

## **AValiação Farmacológica do Complexo de Inclusão Contendo Farnesol em $\beta$ -Ciclodextrina no Modelo de Dor Orofacial em Camundongos**

Isaías V. Santos<sup>1\*</sup>, Matheus S. S. Cavalcanti<sup>1</sup>, Adriano A. S. Araújo<sup>2</sup>, Lucindo J. Quintans Júnior<sup>2</sup>, Jackson R. G. S. Almeida<sup>3</sup>, Juliane C. Silva<sup>4</sup>

1. Estudante de IC da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas

2. Pesquisadora Universidade Federal de Sergipe

3. Pesquisador da Universidade Federal do Vale do São Francisco

4. Pesquisadora da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas / Orientadora

### **Resumo:**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito farmacológico do farnesol e de seu complexo de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina sobre a dor orofacial em camundongos. O complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina e farnesol ( $\beta$ CD/FAR) foi utilizado visando melhorar as propriedades físico-químicas e farmacológicas do farnesol. Para avaliar o efeito farmacológico, utilizou-se um modelo animal de dor orofacial induzida por formalina, glutamato e capsaicina. No teste de dor orofacial induzido por formalina, capsaicina e glutamato, os resultados mostraram que o farnesol e seu complexo em doses de 50 e 100 mg/Kg diminuíram significativamente ( $p < 0,001$ ) o comportamento de fricção facial. Em conclusão, farnesol e  $\beta$ CD/FAR reduziram a dor orofacial, sendo necessário novos estudos de farmacocinética, farmacodinâmica, bem como de toxicidade para avaliar a segurança desse complexo.

### **Autorização legal:**

Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisa da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Protocolo nº 0019/140415.

**Palavras-chave:** Óleo Essencial; Neuralgia; Farmacologia.

**Apoio financeiro:** Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de Alagoas (FAPEAL).

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UNCISAL.

### **Introdução:**

Os distúrbios de dor orofacial são condições altamente prevalentes e debilitantes na distribuição do nervo trigêmeo que afeta os tecidos da cabeça, do pescoço e da estrutura intra-oral, afetando negativamente a qualidade de vida de pacientes com estas condições dolorosas (FAN *et al.*, 2012; SHUEB *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas contidas nas plantas (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011). Muitos OEs e seus derivados de terpeno têm sido sistematicamente estudados em relação ao manejo da dor orofacial, bem como as suas modificações estruturais, a fim de que eles sejam possíveis fontes de novos princípios biologicamente ativos com bons efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos (Lakoud & Djerourou, 2016).

O farnesol é um sesquiterpeno, comumente encontrado nos OEs de diversos vegetais, como em “casca de laranja” e “camomila”, possuindo um grande potencial analgésico comprovado em estudos, porém sua baixa solubilidade em água e curta meia vida plasmática dificultam o seu uso farmacológico (ALVES *et al.*, 2013). O farnesol é conhecido por exibir múltiplas funções, como a inibição dos canais  $Ca^{2+}$  (ENDO *et al.*, 2011), um alvo importante para drogas usadas em dor orofacial, especialmente em dor crônica. Este sesquiterpeno mostrou excelentes propriedades analgésicas e anti-inflamatórias sem neurotoxicidade significativa no cérebro de camundongos adultos (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2013), mas não há dados sobre seu possível uso na dor orofacial.

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos empregadas na complexação de fármacos, sendo carreadoras, e portanto melhorando a solubilidade e volatilidade das substâncias complexadas (GRILLO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2016).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito farmacológico do Farnesol (FAR) e de seu complexo de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD/FAR) sobre a dor orofacial em camundongos.

### **Metodologia:**

#### **Animais**

Foram utilizados camundongos adultos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos (25-35g) alojados em

gaiolas apropriadas em um ciclo de 12 horas claro/escuro, cujas luzes foram acesas às 6:00 horas da manhã com acesso a alimentos e água à vontade. Os animais foram autorizados a ter um período de adaptação ao ambiente de 48 horas antes de qualquer experimentação. Eles foram separados em grupos de seis animais.

### **Obtenção do farnesol e de seu complexo de inclusão em $\beta$ -ciclodextrina**

O complexo de inclusão contendo farnesol em  $\beta$ -ciclodextrina foi obtido em parceria com a Universidade Federal de Sergipe.

