uso (Hadžiabdić et al., 2017; Maronpot, 2015). A partir dos resultados obtidos no ensaio cometa e teste de micronúcleo, tem-se que o OEEb- β -CD não promove efeitos

genotóxicos na administração oral de 2000mg/kg. Além disso, foi observado que o tratamento com o complexo pode promover efeito protetor no DNA quando avaliado o Índice de dano em relação ao controle negativo. Este resultado corrobora com os dados da avaliação dos níveis de antioxidantes endógenos no fígado dos animais tratados com o complexo no decorrer de 28 dias, em que foi observado o aumento nos níveis da enzima (SOD) que atua protegendo o DNA em relação a danos promovidos por espécies reativas de oxigênio (Nguyen et al., 2020).

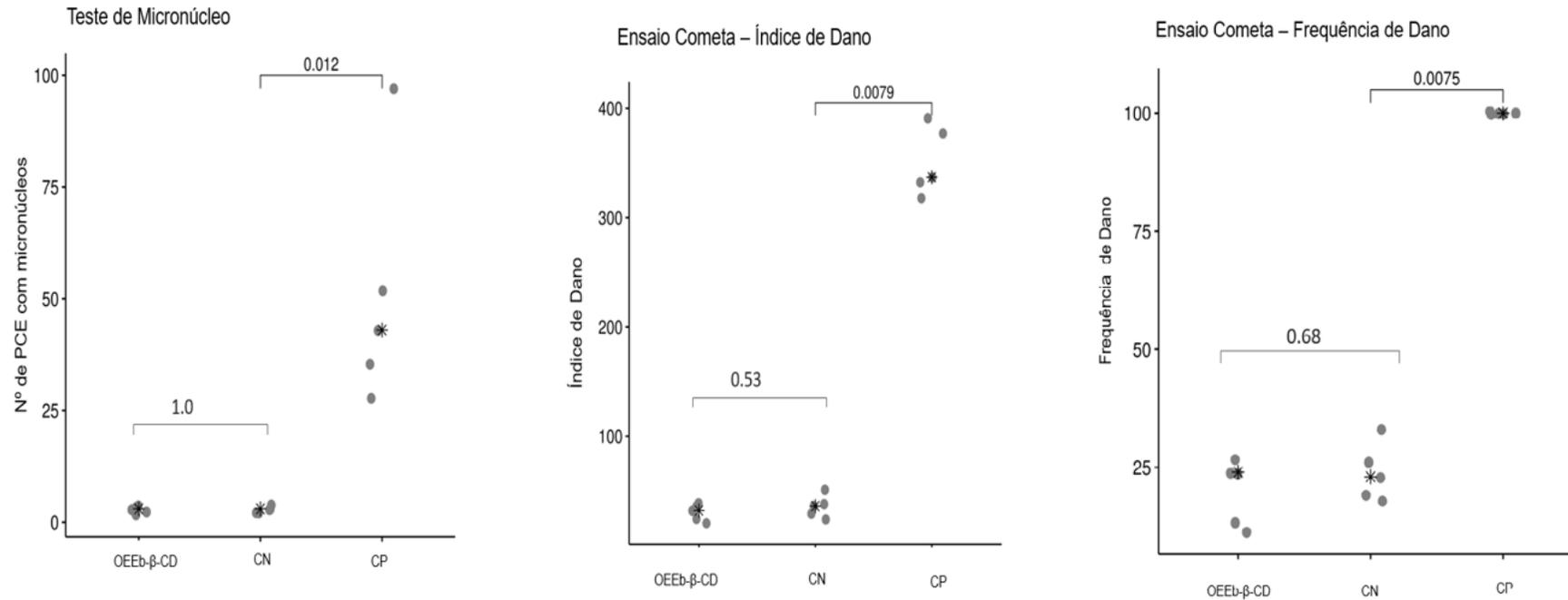


Figura 11. Teste de micronúcleo e ensaio cometa. PCE: eritrócitos policromáticos; CN: controle negativo (solução salina 0,9%); CP: controle positivo (ciclofosfamida - 25 mg/kg); OEEb-β-CD: Complexo de inclusão do óleo essencial de *E. brejoensis* com β-ciclodextrina (2000 mg/kg). Os asteriscos representam a média; os valores de p são apresentados em barras.

4. Conclusão

Este é o primeiro relato de atividade antinociceptiva, anti-inflamatório e de segurança no uso de complexos de inclusão de β -ciclodextrina com o óleo essencial de *E. brejoensis*. As técnicas de DSC, TG, MEV, DR-X confirmaram que foi possível formar complexos de inclusão utilizando os métodos de malaxagem e *slurry* entre β -ciclodextrina e o óleo essencial de *E. brejoensis*. O complexo OEEb- β -CD (*slurry*) mostrou atuar na inibição da nocicepção por mecanismos opioides e na modulação da inflamação com inibição de síntese de mediadores pró inflamatórios (TNF- α e IL-1 β). Além disso, OEEb- β -CD não promove toxicidade aguda nem genotoxicidade; atua na prevenção do estresse oxidativo, elevando os níveis de antioxidantes endógenos e é considerado seguro para administrações diárias de 250 mg/kg em tratamentos por 28 dias. Esses resultados sugerem que o OEEb- β -CD é uma abordagem interessante para veiculação do óleo essencial de *E. brejoensis* em novas formas farmacêuticas com fins terapêuticos no tratamento da dor e inflamação.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências financiadoras: Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Agradecem também ao apoio técnico da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Referências

- Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E., 2016. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry* 196, 968–975. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.023>
- Adane, F., Asres, K., Ergete, W., Woldekidan, S., Abebe, A., Lengiso, B., Seyoum, G., 2021. Composition of the Essential Oil *Thymus schimperi* and Evaluation of Its Acute and Subacute Toxicity in Wistar Albino Rats: In Silico Toxicity Studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2021, e5521302. <https://doi.org/10.1155/2021/5521302>
- Adedayo, L.D., Ojo, A.O., Awobajo, F.O., Adeboye, B.A., Adebisi, J.A., Bankole, T.J., Ayilara, G.O., Bamidele, O., Aitokhuehi, N.G., Onasanwo, S.A., 2019. Methanol extract of *Cola nitida* ameliorates inflammation and nociception in experimental animals. *Neurobiology of Pain* 5, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.jnypai.2019.100027>
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ait Atmane, S., Ait Eldjoudi, D., Aksoylu Özbek, Z., Günç Ergönül, P., Khettal, B., 2022. Acute and 28-day repeated dose toxicity evaluations of cold pressed *Pinus halepensis* Mill. seed oil in mice and rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 132, 105191. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105191>
- Anaya-Castro, M.A., Ayala-Zavala, J.F., Muñoz-Castellanos, L., Hernández-Ochoa, L., Peydecastaing, J., Durrieu, V., 2017. β -Cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: Preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. *Food Packaging and Shelf Life* 14, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.09.002>
- 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., Menezes, I.R.A., Nunes, P.S., Araújo, A.A.S., Costa, M.S., Campina, F.F., Santos, A.T.L., Silva, A.R.P., Coutinho, H.D.M., 2017. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in β -cyclodextrin. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.158>
- Araújo, F.F., Neri-Numa, I.A., de Paulo Farias, D., da Cunha, G.R.M.C., Pastore, G.M., 2019. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. *Food Research International* 121, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.018>
- Bars, D.L., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev* 53, 597–652.
- Basting, R.T., Nishijima, C.M., Lopes, J.A., Santos, R.C., Lucena Périco, L., Laufer, S., Bauer, S., Costa, M.F., Santos, L.C., Rocha, L.R.M., Vilegas, W., Santos, A.R.S., dos Santos,

- C., Hiruma-Lima, C.A., 2014. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 157, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.041>
- Beserra-Filho, J.I.A., de Macêdo, A.M., Leão, A.H.F.F., Bispo, J.M.M., Santos, J.R., de Oliveira-Melo, A.J., Menezes, P.D.P., Duarte, M.C., de Souza Araújo, A.A., Silva, R.H., Quintans-Júnior, L.J., Ribeiro, A.M., 2019. *Eplingiella fruticosa* leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin produces a superior neuroprotective and behavioral profile in a mice model of Parkinson's disease. *Food and Chemical Toxicology* 124, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.056>
- Bezerra Filho, C.M., da Silva, L.C.N., da Silva, M.V., Løbner-Olesen, A., Struve, C., Krogfelt, K.A., Correia, M.T.D.S., Vilela Oliva, M.L., 2020. Antimicrobial and Antivirulence Action of *Eugenia brejoensis* Essential Oil in vitro and in vivo Invertebrate Models. *Front Microbiol* 11, 424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00424>
- Bingham, S., Beswick, P.J., Blum, D.E., Gray, N.M., Chessell, I.P., 2006. The role of the cylooxygenase pathway in nociception and pain. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Pain* 17, 544–554. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2006.09.001>
- Bonomini, T.J., Holzmann, I., Thiesen, L.C., Fratoni, E., Muller, A.F.F., Lucinda-Silva, R.M., Yunes, R.A., Malheiros, A., Gonçalves, A.E., Dalmagro, A.P., da Silva, K.A.B.S., de Souza, M.M., Santin, J.R., 2017. Neuropharmacological and acute toxicological evaluation of ethanolic extract of *Allamanda cathartica* L. flowers and plumieride. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 91, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.005>
- Bradford, M.M., n.d. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding 7.
- Braga, R.M., de Andrade, H.H.N., Neto, H. de C.A., da Cruz, R.M.D., Assis, D.B., Cavalcante-Silva, L.H.A., Rodriguez-Mascarenhas, S., Pordeus, L.C. de M., Quintans-Junior, L.J., de Almeida, R.N., 2021. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Lippia pedunculosa* Hayek essential oil and its β -cyclodextrin inclusion complex. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*; Vol. 20 No. 2: March 2021; 162-176. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.2.13>
- Brewster, M.E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 645–666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>
- Brito, W.A., Ferreira, M.R.A., de Sousa Dantas, D., Soares, L.A.L., 2022. Biological activities of *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) extracts in oxidative stress-induced pathologies: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *PharmaNutrition* 20, 100290. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100290>
- Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J.C., Simal-Gandara, J., Astray, G., 2022. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chemistry* 384, 132467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132467>

