



Universidade Federal do Piauí
Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Ponto Focal - UFPI

LÚCIO FERNANDES PIRES

**INVESTIGAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO
TERPINOLENO LIVRE E DE FORMULAÇÃO TRANSDÉRMICA EM UM MODELO
DE DOR NEUROPÁTICA**

Teresina – PI
2018

LÚCIO FERNANDES PIRES

**INVESTIGAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO
TERPINOLENO LIVRE E DE FORMULAÇÃO TRANSDÉRMICA EM UM MODELO
DE DOR NEUROPÁTICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): Profa. Dra.
Fernanda Regina de Castro Almeida

Teresina – PI

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: LÚCIO FERNANDES PIRES

TÍTULO DO PROJETO: “Investigação comparativa da atividade antinociceptiva do Terpinoleno livre e de formulação transdérmica em modelos de dor neuropática.”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida - UFPI
(Presidente)

Satisfatório

Almeida

Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira - UFPI
(Examinadora)

SATISFATÓRIO

Pereira

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira - UFPI
(Examinadora)

Satisfatório

Meneses

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes – UFPI
(Examinador)

SATISFATÓRIO

Lopes

Prof. Dr. Sidney Goncalo de Lima - UFPI
(Examinador)

SATISFATÓRIO

Lima

DATA DA AVALIAÇÃO: 12 de março de 2018.

HORÁRIO: 14h00

LOCAL: Auditório do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais - Bloco 15
(NPPM/CCS/UFPI)

“Torna-te aquilo que és”

Friedrich Nietzsche

Dedicatória

À Energia Quântica que me permitiu estar evoluindo neste Universo, com minhas qualidades e defeitos.

À minha mãe, Catarina, pelo exemplo de esforço e dedicação.

À minha mulher, Juliana, pela doçura e amabilidade.

Ao Henry e ao Lúcio Filho.

Agradecimentos

Agradeço à Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, bem como à Universidade Federal do Piauí, em especial à Coordenação geral de ambas, por me permitirem concretizar este trabalho.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

À minha orientadora profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida, pela criatividade, motivação e amizade.

Ao professor Dr. Damião Pergentino de Sousa, por ter cedido a substância teste para a realização da pesquisa e ao professor Dr. André Luiz Menezes Carvalho pela dedicação e acessibilidade.

Aos professores Drs. Rita de Cássia Meneses Oliveira, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, Francisco das Chagas Alves Lima, Aldeídia Pereira de Oliveira, Fernando Aécio de Amorim Carvalho e Francisco de Assis Oliveira e aos amigos Everton Lopes, Gláucia Nunes, Victor Viana, Celiane Piauilino, Flávia Passos, Bruno Gomes, Marluce Damasceno, Carlos dos Reis, George Oliveira e Jonas Moura.

À minha família, em especial minha mãe, minha irmã, minha esposa, ao Henry e ao Lúcio Filho, pela motivação que me fazem ter.

PIRES, L.F. **Investigação comparativa da atividade antinociceptiva do Terpinoleno livre e de formulação transdérmica em um modelo de dor neuropática.** Orientadora: Professora Doutora Fernanda Regina de Castro Almeida. 2018. 204p. Tese – Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

RESUMO

A dor é um dos sintomas mais relatados em serviços de saúde. Contudo, as opções farmacológicas para seu tratamento costumam provocar frequentes eventos adversos, tornando o tratamento intolerável para muitos pacientes. Portanto, a fim de ampliar as possibilidades de tratamento, são realizados estudos que buscam novos fármacos, estando os produtos naturais incluídos. O terpinoleno (TPO) é um monoterpreno que compõe óleos essenciais de plantas frequentemente encontradas no nordeste brasileiro, como *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz), *Citrus aurantium* L. (laranja amarga) e *Cuminum cyminum* L. (cominho), com algumas propriedades terapêuticas já sugeridas. Assim, esta tese se fundamentou em quatro capítulos, com os seguintes objetivos: o capítulo I consistiu em realizar uma revisão de literatura científica descrevendo a fisiopatologia da dor neuropática, bem como os tratamentos convencionalmente utilizados, e novas perspectivas terapêuticas, envolvendo o TPO como possibilidade. No capítulo II, objetivou-se elaborar uma outra revisão de literatura científica, abordando as classes de fármacos que poderiam gerar dor neuropática como efeito adverso, com a descrição dos respectivos mecanismos fisiopatológicos. No capítulo III, consistiu-se em elaborar formulações transdérmicas contendo TPO, por meio de um sistema de microemulsão detalhadamente descrito. No capítulo IV, foi testada a ação no TPO por via oral e transdérmica, por meio das formulações desenvolvidas no capítulo III, sobre o modelo de neuropatia por ligadura do nervo ciático. O efeito sobre a atividade locomotora dos camundongos também foi testado (teste do campo aberto e Rota rod), bem como sobre os níveis de malondialdeído, glutathiona reduzida e sobre a atividade da superóxido dismutase. Os resultados demonstraram que o método selecionado para desenvolvimento do sistema de microemulsão para as formulações transdérmicas de TPO, no capítulo III, foi satisfatório, o que permitiu a obtenção das formulações F4 e F8, que apresentaram os melhores resultados no teste da cinética de liberação, sendo essas utilizadas para os testes *in vivo* do capítulo IV. Além disso, o TPO, tanto livre (100 e 200 mg/kg vo) quanto transdérmico, sugeriu efeito antinociceptivo nos testes de von Frey e acetona, tanto com administrações agudas quanto subagudas (por 8 dias), sem, contudo, alterar a atividade locomotora no teste do campo aberto no Rota rod. Esse efeito não esteve correlacionado aos níveis de malondialdeído glutathiona reduzida e nem atividade da superóxido dismutase.

Palavras chave: dor neuropática, formulação transdérmica, monoterpreno, terpinoleno

PIRES, L.F. **Comparative investigation of antinociceptive activity of free Terpinolene and transdermal formulation in a neuropathic pain model.** Advisor: Professor Fernanda Regina de Castro Almeida. 2018. 204p. Thesis - Post-graduation in Biotechnology, Northeast Network of Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí.

ABSTRACT

Pain is one of the most reported symptoms in health services. However, the pharmacological options for its treatment usually cause frequent adverse events, making the treatment intolerable for many patients. Therefore, in order to expand the possibilities of treatment, studies are conducted with new options of drugs, with natural products. Terpinolene (TPO) is a monoterpene which composes essential oils of plants frequently found in northeastern Brazil, such as *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz), *Citrus aurantium* L. (bitter orange) and *Cuminum cyminum* L. (cumin), with some therapeutic properties suggested. Thus, this thesis was based on four chapters, with the following objectives: Chapter I consisted of a review of scientific literature describing the pathophysiology of neuropathic pain, as well as the treatments conventionally used, and new therapeutic perspectives, involving TPO as a possibility. Chapter II aimed to elaborate another review of scientific literature, addressing the classes of drugs which could generate neuropathic pain as an adverse effect, with a description of the respective pathophysiological mechanisms. Chapter III consisted of elaborate transdermal formulations containing TPO by means of a detailed microemulsion system. In Chapter IV, oral and transdermal TPO action was tested through formulations developed in Chapter III on the sciatic nerve ligation neuropathy model. The effect on the locomotor activity of the mice was also tested (open field test and Rota rod), as well as levels of malondialdehyde, reduced glutathione and superoxide dismutase activity. The results showed that the method selected for the microemulsion system for TPO transdermal formulations in chapter III was satisfactory, which allowed to select F4 and F8 formulations, which presented the best results in the release kinetics test, being used for the *in vivo* tests of Chapter IV. In addition, TPO, both free (100 and 200 mg/kg, orally) and transdermal, suggested an antinociceptive effect in the von Frey and acetone tests, both with acute and subacute administrations (for 8 days), without, however, changing the locomotor activity in the open field test and Rota rod test. This effect was not correlated with malondialdehyde and reduced glutathione levels nor superoxide dismutase activity.

Keywords: monoterpene, neuropathic pain, terpinolene, transdermal formulation

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estrutura química do terpinoleno..... | 21 |
| Figura 2: Descrição do desenvolvimento dos capítulos II, III e IV..... | 22 |

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Figura 1: Esquema do sistema nociceptivo..... | 31 |
| Figura 2: Circuito de mediação da dor fisiológica..... | 32 |
| Figura 3: Lâminas do corno dorsal..... | 33 |
| Figura 4: Via descendente da nocicepção (sistema opióide)..... | 37 |
| Figura 5: Via nervosa onde os antidepressivos atuam no tratamento da dor..... | 48 |
| Figura 6: Estrutura química do terpinoleno..... | 55 |
| Figura 7: Vias de penetração cutânea de fármacos..... | 63 |
| Figura 8: Tipos de microemulsões..... | 65 |

CAPÍTULO II

| | |
|--------------------------------------|----|
| Figura 1: Resumo gráfico..... | 88 |
|--------------------------------------|----|

CAPÍTULO III

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Estrutura química do terpinoleno..... | 117 |
| Figura 2: Aspecto visual das microemulsões..... | 131 |
| Figura 3: Varredura espectrofotométrica das MEs..... | 132 |
| Figura 4: Curva de calibração do terpinoleno..... | 134 |
| Figura 5: Aspecto visual das microemulsões após o TET..... | 143 |
| Figura 6: Quantidade de TPO liberada nas sete formulações..... | 147 |

CAPÍTULO IV

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Resumo gráfico..... | 163 |
| Figura 2: Limiar nociceptivo no tratamento agudo com TPO (vo)..... | 173 |
| Figura 3: Limiar nociceptivo no tratamento agudo com FTPO..... | 174 |
| Figura 4: Efeito do Teste da Acetona sobre a nocicepção térmica no tratamento agudo com TPO (vo)..... | 175 |
| Figura 5: Efeito do Teste da Acetona sobre a nocicepção térmica no tratamento agudo com FTPO..... | 176 |
| Figura 6: Limiar nociceptivo no tratamento subagudo com TPO (vo)..... | 178 |
| Figura 7: Limiar nociceptivo no tratamento subagudo com FTPO..... | 179 |
| Figura 8: Efeito do Teste da Acetona sobre a nocicepção térmica com TPO (vo) no tratamento subagudo..... | 180 |
| Figura 9: Efeito do Teste de Acetona sobre a nocicepção térmica, com administrações subagudas de FTPO..... | 181 |
| Figura 10: TPO 200 mg/kg (vo) e FTPO´s no teste do campo aberto..... | 182 |
| Figura 11: TPO 200 mg/kg (vo) e FTPO´s no teste do <i>Rota rod</i> | 183 |
| Figura 12: Mensuração do efeito das FTPO´s sobre níveis de MDA..... | 184 |
| Figura 13: Mensuração do efeito das FTPO´s sobre níveis de GSH..... | 185 |
| Figura 14: Mensuração do efeito das FTPO´s sobre atividade da SOD..... | 186 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Eventos adversos de fármacos no tratamento de dor.....52

CAPÍTULO III

Tabela 1: Fatores de planejamento fatorial..... 124

Tabela 2: Descrição do planejamento fatorial..... 125

Tabela 3: Percentual de cada componente da ME..... 125

Tabela 4: Análise dos resultados das curvas analíticas do terpinoleno..... 134

Tabela 5: Dados da Exatidão..... 135

Tabela 6: Análise da precisão..... 136

Tabela 7: Resultados obtidos no teste da robustez..... 137

Tabela 8: Valores das médias do teor de Terpinoleno nas formulações..... 138

Tabela 9: Mensuração do pH das formulações..... 139

Tabela 10: Valores da média de condutividade..... 140

Tabela 11: Valores dos tamanhos das gotículas..... 140

Tabela 12: Comparação entre emulsões e microemulsões..... 141

Tabela 13: Valores do Índice de Polidispersividade..... 142

Tabela 14: Valores do teor de terpinoleno antes e depois do estresse térmico..... 144

Tabela 15: Comparação dos pH's antes e após o estresse térmico..... 145

Tabela 16: Comparação das condutividades antes e após o estresse térmico..... 146

Tabela 17: Valores da quantidade de terpinoleno liberada em 24h..... 148

Tabela 18: Aplicação dos modelos de ordem zero e Higuchi..... 149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|--|
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AINE | Antiinflamatório não esteróide |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do cérebro |
| CAT | Capacidade antioxidante total |
| CEEA | Comitê de Ética em Experimentação Animal |
| CFMV | Conselho Federal de Medicina Veterinária |
| COX | Cicloxygenase |
| ddC | Zalcitabina |
| ddl | Didanosina |
| EOT | Estresse Oxidativo Total |
| EPM | Erro padrão da média |
| FTPO | Formulação de Terpinoleno |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| IASP | Associação Internacional para o Estudo da Dor |
| IL | Interleucina |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzida |
| LPNC | Ligadura parcial do nervo ciático |
| ME | Microemulsões |
| MN | Micronúcleos |
| NA | Noradrenalina |
| nNOS | Óxido nítrico sintase neuronal |
| NO | Óxido nítrico |
| NRTI | Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos |
| OE | Óleos essenciais |

| | |
|------------------------|---|
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCI | Permuta de Cromatinas Irmãs |
| PGs | Prostaglandinas |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PGI₂ | Prostaglandina I ₂ |
| PKA | Proteína quinase A |
| PKC | Proteína quinase C |
| PAG | Substância cinzenta periaquedutal |
| SAMP | Sistema ascendente multissináptico próprio espinhal |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SNP | Sistema Nervoso Periférico |
| SP | Substância P |
| SPDC | Sistema pós-sináptico da coluna dorsal |
| TBARS | Espécies reativas de ácido tiobarbitúrico |
| TPO | Terpinoleno |
| TRPV1 | Receptor de potencial transitório vanilóide 1 |
| TSC | Trato espinocervical |
| TSM | Trato espinomesencefálico |
| TSR | Trato espinoreticular |
| TST | Trato espinotalâmico |
| WDR | Ampla faixa dinâmica |
| 3TC | Lamivudina |
| 5-HT | Serotonina |
| 8-OH-dG | 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2. OBJETIVOS..... | 24 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 25 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| | |
| CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA – Dor neuropática: descrição fisiopatológica, tratamentos convencionais e novas perspectivas terapêuticas com a aplicação de Terpinoleno..... | 26 |
| 1. Conceito de dor e nocicepção..... | 27 |
| 2. Fisiologia da nocicepção..... | 28 |
| 3. Condução do estímulo doloroso e nociceptivo..... | 30 |
| 4. Mediadores envolvidos na modulação da dor..... | 37 |
| 5. Classificações da dor..... | 39 |
| 5.1 Fisiologia da dor neuropática..... | 40 |
| 6. Tratamento farmacológico da dor..... | 44 |
| 7. Produtos naturais para tratamento da dor..... | 52 |
| 8. Propriedades farmacológicas e biológicas do Terpinoleno..... | 55 |
| 8.1 Genotoxicidade..... | 56 |
| 8.2 Antimutagenicidade..... | 58 |
| 8.3 Atividade antioxidante..... | 59 |
| 9. Medicamentos transdérmicos para tratamento de dor..... | 60 |
| 10. Fisiologia da pele..... | 62 |
| 11. Desenvolvimento de microemulsões contendo TPO..... | 63 |
| 12. Validação de métodos analíticos..... | 65 |
| REFERÊNCIAS..... | 66 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA: Dor neuropática como efeito adverso de tratamentos medicamentosos e sua descrição fisiopatológica..... | 85 |
| RESUMO..... | 86 |
| 1. Introdução..... | 89 |
| 2. Métodos..... | 90 |
| 3. Resultados e discussão..... | 91 |
| 3.1 Fármacos com potencial para provocar dor neuropática..... | 91 |
| 3.1.1 Antineoplásicos..... | 91 |
| 3.1.2 Antirretrovirais..... | 94 |
| 3.1.3 Fármacos que agem sobre o sistema cardiovascular..... | 97 |
| 3.1.4 Antimicrobianos..... | 101 |
| 3.1.5 Anticonvulsivantes e psicotrópicos..... | 102 |
| 4. Conclusão..... | 103 |
| REFERÊNCIAS..... | 104 |
| | |
| CAPÍTULO III – Microemulsão de Terpinoleno: desenvolvimento, liberação, cinética e controle de qualidade..... | 113 |
| RESUMO..... | 114 |
| 1. Introdução..... | 116 |
| 2. Material e métodos..... | 120 |
| 2.1 Matérias primas e reagentes..... | 120 |
| 2.2 Equipamentos..... | 120 |
| 2.3 Testes de validação..... | 121 |
| 2.3.1 Especificidade..... | 121 |
| 2.3.2 Linearidade..... | 121 |
| 2.3.3 Limite de quantificação e limite de detecção..... | 122 |

| | |
|---|-----|
| 2.3.4 Exatidão..... | 122 |
| 2.3.5 Precisão..... | 123 |
| 2.3.6 Robustez..... | 123 |
| 2.3.7 Análise estatística para os testes de validação..... | 123 |
| 2.4 Condução do experimento com planejamento fatorial..... | 123 |
| 2.4.1 Preparação da ME e incorporação do TPO..... | 126 |
| 2.5 Caracterização físico-química..... | 126 |
| 2.5.1 Características organolépticas..... | 126 |
| 2.5.2 Teor..... | 126 |
| 2.5.3 Determinação do pH..... | 127 |
| 2.5.4 Condutividade..... | 127 |
| 2.5.5 Tamanho de gotícula e índice de polidispersividade..... | 127 |
| 2.5.6 Estabilidade preliminar..... | 127 |
| 2.6 Teste de estabilidade ao estresse térmico..... | 128 |
| 2.7 Condições “SINK” | 128 |
| 2.8 Cinética de liberação <i>in vitro</i> | 129 |
| 3. Resultados e discussão..... | 130 |
| 3.1 Obtenção e seleção das microemulsões..... | 130 |
| 3.2 Validação do método analítico..... | 131 |
| 3.2.1 Especificidade..... | 131 |
| 3.2.2 Linearidade..... | 133 |
| 3.2.3 Exatidão..... | 135 |
| 3.2.4 Precisão..... | 136 |
| 3.2.5 Robustez..... | 136 |
| 3.3 Caracterização físico-química..... | 137 |
| 3.3.1 Características organolépticas..... | 137 |
| 3.3.2 Teor..... | 137 |

| | | |
|-------|--|------------|
| 3.3.3 | Determinação do pH..... | 138 |
| 3.3.4 | Condutividade..... | 139 |
| 3.3.5 | Teste de mensuração do tamanho da gotícula e PDI..... | 140 |
| 3.4 | Teste de estabilidade ao estresse térmico..... | 143 |
| 3.4.1 | Teor..... | 143 |
| 3.4.2 | Valores do pH..... | 144 |
| 3.4.3 | Valores da condutividade..... | 145 |
| 3.5 | Cinética de liberação..... | 146 |
| 4. | Conclusão..... | 150 |
| | REFERÊNCIAS..... | 150 |
| | | |
| | CAPÍTULO IV – Efeito antinociceptivo do terpinoleno livre e de formulação transdérmica em um modelo de dor neuropática..... | 159 |
| | RESUMO..... | 160 |
| 1. | Introdução..... | 162 |
| 2. | Material e métodos..... | 165 |
| 2.1 | Terpinoleno..... | 165 |
| 2.2 | Animais..... | 165 |
| 2.3 | Fármacos e produtos químicos..... | 166 |
| 2.4 | Indução da neuropatia por constrição parcial do nervo ciático..... | 167 |
| 2.5 | Divisões dos grupos e administrações dos fármacos..... | 167 |
| 2.6 | Mensuração da nocicepção mecânica..... | 168 |
| 2.7 | Mensuração da nocicepção térmica..... | 169 |
| 2.8 | Medida da performance motora..... | 169 |
| 2.8.1 | Teste do campo aberto..... | 169 |
| 2.8.2 | Teste do Rota rod..... | 169 |
| 2.9 | Testes de atividade antioxidante..... | 170 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 2.9.1 | Análise dos níveis de Malondialdeído..... | 170 |
| 2.9.2 | Análise dos níveis de Glutathiona reduzida..... | 171 |
| 2.9.3 | Determinação da atividade da Superóxido dismutase..... | 171 |
| 2.10 | Análise estatística..... | 172 |
| 3. | Resultados..... | 172 |
| 3.1 | Teste de von Frey com administrações agudas..... | 172 |
| 3.2 | Teste da acetona com administrações agudas..... | 174 |
| 3.3 | Teste de von Frey com administrações subagudas..... | 177 |
| 3.4 | Teste da acetona com administrações subagudas..... | 179 |
| 3.5 | Teste do campo aberto..... | 182 |
| 3.6 | Teste do Rota rod..... | 183 |
| 3.7 | Níveis de Malondialdeído..... | 183 |
| 3.8 | Níveis de Glutathiona reduzida..... | 184 |
| 3.9 | Atividade da Superóxido dismutase..... | 185 |
| 4. | Discussão..... | 186 |
| 5. | Conclusão..... | 190 |
| | REFERÊNCIAS..... | 191 |
| | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... | 202 |

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial. Essa experiência é necessária para proteção contra estímulos prejudiciais ao tecido (BINGHAM et al., 2009, GANGADHARAN; KUNER, 2013).