### **Teste de dor induzida por formalina**

Os grupos de camundongos foram tratados com solução salina administrada via oral (v.o.), farnesol (50 ou 100 mg/Kg, v.o.),  $\beta$ CD/FAR (50 e 100 mg/Kg, v.o.) ou morfina (10 mg/Kg, via intraperitoneal [i.p.]) 1 hora antes da injeção de formalina (n = 6 por grupo). A solução de formalina foi administrada 20  $\mu$ L via subcutânea (sc) (2,0% em solução salina a 0,9%) no lábio superior direito (área perinasal) e os animais foram observados em uma caixa com espelho e a quantidade de tempo (em segundos) gasto friccionando a face na área injetada com as patas dianteiras ou posteriores foi utilizado como um indicador de dor. As respostas foram medidas nos primeiros 5 minutos após a injeção de formalina (primeira fase, neurogênica) e no período 15-40 minutos após a injeção de formalina (segunda fase, inflamatória) (BORNHOF *et al.*, 2011; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2010).

### **Teste de dor induzido por capsaicina**

O procedimento utilizado foi o mesmo que o relatado para o da formalina (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2010). A capsaicina (20  $\mu$ L, 2,5  $\mu$ g, via subcutânea [s.c]) foi dissolvida em etanol, dimetilsulfóxido e água destilada (1:1:8) e injetada na área perinasal, e os efeitos da droga foram avaliados utilizando os mesmos grupos como descrito anteriormente. O comportamento de fricção facial foi observado durante um período de 10 a 25 minutos (BRITO *et al.*, 2013).

### **Teste de dor induzido por glutamato**

O procedimento utilizado foi o mesmo que o relatado para formalina e capsaicina (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2010). O glutamato (20  $\mu$ L, 25  $\mu$ M, s.c.) foi injetado na área perinasal e os camundongos foram observados individualmente em relação a quantidade de tempo (em segundos) gasto friccionando a face na área injetada com as patas dianteiras ou posteriores foi medida como um indicador de dor. As respostas foram medidas por 15 min (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

### **Análise estatística**

As análises de dados foram realizadas usando GraphPadPrism 5.0 (GraphPadPrism Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido do teste de Tukey (teste post hoc). Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM. As diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

## **Resultados e Discussão:**

### **Teste de dor induzido por formalina**

A injeção de formalina no lábio superior induz uma resposta nociceptiva bifásica causando comportamento de fricção no rosto e área perinasal, com a pata ipsilateral e às vezes com a pata traseira (LUCCARINI *et al.*, 2006). Neste estudo, a administração de farnesol e seu complexo em doses de 50 e 100 mg/Kg diminuiu significativamente ( $p < 0,001$ ) o tempo de fricção em ambas as fases, efeito também produzido pela morfina (10 mg/Kg).

Na segunda fase, o complexo mostrou um melhor efeito, corroborando com a literatura que demonstrou o efeito mais duradouro dos complexos com  $\beta$ CD, como o observado com o óleo de *Ocimum basilicum*, que quando complexado e testado *in vivo* na hiperalgesia teve um efeito mais persistente do que o óleo isolado (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Estes dados sugerem que a complexação com  $\beta$ -ciclodextrina pode aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade, bem como a intensidade ou duração da atividade terapêutica (SIQUEIRA-QUINTANS, *et al.*, 2010; MARQUES, 2010).

### **Teste de dor induzido por capsaicina**

A capsaicina ativa os receptores vaniloides induzindo influxo de  $Ca^{2+}$  (VOLGT-EISELE *et al.*, 2007) e a liberação de neuropeptídeos, como taquicininas, substância P, calcitonina, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e outras substâncias de terminais periféricos para transferir o estímulo doloroso através do nervo trigeminal (HONDA *et al.*, 2008).

Os resultados mostraram que o farnesol (50 mg/Kg) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o tempo de fricção facial, enquanto o farnesol na dose de 100 mg/Kg e o complexo nas doses de 50 e 100 mg/Kg reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) o tempo de fricção facial, semelhante ao efeito produzido pela morfina (10 mg/Kg). Houve também uma diferença significativa entre o farnesol puro e o complexo ( $p < 0,001$ ), com o complexo apresentando um melhor efeito analgésico.

### **Teste de dor induzido por glutamato**

O glutamato, que pode ser usado como estímulo da dor, é um aminoácido excitatório encontrado nos terminais central e periférico do trigêmeo e nos neurônios ganglionares da raiz dorsal (BONJARDIM *et al.*,

2011; Kung et al., 2013).