- Cimino, C., Maurel, O.M., Musumeci, T., Bonaccorso, A., Drago, F., Souto, E.M.B., Pignatello, R., Carbone, C., 2021. Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. *Pharmaceutics* 13, 327. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030327>
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
- Costa, W.K., Oliveira, J.R.S. de, Oliveira, A.M. de, Santos, I.B. da S., Cunha, R.X. da, Freitas, A.F.S. de, Silva, J.W.L.M. da, Silva, V.B.G., Aguiar, J.C.R. de O.F. de, Silva, A.G. da, Navarro, D.M. do A.F., Lima, V.L. de M., Silva, M.V. da, 2020. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Industrial Crops and Products* 144, 112059. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112059>
- Das, S., Gazdag, Z., Szente, L., Meggyes, M., Horváth, G., Lemli, B., Kunsági-Máté, S., Kuzma, M., Kőszegi, T., 2019. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin – captured essential oils. *Food Chemistry* 278, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.047>
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M.J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Leblanc, J.-C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Parent-Massin, D., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R.A., Wright, M., Younes, M., Boon, P., Chrysafidis, D., Gürtler, R., Tobbäck, P., Arcella, D., Rincon, A.M., Lambré, C., 2016. Re-evaluation of β -cyclodextrin (E 459) as a food additive. *EFSA Journal* 14, e04628. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4628>
- Food and Drug Administration, HHS, 2012. International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice. *Fed Regist* 77, 33748–33749.
- Goh, C.F., Lane, M.E., 2022. Advanced structural characterisation of pharmaceuticals using nano-thermal analysis (nano-TA). *Advanced Drug Delivery Reviews* 180, 114077. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114077>
- Gomes Vidal Sampaio, M., Bezerra Dos Santos, C.R., Cortez Sombra Vandesmet, L., Souza Dos Santos, B., Bianca Da Silva Santos, I., Correia, M.T.D.S., Lima de Berrêdo Martins, A., Nascimento da Silva, L.C., De Alencar Menezes, I.R., Veja Gomez, M.C., Da Silva, M.V., 2021. Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil. *Nat Prod Res* 35, 1914–1918. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644506>
- Gratieri, T., Pinho, L.A.G., Oliveira, M.A., Sa-Barreto, L.L., Marreto, R.N., Silva, I.C., Gelfuso, G.M., de Souza Siqueira Quintans, J., Quintans-Junior, L.J., Cunha-Filho, M., 2020. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-complexed naringenin by solvent change precipitation for improving anti-inflammatory effect in vivo. *Carbohydrate Polymers* 231, 115769. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115769>

- Hadžiabdić, J., Kopjar, N., Želježić, D., Špirtović-Halilović, S., Završnik, D., 2017. Cytogenotoxicity of Inclusion Complexes of Diazepam with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Res (Stuttg)* 67, 661–672. <https://doi.org/10.1055/s-0043-115123>
- Halahlah, A., Kavetsou, E., Pitterou, I., Grigorakis, S., Loupassaki, S., Tziveleka, L.-A., Kikionis, S., Ioannou, E., Detsi, A., 2021. Synthesis and characterization of inclusion complexes of rosemary essential oil with various β -cyclodextrins and evaluation of their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 65, 102660. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102660>
- Hassanpour, S., Rezaei, H., Razavi, S.M., 2020. Anti-nociceptive and antioxidant activity of betaine on formalin- and writhing tests induced pain in mice. *Behavioural Brain Research* 390, 112699. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112699>
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M., 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 245, 245–249. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-b](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-b)
- Herrera, A., Rodríguez, F.J., Bruna, J.E., Abarca, R.L., Galotto, M.J., Guarda, A., Mascayano, C., Sandoval-Yáñez, C., Padula, M., Felipe, F.R.S., 2019. Antifungal and physicochemical properties of inclusion complexes based on β -cyclodextrin and essential oil derivatives. *Food Research International* 121, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.026>
- Jisha, N., Vysakh, A., Vijeesh, V., Latha, M.S., 2019. Anti-inflammatory efficacy of methanolic extract of *Muntingia calabura* L. leaves in Carrageenan induced paw edema model. *Pathophysiology* 26, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2019.08.002>
- John de Oliveira Melo, A., Heimarth, L., Maria dos Santos Carvalho, A., de Souza Siqueira Quintans, J., Serafini, M.R., Antunes de Souza Araújo, A., Alves, P.B., Ribeiro, A.M., Shanmugam, S., Quintans-Júnior, L.J., Duarte, M.C., 2020. *Eplingiella fruticosa* (Lamiaceae) essential oil complexed with β -cyclodextrin improves its anti-hyperalgesic effect in a chronic widespread non-inflammatory muscle pain animal model. *Food and Chemical Toxicology* 135, 110940. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110940>
- Junior, J.A.A. do N., Filho, C.M.B., Oliveira, T.H.F. de, Silva, A.G. da, Bezerra-Silva, P.C., Paiva, P.M.G., Silva, M.V. da, Navarro, D.M. do A.F., Silva, L.C.N. da, Correia, M.T. dos S., 2018. Spermostatic activity of *Eugenia brejoensis* and *Myroxylon peruiferum* essential oils toward human spermatozoa. *JMPR* 12, 264–269. <https://doi.org/10.5897/JMPR2018.6614>
- Kavetsou, E., Pitterou, I., Katopodi, A., Petridou, G., Adjali, A., Grigorakis, S., Detsi, A., 2021. Preparation, Characterization, and Acetylcholinesterase Inhibitory Ability of the Inclusion Complex of β -Cyclodextrin–Cedar (*Juniperus phoenicea*) Essential Oil. *Micro* 1, 250–266. <https://doi.org/10.3390/micro1020019>
- Kiernan, J.A., 1999. HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL METHODS: THEORY AND PRACTICE, 3rd EDITION. *Shock* 12, 479.

- Kissinger, H.E., 1957. Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis. *Anal. Chem.* 29, 1702–1706. <https://doi.org/10.1021/ac60131a045>
- Kotronia, M., Kavetsou, E., Loupassaki, S., Kikionis, S., Vouyiouka, S., Detsi, A., 2017. Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. *Bioengineering* 4, 74. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030074>
- Kurkov, S.V., Loftsson, T., 2013. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 453, 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>
- Li, J., Zhang, S., Zhou, Y., Guan, S., Zhang, L., 2016. Inclusion complexes of fluconazole with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in aqueous solution: preparation, characterization and a structural insight. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 84, 209–217. <https://doi.org/10.1007/s10847-016-0598-z>
- Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J., Chen, J., 2007. γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 245–255. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1166-7>
- Lima, B. dos S., Campos, C. de A., da Silva Santos, A.C.R., Santos, V.C.N., Trindade, G. das G.G., Shanmugam, S., Pereira, E.W.M., Marreto, R.N., Duarte, M.C., Almeida, J.R.G. da S., Quintans, J. de S.S., Quintans, L.J., Araújo, A.A. de S., 2019. Development of morin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology* 126, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.038>
- Lin, Y., Huang, R., Sun, X., Yu, X., Xiao, Y., Wang, L., Hu, W., Zhong, T., 2022. The p-Anisaldehyde/ β -cyclodextrin inclusion complexes as a sustained release agent: Characterization, storage stability, antibacterial and antioxidant activity. *Food Control* 132, 108561. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108561>
- Liu, C., Zhang, W., Yang, H., Sun, W., Gong, X., Zhao, J., Sun, Y., Diao, G., 2014. A Water-Soluble Inclusion Complex of Pedunculoside with the Polymer β -Cyclodextrin: A Novel Anti-Inflammation Agent with Low Toxicity. *PLOS ONE* 9, e101761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101761>
- Luo, L., Schomaker, S., Houle, C., Aubrecht, J., Colangelo, J.L., 2014. Evaluation of Serum Bile Acid Profiles as Biomarkers of Liver Injury in Rodents. *Toxicological Sciences* 137, 12–25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft221>
- Luo, X., Zeng, L., Li, Q., Wang, Z., Kong, F., Bi, Y., 2022. β -cyclodextrin inclusion complex containing essential oil from wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] fruit pericarp: Synthesis, characterization, and evaluation of antioxidant activity. *Journal of Molecular Structure* 133525. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133525>
- Machado, V.S., Verdi, C.M., Somacal, S., Rossi, G.G., Machado, M.L., Klein, B., Roos, V.C., Urquhart, C.G., Dalcol, I.I., Sagrillo, M.R., Machado, A.K., Campos, M.M., Wagner, R., Santos, R.C.V., 2021. *Achyrocline flaccida* essential oil from Brazil: phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditis elegans*, and