Ao contrário da dor aguda, a dor crônica (inflamatória ou neuropática) pode persistir por meses ou até anos após a cicatrização da lesão original (BINGHAM et al., 2009; COSTIGAN et al., 2009; NICE, 2010). A dor neuropática é causada por uma condição que afeta o sistema somatossensorial, e está relacionada com sensações de queimação, parestesia (formigamento, cócegas e picadas) e diastesia (sensação desagradável ao toque) (TREEDE et al., 2008; PHILLIPS, 2009).

Na dor crônica, pode haver hiperalgesia - uma resposta aumentada aos estímulos nódicos térmicos e mecânicos -, bem como alodinia, em que respostas nociceptivas ocorrem normalmente a estímulos inócuos, como toque leve. Essa seria denominada alodinia mecânica (JI; XU; GAO, 2014).

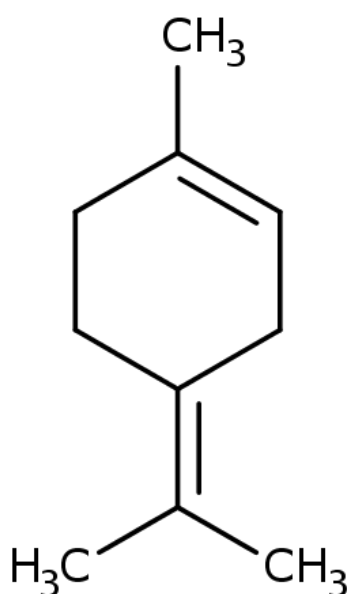
O tratamento farmacológico da dor inclui anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), opióides, anticonvulsivantes, antidepressivos, dentre outros. Contudo, devido aos seus frequentes efeitos adversos, têm sido desenvolvidos vários estudos a fim de descobrir novos fármacos para tratar essa condição, visando, dentre os objetivos, reduzir os efeitos colaterais (DWORKIN et al., 2007; MARNETT, 2009; LI; ZHANG, 2012). Dentre as alternativas, estão os produtos naturais, merecendo destaque os óleos essenciais (OE) e seus constituintes. Os OEs são misturas complexas de substâncias de baixo peso molecular extraídos por meio de vários métodos, sendo a destilação a vapor um exemplo (DWORKIN et al., 2007).

Atividades antibacteriana, antifúngica, antimutagênica, antioxidante, antidiabética, antiviral, antidepressiva, ansiolítica, anticonvulsivante, analgésica e anti-inflamatória já foram atribuídas a alguns produtos naturais, dentre os quais óleos essenciais e os compostos que os constituem, bem como os derivados desses compostos (PIRES et al., 2013a; PIRES et al., 2013b; PIRES et al., 2014a; PIRES et al., 2014b; RAUT e KARUPPAYIL, 2014; MARTINO et al., 2015). Do ponto de vista químico, os OEs contêm principalmente terpenóides, incluindo monoterpenos como carvacrol, timol, geraniol, eugenol e borneol. Os monoterpenos e seus derivados sugerem amplo potencial terapêutico, principalmente atividade ansiolítica,

anticonvulsivante, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória (PIRES et al., 2013b; PIRES et al., 2014a; PIRES et al., 2014b; GUIMARÃES et al., 2015). Contudo, a baixa solubilidade de alguns terpenos em água limita suas aplicações (XIAO-XIAO et al., 2013). Assim, a fim de melhorar a biodisponibilidade e, portanto, otimizar o efeito desses bioprodutos e conferir um melhor aproveitamento do princípio ativo, as formulações transdérmicas têm sido desenvolvidas, utilizando-se frequentemente um sistema de microemulsões (NARUSE et al., 2014).

O terpinoleno (TPO), cujo nome sistemático é 4-Isopropilideno-metilciclohex-1-eno (**Figura 1**), é um monoterpene incolor, que acrescenta sabor artificial a alimentos, sem apresentar perigo à saúde. Ele compõe o OE de plantas frequentemente encontradas no nordeste brasileiro, dentre as quais, *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz; erva de santa maria), *Citrus aurantium* L. (laranja amarga), *Cumminum cyminum* L. (cominho) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) (LOTA et al., 2001; GACHKAR et al., 2007; CLEF et al., 2012; ALMANÇA et al., 2013).

Figura 1: Estrutura química do terpinoleno.

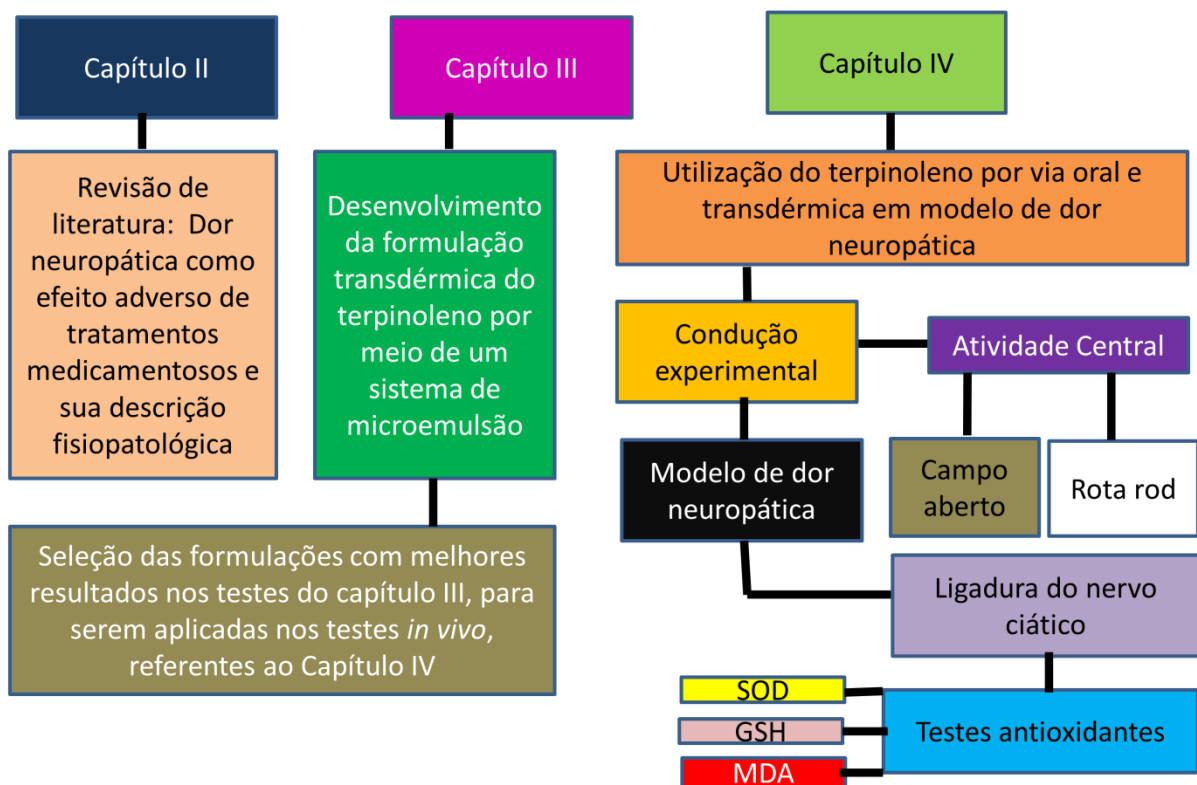


Quanto ao seu potencial terapêutico, estudos já demonstraram propriedades antinociceptiva, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante de óleos essenciais e o contêm em sua constituição. Deve ser salientado que a dose letal da forma livre foi anteriormente testada, por via oral, em camundongos e ratos (DL50 de 3800 e 3790 mg/kg, respectivamente) (MASTEN e TICE, 1999; MOURA, 2012).

Dessa forma, levando em conta o potencial terapêutico do TPO e sua baixa toxicidade, nesta tese foram estudadas sua forma livre, bem como formulações transdérmicas que o contêm, no modelo de dor neuropática induzido por ligadura do nervo ciático em camundongos.

Inicialmente, no capítulo I, foi realizada uma revisão de literatura científica, abordando a dor neuropática e sua descrição fisiopatológica, os tratamentos convencionalmente aplicados e novas perspectivas de tratamento envolvendo o uso de terpinoleno. A descrição resumida do que foi abordado nos capítulos II, III e IV pode ser observada na **Figura 2**.

Figura 2: Descrição do desenvolvimento dos capítulos II, III e IV



O segundo capítulo apresenta uma revisão científica de literatura a fim de expor as principais classes de medicamentos que podem desencadear síndromes neuropáticas como efeito adverso, bem como o provável mecanismo fisiopatológico envolvido em cada categoria. Dentre eles, estão incluídos antirretrovirais, antineoplásicos, estatinas, antimicrobianos e anticonvulsivantes. Note-se que antineoplásicos como o Paclitaxel já são empregados como fármacos padrão para o desenvolvimento de modelos animais de neuropatia.

O terceiro capítulo visou elaborar e descrever como foram desenvolvidas as formulações transdérmicas do TPO, sob um sistema de microemulsão (ME). Nele, foram feitos testes de caracterização físico-química, validação, solubilidade e cinética de liberação *in vitro*. Após o desenvolvimento das formulações, duas delas foram selecionadas, conforme os melhores resultados, para os testes *in vivo* referentes ao capítulo IV. Note-se, portanto, que os capítulos III e IV se complementam.

O quarto capítulo apresenta o estudo das propriedades antinociceptivas do TPO no modelo de dor neuropática induzida por ligadura do nervo ciático. Para as mensurações, foram aplicados testes de hipernocicepção mecânica (Von Frey Digital) e alodinia térmica (teste da acetona, 10°C). Também foram testados seus possíveis efeitos adversos sobre o sistema nervoso central, refletidos em alterações de coordenação motora, bem como locomotricidade, por meio dos testes do campo aberto e do Rota Rod. Foram utilizadas duas formas diferentes de administração de TPO: uma livre e outra transdérmica, e mensuradas as possíveis propriedades antioxidantes, com níveis de malondialdeído (MDA), glutatona reduzida (GSH) e atividade da superóxido dismutase (SOD).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar o potencial antinociceptivo do TPO livre e de formulação transdérmica no modelo de dor neuropática induzido por ligadura do nervo ciático.

2.2 Objetivos Específicos

- Buscar na literatura as principais classes de medicamentos que tenham a dor neuropática como um efeito adverso.
- Realizar testes para elaboração das formulações transdérmicas de terpinoleno
- Selecionar duas formulações em que se obtiveram os melhores resultados, a fim de serem usadas em testes *in vivo*.
- Avaliar o efeito do terpinoleno livre e de sua formulação transdérmica no modelo de neuropatia periférica em camundongos, induzida pela lesão parcial do nervo ciático
 - Avaliar o efeito do terpinoleno livre e da formulação transdérmica sobre a atividade locomotora e coordenação motora em camundongos
 - Avaliar um possível efeito antioxidante do Terpinoleno livre e de sua Formulação Transdérmica

CAPÍTULO I

Revisão de literatura

Dor neuropática: Descrição fisiopatológica, tratamentos convencionais e novas perspectivas terapêuticas com a aplicação de Terpinoleno

1. Conceito de dor e nocicepção

A dor é caracterizada por uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos desse dano (IASP-*International Association for Study of Pain*, 2012). Sukhotinsky e Devor (2014) acrescentam que a sensação de dor protege o organismo de danos potenciais, desencadeando uma ação defensiva e por transmitir sinais sobre o evento nocivo à percepção consciente.

Quanto à duração, a dor pode ser aguda (menor que 3 meses) ou crônica (maior que 3 meses) (NICE, 2010). Esse dano tecidual acomete terminações nervosas de várias regiões, como aponeuroses, articulações, vísceras, etc. O componente fisiológico da dor envolve várias estruturas neurais, e é iniciado com o estímulo de receptores periféricos, que realizam a transdução do estímulo em um potencial de ação ou impulso nociceptivo. A literatura científica relata haver uma semelhança entre homens e animais quanto à neuroanatomia das vias nociceptivas, bem como os mecanismos fisiológicos de percepção da dor. Por definição, a dor não pode existir sem um componente emocional ou afetivo (KRAMER et al., 2016). Dessa forma, supõe-se que a diferença entre cada indivíduo não esteja na forma como se sente a dor, mas sim no comportamento reativo diante desse estímulo doloroso (TEIXEIRA, 2010). Portanto, o observador deve reconhecer a dor neuropática por meio de comportamentos e aparência (WHITTAKERA; HOWARTHA, 2014; KRAMER et al., 2016).

Assim, considerando o referido acima, pode-se pontuar que a dor sentida por humanos envolve diversos componentes, dentre os quais os neurais, os fisiológicos, os comportamentais, os psicológicos e os emocionais. Contudo, no caso de animais, apenas os mecanismos neurais e fisiológicos são passíveis de mensuração nos modelos experimentais de dor. Esses dois mecanismos representam a nocicepção. Dessa forma, essa sensação pode ser mensurada por meio desses dois parâmetros, o que permite salientar que modelos animais para investigação da dor são, na verdade, modelos de nocicepção (WALL; MELZACK, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

2. Fisiologia da nocicepção

O sistema nervoso central dos mamíferos possui redes nervosas que modulam a transmissão nociceptiva. As mais extensamente estudadas têm conexões no corno dorsal da medula espinhal. O núcleo ventromedial rostral da medula e o tegmento dorsolateral da ponte são os dois principais núcleos de onde partem as principais projeções para o corno dorsal da medula (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Didaticamente, esse processo fisiológico da condução do estímulo doloroso é dividido nas seguintes etapas: transdução, em que um estímulo nocivo externo é convertido em atividade eletrofisiológica; transmissão e modulação, em que a informação é retransmitida por meio da medula espinhal até o tronco cerebral e tálamo; e percepção, em que as conexões entre o tálamo e centros corticais superiores integram a resposta afetiva e controlam a dor (BRIDGESTOCK; RAE, 2013).

Na primeira etapa da neurofisiologia da dor, chamada de transdução, ocorre a transformação de estímulos nocivos em sinais elétricos nas vias nociceptoras periféricas. Os nociceptores respondem aos estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, provocando despolarização das fibras e gerando um potencial de ação (WALKER, 2014). Quando essa despolarização é suficientemente grande, ela abre os canais de Na^+ dependentes de voltagem e provoca a geração de potenciais de ação que são conduzidos para o corno dorsal da medula espinhal ou para o tronco cerebral. A partir das suas terminações sensoriais, os nociceptores peptidérgicos podem liberar substâncias como o péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP-*calcitonin gene-related peptide*), neuropeptídeos da substância P (SP), glutamato e N-metil-D-aspartato (NMDA). Esses induzem vasodilatação e extravasamento de plasma, culminando em um estado inflamatório neurogênico (GREENE, 2010; WALKER, 2014).

Os nociceptores são terminações nervosas essenciais para a condução do estímulo nociceptivo. Sua função é preservar a integridade tecidual, assinalando uma injúria potencial ou real. Podem ser classificados em mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos. Possuem terminações nervosas livres, bem como um alto

limiar de excitabilidade, sendo encarregados de detectar o estímulo nociceptivo em nível periférico. Os do tipo mecânico respondem a pressão intensa. Os térmicos respondem às temperaturas extremas. Os polimodais respondem aos estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos e os silenciosos são ativados por estímulos químicos, mecânicos, térmicos e mediadores inflamatórios (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A literatura científica tem sugerido que os nociceptores são canais catiônicos de potencial transitório (TRPs), com estruturas protéicas que se enovelam na membrana do neurônio terminal, estando presentes em todas as fibras sensitivas. A função básica dos nociceptores é transformar um estímulo em um sinal apropriado para trafegar nas células neurais subsequentes. Mas, para ser estimulado, o receptor deve sofrer uma mudança no potencial de membrana. Esta é denominada potencial de receptor, e deflagra a passagem de cátions, gerando um potencial de ação (GARDNER et al., 2000; JULIUS, 2013).