Os resultados desta avaliação demonstraram que o farnesol e seu complexo nas doses de 50 e 100 mg/Kg ou morfina (10 mg/Kg, i.p.) inibiram significativamente ( $p < 0,0001$ ) o comportamento nociceptivo, este efeito sugere uma possível interação com o Sistema glutamatérgico. Houve diferenças estatísticas ( $p < 0,0001$ ) entre o complexo de farnesol a uma dose de 100 mg/Kg e as doses puras de farnesol de 50 e 100 mg/Kg, bem como o farnesol complexado em uma dose de 50 mg/Kg.

### Conclusões:

Nossos resultados levam-nos a concluir que o farnesol e  $\beta$ CD/FAR reduziram o comportamento da dor orofacial. Além disso,  $\beta$ CD/FAR demonstrou propriedades farmacológicas melhoradas em comparação com o composto ativo sozinho. O complexo de inclusão contendo farnesol em  $\beta$ CD, portanto, parece ter potencial terapêutico no tratamento de alguns tipos de dor disfuncional, como a dor orofacial. No entanto, são necessários estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos para compreender melhor os mecanismos de ação do complexo e sua segurança antes de qualquer possível uso clínico.

### Referências bibliográficas

- ALVES, F. R. *et al.* Antibiofilm and Antibacterial Activities of Farnesol and Xylitol as Potential Endodontic Irrigants. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 3, 2013.
- BRITO, R.G. *et al.* Citronellol Reduces Orofacial Nociceptive Behaviour in Mice - Evidence of Involvement of Retrosplenial Cortex and Periaqueductal Grey Areas. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, p. 215–221, 2013.
- BONJARDIM, L.R. *et al.* Sida cordifolia leaf extract reduces the orofacial nociceptive response in mice. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1236–41, 2011.
- BORNHOF, M. *et al.* The orofacial formalin test in mice revisited--effects of formalin concentration, age, morphine and analysis method. **Journal of Pain**, v. 12, p. 633–639, 2011.
- ENDO, S. *et al.* Hara, Roles of rat and human aldo-ketoreductases in metabolism of farnesol and geranylgeraniol. **Chemico-Biological Interactions**, v. 191, p. 261–268, 2011.
- FAN, W. *et al.* The role of nitric oxide in orofacial pain. **Nitric Oxide**. v. 26, p. 32–, 2012.
- GRILLO, R. *et al.* Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil-beta-ciclodextrina. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 290-295, 2008.
- HONDA, K. *et al.* Mechanisms involved in an increment of multimodal excitability of medullary and upper cervical dorsal horn neurons following cutaneous capsaicin treatment. **Molecular Pain**, v. 4, p. 59, 2008.
- KUNG, L.H. *et al.* Evidence for Glutamate as a Neuroglial Transmitter within Sensory Ganglia. **PLoS One**. v. 8, 2013.
- KURKOV, S.V.; LOFTSSON, L. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 167–180, 2013.
- LUCARINI, P. *et al.* The Orofacial Formalin Test in the Mouse: A Behavioral Model for Studying Physiology and Modulation of Trigeminal Nociception. **Journal of Pain**, v.7, p. 908–914, 2006.
- LAKOUD, G.S.; DJEROUROU, A. Esterification and etherification of steroid and terpene under Mitsunobu conditions. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 9, p. 889–892, 2016.
- MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of 702 essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 313–326, 2010.
- NASCIMENTO, S. *et al.* Cyclodextrin-Complexed Ocimum basilicum Leaves Essential Oil Increases Fos Protein Expression in the Central Nervous System and Produces an Antihyperalgesic Effect in Animal Models for Fibromyalgia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 547–563, 2014.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, W.M. *et al.* Farnesol: Antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 419–426, 2013.
- QUINTANS-JÚNIOR, L.J. *et al.* Antinociceptive effects of citronellal in formalin, capsaicin, and glutamate induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of Orofacial Pain**, v. 24, p. 305–312, 2010.
- SIQUEIRA QUINTANS, J.S. *et al.* Improvement of p517 cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 436–440, 2013.
- SHUEB, D.R. *et al.* What is the impact of acute and chronic orofacial pain on quality of life?. **Journal of Dentistry**, v. 43, p. 1203–1210, 2015.

SILVA, J. C. *et al.* Enhancement of orofacialantinociceptive effect of carvacrol, a monoterpene present in oregano and thyme oils, by  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in mice. **Biomed Pharmacother**, v. 84, n. 1, p. 454-461, 2016.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. **Lippiaalba: estudos químicos, etnofarmacológicos e agronômicos**. Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia, 2011.