- antimycobacterial activity. *Natural Product Research* 35, 5899–5903. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1802269>
- Magalhães, T.S.S., de Oliveira Macedo, P.C., da Costa, É.C.P., de Aragão Tavares, E., da Silva, V.C., Guerra, G.C.B., Pereira, J.R., de Araújo Moura Lemos, T.M., de Negreiros, M.M.F., de Oliveira Rocha, H.A., Converti, A., de Lima, Á.A.N., 2021. Increase in the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Euterpe oleracea* Martius Oil Complexed in β -Cyclodextrin and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 11524. <https://doi.org/10.3390/ijms222111524>
- Magalhães, T.S.S., de Oliveira Macedo, P.C., Kawashima Pacheco, S.Y., Silva, S.S. da, Barbosa, E.G., Pereira, R.R., Costa, R.M.R., Silva Junior, J.O.C., da Silva Ferreira, M.A., de Almeida, J.C., Rolim Neto, P.J., Converti, A., Neves de Lima, Á.A., 2020. 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* 21, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms21030942>
- Malone, M.H., n.d. THE PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF NATURAL PRODUCTS -. GENEAL AND SPECIFIC APPROACHBS TO SCREENING ETHNOPHARMACEUTICALS 21.
- Maronpot, R.R., 2015. Toxicological assessment of Ashitaba Chalcone. *Food and Chemical Toxicology* 77, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.021>
- Marreto, R.N., Almeida, E.E.C.V., Alves, P.B., Niculau, E.S., Nunes, R.S., Matos, C.R.S., Araújo, A.A.S., 2008. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochimica Acta* 475, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.06.015>
- Menezes, P., A. de S. Araujo, A., Anne A. Doria, G., J. Quintans-Junior, L., G.B. de Oliveira, M., R.V. dos Santos, M., F. de Oliveira, J., do R. Matos, J., M. de S. Carvalho, F., B. Alves, P., L. de Matos, I., A. dos Santos, D., N. Marreto, R., F. da Silva, G., R. Serafini, M., 2015. Physicochemical Characterization and Analgesic Effect of Inclusion Complexes of Essential Oil from *Hyptis pectinata* L. Poit Leaves with β -Cyclodextrin. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 16, 440–450.
- Meira, E.F., Oliveira, N.D., Mariani, N.P., Porto, M.L., Severi, J.A., Siman, F.D.M., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Gava, A.L., 2020. *Eugenia uniflora* (pitanga) leaf extract prevents the progression of experimental acute kidney injury. *Journal of Functional Foods* 66, 103818. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103818>
- Mendes, J.F., Martins, H.H.A., Otoni, C.G., Santana, N.A., Silva, R.C.S., Da Silva, A.G., Silva, M.V., Correia, M.T.S., Machado, G., Pinheiro, A.C.M., Piccoli, R.H., Oliveira, J.E., 2018. Chemical composition and antibacterial activity of *Eugenia brejoensis* essential oil nanoemulsions against *Pseudomonas fluorescens*. *LWT* 93, 659–664. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.015>

- Messelmani, T., Morisseau, L., Sakai, Y., Legallais, C., Goff, A.L., Leclerc, E., Jellali, R., 2022. Liver organ-on-chip models for toxicity studies and risk assessment. *Lab on a Chip*. <https://doi.org/10.1039/D2LC00307D>
- Mura, P., 2015. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 113, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.058>
- Nair, A.B., Jacob, S., 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7, 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Nguyen, N.H., Tran, G.-B., Nguyen, C.T., 2020. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *J Mol Med* 98, 59–69. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01845-2>
- Nunes, T.A. de L., Costa, L.H., De Sousa, J.M.S., De Souza, V.M.R., Rodrigues, R.R.L., Val, M. da C.A., Pereira, A.C.T. da C., Ferreira, G.P., Da Silva, M.V., Da Costa, J.M.A.R., Vêras, L.M.C., Diniz, R.C., Rodrigues, K.A. da F., 2021. Eugenia piauhiensis Vellaff. essential oil and γ -elemene its major constituent exhibit antileishmanial activity, promoting cell membrane damage and in vitro immunomodulation. *Chemico-Biological Interactions* 339, 109429. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109429>
- OECD, 2016a. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2016b. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2008. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2002. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Okereke, G., Emmanuel, O., Ude, V.C., Ekweogu, C.N., Ikpeazu, V.O., Ugbogu, E.A., 2020. Physicochemical characteristics, acute and subacute toxicity of cashew nut shell oil in Wistar rats. *Scientific African* 8, e00391. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00391>
- Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, A., Correia de Oliveira, M.R., Alcântara, I.S., Rodrigues, L.B., Cesário, F.R.A.S., da Silva, M.S.A., Castro, F.F. e, Nascimento, E.P. do, Albuquerque, T.R. de, Quintans Júnior, L.J., Araújo, A.A. de S., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A. de, Wanderley, A.G., 2021. Effect of the Croton rhamnifolioides Essential Oil and the Inclusion Complex (OEFC/ β -CD) in Antinociceptive Animal Models. *Macromol* 1, 94–111. <https://doi.org/10.3390/macromol1020008>

- Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, A., Wanderley, A.G., Alcântara, I.S., Rodrigues, L.B., Cesário, F.R.A.S., Correia de Oliveira, M.R., Castro, F.F. e, Albuquerque, T.R. de, da Silva, M.S.A., Ribeiro-Filho, J., Coutinho, H.D.M., Menezes, P.P., Quintans-Júnior, L.J., Araújo, A.A. de S., Iriti, M., Almeida, J.R.G. da S., Menezes, I.R.A. de, 2020. Anti-Inflammatory and Physicochemical Characterization of the *Croton rhamnifolioides* Essential Oil Inclusion Complex in β -Cyclodextrin. *Biology* 9, 114. <https://doi.org/10.3390/biology9060114>
- Oliveira de Souza, L.I., Bezzera-Silva, P.C., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., da Silva, A.G., dos Santos Correia, M.T., da Silva, M.V., de Figueiredo, R.C.B.Q., 2017. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96, 1055–1064. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121>
- Oliveira de Veras, B., Melo de Oliveira, M.B., Granja da Silva Oliveira, F., Queiroz dos Santos, Y., Saturnino de Oliveira, J.R., Lúcia de Menezes Lima, V., Guedes da Silva Almeida, J.R., Maria do Amaral Ferraz Navarro, D., Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar, J.C., Aguiar, J. dos S., Gorlach-Lira, K., Dias de Assis, C.R., Vanusa da Silva, M., Catarina de Souza Lopes, A., 2020. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 247, 112265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265>
- Oliveira, A.M., de Freitas, A.F.S., Costa, W.K., Machado, J.C.B., Bezerra, I.C.F., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Soares, L.A.L., 2022. Flavonoid-rich fraction of *Croton blanchetianus* Baill. (Euphorbiaceae) leaves: Chemical profile, acute and subacute toxicities, genotoxicity and antioxidant potential. *South African Journal of Botany* 144, 238–249. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.040>
- Oliveira, A.M., da Silva, W.A.V., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., de Medeiros, P.L., Soares, L.A.L., Carvalho, B.M., Napoleão, T.H., 2019. Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 234, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.036>
- Quintans-Júnior, L.J., Araújo, A.A.S., Brito, R.G., Santos, P.L., Quintans, J.S.S., Menezes, P.P., Serafini, M.R., Silva, G.F., Carvalho, F.M.S., Brogden, N.K., Sluka, K.A., 2016. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. *Life Sciences* 149, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.049>
- Quintans-Júnior, L.J., Barreto, R.S.S., Menezes, P.P., Almeida, J.R.G.S., Viana, A.F.S.C., Oliveira, R.C.M., Oliveira, A.P., Gelain, D.P., de Lucca Júnior, W., Araújo, A.A.S., 2013. β -Cyclodextrin-complexed (–)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (–)-linalool in experimental pain protocols. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 113, 167–172. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12087>
- R, K., 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 18, 412.