Os nociceptores podem conter diversos tipos de receptores. O receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), por exemplo, é ativado por três estímulos dolorosos, que são os seguintes: estímulos induzidos por compostos vanilóides (capsaicina e resiniferatoxina), por calor nocivo ($>43^{\circ}$) e por pH baixo (<5.9) (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998). Sua presença, em todos esses diferentes tipos de células e em diferentes partes do corpo, sugere que o TRPV1 é estimulado normalmente por um ligante endógeno – um endovanilóide – e não apenas por estimulação térmica (FEIN, 2011).

Os receptores do tipo TRPM8 também estão presentes nos nociceptores, e são canais sensíveis ao frio. O estímulo desses canais ativa outros canais de sódio, como os da isoforma $Na_v1.7$. Estes, por sua vez, disparam o potencial de ação que carrega a informação nociceptiva da periferia ao SNC por meio do axônio. Uma vez que os estímulos iniciam e são desencadeados, ocorre a transmissão destes por meio das fibras nervosas até os centros superiores (LEFFLER et al., 2007; JULIUS, 2013).

Diversos outros receptores têm sido associados aos nociceptores, dentre os quais os opióides, cuja ativação resulta em potente analgesia via inibição da transmissão nociceptiva ascendente excitatória e ativação de sistemas de inibição descendente. A redução nessa excitabilidade ocorre por meio da estimulação do

óxido nítrico (NO) e abertura de canais de potássio sensíveis a ATP (K^+ ATP) (CUNHA et al., 2010, STEIN; SCHÄFER; MACHELSKA, 2003; STEIN, 2013).

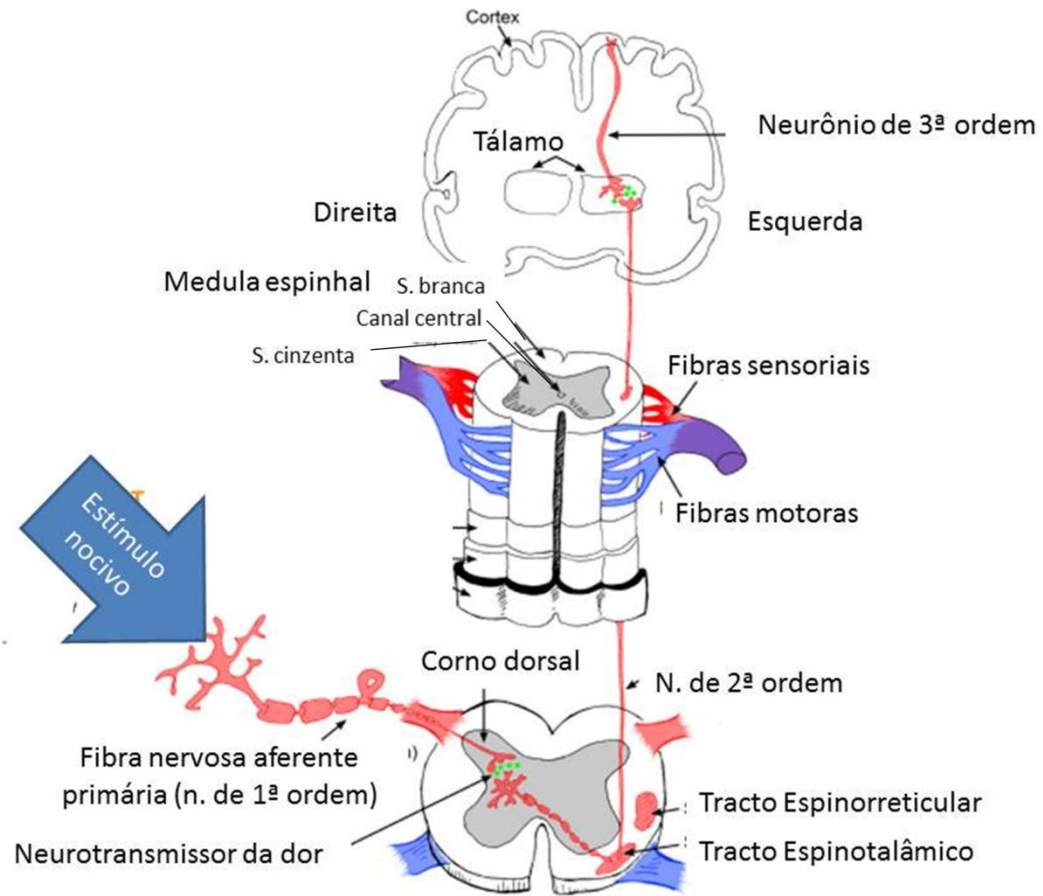
Os receptores colinérgicos também estão envolvidos na nocicepção, pois a liberação de acetilcolina pela medula espinhal produz antinocicepção. Assim, agonistas muscarínicos e nicotínicos, bem como inibidores da colinesterase podem produzir analgesia (DUTTAROY et al., 2002; ZHANG et al., 2012).

Além dos receptores e canais iônicos, os nociceptores são também estimulados por mediadores químicos, como as prostaglandinas (PGs), principalmente a prostaglandina E_2 (PGE_2). Elas atuam por meio de receptores EP1, EP3, EP4 e IP. Todos eles são acoplados à proteína G, e sua ativação aumenta a atividade de receptores como os TRPV1, por sua vez despolarizando as fibras sensitivas (ZEILHOFER, 2007).

3. Condução do estímulo doloroso e nociceptivo

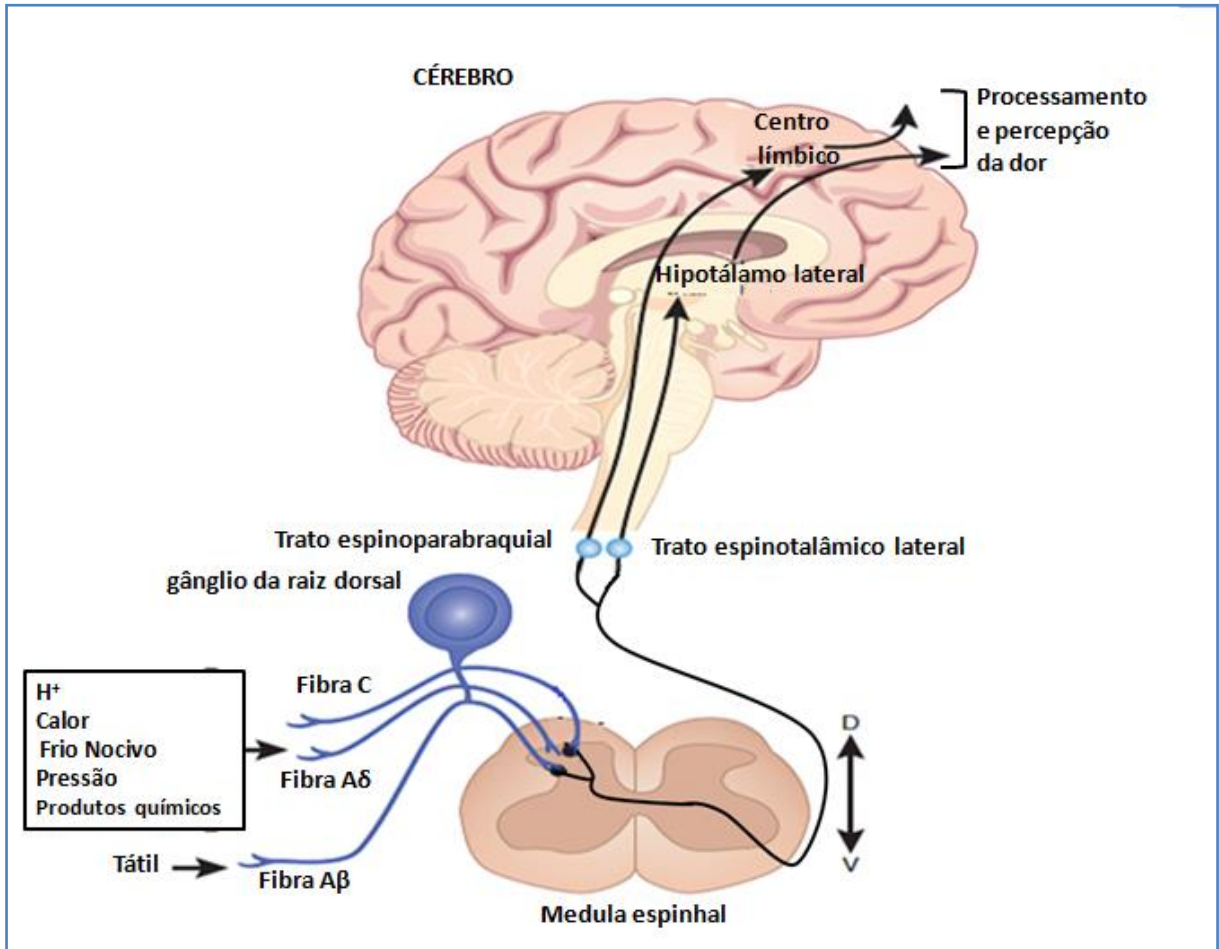
Assim que algum estímulo externo ativa os nociceptores, o impulso é conduzido até o corno dorsal da medula espinhal por meio dos neurônios aferentes primários (fibras A δ e C), que possuem seu corpo celular localizado no gânglio da raiz dorsal. Na medula, estas fibras realizam sinapse nas lâminas I, II, III e IV do corno dorsal – **Figuras 1, 2 e 3** (SCHAIBLE; RICHTER, 2004). Como pode ser observado nas **Figuras 1 e 2**, o estímulo nociceptivo é conduzido, em seguida, por um neurônio de segunda ordem, com seu corpo celular localizado no corno dorsal da medula. Este, por meio do tracto espinotalâmico, conduz o estímulo até o tálamo, onde faz sinapse com um neurônio de terceira ordem, que leva o estímulo à região cortical responsável pelo processamento da nocicepção (KUNER, 2010; HASUDUNGAN, 2013).

Figura 1: Esquema do sistema nociceptivo.



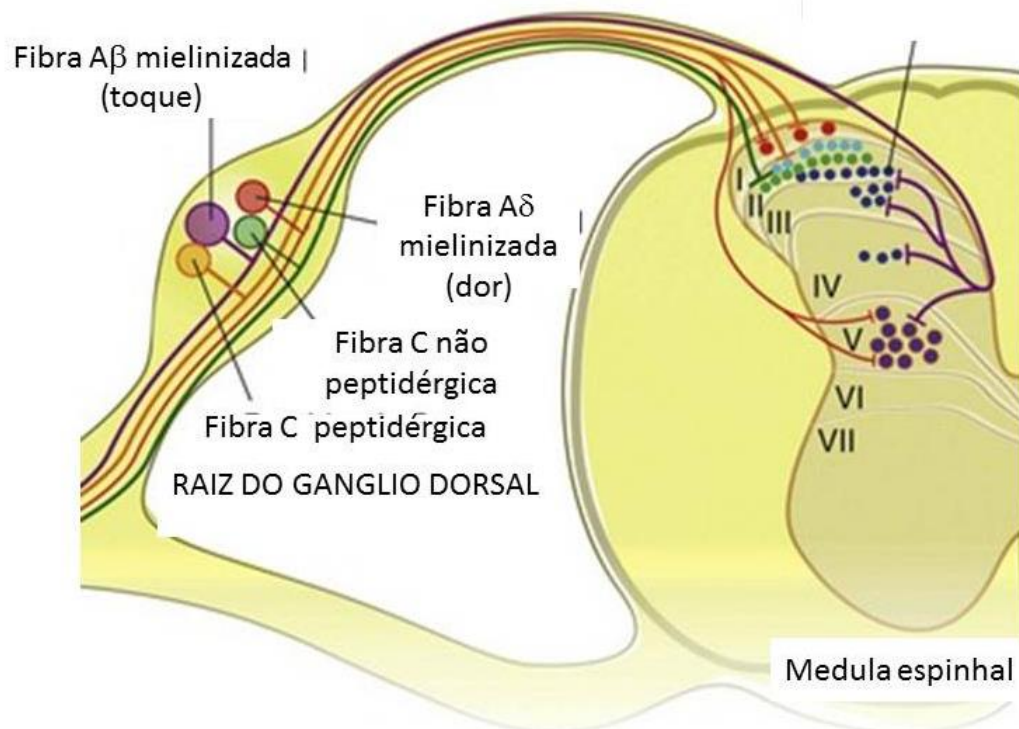
Fonte: Adaptado HASUDUNGAN (2013).

Figura 2: Circuito de mediação da dor fisiológica. As setas indicam o sentido ascendente da condução do estímulo doloroso.



Fonte: adaptado de KUNER, 2010.

Figura 3: Lâminas do corno dorsal



Fonte: adaptado de DUNCAN X. LASCELLES, North Carolina State University, 2011

Para a condução do estímulo doloroso, é necessário que haja o movimento da atividade elétrica, desde as fibras Aδ e C dos aferentes periféricos até os centros nervosos superiores. Na transmissão, os impulsos são enviados por meio dos nervos periféricos à medula espinhal, onde as fibras fazem sinapses com os neurônios da substância cinzenta (**Figura 1**) (JULIUS; BASBAUM, 2001; SCHAIBLE; RICHTER, 2004; LORENZ; COATES; KENT, 2011).

Conforme a **Figura 2**, as fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia para o SNC podem ser classificadas entre subtipos. As do subtipo Aβ, de diâmetro maior (10 μm) e bastante mielinizadas, são as de mais rápida condução nervosa (30-100 m/s) dentre as envolvidas com o processo nociceptivo. Elas detectam estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e articulações. As fibras Aδ são pouco mielinizadas, tendo por isso uma condução nervosa mais lenta (1,2-30 m/s). Apresentam diâmetro intermediário (2-6 μm) e são

ativadas por meio de nocicepções mecânicas e térmicas. As fibras C não apresentam mielinização, sendo as de condução mais lenta (0,5-2 m/s). Apresentam o menor diâmetro (0,4-1,2 μm) e são ativadas por meio de vários tipos de estímulos (JULLIUS; BASBAUM, 2001; KUNER, 2010).

As fibras A δ são projetadas para as lâminas II e V. Já as fibras A β são projetadas para as lâminas profundas III, IV e V. As do subtipo C são projetadas mais superficialmente nas lâminas I e II. As fibras C peptidérgicas são conectadas na lâmina I e na maior parte dorsal externa da lâmina II. Em contraste, as fibras C não peptidérgicas são conectadas na região média mais interior da medula. Além disso, a parte ventral da medula apresenta interneurônios excitatórios, que expressam uma isoforma gama da proteína cinase C (PKC), a qual tem sido implicada na dor persistente produzida pela injúria (**Figuras 2 e 3**) (MEYER et al., 2008; BASBAUM et al., 2009).

É sabido que os neurônios da medula espinhal da lâmina I são responsivos à estimulação nóxica por meio das fibras A δ e C. Já os neurônios das lâminas III e IV são primariamente responsivos a estímulos “não nódicos e os neurônios da lâmina V recebem estímulos nódicos e não nódicos via direta, por meio das fibras C e A δ , e das polissinapses C de forma indireta (BASBAUM et al., 2009).

Uma fibra nociceptora tem uma morfologia pseudo-unipolar e, portanto, suas terminações periféricas e centrais são originárias de um único corpo celular e de um único axônio. Assim, a maioria das substâncias que são sintetizadas no corpo celular da raiz do corno dorsal da medula são distribuídas para os terminais periféricos e central. Dessa forma, apresentam as mesmas características bioquímicas, o que permite o envio e o recebimento da informação de um terminal para o outro (BASBAUM et al., 2009).

Após a condução e transmissão do estímulo doloroso, acontece, por fim, a fase da percepção, em que a sinalização nociceptiva é conduzida até o encéfalo e reflete a experiência física e emocional provocada pelo estímulo nociceptivo. Diferentes grupos funcionais de neurônios encefálicos recebem a sinalização da via nociceptiva que, além de definirem a percepção das características somáticas do estímulo, são responsáveis pelos aspectos cognitivo e afetivo da sensação de dor (TRACEY; MANTYH, 2007).

Além da condução do estímulo doloroso ser feita por via ascendente, há também envolvimento de um trajeto descendente, constituído principalmente de vias

inibitórias da dor. Quanto às vias ascendentes, os principais feixes nervosos que transmitem o impulso até estruturas supramedulares são o tracto espinotalâmico (TST); o espinoreticular (TSR); o espinomesencefálico (TSM); o sistema pós-sináptico da coluna dorsal (SPCD); o tracto espinocervical (TSC) e o sistema ascendente multissináptico próprio espinhal (SAMP). Os dois primeiros estão no quadrante anterolateral; o terceiro se encontra tanto no anterolateral quanto no funículo dorso lateral; o quarto e o quinto, na coluna dorsal e o sexto em várias porções da medula (DRUMMOND, 2000).

Os neurônios do TST se projetam para o tálamo. O TST se subdivide em duas projeções, sendo a lateral chamada de sistema neoespinotalâmico e a mediana, juntamente com o TSR e o TSM, constituem o paleoespinotalâmico (DRUMMOND, 2000). Essa última via está intimamente relacionada aos componentes afetivos da dor, e se conecta com o hipotálamo medial, com a substância cinzenta que margeia a substância periaquedutal e com o terceiro ventrículo do diencéfalo. Ela é responsável pela condução da dor que é pouco definida e de localização difusa. Isso acontece devido à presença de neurônios mais curtos e com maior número de sinapses, bem como pela escassez de somatotopia (TEIXEIRA, 2009).

A via neoespinotalâmica é formada por uma cadeia de três neurônios. O neurônio aferente se localiza em gânglios próximos ao SNC. Suas terminações ficam na periferia e se localizam em gânglios situados próximos ao SNC. Esse neurônio conduz, portanto, a informação desde a periferia. Quanto à sua arquitetura, ele tem formato de T, sendo que um de seus ramos se dirige à superfície e o outro, às vísceras. O primeiro faz sinapse com o segundo neurônio (aferente secundário) que, por sua vez, comunica-se com o terceiro (aferente terciário), localizado no tálamo. Há de se salientar que o tálamo recebe a maioria das informações sensoriais provenientes das várias regiões do corpo, além de se ligar estreitamente com o hipotálamo, com os núcleos do sistema límbico e as áreas sensitivas do córtex (BAKER, 2005). Esta via permite discriminar o local e a intensidade da dor. A característica de maior precisão quanto ao estímulo doloroso é mais típica da dor aguda, do tipo em pontadas e dores devido a estímulos térmicos. Essas vias fazem projeções com hipotálamo, núcleo magno da rafe (NRF), substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo do trato solitário e *locus coeruleos*, além de estabelecerem comunicação com estruturas responsáveis pelo controle autonômico

e endócrino, justificando respostas neuroendócrinas observadas em um estado doloroso (JONES, 2001).