- Research, C. for D.E. and, 2020. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use [WWW Document]. U.S. Food and Drug Administration. URL <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/s2r1-genotoxicity-testing-and-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use> (accessed 6.17.22).
- Rocha Neto, A.C., de Oliveira da Rocha, A.B., Maraschin, M., Di Piero, R.M., Almenar, E., 2018. Factors affecting the entrapment efficiency of β -cyclodextrins and their effects on the formation of inclusion complexes containing essential oils. *Food Hydrocolloids* 77, 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>
- Rodrigues, 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., Quintans Júnior, L.J., Araújo, A.A. de S., Menezes, P. dos P., Nunes, P.S., Matos, I.G., Coutinho, H.D.M., Goncalves Wanderley, A., de Menezes, I.R.A., 2017. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice. *Food and Chemical Toxicology* 109, 836–846. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.027>
- Saheed, S., Oladipipo, A.E., Abdulazeez, A.A., Olarewaju, S.A., Ismaila, N.O., Emmanuel, I.A., Fatimah, Q.D., Aisha, A.Y., 2015. Toxicological evaluations of *Stigma maydis* (corn silk) aqueous extract on hematological and lipid parameters in Wistar rats. *Toxicology Reports* 2, 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.001>
- Santana, D.V.S., Trindade, I.A.S., Carvalho, Y.M.B.G., Carvalho-Neto, A.G., Silva, E.C.D., Silva-Júnior, E.F., Leite, R.F.S., Quintans-Júnior, L.J., Aquino, T.M., Serafini, M.R., Guterres, S.S., Scotti, L., Scotti, M.T., Araújo, A.A.S., Frank, L.A., Menezes, P.P., 2021. Analytical techniques to recognize inclusion complexes formation involving monoterpenes and cyclodextrins: A study case with (–) borneol, a food ingredient. *Food Chemistry* 339, 127791. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127791>
- Santos, I.B. da S., Santos dos Santos, B., Oliveira, J.R.S. de, Costa, W.K., Zagnignan, A., da Silva, L.C.N., Ferreira, M.R.A., Lermen, V.L., Lermen, M.S.B. de S., da Silva, A.G., Ximenes, R.M., Soares, L.A.L., Paiva, P.M.G., Lima, V.L. de M., Correia, M.T. dos S., da Silva, M.V., 2020. Antioxidant Action and In Vivo Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of *Myrciaria floribunda* Fruit Peels: Possible Involvement of Opioidergic System. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences* 2020, e1258707. <https://doi.org/10.1155/2020/1258707>
- Santos Souza, T.G., da Silva, M.M., Feitoza, G.S., de Melo Alcântara, L.F., da Silva, M.A., de Oliveira, A.M., de Oliveira Farias de Aguiar, J.C.R., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., de Aguiar Júnior, F.C.A., da Silva, M.V., Chagas, C.A., 2021. Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. *Journal of Ethnopharmacology* 272, 113941. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113941>
- Sawant, S.G., Fielden, M.R., Black, K.A., 2014. Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.06.005>

- Sebai, E., Abidi, A., Serairi, R., Marzouki, M., Saratsi, K., Darghouth, M.A., Sotiraki, S., Akkari, H., 2021. Essential oil of *Mentha pulegium* induces anthelmintic effects and reduces parasite-associated oxidative stress in rodent model. *Experimental Parasitology* 225, 108105. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108105>
- Silva, A.G., Alves, R.C.C., Filho, C.M.B., Bezerra-Silva, P.C., Santos, L.M.M. dos, Foglio, M.A., Navarro, D.M. do A.F., Silva, M.V. da, Correia, M.T. dos S., 2015. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 18, 1441–1447. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.1000390>
- Silva Júnior, W.F., Bezerra de Menezes, D.L., de Oliveira, L.C., Koester, L.S., Oliveira de Almeida, P.D., Lima, E.S., de Azevedo, E.P., da Veiga Júnior, V.F., Neves de Lima, Á.A., 2019. Inclusion Complexes of β and HP β -Cyclodextrin with α , β Amyrin and In Vitro Anti-Inflammatory Activity. *Biomolecules* 9, 241. <https://doi.org/10.3390/biom9060241>
- Siqueira-Lima, P.S., Brito, R.G., Araújo-Filho, H.G., Santos, P.L., Lucchesi, A., Araújo, A.A.S., Menezes, P.P., Scotti, L., Scotti, M.T., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Zengin, G., Aktumsek, A., Antonioli, A.R., Quintans-Júnior, L.J., Quintans, J.S.S., 2017. 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 & Pharmacotherapy* 91, 739–747. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.009>
- Souza, C.R.F., Ferraz-Freitas, P.N., Oliveira, W.P., 2016. COMPLEXOS DE INCLUSÃO BINÁRIOS, TERNÁRIOS E QUATERNÁRIOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides*. *Quím. Nova* 39, 979–986. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160108>
- Souza Sampaio, R., Petícia do Nascimento, E., Alencar de Menezes, I.R., Sales, V. dos S., Brito Pereira, A.O., Mendes de Lacerda, G., Santos, E.S., Pereira Lopes, M.J., Gomes da Silva, L., de Araújo Delmondes, G., Vieira, N.B., Zaia, V.M., Bezerra, D.S., Martins da Costa, J.G., Bezerra Felipe, C.F., Kerntopf, M.R., 2020. Antinociceptive activity of the *Psidium brownianum* Mart ex DC. leaf essential oil in mice. *Food and Chemical Toxicology* 135, 111053. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111053>
- Souza Siqueira Quintans, J., Menezes, P.P., Santos, M.R.V., Bonjardim, L.R., Almeida, J.R.G.S., Gelain, D.P., Araújo, A.A. de S., Quintans-Júnior, L.J., 2013. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine* 20, 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.009>
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j)
- Tietje, C., Brouder, A. (Eds.), 2010. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, in: *Handbook of*

Transnational Economic Governance Regimes. Brill | Nijhoff, pp. 1041–1053. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>

- Van Hees, T., Piel, G., de Hassonville, S.H., Evrard, B., Delattre, L., 2002. Determination of the free/included piroxicam ratio in cyclodextrin complexes: comparison between UV spectrophotometry and differential scanning calorimetry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 347–353. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00018-0](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00018-0)
- Vechi, G., Campos, A., Rosa, R.L. da, Capistrano, K., Zermiani, T., Buzzi, F. de C., Andrade, S.F. de, Filho, V.C., 2018. Analyses of chemical composition and gastroprotective and antinociceptive properties of *Eugenia involucrate* DC. leaves -. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8, 79–83.
- Veras, B.O., de Oliveira, J.R.S., de Menezes Lima, V.L., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., de Oliveira Farias de Aguiar, J.C.R., de Medeiros Moura, G.M., da Silva, J.W., de Assis, C.R.D., Gorchach-Lira, K., de Assis, P.A.C., de Souza Barbosa, J.I., de Melo, M.R.C.S., de Oliveira, M.B.M., da Silva, M.V., de Souza Lopes, A.C., 2021. The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology* 265, 113248. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248>
- Vinegar, R., Schreiber, W., Hugo, R., 1969. Biphasic Development of Carrageenin Edema in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 166, 96–103.
- Viscardi, D.Z., Arrigo, J. da S., Correia, C. de A.C., Kassuya, C.A.L., Cardoso, C.A.L., Maldonado, I.R., Argandoña, E.J.S., 2017. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. *PLOS ONE* 12, e0157107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157107>
- Wadhwa, G., Kumar, S., Chhabra, L., Mahant, S., Rao, R., 2017. Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 89, 39–58. <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0744-2>
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111, 544–547. <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27849>
- Wüpper, S., Lüersen, K., Rimbach, G., 2021. Cyclodextrins, Natural Compounds, and Plant Bioactives—A Nutritional Perspective. *Biomolecules* 11, 401. <https://doi.org/10.3390/biom11030401>
- Xiao, Z., Hou, W., Kang, Y., Niu, Y., Kou, X., 2019. Encapsulation and sustained release properties of watermelon flavor and its characteristic aroma compounds from γ -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Hydrocolloids* 97, 105202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105202>

4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *E. brejoensis* tem atividade antinociceptiva e anti-inflamatória para administração por via oral. No teste de contorção abdominal atuou reduzindo em 68% (50mg/kg) e 75% (100mg/kg) o número de contorções. No ensaio formalina, verificou-se que o óleo atua nas fases neurogênica e anti-inflamatória com envolvimento do sistema opioide. Em relação à atividade anti-inflamatória, o óleo reduziu o edema de pata (89%) e os níveis de citocinas pró inflamatórias ($p < 0,05$). Na toxicidade aguda, a administração de 2000mg/kg do óleo não proveu efeitos adversos nos animais nem alterações nas análises histológica dos órgãos e parâmetros hematológicos. Porém, foi observada uma elevação dos biomarcadores hepáticos. Nenhum sinal de genotoxicidade foi observado no teste de micronúcleo e ensaio cometa nos animais tratados com 2000mg/kg do óleo.

Quatros sistemas microemulsionados foram desenvolvidos com o óleo essencial de *E. brejoensis* por diagrama de fases pseudoternários, na razão de 1:1 de surfactantes/co-surfactante, 5% do óleo essencial e água ultrapura. Três microemulsões foram classificadas como newtonianas com viscosidade constante, e uma microemulsão apresentou perfil não newtoniana do tipo pseudoplástico com viscosidade aparente. A microemulsão constituído por 5% de óleo, 20% de tensoativos e 75% de água (ME 2) foi selecionado para investigação das atividades biológicas por apresentar melhor comportamento no parâmetro de condutividade, tamanho de partículas e ser classificado como uma microemulsão tipo O/A, sendo ideal para administrações tópicas. A ME 2 não foi tóxica em fibroblasto e promoveu atividade anti-inflamatória com redução do edema na orelha de camundongos nos intervalos de 2 - 4 horas. Na avaliação da resposta ao tratamento com ME 2 na dor aguda (contorção abdominal) e na ação central (movimento de cauda), revelou resultados promissores em comparação com o controle negativo e com a microemulsão inerte.

Complexos de inclusão do óleo essencial em β -ciclodextrina foram formados por dois métodos (malaxagem e slurry) e caracterizados por técnicas de DSC, TG, DR-X, MEV e UV-Vis. O complexo OEEb- β -CD (slurry) reduziu as contorções abdominais em 77,21% com administração de 100mg.kg. No teste de formalina, o complexo acompanhou o comportamento do óleo atuando nas duas fases e por vias opioides. A ação anti-inflamatória no o modelo de edema de pata promoveu redução máxima de 90% na dose de 100mg/kg; que foi acompanhada pela diminuição nos níveis de citocinas TNF- α (54%) e IL-1 β (75,14%) no teste de peritonite aguda. Na avaliação da segurança, o complexo não promoveu toxicidade aguda ou toxicidade

genética na administração de 2000mg/kg. A avaliação de toxicidade subaguda, o complexo se mostrou seguro para uso na dosagem de 250mg/kg no tratamento por 28 dias.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, D. P.; HARTLEY, P. G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 274-280, 2012.
- AGRA, M.F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.
- AGUIAR, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, p. 50-55, 2014.
- ALBERGARIA, E. T. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais localizadas na Unidade de Conservação Tatu-Bola, município de Lagoa Grande, PE-Brasil. 2019.
- ALBUQUERQUE, R. D. D. G. et al. Wound healing activity and chemical standardization of *Eugenia pruniformis* Cambess. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 48, p. 288, 2016.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76–91, 2007.
- ALHASSO, B. et al. Systematic review on the effectiveness of essential and carrier oils as skin penetration enhancers in pharmaceutical formulations. **Scientia Pharmaceutica**, v. 90, n. 1, p. 14, 2022.
- ALLAW, M. et al. Formulation of liposomes loading lentisk oil to ameliorate topical delivery, attenuate oxidative stress damage and improve cell migration in scratch assay. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112351, 2021.
- ALVES, J. E.O. et al. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 8, n. 1, p. 56-68, 2017.
- ANAYA-CASTRO, M. A. et al. β -Cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: Preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 14, p. 96-101, 2017.
- ANGELA, M. S. et al. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862-867, 2014.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (2016), «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV» (PDF), *Botanical Journal of the Linnean Society*, **181** (1): 1–20, doi:10.1111/boj.12385
- APKARIAN, A. V. et al. Towards a theory of chronic pain. **Progress in neurobiology**, v. 87, n. 2, p. 81-97, 2009.

ARAÚJO FILHO, J. **Manejo pastoril sustentável da caatinga**. IICA, Brasília (Brasil) Projeto Dom Helder Camara, Recife (Brasil) Projeto SEMEAR, Brasília (Brasil) Associação Brasileira de Agroecologia, Rio Grande do Sul (Brasil), 2013.

ARAÚJO, H. F. P. et al. The Caatinga region is a system and not an aggregate. **Journal of Arid Environments**, v. 203, p. 104778, 2022.

ARAÚJO, N. M. P. et al. Plants from the genus *Eugenia* as promising therapeutic agents for the management of diabetes mellitus: A review. **Food Research International**, v. 142, p. 110182, 2021a.

ARAÚJO, T. D. S. et al. Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 100-108, 2021b.

ARCOVERDE, J. H. V. et al. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1297–1301, 18 ago. 2014.

ARELLANO, S et al. Essential oil microemulsions inactivate antibiotic-resistant *Salmonella* Newport and spoilage bacterium *Lactobacillus casei* on Iceberg lettuce during 28-day storage at 4° C. **Food Control**, v. 130, p. 108209, 2021.

ASHLEY, N. et al. Inflamação: mecanismos, custos e variação natural. **Revisão Anual de Ecologia, Evolução e Sistemática**, v. 43, p. 385-406, 2012.

ASSIS, K. M. A. et al. Bicontinuous microemulsions containing *Melaleuca alternifolia* essential oil as a therapeutic agent for cutaneous wound healing. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1748-1763, 2020.

ATTIQ, A. et al. The triumvirate of NF- κ B, inflammation and cytokine storm in COVID-19. **International immunopharmacology**, v. 101, p. 108255, 2021.

AUM, P. T. P. et al. Evaluation of oil-in-water microemulsion base ethoxylated surfactant under acid conditions. **Fuel**, v. 290, p. 120045, 2021.

AZEVEDO, P. R. et al. Antimicrobial activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, 2012.

BANKOGLU, E. E. et al. Short-and long-term reproducibility of the COMET assay for measuring DNA damage biomarkers in frozen blood samples of the EPIC-Heidelberg cohort. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, p. 503442, 2022.

BASTING, R. T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 257-267, 2014.

BASTOS, R. G. et al. Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC.(Myrtaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 317-332, 2019.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

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, p. 424, 2020.

BJARNASON, I. et al. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Gastroenterology**, v. 154, n. 3, p. 500-514, 2018.

BRAND, K. Pain assessment in children. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N°224, de 5 de abril de 2015**. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/9579136/do1-2018-04-09-resolucao-rdc-n-224-de-5-de-abril-de-2018-9579132. Acessado: 23 mar. 2019.

BRASIL. *Myrtaceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB171>>. Acesso em: 30 abr. 2022.

BRITO, M. T. et al. Antitumor activity and toxicity of volatile oil from the leaves of *Annona leptopetala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 602-609, 2018.

BRITO, T. G. et al. Anti-inflammatory, hypoglycemic, hypolipidemic, and analgesic activities of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Brazilian grape) epicarp. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, p. 113611, 2021.

BRUNTON, L. L. et al. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics 13e. McGraw Hill; 2017. Acessado em :05 maio 2022. Disponível em: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2189&ioid=165936845>

CABRAL, B. et al. Cardiovascular Effects Induced by Fruit Peels from *Passiflora edulis* in Hypertensive Rats and Fingerprint Analysis by HPLC-ESI-MSn spectrometry. **Planta Medica**, 2021.

CALLENDER, S. P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International journal of pharmaceuticals**, v. 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.

CAMPOS, C. A. et al. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. **Life sciences**, 229: 139–148, 2019.

CARNEIRO, S. B. et al. Cyclodextrin–drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 642, 2019.

CARTAXO, S. L. et al. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CARVALHO, L. M.; DA COSTA, J. A. M.; CARNELOSSI, M. A. G. Qualidade em plantas medicinais. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E)**, 2010.

CHANG, L. et al. Prediction of microemulsion phase behavior from surfactant and co-solvent structures. **Fuel**, v. 237, p. 494-514, 2019

CHANG, R. et al. A new approach for quantifying furanodiene and curzerene: a case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (pitangueira) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 392-396, 2011.

CHEN, S. N. et al. Subchronic toxicity and genotoxicity studies of *Herichium erinaceus* β -glucan extract preparation. **Current Research in Toxicology**, v. 3, p. 100068, 2022.

CHIAPPISI, L.; NOIREZ, L.; GRADZIELSKI, M. A journey through the phase diagram of a pharmaceutically relevant microemulsion system. **Journal of colloid and interface science**, v. 473, p. 52-59, 2016.

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, 2013.

CHOUDHURI, S. et al. A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 345, p. 109531, 2021.

CIARAMELLA, A. Psychopharmacology of chronic pain. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 165, p. 317-337, 2019.

CID-SAMAMED, A. et al. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. **Food Chemistry**, p. 132467, 2022.

CIMINO, C. et al. Essential oils: Pharmaceutical applications and encapsulation strategies into lipid-based delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 327, 2021.

COELHO, M. G. P. et al. Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos**, v. 7, n. 04, p. 245-251, 2013.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

CONCEIÇÃO, G. M. et al. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, 2011.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 57-63, 2002.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Bases farmacológicas para o uso empírico de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) como anti-hipertensivo. **Revista de etnofarmacologia** , v. 66, n. 1, pág. 33-39, 1999.

CONTINI, A. et al. Assessing the cytotoxic/genotoxic activity and estrogenic/antiestrogenic potential of essential oils from seven aromatic plants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 138, p. 111205, 2020

COSTA, W. K. et al. Antibacterial mechanism of *Eugenia stipitata* McVaugh essential oil and synergistic effect against *Staphylococcus aureus*. **South African Journal of Botany**, v. 147, p. 724-730, 2022.

COSTA, W. K. et al. Oral administration of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 599-607, 2022a.

CRINI, G. A history of cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940-10975, 2014.

CRINI, G. et al. Cyclodextrins, from molecules to applications. **Environmental chemistry letters**, v. 16, n. 4, p. 1361-1375, 2018.

CRINI, G.; FOURMENTIN, S.; LICHTFOUSE, E. **The history of cyclodextrins**. Springer, 2020.

CRUMLING, M. A.; KING, K. A.; DUNCAN, R. K. Ciclodextrinas e perda auditiva iatrogênica: novas drogas com risco significativo. **Frontiers in cell neuroscience** , v. 11, p. 355, 2017.

CRUZ MONTEIRO, S.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed Editora, 2017.

CUI, H. et al. Controlled-release casein/cinnamon essential oil nanospheres for the inactivation of *Campylobacter jejuni* in duck. **International Journal of Food Microbiology**, v. 341, p. 109074, 2021.

CURY, Y. et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric oxide**, v. 25, n. 3, p. 243-254, 2011.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 9-18, 2011.

DAS, S. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin-captured essential oils. **Food Chemistry**, v. 278, p. 305-313, 2019.

DEL RE, M. et al. Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7931, 2017.

DEL VALLE, EM Martin. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DHIMAN, N. et al. Lipid nanoparticles as carriers for bioactive delivery. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 2021.

DI, L.; KERNS, E. **Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization**. Academic press, 2015.