Quanto aos outros tractos, o TSR está correlacionado tanto a aspectos afetivo-emocionais como a mecanismos envolvidos na ativação dos reflexos somáticos ou autonômicos. Já o TSM supostamente apresenta ação inibitória sobre a atividade nociceptiva e possui neurônios que se localizam na mesma região em que estão os neurônios do TST, estendendo-se para o colículo superior e para o núcleo intercolicular. Algumas terminações também se dirigem para a PAG e formação reticular adjacente. Estas duas vias citadas constituem o sistema medial de condução de estímulos dolorosos (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

O SPCD projeta suas fibras para os núcleos da coluna dorsal, principalmente para o núcleo grácil, cujas células neuronais se dirigem ao núcleo talâmico lateral posteroventral (VPL), do lado oposto. Contudo, como lesões da coluna dorsal não costumam alterar o limiar da dor, o papel dessa estrutura na condução da dor é controverso, podendo este transmiti-la apenas de forma eventual e alternativa (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

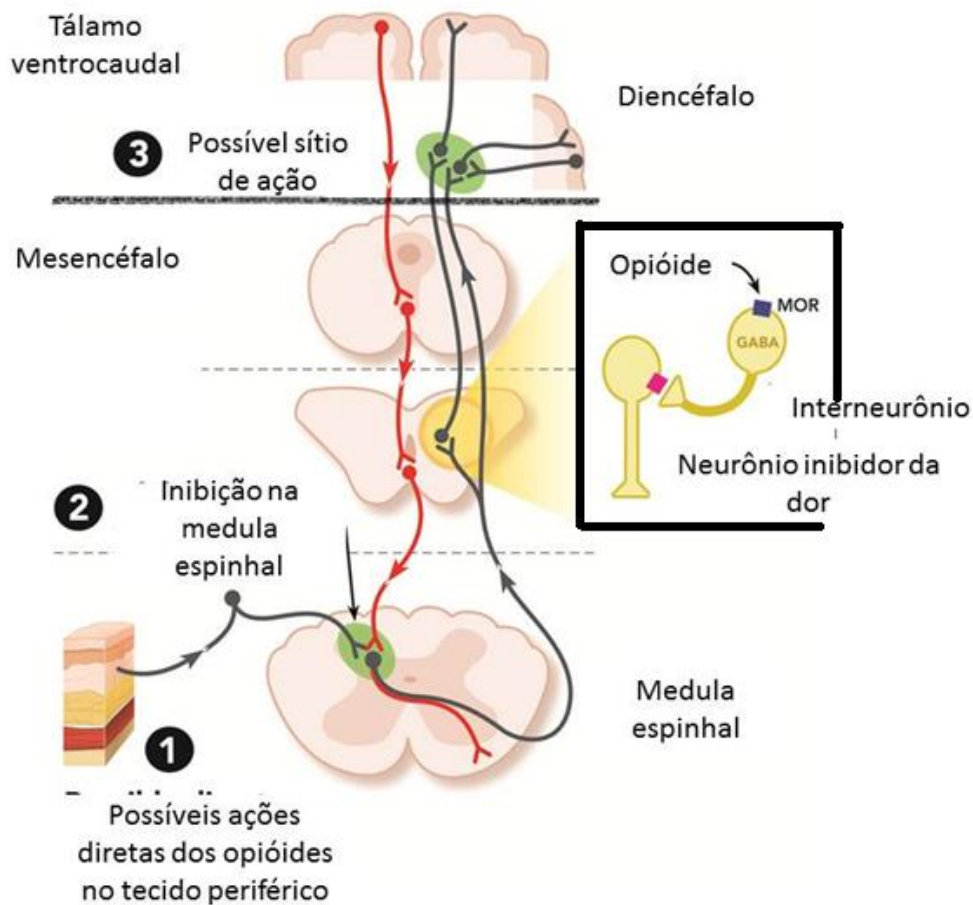
Já o TSC possui fibras que se dirigem para o funículo dorsolateral de forma ipsilateral, mas também é constituído pelo núcleo cervical, de onde as fibras se direcionam até o tálamo contralateral. Contudo, na maioria dos casos, esse sistema pouco participa do processo de condução do impulso doloroso nos seres humanos. Os dois últimos tractos citados possuem fibras longas, de condução rápida e que apresentam discreta organização somatotópica, supostamente transmitindo informações rápidas e de localização da dor (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Além de todas as estruturas já citadas, existem ainda mecanismos de controle da dor, estando incluída a via descendente inibitória. Fazem parte dessa via o córtex cerebral, o hipotálamo, a amígdala, a PAG e o *locus coeruleus* (MILLAN, 2002).

O sistema opióide constitui um dos principais mediadores da via descendente inibitória da dor, e atua pelas vias central e periférica. Na central, eles atuam sobre o bulbo rostroventromedial, a PAG e o corno dorsal da medula, por meio da ativação dos canais de potássio e inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Supõe-se que o sistema opióide ative interneurônios GABAérgicos e, portanto, inibitórios quanto à condução do estímulo doloroso (AL-HASANI, R.; BRUCHAS, 2011) (**Figura 4**).

Já quanto à ação do sistema opioide de forma periférica, sugere-se que agonistas sobre os receptores μ inibiriam a ativação da adenilato ciclase em neurônios aferentes primários, agindo, portanto de forma ascendente. Já os agonistas dos receptores δ e κ inibiriam a liberação de mediadores pró-inflamatórios nos neurônios aos quais elas se ligam (KIM et al., 2006).

Figura 4: Via descendente da nocicepção (sistema opioide).



Fonte: adaptado AL-HASANI, R.; BRUCHAS, 2011.

4. Mediadores envolvidos na modulação da dor

Nos aferentes primários, após uma lesão tecidual, neurotransmissores excitatórios são liberados nas sinapses entre o primeiro e o segundo neurônio no corno dorsal da medula. Dentre esses neurotransmissores, destacam-se o glutamato, o aspartato, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P (SP). O glutamato é o principal neurotransmissor do estímulo

excitatório da dor, enquanto o ácido gamaaminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do estímulo doloroso. Vários outros mediadores estão também envolvidos na modulação, como o óxido nítrico, o *Brain Derived Neurotrophic Fator* (BDNF), interleucinas 1, 6 e 7, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (INF-gama). É sabido que a injeção intratecal de glutamato provoca respostas dolorosas em ratos, e a administração de antagonistas dessa substância inibe essas respostas (GRACE et al., 2014).

Não somente a dor inflamatória, mas também a dor neuropática tem em sua fisiopatologia uma modulação dos receptores de glutamato. Esses receptores podem ser metabotrópicos ou ionotrópicos. Como já é sabido, os metabotrópicos são acoplados à proteína G e ligados a segundos mensageiros intracelulares. Os ionotrópicos são acoplados a canais iônicos, e, conforme sua permeabilidade a íons e ativação por ligantes que medeiam a ação sináptica rápida, podem ser do tipo NMDA (N – metil-D–Aspartato), cainato e AMPA (ácido DL- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol - propiônico) (MELLO; DICKENSON, 2008; GOUDET et al., 2009).

Quando o glutamato liberado pelo neurônio pré-sináptico se liga ao receptor NMDA do neurônio pós-sináptico, há aumento do influxo de cálcio neste neurônio. Isso, por sua vez, ativa a fosfolipase A₂, a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e a óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS), que estimulam a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) e óxido nítrico (NO), respectivamente. Estes dois mediadores se difundem para o neurônio pré-sináptico e ativam diferentes mecanismos de transdução (URBAN; GEBHART, 1999; VETTER et al., 2001; GRACE et al., 2014).

As prostaglandinas (PGs) costumam estar envolvidas na mediação de diversas condições químicas no organismo, incluindo, principalmente a dor, o edema e a febre. A PGE₂ é uma das mais estudadas, e é sabido que ela ativa receptores EP2 e costuma estar em maior concentração no fluido cérebro espinhal. Ela está envolvida no estímulo à liberação de glutamato, à facilitação da despolarização de neurônios no corno dorsal da medula e à inibição de receptores da glicina (ZEILHOFER, 2007; GRACE et al., 2014).

5. Classificações da dor

Existem diversas classificações para a dor. Uma das principais tem como base a duração da sua manifestação, que pode ser aguda ou crônica. Esses termos são comumente usados para descrever a duração de sensações de dor, embora difíceis de definir categoricamente (KAPUR; LALA; SHAW, 2014). Conforme a Sociedade Brasileira para Estudo da Dor-SBED (2013), a dor aguda apresenta curta duração, de minutos a algumas semanas. Ela pode ser desencadeada por processo inflamatório, infeccioso, traumatismos e outros.

A crônica, em contrapartida, manifesta-se por tempo prolongado, de meses a anos, e geralmente está associada a moléstias crônicas, costumando ter um difícil tratamento (KAPUR; LALA; SHAW, 2014).

A dor também pode ser classificada como possuindo dois componentes em especial: o neurosensorial e o afetivo. No componente afetivo, são atribuídas emoções à experiência, sendo responsável pelas respostas comportamentais (ALMEIDA et al., 2004). Assim, a dor tem uma conotação individual e sofre a influência de experiências anteriores.

Há de ser considerada, também, a classificação quanto à fisiopatologia, ocorrendo a dor fisiológica e patológica. A fisiológica induz respostas protetoras, como o reflexo de retirada (ou reação de fuga). Nesse caso, há uma estimulação dos nociceptores por estímulos nocivos, incluindo temperatura, excitação mecânica ou química (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; KAPUR; LALA; SHAW, 2014). O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que está relacionado com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que formulam informações relacionadas à lesão. Conforme já comentado, o termo nocicepção seria melhor aplicado a animais e o termo dor, a seres humanos, pelo fato envolver um componente emocional (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). Contudo, quando há exposição a estímulos nocivos, a dor propriamente dita é experimentada. Neste caso, age como parte dos mecanismos de defesa do corpo normal e sinaliza o contato com os insultos potencialmente prejudiciais.

Note-se, em suma, que a dor é definida como fisiológica quando é completamente distinta da dor decorrente de danos aos tecidos e nervos. Todavia,

quando esses danos ocorrem, há uma modificação no sistema nervoso, o que resulta em dor patológica ou clínica. Esta, diferentemente, não possui qualquer função adaptativa e produz uma variedade de efeitos sistêmicos deletérios, que podem contribuir para a morbidade do paciente (LAMONT, 2002).

Há vertentes que ainda dividem a dor em quatro categorias: nociceptiva, inflamatória, neuropática e psicogênica. A nociceptiva é induzida por estímulos nocivos de naturezas térmica, química ou mecânica que ativam diretamente os neurônios sensoriais de diâmetro médio e levemente mielinizados. Esses são denominados nociceptores A δ , como já descrito. Já a dor inflamatória está associada à produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, eicosanoides, serotonina (5-HT), histamina, SP e adenosina, que ativam ou sensibilizam os nociceptores, levando a alterações funcionais de neurônios sobre o SNC (GEORGE et al., 1999; SCHAFERS et al., 2003; SACERDOTE et al., 2008; LEUNG; CAHILL, 2010).

A dor neuropática é caracterizada como um déficit sensorial decorrente de lesões ou disfunção do SNC ou de nervos. Dentre essas condições, estão incluídas lesão na coluna vertebral, acidentes vasculares cerebrais, síndrome do túnel do carpo e condições que cursam com constrição nervosa, que pode ser, inclusive, experimentalmente induzida pela constrição do nervo ciático em animais (CHAPLAN et al., 1994; SCI; SIDDALL; LOESER, 2001; SIDDALL et al., 2003; IKEDA et al., 2009; FINNERUP et al., 2014; CRAGG et al., 2015; KRAMER et al., 2016).

5.1 Fisiologia da dor neuropática

Em algumas condições, a dor pode surgir devido à ativação gerada no sistema nervoso sem estimulação adequada das suas terminações nervosas sensoriais periféricas. Para esse tipo de dor, a Associação Internacional para o Estudo da Dor introduziu o termo dor neuropática, definido como “uma dor iniciada ou provocada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso”.

Treede et al, 2008, propõem um novo conceito para dor neuropática, que seria o de “dor que surge devido a uma consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial”. Nesse caso, o termo “doença” se refere a processos patológicos identificáveis, como inflamação e condições auto-

imunes, enquanto lesão se refere a danos identificados macro ou microscopicamente. A restrição para o sistema somatossensorial, conforme esses autores, é necessária porque doenças e lesões de outras partes do sistema nervoso poderiam causar outros tipos de dor que não poderiam ser confundidas com a dor neuropática, como a dor associada com espasticidade e rigidez, esta última mediada pela ativação de aferentes nociceptivos dos músculos. Essas mudanças com respeito à definição convencional refletem a concepção de que, na dor neuropática, um processamento somatossensorial aberrante acontece, indo além de uma mera plasticidade do sistema nociceptivo íntegro.

A dor neuropática é caracterizada como um déficit sensorial, chegando a estar presente, por exemplo, em cerca de 80% de indivíduos com lesão na coluna vertebral. Uma constrição em algum nervo também pode levar a dor neuropática por gerar um agravo no sistema somatossensorial (SIDDALL; LOESER, 2001; SIDDALL et al., 2003; FINNERUP et al., 2014; CRAGG et al., 2015; KRAMER et al., 2016). Em muitos casos, a interpretação do estado doloroso em modelos experimentais de dor está focada quase que exclusivamente em respostas de retirada de estímulo mecânico ou térmico de tecidos periféricos (geralmente patas ou cauda). Contudo, indicadores de componentes afetivos são frequentemente ignorados (VIERCK; YEZIERSKI, 2015). Com base em dados humanos, a dor neuropática está geralmente presente após lesões graves, mas a avaliação quantitativa dessa severidade está centrada em um aumento involuntário de movimentos motores em animais, particularmente abaixo da lesão, quando o controle descendente dos circuitos sensoriais e motores está disfuncional (KRAMER et al., 2016).

A neuropatia é uma síndrome complexa, com diversos mecanismos envolvidos. Teorias inflamatórias e imunes estão entre as principais, mas há ainda o envolvimento do estresse oxidativo e da degeneração nervosa. Esses fatores somados interferem na condução normal dos impulsos dolorosos, distorcendo a interpretação e a resposta ao estímulo. Modelos experimentais para o estudo da dor neuropática geralmente desenvolvem a alodinia ou hiperalgesia a partir de lesões periféricas traumáticas, metabólicas ou tóxicas (KRAYCHETE et al., 2008; LIM et al., 2014).

A ligadura parcial do nervo ciático (LPNC) de ratos, induzida experimentalmente, altera a transmissão dos impulsos dolorosos. Neste modelo,

ocorre uma sucessão de eventos resultantes do processo reparador, que causam modificações estruturais e funcionais, alterando a condução nervosa e promovendo sensibilização periférica e central (TEIXEIRA, 2003). A importância de investigações farmacológicas com este modelo de dor neuropática está relacionada com o fato de que a constrição do nervo ciático é um tipo de lesão muito comum na prática clínica e frequentemente é resultante de traumas ou de doenças crônicas que provocam algum tipo de injúria, principalmente nos nervos periféricos (SWAMYDAS et al., 2004).

Indivíduos acometidos por moléstias que geram dores, sejam elas agudas, inflamatórias ou neuropáticas, frequentemente sofrem de problemas emocionais que interferem na sua qualidade de vida. Dessa forma, a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos diversos tipos de dores e a busca de novos fármacos para a prevenção delas são de suma importância.

Diversas condições de saúde podem ter a dor neuropática como sintoma secundário, dentre elas a neuropatia diabética, a dor do membro fantasma, a dor central pós-AVC e a síndrome da dor regional complexa, doenças autoimunes (esclerose múltipla), infecção (neuralgia pós-herpética), trauma e câncer (CAMPBELL; MEYER, 2006; SCHAIBLE, 2006; LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

O mecanismo fisiopatológico da dor da neuropatia periférica no diabetes, por exemplo, reflete uma interação complexa entre alterações metabólicas e bioquímicas induzidas pela hiperglicemia e uma perfusão sanguínea inadequada. Isso ocorre devido a comprometimentos microvasculares que afetam predominantemente os axônios, por um déficit no transporte axoplasmático. Como na maioria dos estados de dor neuropática, os mecanismos centrais também são importantes. Anormalidades distais com impulsos espontâneos levam à sensibilização central, alterações nos canais de sódio e cálcio e perda da inibição descendente (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

Adicionalmente, no caso da dor do membro fantasma, mecanismos periféricos alteram o suprimento de nervos aferentes para o sistema nervoso central. Isso inclui uma reação inflamatória e um processo em que brotos de terminações livres de fibras A δ e fibras C formam um neuroma, com uma alteração na função dos canais de sódio, redução dos limiares de ativação e descarga espontânea, levando a uma sensibilização (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

Em um paciente com essa condição, uma reorganização anatômica adicional dentro da medula espinhal ocorre após lesão do nervo periférico. Ela inclui a degeneração de fibras C não mielinizadas, que normalmente fazem sinapse nas lâminas 1 e 2 no corno dorsal da medula (**Figuras 2 e 3**). Além disso, também ocorre brotamento de conexões entre fibras A β dentro das lâminas 1 e 2. Essas fibras A β estão normalmente envolvidas no toque, pressão e propriocepção, e fazem sinapse normalmente nas lâminas 3 e 4, ao invés de na lâminas 1 e 2 (**Figuras 3 e 4**). Essa alteração resulta em uma sensação dolorosa provocada por um estímulo não doloroso (alodinia) (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

A sensibilização central de células do corno dorsal ocorre em resposta ao aumento da barreira do estímulo doloroso no sítio do membro amputado, e é responsável pela hiperalgesia resultante. Durante esse processo, há também um aumento na atividade dos receptores NMDA mediado por neurotransmissores como substância P, taucininas e neurocininas (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

Além disso, uma reorganização cortical também tem sido demonstrada nessa condição. O córtex somatossensorial correspondente ao membro amputado parece receber informação sensorial a partir de outras áreas do corpo que fazem sinapses com áreas adjacentes no córtex somatossensorial. O grau de reorganização cortical parece estar diretamente relacionado com a intensidade da dor fantasma, e estudos de imagem têm correlacionado uma maior extensão de alterações no córtex somatossensorial com maior dor no membro fantasma (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

A dor central pós-AVC (CPSP), originalmente chamada de síndrome dolorosa talâmica, é uma outra condição patológica relacionada à síndrome neuropática. Ela resulta de uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso central consequente a um AVC, geralmente ocorrendo no lado contralateral ao AVC, que pode estar em qualquer local dentro da via espinotalâmica (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016). Ela é caracterizada por uma dor espontânea ou provocada. É tipicamente constante e frequentemente pode piorar com toque, movimento, emoções e alterações de temperatura. É também descrita como uma queimação e uma dor constante, com parestesia, alodinia ou hiperalgesia. Disfunção nas vias corticais espinotalâmicas é essencial para o desenvolvimento da CPSP, e o exame geralmente revela sensações anormais de temperatura e perda sensorial à picada de agulha. Um fato secundário pode ser a hipersensibilidade relacionada a desnervação (perda de *input*

inibitório), com descargas espontâneas resultantes em neurônios talâmicos e centrais, gerando uma desinibição central (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

Já a síndrome dolorosa regional complexa (CRPS) frequentemente se desenvolve após um trauma em um membro, e resulta em dor desproporcional. Há sinais de alterações vasomotoras (contração/dilatação dos vasos sanguíneos), sudomotoras (disfunção de glândulas sudoríparas), inflamatórias e tróficas, que levam a uma limitação severa na função do membro. O tratamento precoce visa restaurar a função do membro, a fim de prevenir problemas secundários relacionados ao desuso do membro (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016)

Tipicamente, a CRPS se apresenta como um membro com dor, eritema e edema. Os pacientes costumam se queixar de anormalidades relacionadas a temperatura e sudorese, e alodinia é comum, inclusive para atividades rotineiras, como vestir roupas. As articulações permanecem rígidas, e os movimentos são limitados devido à dor e edema. A CRPS pode ser dividida em dois tipos: tipo 1 (mais comum), sem lesão em um nervo principal, e o tipo 2, com dano em um nervo principal (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016). O possível mecanismo fisiopatológico inclui inflamação neuropática, desregulação simpática, com alterações anatômicas regionais, sensibilização central, reorganização cortical e estado auto-imune (LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

6. Tratamento farmacológico da dor

Os principais grupos de fármacos que costumam ser utilizados para o tratamento da dor são os opióides e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). Os opióides se ligam a receptores no SNC e periférico (SNP), bem como do trato gastrointestinal, sendo úteis no manejo da dor de lesões agudas, em cuidados paliativos de doença em estágio avançado ou fase terminal, bem como o tratamento a curto ou longo prazo de estados de dor crônica (VON KORFF et al, 2008; VON KORFF, 2013).