DIAS, C. N. Avaliação da atividade larvicida em *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE) de óleos essenciais de espécies vegetais: um estudo de revisão e bioprospecção. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Maranhão., 2013.

DIAS, G. P.; CRUZ, F. M. INFLAMASSOMOS: Estruturas, mecanismos de ativação e importância na resposta imunológica. **Episteme Transversalis**, v. 6, n. 2, 2017.

DONATO, M. T.; TOLOSA, L. Application of high-content screening for the study of hepatotoxicity: Focus on food toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 147, p. 111872, 2021.

DORSAM, B. et al. The eucalyptus oil ingredient 1, 8-cineol induces oxidative DNA damage. **Archives of toxicology**, v. 89, p. 797-805, 2015.

DRUMOND, M. A. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do Bioma Caatinga. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2013.

DUBEY, S. K. et al. Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 112440, 2022.

DUSSAULT, D.; VU, K. D.; LACROIX, M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 514-520, 2014.

EL MAGHRABY, G. M. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 285-292, 2008.

ELLISON, D. L. Physiology of pain. **Critical Care Nursing Clinics**, v. 29, n. 4, p. 397-406, 2017.

ESCH, T.; KREAM, R. M.; STEFANO, G. B. Emerging regulatory roles of opioid peptides, endogenous morphine, and opioid receptor subtypes in immunomodulatory processes: Metabolic, behavioral, and evolutionary perspectives. **Immunology letters**, v. 227, p. 28-33, 2020.

ESTRELLA, G.-R. A. et al. Limonene from *Agastache mexicana* essential oil produces antinociceptive effects, gastrointestinal protection and improves experimental ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 280, p. 114462, 2021.

ETIENNE, R.; VIEGAS, F. P. D.; VIEGAS JR, C. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, 2021.

FALCÃO, T. R. et al. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2018.

FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M.G. Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components . 65-94. 2013

FARIAS, D. P. et al. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. **Food chemistry**, v. 306, p. 125630, 2020.

FARMER, M. A.; BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. A dynamic network perspective of chronic pain. **Neuroscience letters**, v. 520, n. 2, p. 197-203, 2012.

FEEHAN, K. T.; GILROY, D. W. Is resolution the end of inflammation?. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 3, p. 198-214, 2019.

FELICE, M. et al. Engagement of descending inhibition from the rostral ventromedial medulla protects against chronic neuropathic pain. **Pain**, v. 152, n. 12, p. 2701-2709, 2011.

FELIPE, L. O. et al. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FENYVESI, É.; VIKMON, M.; SZENTE, L. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: benefits and limitations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 12, p. 1981-2004, 2016.

FERRAZ, C. A. et al. Chemical profile and eco-safety evaluation of essential oils and hydrolates from *Cistus ladanifer*, *Helichrysum italicum*, *Ocimum basilicum* and *Thymbra capitata*. **Industrial Crops and Products**, v. 175, p. 114232, 2022a.

FERRAZ, C. A. et al. Ecotoxicity of plant extracts and essential oils: A review. **Environmental Pollution**, v. 292, p. 118319, 2022b.

FIDELIS-DE-OLIVEIRA, P. et al. Hypotensive effect of *Eugenia dysenterica* leaf extract is primarily related to its vascular action: The possible underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 251, p. 112520, 2020.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, 2011.

FITZCHARLES, M.-A. et al. Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. **The Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2098-2110, 2021.

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**, v. 44, n. 10, p. e13442, 2020.

FONSECA, R. N. S.; PEREIRA, L. C. G. O uso de antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais no controle da dor e do edema em cirurgia de terceiros molares. **Journal of Dentistry & Public Health (inactive/archive only)**, v. 7, n. 1, 2016.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

FRAGOSO-SERRANO, M. et al. Profiling of alkaloids and eremophilanes in miracle tea (*Packera candidissima* and *P. bellidifolia*) products. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 890-895, 2012.

FREITAS, C. L. et al. Uso terapêutico e religioso das ervas. **Revista Caminhos-Revista de Ciências da Religião**, v. 12, n. 1, p. 79-92, 2014.

FREITAS, P. R. et al. Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias: uma revisão. 2019.

GAIOLA, L.; CARDOSO, C. A. L. Influência da sazonalidade no teor de flavonoides, potencial antioxidante e toxicidade da infusão das folhas de *Dolichopus dentatus*. **Revista Fitos**, v. 15, n. Supl 1, p. 116-124, 2021

GALENO, D. M. L. et al. Extract from *Eugenia punicifolia* is an antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, p. 311-324, 2014.

GALLUCCI, M. N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and fragrance journal**, v. 24, n. 6, p. 348-354, 2009.

GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14-19, 2015.

GARAVAND, F. et al. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. **Food Chemistry**, v. 364, p. 130376, 2021.

GE, Y. et al. Mediating different-diameter A β nerve fibers using a biomimetic 3D TENS computational model. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 346, p. 108891, 2020.

GENG, Q. et al. Improved antifungal activity and reduced aquatic toxicity of fludioxonil by complexation with β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1246, p. 131167, 2021.

GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L. New records of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae) and complementary description. **Check List**, v. 10, n. 5, p. 1176-1178, 2014.

GOMES, I. V. et al. Fatores de risco para eventos adversos a medicamentos em pacientes hospitalizados: uma overview de revisões sistemáticas. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 1, p. 738-738, 2022.

GUIMARÃES, A. G. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 883-887, 2009.

HEJAZIFAR, M.; LANARIDI, O.; BICA-SCHRÖDER, K. Ionic liquid based microemulsions: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 303, p. 112264, 2020.

HERZOG, C.; HAUN, R. S.; KAUSHAL, G. P. Papel das metaloproteinases da meprina no processamento de citocinas e inflamação. **Cytokine**, v. 114, p. 18-25, 2019.

HO, S. et al. Cyclodextrin encapsulated catechin: Effect of pH, relative humidity and various food models on antioxidant stability. **LWT-Food Science and Technology**, v. 85, p. 232-239, 2017.

HOGENBOM, J.; ISTANBOULI, M.; FARAONE, N. Novel β -Cyclodextrin and Catnip Essential Oil Inclusion Complex and Its Tick Repellent Properties. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7391, 2021.

HSU, S. W. et al. *Rhodiola crenulata* extract counteracts the effect of hypobaric hypoxia in rat heart via redirection of the nitric oxide and arginase 1 pathway. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 29, 7 dez. 2017.

HUSSAIN, A. I. et al. Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. **Pak. J. Bot.**, v. 43, n. 2, p. 1315-1321, 2011.

IASP, International Association for the Study of Pain (IASP). IASP Terminology. Disponível em: <https://www.iasppain.org/terminology?navItemNumber=576#Centralsensitization>. Acessado: 28 marc 2021.

IBIKUNLE, G. F. et al. In-vitro evaluation of anti-trichomonal activities of *Eugenia uniflora* leaf. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 2, 2011.

IRACHE, J. M. et al. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 47-71, 2011.

JEON, S. et al. A modified formulation of Chinese traditional medicine improves memory impairment and reduces A β level in the Tg-APP^{swE}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 783-789, 2011.

JOHANSSON, J.; LARSSON, M. H.; HORNBERG, J. J. Predictive in vitro toxicology screening to guide chemical design in drug discovery. **Current Opinion in Toxicology**, v. 15, p. 99-108, 2019.

JULIUS, D.; BASBAUM A. I. Molecular Mechanisms of Nociception. **Nature**, n.413, v. 6852, p. 203-10, 2001.

JUNG, J. A. et al. Safety evaluation of fermented *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. extract: genotoxicity, acute toxicity, and 13-week subchronic toxicity study in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 275, p. 114138, 2021.

KARAM, T. K. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 15, p. 280-286, 2013.

KASHYAP, N. et al. Prospects of essential oil loaded nanosystems for skincare. **Phytomedicine Plus**, p. 100198, 2021.

KAUR, B.; SINGH, P. Inflammation: Biochemistry, Cellular Targets, Anti-inflammatory Agents and Challenges with Special Emphasis on Cyclooxygenase-2. **Bioorganic Chemistry**, p. 105663, 2022.

KAVETSOU, E. et al. Preparation, Characterization, and Acetylcholinesterase Inhibitory Ability of the Inclusion Complex of β -Cyclodextrin–Cedar (*Juniperus phoenicea*) Essential Oil. In: **Micro**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. p. 250-266.

KFOURY, M.; LANDY, D.; FOURMENTIN, S. Characterization of cyclodextrin/volatile inclusion complexes: a review. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1204, 2018.

KIM, Ki-Taek et al. Microemulsion-based hydrogels for enhancing epidermal/dermal deposition of topically administered 20 (S)-protopanaxadiol: in vitro and in vivo evaluation studies. **Journal of ginseng research**, v. 42, n. 4, p. 512-523, 2018.

KRUPINA, K.; GOGINASHVILI, A.; CLEVELAND, D. W. Causes and consequences of micronuclei. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 70, p. 91-99, 2021.

KUMAR, A. et al. Application of nanotechnology to boost the functional and preservative properties of essential oils. In: **Functional and preservative properties of phytochemicals**. Academic Press, 2020. p. 241-267.

KUMAR, S. et al. Atividade anti-inflamatória de plantas herbáceas: uma revisão. **Int J Adv Pharm Biol Chem**, v. 2, n. 2, pág. 272-281, 2013.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, v. 64, p. 175-193, 2012.

LAZARINI, J. G. et al. Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 132-139, 2018.

LEMES, R. et al. Óleos essenciais dos frutos e folhas de *Kielmeyera coriacea*: atividade antitumoral e estudo químico. **Revista Virtual de Química**. 2017

LIMA, A. B. et al. Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 642-649, 2017.

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

LIMA, T. B. et al. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1426-1433, 2010.

LIN, Hsun-Hsun et al. Spontaneously hypertensive rats exhibit higher sensitivity to ethanol-induced hypotensive effects: Role of NMDA receptors and nitric oxide in rostral ventrolateral medulla. **Alcohol**, v. 73, p. 25-35, 2018.

LIU, J. Y. et al. Selective modifications at the different positions of cyclodextrins: a review of strategies. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 261, 2020.

MACHADO, V. S. et al. *Achyrocline flaccida* essential oil from Brazil: phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditis elegans*, and antimycobacterial activity. **Natural Product Research**, v. 35, n. 24, p. 5899-5903, 2021.

MACIEL, M. V. Monitoramento nutricional da dieta de pequenos ruminantes utilizando espectroscopia da reflectância do infravermelho próximo (NIRS) no sertão de Pernambuco. Tese de doutorado, p.47-48, Recife - PE 2016.

MADDIPATI, K. R. Non-inflammatory Physiology of “Inflammatory” Mediators–Unalamation, a New Paradigm. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 580117, 2020.

MADHAV, S.; GUPTA, D. A review on microemulsion based system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 8, p. 1888, 2011.

MAGALHÃES, T. S. S. A. Complexos de inclusão do óleo de *Euterpe oleracea* Mart. em (B-) ou (HP-B-) ciclodextrinas e ação antioxidante, antiinflamatória e modulatória antibacteriana. 2020.

MANDAL, S. et al. A novel ionic liquid-in-oil microemulsion composed of biologically acceptable components: an excitation wavelength dependent fluorescence resonance energy transfer study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 11, p. 3221-3231, 2013.

MANDAVI, N. et al. Microemulsion: A Potential Novel Drug Delivery System. **Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology**, v. 10, n. 4, p. 266-271, 2018.

MARIYATE, J.; BERA, A. A Critical Review on Selection of Microemulsions or Nanoemulsions for Enhanced Oil Recovery. **Journal of Molecular Liquids**, p. 118791, 2022.

MARQUES, C. S. et al. β -Cyclodextrin inclusion complexes with essential oils: Obtention, characterization, antimicrobial activity and potential application for food preservative sachets. **Food Research International**, v. 119, p. 499-509, 2019.

MARTINS, A. O. B. P. B. et al. Effect of the Croton rhamnifolioides Essential Oil and the Inclusion Complex (OEFC/ β -CD) in Antinociceptive Animal Models. **Macromol**, v. 1, n. 2, p. 94-111, 2021.

MAZINE, F. F. et al. 2022. *Eugenia in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10338>>.

MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C. A new species of Eugenia (Myrtaceae) from north-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, n. 4, p. 775-777, 2008.

MEDAREVIĆ, D. et al. Influence of hydrophilic polymers on the complexation of carbamazepine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 273-285, 2015.

MEHTA, A. K. et al. The effect of the essential oil of Eugenia caryophyllata in animal models of depression and locomotor activity. **Nutritional neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 233-238, 2013.

MEHTA, D. P.; RATHOD, H.; SHAH, D. P. Microemulsions: A potential novel drug delivery system. **Int. J. Pharm. Sci**, v. 1, p. 48, 2015.

MENEZES, P. P. et al. Advances of nanosystems containing cyclodextrins and their applications in pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, p. 312-328, 2019.

MENEZES, P. P. et al. Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of β -cyclodextrin containing carvacrol. **Journal of Molecular Structure**, 1125: 323 – 330, 2016.

MENEZES, P. P. et al. Physicochemical characterization and analgesic effect of inclusion complexes of essential oil from Hyptis pectinata L. Poit leaves with β -cyclodextrin. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 440-450, 2015.

MERTENS, P. et al. Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: a focus on low back pain (part A). **Neurochirurgie**, v. 61, p. S22-S34, 2015.

MEYRE-SILVA, C. et al. Phytochemical analyses and gastroprotective effects of Eugenia umbelliflora (Myrtaceae) on experimental gastric ulcers. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 7, p. 1934578X0900400706, 2009.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57,n.1, p. 1-164, 1999.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 213-220, 2016.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Caatinga**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1/biomas/caatinga>>. Acessado em: 21 jan. 2022.

MONTEIRO, Á. B. et al. Effects of the *Hyptis martiusii* Benth. leaf essential oil and 1, 8-cineole (eucalyptol) on the central nervous system of mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110802, 2019.

MONTEIRO, C. et al. Thymol and eugenol microemulsion for *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato control: Formulation development, field efficacy, and safety on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 296, p. 109501, 2021.

MOUNESAN, M.; AKBARI, S.; BRYCKI, B. E. Extended-release essential oils from poly (acrylonitrile) electrospun mats with dendritic materials. **Industrial Crops and Products**, v. 160, p. 113094, 2021.

MUÑOZ-SHUGULÍ, C. et al. Encapsulation of plant extract compounds using cyclodextrin inclusion complexes, liposomes, electrospinning and their combinations for food purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 177-186, 2021.

NAI, G. A. et al. Evaluation of genotoxicity induced by repetitive administration of local anaesthetics: an experimental study in rats. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 65, p. 21-26, 2015.

NEVES, J. K. O. et al. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery. **Industrial crops and products**, v. 111, p. 185-192, 2018.

NUGRAHANI, I.; PARWATI, R. D. Challenges and Progress in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Co-Crystal Development. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4185, 2021

O'DONNELL, J.; KALER, E. **Polymer Nanoparticles by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Microemulsion Polymerization**. CRC Press: Boca Raton, FL, 2011.

OBIAKOR, M. O.; OKONKWO, J. C.; EZEONYEJIAKU, C. D. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 775, p. 20-30, 2014.

OECD, Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section**, v. 4, 2016.

OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 3, p. 147-152, 2005.

OLIVEIRA MAKSON, G. B. et al. Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n. 8, p. 897-907, 2015.

OLIVEIRA, A. M. et al. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 289-297, 2018.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 61, n. 2, p. 260-265, 2019.

ORLANDO, J. B. et al. Genotoxic effects induced by beta-myrcene following metabolism by liver HepG2/C3A human cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 82, n. 3, p. 176-185, 2019.

PADOIN, K.; COMARELLA, L.; SOLDA, C. Medicamentos comumente prescritos na odontologia e suas principais interações medicamentosas: revisão de literatura. **Journal of Oral Investigations**, v. 7, n. 1, p. 62-76, 2018.

PAHWA, R. et al. Chronic Inflammation. Study Guide from **StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)**, 10 Apr 2018.

PAI, R. J. et al. **Gastrointestinal Protective Effects of Eugenia jambolana Lam.(Black Plum) and Its Phytochemicals**. Academic Press, 2012.

PALIWAL, H. et al. Pharmaceutical considerations of microemulsion as a drug delivery system. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 4-s, p. 661-665, 2019.

PANDIT, J.; AQIL, M.; SULTANA, Y. Nanoencapsulation technology to control release and enhance bioactivity of essential oils. In: **Encapsulations**. Academic Press, 2016. p. 597-640.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74, 2011.

PARK, M. K. et al. Novel anti-nociceptive effects of cardamonin via blocking expression of cyclooxygenase-2 and transglutaminase-2. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 118, p. 10-15, 2014.

PASTERNAK, G. W.; PAN, Y. X. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 4, p. 1257-1317, 2013.

PEDROSO, R. S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, 2021.

PEREIRA, A. M. N. et al. **Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo essencial de *Cyperus articulatus* var. *nodosus* L.** 2019. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Oeste do Pará.

PEREIRA, M. P. S. et al. Brazilian dry forest (Caatinga) response to multiple ENSO: The role of Atlantic and Pacific Ocean. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135717, 2020.

PINTO, R. B.; TOZZI, A. M .G. A.; MANSANO, V. F. 2021. *Hymenaea* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB28134>>. Acesso em: 16 jan. 2021

PORTO, A. S. et al. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. 2020.

PROENÇA, C. E. B. et al. Myrtaceae em Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171> (acesso em 12-07-2022), 2022.

QUEIROZ, T. B. et al. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.

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

RAINA, N. et al. Biopolymers and treatment strategies for wound healing: An insight view. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 71, n. 5, p. 359-375, 2020.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain. press. doi**, v. 10, 2020

RAJPOOT, K.; TEKADE, R. K. Microemulsion as drug and gene delivery vehicle: An inside story. In: **Drug Delivery Systems**. Academic Press, 2019. p. 455-520.

RANG, H. P. et al. Rang & Dale Farmacologia. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAO, A.; WANG, E. Demand for “healthy” products: False claims and FTC regulation. **Journal of Marketing Research**, v. 54, n. 6, p. 968-989, 2017.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 9, p. 5026-5035, 2011.

REN, N. et al. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2017.

RIBEIRO, N. E. et al. Acute and repeated dose 28-day oral toxicity of *Chrysobalanus icaco* L. leaf aqueous extract. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 113, p. 104643, 2020.