Os receptores opióides são distribuídos por todo o corpo e medeiam várias respostas fisiológicas, incluindo dor, controle respiratório, estresse, apetite e termorregulação. Os receptores associados à dor são μ e κ , localizados no sistema nervoso periférico e central (STEIN, 2013; ARORA; CAO; JAVAHERI, 2014).

Apesar das respostas terapêuticas significativas, a utilização dos opióides é limitada devido à sua ampla gama de efeitos adversos, além do risco de dependência física. Um dos fatores que contribuem para o aparecimento dessa condição se associa ao fenômeno de taquifilaxia, ou tolerância, que pode ser farmacologicamente desencadeada por uma redução da sensibilidade, bem como do número de receptores acoplados à proteína G. Outra condição que limita o uso seguro de opioide é sua curta janela terapêutica, tornando ainda maior o risco de eventos adversos em pacientes que costumam já estar debilitados. Estudos mostram que o tratamento crônico com opióide parece aumentar a atividade do receptor de glutamato no corno dorsal da medula, contribuindo, somado a outros fatores, para o desenvolvimento de tolerância (KIGUCHI et al., 2016).

Dentre os efeitos adversos, os mais citados são constipação, náusea, vômito, sudorese, depressão respiratória, sedação, dentre outros. Além desses efeitos, os opióides provocam efeitos imunomodulatórios, alterações hormonais, distúrbios do sono e desordens psicomotoras (CHRYSTIE; OWEN, 2011; KRAYCHETE; GARCIA; SIQUEIRA, 2014). Dessa forma, a terapêutica opióide não demonstrou ser uma boa alternativa para uso crônico (MOULIN et al, 2015).

Já os AINEs apresentam boa eficácia nas dores agudas relacionadas a processos inflamatórios decorrentes de traumas ou esforços, assim como outras doenças de origem inflamatória, pois possuem atividades analgésica, antipirética e anti-inflamatória (ALMEIDA E SILVA, 2013). Grande parte deles inibe a enzima cicloxigenase (COX), que participa da produção de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Segundo Almeida e Silva (2013), a COX possui três isoformas: a COX-1, a COX-2 e a COX-3. A COX-1 está expressa em vários tecidos, como intestino, rins e estômago e possui papel citoprotetor nestes órgãos. A COX-2 não está expressa de modo constitutivo, à exceção de sua participação fisiológica na produção de PGI₂, de modo que apresenta sua síntese induzida mediante a ocorrência do processo inflamatório, originando diversos prostanóides como as prostaglandinas que potencializam eventos como a vasodilatação. Já a COX-3 possui uma distribuição mais restrita que as demais, sendo abundantemente encontrada nos tecidos encefálico e cardíaco (MINSON; MENTZ-ROSANO, 2013).

Contudo, os usuários de AINEs também não estão livres de efeitos adversos, como dor abdominal, pirose e diarreia (COELHO-DE-SOUZA et al, 2013). Os

inibidores da COX não seletivos inibem a produção de PG na mucosa gastrointestinal, predispondo a gastroduodenite, úlcera gástrica e sangramento digestivo. Estes AINEs não seletivos reduzem a produção de TXA2 e a agregação plaquetária, devido ao bloqueio da COX-1. Isso previne a trombose arterial. Já os inibidores seletivos para COX-2 podem aumentar o risco cardiovascular, pois esses agentes não apresentam ação anti-plaquetária devido à inibição mínima da COX-1. Além disso, vários modelos experimentais demonstram que a COX-2 tem efeito cardioprotetor devido à produção de prostaciclina e, estes estudos sugerem que a inibição da COX-2 por meio de medicamentos pode aumentar o risco de formar ateromas em bifurcações vasculares (BATLOUNI, 2010).

Quanto ao tratamento da dor neuropática, os analgésicos costumam ser pouco efetivos. Os fármacos de primeira linha para tratar dor neuropática são os antidepressivos tricíclicos e os inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT), conhecidos com a abreviatura de ISRS. Os antiepilépticos gabapentanóides também são utilizados para esse tratamento (KREMER et al., 2016).

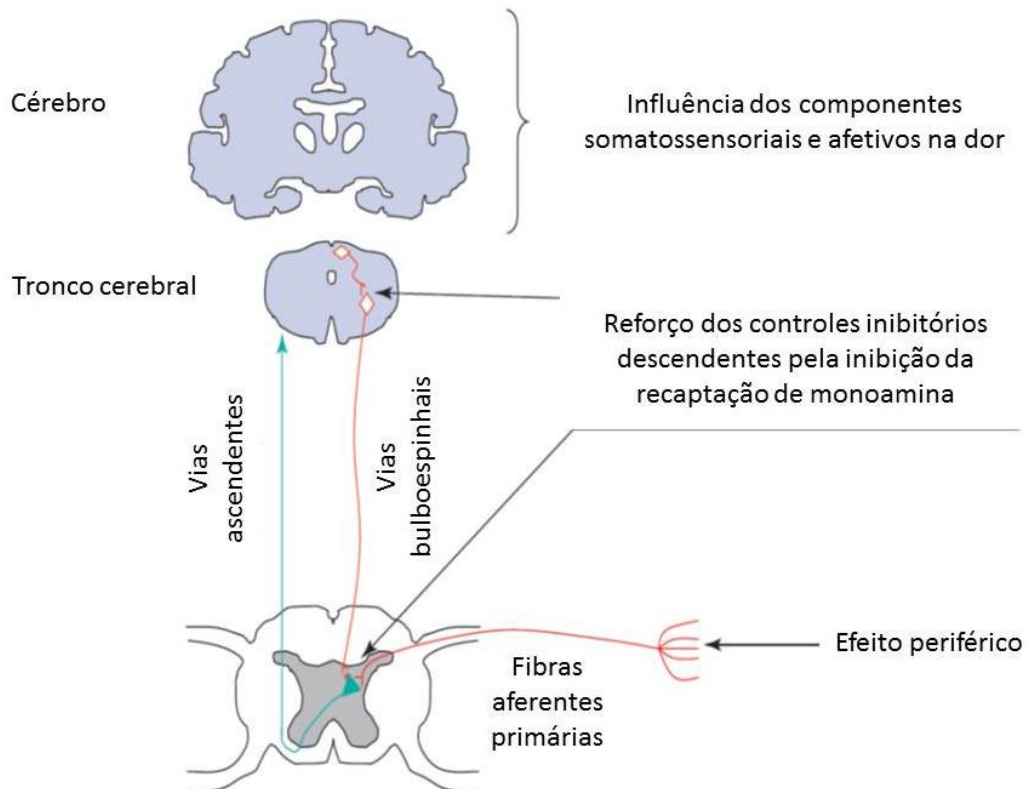
Os antidepressivos, por um longo tempo, não foram considerados fármacos ideais para o tratamento de dor. Contudo, devido à sua ação sobre circuitos neuronais que regulam a emoção, um componente essencial da dor, eles passaram a ser considerados uma opção razoável. Os tricíclicos, juntamente com os anticonvulsivantes, são considerados os medicamentos de primeira linha para o tratamento de dor neuropática, sobretudo para aqueles pacientes que não necessariamente cursam com sintomas depressivos, indicando que os efeitos analgésicos ocorrem independentemente dos efeitos antidepressivos (MICÓ et al., 2006, KREMER et al., 2016).

Vários mecanismos farmacológicos são sugeridos, mas a inibição dos transportadores de monoaminas, e, conseqüentemente, a facilitação da inibição descendente dos sistemas de controle da dor, estão implicadas. Todavia, a dor é uma queixa comum em pacientes deprimidos, e depressão é frequente em pacientes com dor crônica, suportando assim a hipótese de que a dor e a depressão compartilham alguns mecanismos bioquímicos em comum. Além disso, a dose requerida para tratar dor crônica costuma ser inferior à dose antidepressiva, e o tempo de início do efeito terapêutico costuma ser inferior para provocar efeitos analgésicos do que efeitos antidepressivos (MICÓ et al., 2006).

Alguns estudos em que a ação analgésica de antidepressivos tem sido investigada em diferentes camundongos *knockout* têm proporcionado excelentes resultados. Muitos acreditam que o aumento na concentração de NA e 5-HT na fenda sináptica, resultante do bloqueio de suas recaptações, é o principal, mas não o único mecanismo possível da ação analgésica dos antidepressivos. A NA, a 5-HT e seus receptores estão intimamente envolvidos na regulação da nocicepção e diferentes níveis no SNC (MICÓ et al., 2006).

A esse respeito, os antidepressivos parecem aumentar o controle da dor endógena e são considerados como estimuladores da via descendente inibitória bulboespinal, que costuma estar comprometida em condições de dor crônica. Esse efeito pode ser aumentado pelo bloqueio de receptores 5-HT_{1A}, que costumam ter uma influência pronociceptiva quando a 5-HT se liga a eles. Os antidepressivos têm ações farmacológicas significativas em núcleos e áreas cruciais envolvidas nesse circuito, como o *locus coeruleus*, os núcleos da rafe e o corno dorsal da medula espinal. Assim, os antidepressivos podem facilitar o controle da dor, agindo a nível neuroanatômico, resultando em um aumento do limiar nociceptivo (**Figura 5**) (MICÓ et al., 2006, KREMER et al., 2016).

Figura 5: Via nervosa onde os antidepressivos atuam no tratamento da dor



Fonte: adaptado MICÓ et al., 2006.

Também se supõe que o mecanismo analgésico de ação está provavelmente relacionado ao bloqueio de receptores noradrenérgicos e serotoninérgicos, bem como histaminérgicos e muscarínicos. A adenosina também parece contribuir para analgesia, nesse caso de forma periférica. Tem sido reportado que os antidepressivos aumentam a transmissão de adenosina, aumentando seus níveis extracelulares. Já foi encontrado, por exemplo, que o efeito analgésico periférico provocado pela amitriptilina é bloqueado por antagonistas de receptores de adenosina. Além disso, antidepressivos tricíclicos poderiam ser mais efetivos do que antidepressivos mais seletivos para tratar a dor porque eles agem em múltiplos alvos nociceptivos, tanto em nível central quanto periférico (KREMER et al., 2016).

Já está bem estabelecida a relação entre transportadores de NA e 5-HT na fisiopatologia da dor crônica. Camundongos *knockout* para transportadores de 5-HT, por exemplo, não desenvolvem hiperalgesia térmica, mas demonstram alodinia mecânica bilateral após lesão nervosa, o que pode ser explicado em termos de perda do sinal medular inibitório mediado pela 5-HT. Além disso, é importante

considerar que a eficácia analgésica da fluoxetina, amitriptilina e duloxetina tem sido avaliada em um tipo específico de camundongos, que são os *knockout* para o fator Lmx1b (LMx1b KO). O fator de transcrição Lmx1b é essencial para o desenvolvimento de neurônios serotoninérgicos. Os camundongos LMx1b KO têm uma perda em todos os marcadores 5-HT no cérebro e medula espinhal. Assim, os efeitos antinociceptivos desses antidepressivos estão reduzidos nos camundongos LMx1b KO, indicando que a 5-HT é essencial na analgesia induzida por diferentes classes de antidepressivos (MICÓ et al., 2006).

É importante considerar que um sistema de neurotransmissor pode estar relacionado com outro, inibindo, estimulando ou somando seus efeitos entre si, como é o caso dos antidepressivos tricíclicos, que aumentam a analgesia induzida por opioide em animais normais, por exemplo. A analgesia induzida por morfina nos camundongos NAT KO é atribuída à ativação de receptores α 2-adrenérgicos. Isso foi reforçado quando o efeito analgésico da amitriptilina ficou reduzido em camundongos *knockout* para esse tipo de receptor. Para corroborar essa ideia, já foi observado que a administração aguda de um antagonista α 2-adrenérgico, a ioimbina, reduziu o efeito antinociceptivo tanto da administração aguda quanto crônica de venlafaxina, um ISRS, sobre a hiperalgesia induzida por calor (MICÓ et al., 2006).

Entretanto, para outros autores, o efeito antialodínico de uma administração a longo prazo de antidepressivos tricíclicos ou ISRS envolve mais especificamente receptores β 2-adrenérgicos, uma vez que, bloqueando-os, ou usando camundongos deficientes desse receptor, há inibição do efeito antialodínico dos antidepressivos (YALCIN et al., 2009; BOHREN et al., 2013; CHOUCAIR-JAAFAR et al., 2014).

Também já foi atribuído que o efeito analgésico mediado pela alteração noradrenérgica provocada por antidepressivos pode estar relacionado à alteração no funcionamento de vias periféricas difundidas pelos gânglios dorsais. Os inibidores de recaptção de monoaminas poderiam também agir indiretamente como anti-inflamatórios, e sua ação terapêutica poderia estar relacionada ao sistema opioide, particularmente a receptores μ ou δ (KREMER et al., 2016).

Há de ser salientado que antidepressivos também podem agir por meio de mediadores inflamatórios, quanto a seu efeito sobre a dor neuropática. Essa ideia é baseada na inflamação neurogênica, que está relacionada ao recrutamento de

citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β (LEUNG; CAHILL, 2010; MIKA et al., 2015). É sabido que a ligadura experimental de nervos aumenta os níveis cerebrais de TNF- α e IL-1 β . Contudo, esses níveis são reduzidos devido ao tratamento com mirtazapina, um antidepressivo. Esse tratamento também favorece a produção da IL-10, uma citocina anti-inflamatória, ao reduzir a hiperativação do NFkappaB, um fator de transcrição conhecido por favorecer a produção de TNF- α . (ZHU et al., 2008).

Apesar de todos os efeitos positivos dos antidepressivos no tratamento de dor neuropática, o seu uso, principalmente em se tratando de tricíclicos, está associado a vários efeitos colaterais, principalmente anticolinérgicos, como retenção urinária, boca seca, sedação, constipação e eventos cardíacos.

Os anticonvulsivantes também podem ter efeito analgésico tanto com administração aguda, em maiores doses, quanto crônica. Eles têm como alvo as subunidades $\alpha 2\text{-}\delta 1$ dos canais de cálcio voltagem-dependente, e atuam decrescendo a liberação da transmissão excitatória e a sensibilização da medula espinhal. Eles também ativam o sistema noradrenérgico inibitório da dor, que é acoplado a adrenoceptores espinhais do tipo $\alpha 2$. Além disso, o tratamento com gabapentanóides também pode provocar um impacto indireto em fatores neuro-humorais, como citocinas pró-inflamatórias (KREMER et al., 2016).

Contudo, assim, como as outras classes de fármacos usualmente utilizados para o tratamento de dor, os antiepilépticos também podem desencadear efeitos adversos nos pacientes, dentre os quais cefaléia, sedação, lentificação psicomotora, tonturas e hipotonia (ORTINSKI e MEADOR, 2004; WEINTRAUB et al., 2007; KATZ; BARKIN, 2010; DENG et al., 2016).

A gabapentina e a pregabalina são gabapentanóides, e ambas ligantes da subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio voltagem dependente. Elas costumam ter um perfil de efeitos adversos que cursa com sonolência, edema periférico, ganho de peso, astenia, cefaleia e boca seca. Já a carbamazepina age sobre os canais de sódio voltagem-dependentes, e é a droga de escolha para tratar neuralgia do trigêmeo desde os anos 1960 (KREMER et al., 2016).

Apesar de estruturalmente semelhantes ao GABA, os gabapentanóides não agem primária e diretamente sobre os receptores GABA. A identificação de um sítio de ligação específico sobre a subunidade $\alpha 2\delta$ de canais de cálcio voltagem

dependente sugeriu que o efeito antinociceptivo dos gabapentanoídes é mediado por meio de uma atenuação do influxo de cálcio sobre os canais celulares (FIELD et al., 2006; MATSUZAWA et al., 2014). Vários modelos animais de dor neuropática demonstraram um aumento na expressão do mRNA referente à subunidade $\alpha 2\delta$ nos gânglios da raiz dorsal e/ou no corno dorsal da medula espinhal (LUO et al., 2001, 2002; NARITA et al., 2007; XIAO et al., 2007). Contudo, a administração repetida de gabapentina ou pregabalina normaliza a quantidade de subunidades $\alpha 2\delta$ resultantes de lesão de neurônios sensitivos aferentes primários (XIAO et al., 2007; HENDRICH et al., 2008; BAUER et al., 2009; MORIMOTO et al., 2012).