RICCIOTTI, E.; LAUDANSKI, K.; FITZGERALD, G. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and glucocorticoids in COVID-19. **Advances in biological regulation**, v. 81, p. 100818, 2021.

ROCHA, T. A. et al. Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 82, n. 3, p. 216-231, 2019.

ROOHINEJAD, S. et al. Extraction methods of essential oils from herbs and spices. **Essential Oils in Food Processing [Internet]**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 21-55, 2017.

ROSAS, R. F. Avaliação dos efeitos da biocerâmica na inflamação periférica em camundongos: análise do mecanismo de ação. **Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde**, 2017.

SÁ, A. Á. M. et al. Evaluation of the incorporation of essential oils in microemulsions as a promising formulation in the inhibition of tyrosinase. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112654, 2020.

SAHU, P. et al. Assessment of penetration potential of pH responsive double walled biodegradable nanogels coated with eucalyptus oil for the controlled delivery of 5-fluorouracil: In vitro and ex vivo studies. **Journal of Controlled Release**, v. 253, p. 122-136, 2017.

SAMPAIO, M. G. V. et al. Chemical composition, antioxidant and antiprotozoal activity of *Eugenia gracillima* Kiaersk. leaves essential oil. **Natural Product Research**, v. 35, n. 11, p. 1914-1918, 2019

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, p. 101876, 2020.

SANTOS JÚNIOR, J. C. M. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. **Rev. bras. coloproctol**, p. 206-210, 2003.

SANTOS, I. B. S. et al. Antioxidant Action and In Vivo Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of *Myrciaria floribunda* Fruit Peels: Possible Involvement of Opioidergic System. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2020, 2020.

SANTOS, L. et al. Perfil fitoquímico e atividade gastroprotetora dos frutos de *Eugenia mattosii*. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 55, p. 138-141, 2018.

SCHNITZLER, A.; PLONER, M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. **Journal of clinical neurophysiology**, v. 17, n. 6, p. 592-603, 2000.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92-101, 2014.

SHUANG, Y. et al. Preparation of a stilbene diamido-bridged bis (β -cyclodextrin)-bonded chiral stationary phase for enantioseparations of drugs and pesticides by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1614, p. 460702, 2019.

SIEBERT, D. A. et al. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. **Natural Product Research**, v. 29, n. 3, p. 289-292, 2015.

SILVA, A. G. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 6, p. 1441-1447, 2015.

SILVA, A. T.; MAZINE, F. F. A família Myrtaceae na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 1, p. 203-224, 2016.

SILVA, B. O. et al. Genotoxicity induced by nerol, an essential oil present in citric plants using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and HepG2/C3A cells as a model. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 84, n. 12, p. 518-528, 2021.

SILVA, J. D. F. et al. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v. 38, p. 1196-1206, 2015b.

SILVA, M. M. et al. O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, v. 2, n. 2, 2019.

SILVA, S. M. M. et al. Wound healing effect of essential oil extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaves. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 2, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O et al. 2018. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora UFRGS, 5.ed, p. 67-495, 2018.

SODANO, F. et al. Galactosylated Prodrugs: A Strategy to Improve the Profile of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 552, 2022.

SOUSA, R. M. F. et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71-78, 2015.

SOUTO, E. B. et al. Microemulsions and Nanoemulsions in Skin Drug Delivery. **Bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 158, 2022.

SOUZA, L. I. O. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1055-1064, 2017.

SOUZA, T. G. S. et al. Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 272, p. 113941, 2021.

SPONCHIADO, G. et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

STASSI, A. F. et al. A review on inflammation and angiogenesis as key mechanisms involved in the pathogenesis of bovine cystic ovarian disease. **Theriogenology**, 2022.

SUVARNA, V. et al. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives—An insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122-1144, 2017.

SZUMAŁA, P.; MACIERZANKA, A. Topical delivery of pharmaceutical and cosmetic macromolecules using microemulsion systems. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 121488, 2022.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5ed. Artmed: Porto Alegre, 2013.

TARONCHER, M. et al. Biological activity and toxicity of plant nutraceuticals: An overview. **Current Opinion in Food Science**, v. 42, p. 113-118, 2021.

TENFEN, A. et al. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Eugenia platysema*. **Natural product research**, v. 30, n. 17, p. 2007-2011, 2016.

THOMAZ, D. V. et al. Antioxidant and neuroprotective properties of *Eugenia dysenterica* leaves. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

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

TRENTIN, D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011

TRINDADE, H. I. Dor: mecanismos envolvidos na sua transmissão e recursos terapêuticos aplicados à sua inibição. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 7, n. 4, p. 6-18, 2013.

ULLAH, R. et al. *Cassia artemisioides attenuates* nociceptive and diabetes-induced neuropathic pain modalities apropos antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 149, p. 112834, 2022.

VECHI, G. et al. Analyses of chemical composition and gastroprotective and antinociceptive properties of *Eugenia involucrate* DC. leaves. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 4, p. 079-083, 2018.

VERAS, B. O. et al. The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) SF Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113248, 2021.

VERDUGO, R J. et al. Review of techniques useful for the assessment of sensory small fiber neuropathies: Report from an IFCN expert group. **Clinical Neurophysiology**, 2022.

VERGNOLLE, N. Sensibilidade visceral pós-inflamatória e mecanismos de dor. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 20, p. 73-80, 2008.

VIKAS, Y. et al. Cyclodextrin Complexes: An Approach to Improve the Physicochemical Properties of Drugs and Applications of Cyclodextrin Complexes. **Asian Journal Of Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p.394-409, apr.-jun. 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.22377/ajp.v12i02.2367>.

VILLAVERDE, J. et al. Combined use of microbial consortia isolated from different agricultural soils and cyclodextrin as a bioremediation technique for herbicide contaminated soils. **Chemosphere**, v. 193, p. 118-125, 2018.

VILVERT, A. F. et al. Atividade anti-inflamatória ex-vivo e in-vivo de derivados do p-aminofenol e salicilatos. 2018.

VITOR, A. O. et al. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. 2008.

WEISANY, W. et al. Targeted delivery and controlled released of essential oils using nanoencapsulation: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 102655, 2022.

WILSON, P.G. Myrtaceae. *In*: K. Kubitzki (Ed.) **The Families and Genera of Vascular Plants, Flowering Plants - Eudicots Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae**, vol. 10. Pp. 212–271, 2011.

WINSOR, P. A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 376-398, 1948.

XIAO, Z. et al. Cyclodextrins as carriers for volatile aroma compounds: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, p. 118292, 2021.

XING, Y. et al. The synergistic effects of opioid and neuropeptide B/W in rat acute inflammatory and neuropathic pain models. **European Journal of Pharmacology**, v. 898, p. 173979, 2021.

YANG, W. et al. Regulação delicada da inflamação mediada por IL-1 β pela ciclofilina A. **Cell Reports**, v. 38, n. 11, pág. 110513, 2022.

YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 473-481, 2013.

ZAKI, M. A. et al. Cytotoxicity and modulation of cancer-related signaling by (Z)-and (E)-3, 4, 3', 5'-tetramethoxystilbene isolated from *Eugenia rigida*. **Journal of natural products**, v. 76, n. 4, p. 679-684, 2013

ZHANG, Q. et al. Lymphocyte function based on IFN- γ secretion assay may be a promising indicator for assessing different immune status in renal transplant recipients. **Clinica Chimica Acta**, v. 523, p. 247-259, 2021.

ZHAO, Y. et al. Solid lipid nanoparticles for sustained pulmonary delivery of Yuxingcao essential oil: Preparation, characterization and in vivo evaluation. **International journal of pharmaceuticals**, v. 516, n. 1-2, p. 364-371, 2017.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 02 de setembro de 2019

Ofício nº 55/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Maria Tereza dos Santos Correia**

Departamento de Bioquímica

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **0018/2019**

Certificamos que a proposta intitulada “**Óleo essencial de *eugenia brejoensis* marzine livre e encapsulado com β -ciclodextrina: composição química e suas potenciais atividades biológica.**” registrado com o nº **0018/2019** sob a responsabilidade de **Prof. Maria Tereza dos Santos Correia** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/08/2019

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2019 A 30/02/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogenico
Nº de animais	272
Peso/Idade	30-35g/10-12 semanas
Sexo	Fêmeas (24) e Machos (248)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)
Destino: Biotério de Experimentação	Departamento de Bioquímica

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, 474
 50170-420 / Recife - PE - Brasil
 Fone: (51) 3446-1144
 www.ufpe.br

Recife, 17 de fevereiro de 2020

Ofício nº 03/20

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Maria Tereza dos Santos Correla**
 Centro de Biociências
 Departamento de Bioquímica/ UFPE
 processo nº 0095/2019

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da toxicidade aguda, genotoxicidade e mutagenicidade do óleo essencial das folhas de eugenia brejoensis mazine e de lectinas de *cratília mollis* mart (cramoll 1,4)", registrado com o 0095/2019 sob a responsabilidade da Prof. Maria Tereza dos Santos Correla o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 17/12/2019

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13 de fevereiro de 2020 a 30 de janeiro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênic Swiss(Mus musculos)
Nº de animais	57
Peso/idade	30-50g/ 8 semanas
Sexo	Machos (57)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Laboratório de Imunopatologia Kelzo Asami (LIKA) da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Centro Acadêmico de Vitória/ UFPE.

Atenciosamente



Prof. Sebastião R. F. Silva
 -Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691