Quando agudamente administrada, a gabapentina pode reduzir as descargas ectópicas de fibras A hipersensibilizadas induzidas pela ligadura parcial do nervo ciático (PAN et al., 1999) ou induzida por paclitaxel (MATSUMOTO et al., 2006). Em estudos *in vivo*, os gabapentanoídes inibem a hiperatividade de neurônios do corno dorsal da medula em diferentes modelos de dor neuropática (DING et al., 2014). Esse efeito pode ser, em partes, resultado do decréscimo da liberação de aminoácidos excitatórios, como sugerido pela observação de que a gabapentina inibe o aumento da liberação de aspartato e glutamato induzida pela formalina em um modelo de lesão crônica induzida por constrição nervosa (CODERRE et al., 2005). O impacto do tratamento com gabapentanoídes também é encontrado a nível supraespinhal. A administração aguda sistêmica desses medicamentos em modelos de ligadura de nervos em roedores reduz a elevação espontânea e as atividades estímulo-evocadas em neurônios do núcleo central da amígdala (GONÇALVES; DICKENSON, 2012). A gabapentina também infrarregula o estado de hiperatividade de sistemas sensoriomotores supraespinhais, particularmente em neurônios implicados em estruturas límbicas provenientes de formações do córtex e do hipocampo (HOOKER et al., 2014). Além disso, é também atribuído que a gabapentina ativa neurônios do *locus coeruleus* (SUTO et al., 2014), aumentando a liberação de NA, que ativa as vias descendentes inibitórias da dor.

Os gabapentanoídes podem também exercer seu efeito antinociceptivo por meio da ação sobre mediadores inflamatórios, uma vez que já foi observada uma supressão dos níveis de TNF- α na raiz dos gânglios dorsais de nervos ciáticos constrictos (KREMER et al., 2016). Na medula espinhal, níveis aumentados de TNF- α , IL-6 e IL-1 β resultantes da constrição ligadura de nervo também foram revertidos

quando da administração intratecal repetida de gabapentina, e esse efeito poderia ser devido, pelo menos em parte, a uma suprarregulação da citocina anti-inflamatória IL-10 (LEE et al., 2013).

Diante dos efeitos colaterais existentes em todas as classes de fármacos acima (**Tabela 1**), são necessários estudos que visem à descoberta de novas substâncias e/ou novas formulações com potencial analgésico e menor perfil de efeitos adversos, com baixo risco de toxicidade. Assim, os produtos naturais se tornam boa opção para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Tabela 1: Eventos adversos de fármacos no tratamento de dor

| Classe | Limitações e efeitos adversos |
|--------------------|--|
| Opióides | Dependência física, curta janela terapêutica, náusea, vômitos, obstipação intestinal, sedação, depressão respiratória |
| AINES | Dor abdominal, pirose, úlceras gástricas, diarreia, gastroduodenite, sangramentos, eventos cardiovasculares |
| Antidepressivos | Boca seca, obstipação intestinal, aumento de peso, hipotensão ortostática, eventos cardiovasculares |
| Anticonvulsivantes | Cefaléia, sedação, lentificação psicomotora, sonolência, edema periférico, ganho de peso, astenia, cefaléia e boca seca. |

Fonte: ORTINSKI e MEADOR, 2004; MICÓ et al., 2006; WEINTRAUB et al., 2007; BATLOUNI, 2010; KATZ; BARKIN, 2010; COELHO-DE-SOUZA et al., 2013; DENG et al., 2016; KREMER et al., 2016;

7. Produtos naturais para tratamento da dor

Até mesmo alguns dos medicamentos mais prescritos atualmente para o tratamento de condições dolorosas tiveram origem a partir de produtos naturais. A morfina, por exemplo, é derivada do ópio. Os salicilatos, da casca do salgueiro. Eles eram inicialmente substâncias utilizadas pela cultura popular para tratar algumas condições dolorosas. Posteriormente, isso despertou o interesse para a pesquisa desta propriedade também em outras plantas (ZHAO et al., 2012). Com o avanço da tecnologia, os estudiosos aprimoraram as técnicas de extração, isolamento e desenvolvimento de novas formulações de substâncias provenientes de plantas, facilitando a otimização dos tratamentos. Essa nova atenção da sociedade moderna

para plantas medicinais contribuiu para o aumento do uso de produtos naturais, implicando uma ampliação do arsenal terapêutico (SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

Muitos estudos etnofarmacológicos mostram que uma parte considerável da população ainda depende dos conhecimentos tradicionais sobre o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças (BOUKHATEM et al., 2013; MENENDEZ-BACETA et al., 2014).

Em relação aos primeiros medicamentos analgésicos obtidos a partir de plantas medicinais, tem-se registros da sua comercialização no século XIX, sendo os primeiros medicamentos à base de morfina, extraída da papoula (*Papaver somniferum* L.), do ácido acetilsalicílico, sintetizado a partir do ácido salicílico extraído da casca de salgueiro (*Salix sp.*). Novos analgésicos foram obtidos após quase dois séculos, como a capsaicina oriunda da pimenta (*Capsicum annum* L.), ziconotide, um peptídeo extraído do molusco marinho *Conus magus* L., e substâncias canabinóides extraídas da *Cannabis sativa* L. (canabidiol) (LI; VEDERAS, 2009; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). No Brasil, essa condição de destaque é atribuída à descoberta de sesquiterpenos obtidos do óleo essencial da erva baleeira (*Cordia verbenácea* DC.), tendo sido demonstradas suas atividades analgésicas e anti-inflamatórias (PASSOS et al., 2007), que gerou a patente do Acheflan®.

Os OEs também se destacam como opção terapêutica de produto natural, e são misturas complexas de substâncias de baixo peso molecular extraídos de plantas por meio de métodos, dentre os quais destilação a vapor, prensagem a frio, hidrodestilação, enfleurage e extração por solventes. Dentre as atividades farmacológicas e biológicas atribuídas a esses óleos, destacam-se a atividade antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, antimutagênica, antidiabética, antiviral e anti-inflamatória (RAUT e KARUPPAYIL, 2014; MARTINO et al., 2015). Eles contêm diversos compostos biologicamente ativos que pertencem a diferentes classes de produtos naturais, como terpenos, esteróides, alcalóides e flavonóides (DA SILVA et al., 2008; DE SOUSA, 2011).

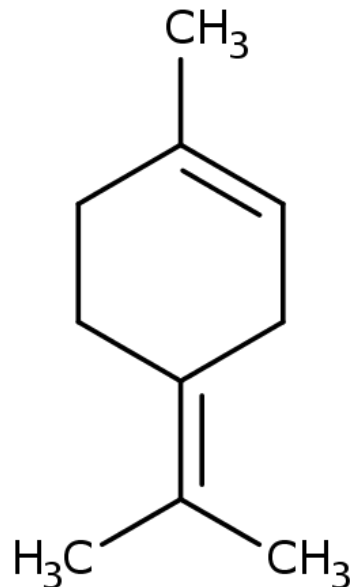
Conforme a literatura científica, alguns terpenos desses óleos têm sugerido atividades analgésicas. Costumam ter baixo peso molecular e alta lipossolubilidade, podendo penetrar na barreira hematoencefálica (DE SOUSA, 2011). Os terpenóides de OEs mais abundantes são os monoterpenos, já tendo sido sugeridas

propriedades terapêuticas, dentre as quais antioxidante, analgésica e anti-inflamatória. Os monoterpenos podem ser classificados de acordo com a ciclização de sua cadeia carbônica. Assim, eles podem ser acíclicos (moléculas abertas), monocíclicos ou bicíclicos. Eles são formados a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno (C10) e são as moléculas mais representativas, constituindo 90% dos óleos essenciais (BAKKALI et al, 2008; DE SOUSA, 2011; GUIMARÃES et al., 2015).

Já foi sugerido que uma variedade de monoterpenos apresenta potenciais efeitos terapêuticos para condições dolorosas. Estão incluídos, por exemplo, o α -terpineol, o α -felandreno, o linalol, o p-cimeno, o citronelal e o carvacrol. É citado que eles provavelmente atuem sobre diversos sistemas, dentre os quais o glutamatérgico, opióide, nitrérgico, adrenérgico e colinérgico, além da ação sobre mediadores inflamatórios (WAGNER et al., 1986; DAGNE et al., 2000; MOREIRA et al., 2001; KHALIL et al., 2004; HELD; SCHIEBERLE; SOMOZA, 2007; BATISTA et al., 2008; KAWATA et al., 2008; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011; SANTANA et al., 2011; SAKURADA et al., 2011; VENÂNCIO et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2012; LIMA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

O TPO (**Figura 6**) é um monoterpeno encontrado em espécies vegetais nas mais diversificadas regiões do globo, como a *Melaleuca alternifolia* C.– Austrália (SOUTHWELL e RUSSELL, 2002); *Pistacia vera* L.- Grécia, Índia e Irã (AHMAD, et al, 2010), dentre outras. No território nacional, ele está presente em algumas espécies como *Rosmarinus officinalis* L. – Pelotas (CLEFF et al, 2012), *Protium heptaphyllum* M. – Acre (MARQUESI et al, 2010) e *Tagetes patula* L. – Rio Grande do Sul (RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009). No nordeste brasileiro, é encontrado principalmente nas espécies *Chenopodium ambrosioides* L., *Citrus aurantium* L. e *Cumminum cyminum* L. (LOTA et al., 2001; GACHKAR et al., 2007; ALMANÇA et al., 2013).

Figura 6: Estrutura química do terpinoleno



. Quanto a possíveis propriedades terapêuticas, a maioria dos estudos utilizam óleos essenciais que contêm o TPO. Essas propriedades estão citadas no item subsequente (SIANI et al, 1999; AL-JABRI e HOSSAIN, 2014; CABRAL et al, 2015; EVRENDILEK, 2015).

8. Propriedades farmacológicas e biológicas do TPO

A utilização do TPO em alimentos para o consumo humano foi autorizada pela FDA (*Food and Drug Administration*, 2014) desde 2000. Porém, foram encontrados poucos estudos sobre suas ações terapêuticas. GRAßMANN et al, 2005, sugeriram atividade antioxidante quando esse composto foi usado isoladamente. Quanto a outras propriedades terapêuticas, como analgésica, anti-inflamatória, anticancerígena e antibacteriana, a maioria deles não utiliza o TPO isoladamente, mas sim OEs que o contêm em sua constituição (SIANI et al, 1999; AL-JABRI e HOSSAIN, 2014; CABRAL et al, 2015; EVRENDILEK, 2015).

Referente à propriedade antibacteriana de OEs que continham, dentre outros compostos, o TPO em sua constituição, foi encontrada ação contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Listeria innocua*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella oxytoca* (AL-JABRI e HOSSAIN, 2014; EVRENDILEK, 2015).

O TPO também já foi estudado isoladamente quanto às suas atividades analgésica e anti-inflamatória, por meio de nosso grupo de pesquisa. Estas foram realizadas em modelos de nocicepção aguda, sugerindo efeito analgésico em baixas doses, porém com pouca atividade anti-inflamatória (MOURA, 2012). Além disso, quando associado aos AINEs sugeriu efeito antinociceptivo e anti-inflamatório sinérgico, que pode ter envolvimento do sistema opióide e serotoninérgico (MACEDO, 2015).

Quanto a questões farmacocinéticas, já é sabido que o TPO, assim como vários monoterpenos, é lipofílico, o que pode conferir uma vantagem em termos de penetração em determinadas barreiras do organismo, como é o caso da barreira hematoencefálica, permitindo assim, agir sobre o SNC, por exemplo (FALK et al., 1990; MOURA, 2012; MACEDO, 2015). Monoterpenos inalados são absorvidos quase que totalmente nos pulmões de humanos e animais e então se direcionam para o fígado, onde eles são completamente metabolizados por meio de enzimas (BOYLE et al., 1974; IGIMI; NISHIMURA, 1974; FOLEY et al., 1987; BOYLE et al., 1999).

Quanto à segurança em sua administração, já foi encontrado que a dose tóxica do TPO quando feita em ratos foi de 3790 mg/kg e em camundongos foi de 3800 mg/kg, por via oral (OPDYKE, 1988).

8.1 Genotoxicidade

O TPO é um monoterpeno monocíclico encontrado em óleos essenciais de plantas como *Chenopodium ambrosioides* L., *Citrus aurantium* L. e *Cumminum cyminum* L. Vários estudos já têm sugerido uma atividade antioxidante e antioncogênica, porém poucos têm pesquisado sobre genotoxicidade (LOTA et al., 2001; GACHKAR et al., 2007; ALMANÇA et al., 2013).

Os estudos de genotoxicidade costumam utilizar células sanguíneas e hepáticas, pois essas são os alvos principais de substâncias consideradas tóxicas. As células sanguíneas são potencialmente vulneráveis. Estudos de culturas de células têm demonstrado que os linfócitos são extremamente sensíveis em estudos *in vivo* e *in vitro* a alterações estruturais dos cromossomos (LERDA et al, 2005; TURKEZ et al., 2015).

Devido a o TPO ser usado com uma relativa frequência como um condimento sintético, bem como para aumentar a fragrância em alimentos, aromatizantes de ar, perfumes e substância de higiene, torna-se importante a pesquisa sobre sua toxicidade (MA e MARSTON, 2009; OKUMURA et al., 2012).

Assim, considerando que o TPO é lipofílico e muito solúvel no sangue, um estudo mensurou a alteração na viabilidade de linfócitos provocada por ele (FALK et al., 1990; TURKEZ et al., 2015). Na dose de 100 mg/L, o TPO decresceu a viabilidade celular, com base na mensuração dos níveis de lactato desidrogenase (LDH) e de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) em culturas de células humanas, e aumentou os níveis de LDH de forma dose-dependente. Sabe-se que a LDH é uma enzima citoplasmática que indica aumento do dano celular (PARK et al, 2010). A desintegração da membrana e posterior morte celular, por exemplo, leva a um aumento na concentração de LDH no soro e nos tecidos. Adicionalmente, a citotoxicidade, o grau em que uma determinada substancia química pode causar dano celular, mas não necessariamente a morte, pode ser mensurado por meio dos níveis de MTT (TURKEZ et al., 2015).

Contudo, em sistemas de testes *in vivo*, foi observado que o TPO não apresentou genotoxicidade em linfócitos humanos. Nas doses de 10, 25, 50 e 75 mg/L, ele também aumentou a atividade antioxidante total nos linfócitos humanos, sem alterar o estresse oxidativo total. (TURKEZ et al., 2015).

Conforme alguns autores, há considerável evidência de que o TPO não é genotóxico em linfócitos. Isso teve como base a mensuração de um possível dano provocado no DNA, indicado pela taxa de formação de micronúcleos (MN) e permuta de cromatinas irmãs (PCI). O TPO não aumentou esses valores. Um DNA danificado pode levar a aneuploidia e/ou instabilidade cromossômica, o que se acredita ser o principal contribuidor de progressão tumoral (EROL, 2010). A PCI é um indicador sensível da instabilidade cromossomial do DNA, pois pode revelar instabilidade geral no genoma (KONAT, 2003).

A 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) é o principal produto de oxidação secundário ao dano do DNA e, quando aumentado, indica carcinogênese. No mesmo estudo citado acima, foi determinado que o TPO não alterou os níveis de 8-OH-dG. Isso corrobora, portanto, a sugestão de que o TPO não provoca dano no DNA (TURKEZ et al., 2015).

Recentes estudos também têm sugerido que o TPO apresenta atividades antioxidantes, com base em métodos de mensuração de *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH), *hexanal/hexanoic acid assay*, *thiobarbituric acid reactive species* (TBARS), e *β -carotene agar diffusion methods* (DORMAN et al., 2000; RUBERTO; BARATTA, 2000; KIM et al., 2004; MOHAMED et al., 2010). Também tem sido observado que o TPO em concentrações abaixo de 150 mg/L não provocou qualquer alteração nos níveis de estresse oxidativo total, porém, nas doses de 150 a 200 mg/L, ele aumentou esses níveis em culturas de células humanas (TURKEZ et al., 2015).

Dessa forma, além de não sugerir genotoxicidade, o TPO apresentou atividade antioxidante em linfócitos humanos. Assim, o TPO, em baixas concentrações, tem o potencial para ser utilizado como terapia antioxidante.

8.2 Antimutagenicidade

O TPO também foi testado quanto a um possível potencial antimutagênico. Foram feitos estudos *in vitro* para as propriedades antiproliferativas e/ou citotóxicas com base nos níveis de MTT, potencial de dano genotóxico usando o gel de eletroforese de célula única (SCGE) e efeitos oxidativos por meio da capacidade antioxidante total (CAT) e do estresse oxidativo total (EOT) em culturas de neurônios de ratos e células N2a de neuroblastoma. Os resultados demonstraram haver um decréscimo na proliferação celular a partir de uma concentração de 100 mg/L e nas células de neuroblastoma a partir de 50 mg/L. O TPO não foi genotóxico em nenhuma das duas linhagens de célula e, nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/L, aumentou o TAC em neurônios primários de ratos, mas não nas células N2a. Todavia, em concentrações acima de 50 mg/L ele aumentou o estresse oxidativo total em ambas as linhagens. Dessa forma, os resultados desse estudo demonstraram que o TPO é um potente agente antiproliferativo para células tumorais cerebrais e poderia ter um potencial como um agente anticâncer (TURKEZ et al., 2015).

Chen et al., 2004, reportaram um potente efeito anticâncer do TPO contra linhagens de células cancerígenas de mama e de colo uterino. Okumura et al., 2012, observaram que o TPO reduziu a expressão de proteína AKT1 em células K562 humanas para leucemia e inibiu a proliferação celular. Enquanto que o

mecanismo exato de ação citotóxica do TPO não é reconhecido, ele é atribuído principalmente ao estresse oxidativo.

Quanto à citotoxicidade, o TPO a 100 mg/L por 24 h não causou nenhuma alteração na viabilidade celular em neurônios primários de ratos. Porém, em doses maiores, como 200 e 400 mg/L, ele se tornou citotóxico (TURKEZ et al., 2015).

8.3 Atividade antioxidante

O TPO em concentrações de 100 mg/L e 200 mg/L não afetou a capacidade antioxidante total (CAT) em neurônios primários de ratos. Contudo, houve um aumento significativo da CAT nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/L e um decréscimo nesse parâmetro em concentrações mais altas, como 400 mg/L, quando comparado ao controle (TURKEZ et al., 2015; FONG, 2016).

Similarmente, nas células N2a de neuroblastoma, o TPO a 10 e 25 mg/L não alterou a CAT. Contudo, quando comparado ao controle, houve decréscimo nesses níveis quando o TPO foi aplicado em concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg/L. Todavia, os níveis de estresse oxidativo total (EOT) aumentaram quando nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/L de TPO em neurônios primários de ratos, não havendo efeito em doses abaixo de 100 mg/L de TPO (TURKEZ et al., 2015; FONG, 2016).

Nas células N2a de neuroblastoma, o EOT aumentou significativamente com concentrações de 50 mg/L a 400 mg/L. Este último achado tem efeito terapêutico positivo, uma vez que para o tratamento do câncer é essencial que haja uma toxicidade seletiva para células cancerígenas, a fim de retardar e/ou abolir a progressão das células tumorais. Isso seria provocado, em tese, no caso do TPO, pelo aumento de espécies reativas de oxigênio de forma seletiva para células cancerígenas (TURKEZ et al., 2015; FONG, 2016).

Os autores também observaram que o TPO a 400 mg/L reduziu a CAT e aumentou o EOT em neurônios saudáveis. Além disso, quando administrado a 25 mg/L, ele reduziu significativamente o CAT e aumentou o EOT em células cancerígenas de neuroblastoma. Esses resultados sugerem que altas concentrações de compostos monoterpênicos, como é o caso do TPO, poderiam provocar efeitos neurotóxicos seletivos sobre células cancerígenas, ao reduzirem os níveis de glutatona e estimular a liberação de LDH pelos hepatócitos, o que é um efeito positivo, considerando o tratamento das neoplasias (TURKEZ et al., 2015).

Nota-se, portanto, que, além de amplo potencial terapêutico a ser desenvolvido, bem como segurança conferida em estudos pré-clínicos (MASTEN e TICE, 1999; MOURA, 2012), é sugerido que o TPO apresenta, ainda, baixa toxicidade e um potencial antioxidante.

Contudo, ainda que ele seja um fármaco com todas essas vantagens, é importante salientar que há diversas condições clínicas que limitam a administração de fármacos por via oral, como por exemplo, insuficiência hepática e distúrbios gastrointestinais. Nesse caso, vias alternativas de administração, como a transdérmica, por exemplo, são também estudadas, a fim de, dentre outros objetivos, permitir que o princípio ativo desvie do metabolismo hepático de primeira passagem, havendo assim um melhor aproveitamento do fármaco, menor risco de sobrecarga ao fígado, menos agressão à mucosa gastrointestinal e maior aderência medicamentosa (XIAO-XIAO et al., 2013).

Desse modo, formulações de fármacos para administração transdérmica podem ser uma boa solução para essas limitações (YACUBIAN, 2002).

9. Medicamentos transdérmicos para tratamento da dor

Considerando a alta incidência de efeitos colaterais relacionados à administração sistêmica de fármacos, bem como limitações quanto ao período de duração de ação da substância, vários estudos têm sido desenvolvidos visando uma alternativa de tratamento mais segura, tolerável e eficaz. Uma das soluções para minimizar essas limitações pode ser por meio do desenvolvimento de microemulsões (MEs) para elaboração de formulações transdérmicas, a fim de melhorar a biodisponibilidade, bem como facilitar a via de administração (FIGUEIREDO et al., 2016).

O fentanil e a buprenorfina são exemplos de medicamentos desenvolvidos para administração transdérmica. Contudo, não somente fármacos com efeito analgésico estão disponíveis para esse tipo de formulação. O metilfenidato (*D,L-threo-MPH*), por exemplo, que é frequentemente prescrito em sua forma racêmica (mistura de 50:50 de isômeros D e L) para tratar transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, também teve desenvolvida sua formulação transdérmica. Quando comparada à administração por via oral, por exemplo, a formulação transdérmica

demonstrou um maior controle quanto à liberação do fármaco no organismo, gerando vantagens para o paciente, dentre as quais uma redução na quantidade de administrações do medicamento ao longo do dia (AHMEDZAI; BROOKS, 1997; ZHANG et al., 2016).

Para o desenvolvimento dessas formulações, é necessário um amplo conhecimento da farmacocinética da substância a ser considerada como princípio ativo. No caso do metilfenitado transdérmico, por exemplo, os autores já sabiam que o *D-threo-methylphenidate hydrochloride (D-threo-MPH)* é o enantiomero farmacologicamente ativo da *D-threo* da mistura racêmica do MPH. Já o *L-threo-methylphenidate hydrochloride* não pareceu contribuir para a eficácia do *D,L-threo-methylphenidate hydrochloride*. Portanto, eles desenvolveram a formulação com o *D-threo-MPH* (ZHANG et al., 2016).

Para o desenvolvimento das microemulsões (MEs), é necessário que o fármaco e os compostos aos quais ele é associado passem por diversas análises, dentre as quais estudos de caracterização físico-química, validação, solubilidade e cinética de liberação *in vitro*. Para elaboração das MEs, é exigido o conhecimento de quais compostos poderão ser usados em associação ao fármaco a fim de otimizar suas características farmacocinéticas (FIGUEIREDO et al., 2016).

Levando em conta esses conhecimentos farmacocinéticos para a prática do desenvolvimento de fármacos e suas diferentes vias de administração, um estudo envolvendo pacientes com câncer e que requeriam altas doses de opióides, por exemplo, comparou o tratamento de fentanil transdérmico com morfina de liberação sustentada por via oral. Ambos pareceram igualmente eficazes em termos de controle da dor, conforme os escores da *Memorial Pain Assessment Card and European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*. O fentanil transdérmico foi associado a menos constipação intestinal e menos sonolência diurna, porém com mais distúrbios do sono e menor duração do sono do que a morfina. Os autores concluíram que o fentanil transdérmico provocou um alívio da dor mais aceitável para os pacientes (AHMEDZAI; BROOKS, 1997).

Dentre as formulações transdérmicas, já foi desenvolvido um sistema transdérmico iontoforético para o fentanil (ITS) a fim de manejar a dor pós-operatória. Em três estudos placebo-controlados na fase III, o fentanil ITS foi superior ao placebo em termos de manejo de dor aguda pós-operatória. Em quatro

estudos de comparações ativas de fase IIIb, o fentanil ITS demonstrou eficácia similar à morfina IV (VISCUSI et al., 2016).

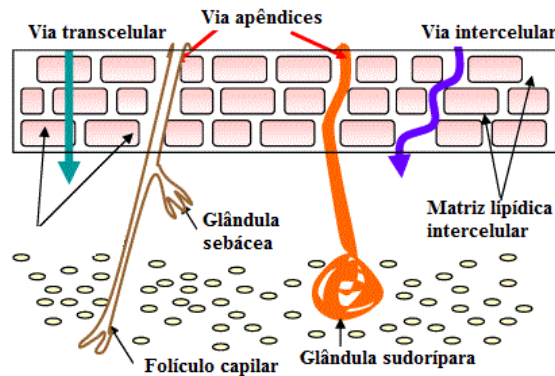
10 Fisiologia da pele

A pele é um órgão extenso, que recobre o exterior do corpo, variando sua estrutura de um local para outro, de acordo com suas funções específicas. Dentre estas funções, destacam-se proteção contra agentes externos; termorregulação; sensopercepção (tato, calor, pressão, dor) e secreção de lipídios protetores. Suas camadas principais são a epiderme e a derme, e uma terceira camada variável, a subcutânea (REICHLING et al., 2006).

Além disso, a pele funciona como barreira e local ideal para aplicação de ativos, uma vez que a via de administração transdérmica pode permitir, dentre outras vantagens, uma liberação de quantidades controladas de substâncias ativas, o que pode significar uma melhor praticidade quanto ao manejo e administração do fármaco (ALVES, 2015).

A absorção dos ativos acontece por difusão pela epiderme ou pelos apêndices cutâneos. Quando a difusão ocorre pela epiderme, pode ser entre ou através dos queratinócitos, pelo meio intercelular (pelos lipídios do estrato córneo) ou transcelular (entre os lipídios do estrato córneo), respectivamente. Além disso, pode ocorrer também de forma transpendicular (através de glândulas e folículos) (**Figura 7**). A permeação é essencialmente regulada por dois aspectos: a estrutura da pele (aspectos concorrentes para a sua função barreira) e parâmetros físico-químicos dos permeantes. Intuitivamente, tudo o que for pequeno e moderadamente lipofílico deverá atravessar a barreira (SIMÕES, 2004; LEONARDI, 2008).

Figura 7: Vias de penetração cutânea de fármacos.



. **Fonte:** Adaptado de HOLMGAARD e NIELSEN, 2009

Logo, em condições normais, a permeação de substâncias na pele é muito difícil, dependendo não apenas das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também do seu comportamento quando colocado em um veículo farmacêutico e, também, da penetração da pele. Logo, cada combinação de fármaco/veículo deve ser examinada individualmente quanto à permeação cutânea e eficácia (CHORILLI et al., 2007).

A administração transdérmica impede que o efeito de primeira passagem hepática ocorra. Além disso, alguns eventos indesejáveis no estômago, como náuseas, dispepsia, diarreia, constipação, ulceração e sangramento na mucosa, que costumam ocorrer quando da administração de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) por via oral, o que pode ser prevenido pela administração transdérmica. Ademais, a via transdérmica oferece vantagem sobre a via intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (NARUSE et al., 2014).

11. Desenvolvimento de microemulsões contendo TPO

As MEs são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por misturas de quatro componentes: água, óleo, tensoativo e co-tensoativo. Apresentam grande potencial como sistemas de liberação e de direcionamento de fármacos, pelas propriedades de solubilizar fármacos hidrofílicos em meio lipofílico, lipofílicos em meio aquoso e anfifílicos na interface óleo/água (SILVA, 2009).

Conforme Pascoa (2012), os sistemas microemulsionados foram descritos originalmente por Hoar e Schulman em 1943, quando geraram uma solução transparente, de única fase, por titulação de uma emulsão de aspecto leitoso com hexanol.

A utilização das MEs na tecnologia farmacêutica é relativamente recente e tem despertado grande interesse como sistema de liberação de fármacos no organismo, principalmente pela facilidade de sua preparação e por apresentarem elevadas taxas de difusão e penetração na pele (SILVA et al, 2015).

As MEs se apresentam descritas na literatura como sistemas reservatórios e permitem liberação lenta do fármaco, proporcionando efeito prolongado, evitando-se assim atingir concentrações plasmáticas acima do necessário. Isso torna, portanto, o tratamento mais seguro e com menos efeitos adversos (DALMORA; DALMORA; OLIVEIRA, 2001). São capazes de incorporar fármacos de acordo com as respectivas características destes, bem como do transportador e do alvo que se pretende atingir. Devem ser consideradas a polaridade, a afinidade e a solubilidade do fármaco, bem como as características dos transportadores – direcionamento do fármaco, liberação controlada e/ou prolongada e as características do órgão, tecido ou células que deverão receber esse fármaco (SILVA, 2013).

A fase interna das MEs constitui um microambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades, sendo veículo para diversos compostos, incluindo os terpenos (OLIVEIRA et al., 2004).

A mistura dos componentes da fase aquosa, fase oleosa, tensoativo e co-tensoativo, na região de ME de um diagrama de fases é capaz de formar diferentes estruturas internas. A estrutura formada é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos componentes utilizados e da razão entre os componentes (**Figura 8**). Existem basicamente três tipos de MEs: água em óleo (A/O), em que gotas de água ficam dispersas em óleo; óleo em água (O/A), em que gotas de óleo são dispersas em água; e bicontínuas, em que tanto água como óleo formam domínios que se comunicam, de modo que ambos se comportam como se fossem uma fase contínua (DAMASCENO et al, 2011).

Figura 8: Tipos de microemulsões esquematizadas pela fase oleosa (cinza), pela fase aquosa (branca) e por um filme interfacial de tensoativo/cotensoativo.



Fonte: DAMASCENO et al., 2011

O processo de liberação dos fármacos das MEs é caracterizado pela transferência do fármaco da fase dispersa para a fase contínua e pela difusão do fármaco da fase contínua para o meio externo. Dessa forma, a permeação do fármaco no sítio de ação será inicialmente influenciada pela concentração do fármaco na fase externa da ME. A diferença entre o mecanismo de liberação de fármacos das soluções em relação às MEs pode ser atribuída à partição do fármaco entre as gotículas dispersas no óleo e a fase contínua (TROTTA et al., 1989).

Faz-se necessário que as mensurações analíticas para elaboração de MEs sigam parâmetros pré-estabelecidos para serem confiáveis, ou seja, metodologias validadas. A validação consiste em um aspecto vital da garantia da qualidade de uma empresa, pois avalia a conformidade dos produtos farmacêuticos. Dessa forma, a validação de uma metodologia analítica objetiva avaliar se o método desenvolvido é apropriado para o objetivo ao qual se propõe (BARROS, 2002).

12. Validação de métodos analíticos

Validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, por meio do estabelecimento de documentações, tudo o que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente até os insumos e matérias-primas que entram em sua composição. Em outras palavras, validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a

mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância rigorosamente pré-estabelecidos (ATHAIDE, 2000; MORETTO, SHIB, 2000; EMANUELLI, 2000; NICOLÓSI, 2003).

De acordo com a *United States Pharmacopeia XXIV* (2000), validação de métodos analíticos é o processo pelo qual é estabelecido, por meio de estudos de laboratório, que as características executadas do método satisfaçam os requisitos para as aplicações analíticas praticadas. As características analíticas típicas usadas na validação de métodos são exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, intervalo de aceitação, robustez ou resistência e conformidade do sistema (ESPIRES, 1998; PECORA, 2000; PINTO et al., 2003).

Os métodos analíticos utilizados para esses estudos devem estar descritos na Farmacopeia Brasileira ou em outros compêndios oficiais aprovados ou referendados pela ANVISA. Tanto a indústria farmacêutica quanto o centro responsável pelo estudo devem testar a capacidade de seus equipamentos e analistas em reproduzir de forma fidedigna o método compendial. Esse procedimento é denominado adequabilidade. Porém, se ocorrer de a metodologia inexistir nessas monografias oficiais, a indústria patrocinadora do estudo deve desenvolver e validar a metodologia que será utilizada (BRASIL, 2010).

REFERÊNCIAS

AHMAD, N. S.; WAHEED, A.; FARMAN, M.; QAYYUM, A.; Analgesic and anti-inflammatory effects of *Pistacia integerrima* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, p. 250-253, 2010.

AHMEDZAI, S.; BROOKS, D. Transdermal Fentanyl versus Sustained-Release Oral Morphine in Cancer Pain: Preference, Efficacy, and Quality of Life. **Journal of Pain and Symptom Management**. , v. 13, p. 254-261, 1997.

AL-HASANI, R.; BRUCHAS, B. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. **Anesthesiology**, V 115, p. 1363-1381, 2011.

AL-JABRI, N. N.; HOSSAIN, M. A. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 247-253, 2014.

ALDAHMASH, B. A., EL-NAGAR, D. M., IBRAHIM, K. E., METWALY, M. S. Biotin amelioration of nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n.3, p. 243-358, 2015.

ALMANÇA, C.; POZZATTI, P. ; CASAGRANDE, F.; SILV FILHO, J.; BISSI, B.; BARBOSA, B.; PORFÍRIO, L. Eficácia in vitro de extratos de *Chenopodium ambrosioides* sobre teleóginas de *Rhicephalus (Boophilus) microplus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.43-49, 2013.

ALMEIDA, P. C.; SILVA, D. A. Antiinflamatórios não esteroidais mais dispensados em uma farmácia de manipulação do município de Itaperuna - Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v.4, n.1, 2013.

ALVES, N. C. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. **Amazônia: Science & Health**, v. 3, n. 4, p. 36-43, 2015.

ARORA, N.; CAO, M.; JAVAHERI, S. Opioids, Sedatives, and Sleep Hypoventilation. **Sleep Medicine Clinics**, v. 9, p. 391–398, 2014.

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.; JESSEL, T.. **Principles of Neuroscience**. New York: Appleton and Lange, 2000. p. 472–491.

BATISTA, P. A.; WERNER, M. F. P.; OLIVEIRA, E.C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L. F. S.; SANTOS, A. R. S. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. **Neuroscience letters**, v.440, p. 299-303, 2008.

BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects - Review Article. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.4, p.522-529, 2010.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, p. 175-177, 2002.

BAUER, C.; NIETO-ROSTRO, M.; RAHMAN, W.; TRAN-VAN-MINH, A.; FERRON, L.; DOUGLAS, L.; KADURIN, I.; SRI RANJAN, Y.; FERNANDEZ-ALACID, L.; MILLAR, N.; DICKENSON, A.; LUJAN, R.; DOLPHIN, A. The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic

pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. **Journal of Neuroscience** , v.29, p. 4076–4088, 2009.

BINGHAM, B.; AJIT, S.; BLAKE, D.; SAMAD, T. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 5, p. 28-37, 2009.

BOHREN, Y.; TESSIER, L.; MEGAT, S.; PETITJEAN, H.; HUGEL, S.; DANIEL, D.; KREMER, M.; FOURNEL, S.; HEIN, L.; SCHLICHTER, R.; FREUND-MERCIER, M.; YALCIN, I.; BARROT, M. Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral beta2-adrenoceptor mediated anti-TNFalpha mechanism. **Neurobiology Disease** , v. 60, p.39–50, 2013.

BOYLE, R.; MCLEAN, S.; DAVIES, N. Biotransformation of 1,8-cineole in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). **Xenobiotica** , v. 30, p. 915-32, 2000.

BOYLE, R.; MCLEAN, S.; FOLEY, W.; DAVIES, N. Comparative metabolism of dietary terpene, p-cymene, in generalist and specialist folivorous marsupials. **Journal of Chemical Ecology** , v. 25, p. 2109- 2127, 1999.

BRIDGESTOCK, C.; RAE, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 480-483, 2013.

CABRAL, C.; Poças, J.; Gonçalves, M. J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M. T.; Salgueiro, L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidante and anti-inflammatory essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 56-61, 2015.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F.; POGREL, J.; CHUNG, J.; YAKSH, T. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.

CHEN, F.; KIM, H.; WANG, X.; WU, C.; CHUNG, H.; JIN, Z. Evaluation of antioxidant and antiproliferative activities of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. In: **IFT Annual Meeting**; ,p. 12-16, 2004.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A.S.; RODRIGUES, C.A.; SALGADO, H.R.N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. Piracicaba, **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 88, n.1, p. 7-13, 2007.

CHOUCAIR-JAAFAR N, SALVAT E, FREUND-MERCIER MJ, BARROT M. The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by beta(2)

adrenoceptors and delta opioid receptors in the ob/ob model of diabetic polyneuropathy. **Brain Research**, v. 1546, p. 18–26, 2014.

CHRYSTIE, P.; OWEN, M. Opioids in the management of persistent, non-cancer pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 12, n. 2, p. 44-45, 2011.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; MADRID, I.; FONSECA, A. O.; ALVES, G. H.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, 2012.

CODERRE, T.; KUMAR, N.; LEFEBVRE, C.; YU, J. Evidence that gabapentin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, p. 1131–1139, 2005.

COELHO-DE-SOUZA, L. N.; GOMES, S. T.; ABDON, A. P. V.; CAMPOS, A. R. Physical therapists understanding and attitudes toward non-steroid anti-inflammatory drugs. **Revista Dor.**, v.14, n.1, p.44-47, 2013.

COSTIGAN, M., SCHOLZ, J., WOOLF, C.J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v.32, p.1-32, 2009.

CRAGG, J.; NOONAN, V.; NOREAU, L.; BORISOFF, J.; KRAMER, J. Neuropathic pain, depression, and cardiovascular disease: a national multicenter study. **Neuroepidemiology**, v. 44, 130–137, 2015.

DAGNE, E.; BISLAT, D.; ALEMYEHU, M.; WORKU, T.J. Essential oils of twelve eucalyptus species from Ethiopia. **Essential Oil Research**, v. 12, p. 467–470, 2000.

DALMORA, M. E. A.; DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 222, p. 45-55, 2001.

DAMASCENO, B.; SILVA, J.; OLIVEIRA, E.; SILVEIRA, W.; ARAÚJO, I.; OLIVEIRA, A.; EGITO, E. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 32, p. 9-18, 2011.

DENG, L.; LEEB, W.; XUC, Z.; MAKRIYANNISD, A.; HOHMANN, A. Prophylactic treatment with the tricyclic antidepressant desipramine prevents development of paclitaxel-induced neuropathic pain through activation of endogenous analgesic systems. **Pharmacological Research**, v. 114, p. 75–89, 2016.

DING, L.; CAI, J.; GUO, X.; MENG, X.; XING, G. The antiallodynic action of pregabalin may depend on the suppression of spinal neuronal hyperexcitability in rats with spared nerve injury. **Pain Research and Management**, v.19, p. 205–211, 2014.

DORMAN, H.; FIGUEIREDO, A.; BARROSO, J.; DEANS, S. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v.15, p. 12–16, 2000.

DWORKIN, R.H.; O'CONNOR, A.B.; BACKONJA, M.; FARRAR, J.T.; FINNERUP, N.; JENSEN, T.; KALSO, E.; LOESER, J.; MIASKOWSKI, C.; NURMIKKO, T.; PORTENOY, R.; RICE, A.; STACEY, B.; TREEDE, R.; TURK, D.; WALLACE, M. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**, v.132, n.3 p. 237-251, 2007.

EROL, A. Systemic DNA damage response and metabolic syndrome as a premalignant state. **Current Molecular Medicine**, v. 10, p. 321–334, 2010.

EVRENDILEK, G. A. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, n. 2, p. 35-41, 2015.

FALK AA, HAGBERG MT, LOF AE, WIGAEUS-HJELM EM, ZHIPING W. Uptake, distribution and elimination of alpha-pinene in man after exposure by inhalation. **Scandinavian Journal of Work Environment and Health**, v. 16, p. 372-378, 1990.

FIELD, M.; COX, P.; STOTT, E.; MELROSE, H.; OFFORD, J.; SU, T.; BRAMWELL, S.; CORRADINI, L.; ENGLAND, S.; WINKS, J.; KINLOCH, R.; HENDRICH, J.; DOLPHIN, A.; WEBB, T.; WILLIAMS, D. Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, p. 17537–17542, 2006.

FIGUEIREDO, K.; NEVES, J.; SILVA, J.; FREITAS, R.; CARVALHO, A. Phenobarbital loaded microemulsion: development, kinetic release and quality control. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 1-13, 2016.

FINNERUP, N.; NORRBRINK, C.; TROK, K.; PIEHL, F.; JOHANNESSEN, I.; SØRENSEN, J.; JENSEN, T.; WERHAGEN, L. Phenotypes and predictors of pain following traumatic spinal cord injury: a prospective study. **Journal of Pain** , v. 15, p. 40–48, 2014.

FOLEY, W.; LASSAK, E.; BROPHY, J. Digestion and absorption of Eucalyptus essential oils in greater glider (*Petauroides volans*) and brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). **Journal of Chemical Ecology** , v.13, p. 2115-30, 1987.

FONG, C. Platinum anti-cancerdrugs: Free radical mechanism of Pt-DNA adduct formation and anti-neoplastic effect **Free Radical Biology and Medicine**. v. 95, p. 216–229, 2016.

FURIA, T.E.; BELLANCA, N. **Fenaroli's Handbook Flavor Ingredients**. CRC Press, Cleveland, Ohio, 2ed., v. II, p. 523, 1975.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, p. 898-904, 2007.

GANGADHARAN, V.; KUNER, R. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. **Disease models & mechanisms**, v. 6, p. 889–95, 2013.

GONCALVES, L.; DICKENSON, A. Asymmetric time-dependent activation of right central amygdala neurones in rats with peripheral neuropathy and pregabalin modulation. **European Journal of Neuroscience** , v.36, p. 3204–3213, 2012.

GRABMANN, J.; HIPPELI, S.; SPITZENBERGER, R.; ELSTNER, E. F. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6–7, p. 416-423, 2005.

GRACE, P.; HUTCHINSON, M.; MAIER, S.; WATKINS, L. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology** , v. 14, p. 217–231, 2014.

GREENE, S. A. Chronic Pain: Pathophysiology and Treatment Implications. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 5-9, 2010.

GUIMARÃES, A.G.; XAVIER, M.A.; SANTANA, M.T.; CAMARGO, E.A.; SANTOS, C.A.; BRITO, F.A.; BARRETO, E.O.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.;

OLIVEIRA, R.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 385, p. 253–263, 2012.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M.A.; ALVES R DOS, S.; MENEZES PDOS, P.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.; BEZERRA, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.

HASUDUNGAN, A. **Nociceptors - an introduction to pain**, 2013.

HELD, S.; SCHIEBERLE, P.; SOMOZA, V. Characterization of alpha terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8040–8046, 2007.

HENDRICH, J.; VAN MINH, A.; HEBLICH, F.; NIETO-ROSTRO, M.; WATSCHINGER, K.; STRIESSNIG, J.; WRATTEN, J.; DAVIES, A.; DOLPHIN, A. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p. 3628–3633, 2008.

HOOKER, B.; TOBON, G.; BAKER, S.; ZHU, C.; HESTERMAN, J.; SCHMIDT, K.; IGIMI, H.; NISHIMURA M. Studies on the metabolism of d-limonene (p-Mentha-1,8-diene). I. The absorption, distribution, and excretion of d-limonene in rats. **Xenobiotica**, v. 4, p. 77-84, 1974.

IKEDA, T.; ISHIDA, Y.; NAONO, R.; TAKEDA, R.; ABE, H.; NAKAMURA, T.; NISHIMORI, T. Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. **Neuroscience Research**, v.63, p. 42-6, 2009.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Part III: Pain terms, a current list with definitions notes on usage classification of chronic pain, in: MERSKEY, H.; BOGDUK, N (Editores), **IASP Task Force on Taxonomy**, 2 ed, Seattle: IASP Press, p. 209-214, 1994.

JI, L.; XU, Z.; GAO, Y. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews/Drug Discovery**, v.13, p. 533-548, 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KAMIRI, A.; HADIAN, J.; FARZANEH, M.; KHADIVI-KHU, A. Phenotypic diversity and volatile composition of Iranian *Artemisia dracunculus*. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 315–323, 2015.

KAPUR, B. M.; LALA, P. K., SHAW, J. L.V. Pharmacogenetics of chronic pain management. **Clinical Biochemistry**, n.47, p. 1169–1187, 2014.

KATZ, W.; BARKIN, R. Dilemmas in chronic/persistent pain management. **Disease a Month** , v. 56, p. 233-50, 2010.

KAWATA, J.; KAMEDA, M.; MIYAZAWA, M. Cyclooxygenase-2 inhibitory effects of monoterpenoids with a p-menthane skeleton. **International Journal Essential Oil Therapeutic**, v. 2, p. 145–148, 2008.

KHALIL, Z.; PEARCE, A.L.; SATKUNANATHAN, N.; STORER, E.; FINLAY-JONES, J.J.; HARTWZ, P.H. Regulation of wheal and flare by tea tree oil: complementary human and rodent studies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p. 683–690, 2004.

KIGUCHI, N.; DING, H.; KO, M. **Pharmacological Mechanisms and the Modulation of Pain.**, 1. ed. v. 75, 2016.

KIM, H.; CHEN, F.; WU, C.; WANG, X.; CHUNG, H.; JIN, Z. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v. 52, p. 2849–2854, 2004.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pain pathophysiology. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KONAT, G. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. **Journal of Bioscience**, v. 28, p. 57–60, 2003.

KRAMER, J.; MINHAS, N.; JUTZELER, C.; ERSKINE, E.; LIU, L.; RAMER, M. Neuropathic Pain Following Traumatic Spinal Cord Injury: Models, Measurement, and Mechanisms. **Journal of Neuroscience Research**, 2016.

KRAYCHETE, D. C., GARCIA, J. B. S., SIQUEIRA, J. T. T. Recommendations for the use of opioids in Brazil: Part IV. Adverse opioid effects. **Revista Dor**. v. 15, n. 3, p. 215-223 ,2014.

- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.
- LEE, B.; JUN, I.; KIM, S.; PARK, J. Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. **Journal of Korean Medicine Science** , v.28, p.308–314, 2013.
- LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. 2ª edição. São Paulo, Santa Izabel, 2008.
- LERDA, D.; BIAGGI BISTONI, M.; PERALTA, N.; YCHARI, S.; VAZQUEZ, M.; BOSIO, G. Fumonisin in foods from Cordoba (Argentina), presence and genotoxicity. **Food and Chemistry Toxicology** , v. 43, p. 691–698, 2005.
- LEUNG, L.; CAHILL, C. TNF-alpha and neuropathic pain—a review. **Journal of Neuroinflammation**, v.7, p. 27, 2010.
- LEWIS, R.; KRIUKELYTE, I. Complex neuropathic pain states. **Pain**, v. 17, p. 571-574, 2016.
- LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009.
- LIMA, D.F.; BRANDÃO, M.S.; MOURA, J.B.; LEITÃO, J.M.; CARVALHO, F.A.; MIÚRA, L.M.; LEITE, J.R.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 283–292, 2012.
- LINDENLAUB T.; SOMMER C. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. **Acta Neuropathologica**, v. 105, p. 593–602, 2003.
- LI, J.; ZHANG, Y. Emerging drug targets for pain treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 681, p. 1-5, 2012.
- LORENZ, M.D.; COATES, J.R.; KENT, M. Pain. In:_____ **Handbook of veterinary neurology**. 5 ed. Missouri: Elsevier Saunders, p. 413-431, 2011.
- LOTA, M.L.; SERRA, D.; JACQUEMOND, C.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. **Flavour and Fragrance Journal**, v., 16, p. 89–96, 2001.

LUO, Z.; CHAPLAN, S.; HIGUERA, E.; SORKIN, L.; STAUDERMAN, K.; WILLIAMS, M.; YAKSH, T. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. **Journal of Neuroscience** , v. 21, p. 1868–1875, 2001.

LUO, Z.; CALCUTT, N.; HIGUERA, E.; VALDER, C.; SONG, Y.; SVENSSON, C.; MYERS, R. Injury type-specific calcium channel alpha 2 delta-1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. **Journal of Pharmacol Experimental Therapeutics** , v.303, p. 1199–1205, 2002.

MA, Y.; MARSTON, G. Formation of organic acids from the gas-phase ozonolysis of terpinolene. **Physical Chemistry Chemical Physics** , v. 11, p. 4198–4209, 2009.

MACEDO, E. **Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da associação do terpinoleno com diclofenaco ou celecoxibe na inflamação crônica.** 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Núcleo de Pesquisa em Plantas medicinais, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

MARQUESI, D. D.; Sartorill, R. A.; Lemosill, T. L. G.; Machado, L. L.; Souza, J. S. N.; Monte, F. J. Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica.**, v.40, n.1, p. 227-230, 2010.

MARNETT, J. L. The COXIB Experience: A Look in the Rearview Mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 265-290, 2009.

MARTINO, L.; NAZARRO, R.; MANCINI, E.; DE FEO, V. Essential Oils from Mediterranean Aromatic Plants. In: **The Mediterranean Diet**, p. 649–661, 2015.

MASTEN, S; TICE, R. **Terpinolene [CASRN586-62-9] Review of Toxicological literature.** National Institute of Environmental Health Sciences, 1999.

MATSUMOTO, M.; INOUE, M.; HALD, A.; XIE, W.; UEDA, H. Inhibition of paclitaxel-induced A-fiber hypersensitization by gabapentin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** , v. 318, p. 735–740, 2006.

MATSUZAWA, R.; FUJIWARA, T.; NEMOTO, K.; FUKUSHIMA, T.; YAMAGUCHI, S.; AKAGAWA, K.; HORI, Y. Presynaptic inhibitory actions of pregabalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of mouse spinal cord: further characterization of presynaptic mechanisms. **Neuroscience Letter** , v. 558, p.186–191, 2014.

MICO, J.; ARDID, D.; BERROCOSO, E.; ESCHALIER, A. Antidepressants and pain. **TRENDS in Pharmacological Sciences** , v.7, p. 348-354, 2006.

MIKA, J.; JURGA, A.; STARNOWSKA, J.; WASYLEWSKI, M.; ROJEWSKA, E.; MAKUCH, W.; KWIATKOWSKI, K.; MALEK, N.; PRZEWLOCKA, B. Effects of chronic doxepin and amitriptyline administration in naive mice and in neuropathic pain mice model. **Neuroscience** , v. 294, p. 38–50, 2015.

MINSON, F. P.; MENTZ-ROSANO, L. **Dor musculoesquelética** -Fascículo 04. Sociedade Brasileira para Estudo da Dor – SBED. 2013.

MISERA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for SOD. **The Journal of Biological Chemistry** v. 247, p. 3170–5, 1972.

MOHAMED, A.; EL-EMARY, G.; ALI, H. Influence of some citrus essential oils on cell viability, glutathione-S-transferase and lipid peroxidation in Ehrlich ascites carcinoma cells. **Journal of American Science** , v. 6, p. 820–826, 2010.

MOREIRA, M.R.; CRUZ, G.M.; LOPES, M.S.; ALBUQUERQUE, A.A.; LEAL-CARDOSO, J.H. Effects of terpineol on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 34, p. 1337–1340, 2001.

MORIMOTO, S.; ITO, M.; ODA, S.; SUGIYAMA, A.; KURODA, M.; ADACHI-AKAHANE, S. Spinal mechanism underlying the antiallodynic effect of gabapentin studied in the mouse spinal nerve ligation model. **Journal Pharmacological Sciences** , v. 118.p. 455–466, 2012.

MOULIN, D. E.; CLARK, A. J.; GORDON, A.; LYNCH, M.; MORLEY-FORSTER, P. K.; NATHAN, H.; SMYTH, C.; TOTH, C.; VANDENKERKHOF, E.; GILANI, A.; WARE, M.A. Long Term Outcome of The Management of Chronic Neuropathic Pain – A Prospective Observational Study. **The Journal of Pain**, v. 16, n. 9, p. 852-861, 2015.

MOURA, J. **Avaliação da atividade antinociceptiva do terpinoleno em roedores e possíveis mecanismos de ação envolvidos**. 2012. 119p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Farmacologia), UFPI.

NARITA, M.; NAKAJIMA, M.; MIYOSHI, K.; NAGUMO, Y.; MIYATAKE, M.; YAJIMA, Y.; YANAGIDA, K.; YAMAZAKI ,M.; SUZUKI, T. Role of spinal voltagedependent calcium channel alpha 2 delta-1 subunit in the expression of a neuropathic pain-like state in mice. **Life Sciences** , v. 80, p. 2015–2024, 2007.

NARUSE, M.; OGAWARA, K.; KIMURA, T.; KONISHI, R.; HIGAKI, K. Development of transdermal therapeutic formulation of CNS5161, a novel NMDA receptor

antagonist, by utilizing pressure-sensitive adhesives II: Improved transdermal absorption and evaluation of efficacy and safety. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 86-94, 2014.

NICE Clinical Guideline 96. **Neuropathic pain: the pharmacological management of neuropathic pain in adults in non-specialist settings**. Draft for consultation, p. 155, 2010.

OKUMURA, N.; YOSHIDA, H.; NISHIMURA, Y.; KITAGISHI, Y.; MATSUDA, S. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. **Oncology Letters**, v.3, p. 321–324, 2012.

OLIVEIRA, A.; SCARPA, M.; CORREA, M.; CERA, L.; FORMARIZ, T. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, M.; MARQUES, R.; SANTANA, M.; SANTOS, A.; BRITO, F.; BARRETO, E.; DE SOUSA, D.; ALMEIDA, F.; BADAUÊ-PASSOS, D.; ANTONIOLLI, A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. α -Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 111, p. 120-125, 2012.

OLIVEIRA, P. F.; ALVES, J. M.; DAMASCENO, J. L.; OLIVEIRA, R. A. M.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 183-188, 2015.

OPDYKE, D., Fragrance raw materials monographs: Terpinolene. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 14, p.877-878, 1988.

ORTINSKI, P.; MEADOR, K. Cognitive side effects of antiepileptic drugs. **Epilepsy and Behavior**, v. 5, p. 60-65, 2004.

PASCOA, H. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão à base de óleo de sucupira (*P. emarginatus* Vog. Fabaceae) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

PAN, H.; EISENACH, J.; CHEN, S. Gabapentin suppresses ectopic nerve discharges and reverses allodynia in neuropathic rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** , v. 288, p. 1026–1030, 1999.

PARK, C.; CHA, Y.; YOUN, H.; CHO, C.; SONG, Y.. Amelioration of oxidative stress by dandelion extract through CYP2E1 suppression against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in Sprague–Dawley rats. **Phytotherapy Research** , v. 24, p. 1347–1353, 2010.

PASSOS, G.; FERNANDES, E.; DA CUNHA, F.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M.; CALIXTO, J. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PHILLIPS, C. The cost and burden of chronic pain. **Review Pain**, v. 3, p. 2-5, 2009.

PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M.; CALIXTO, J. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PIRES, L.; FREITAS, R.; RODRIGUES, A.. EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ATIVIDADE SEROTONINÉRGICA DA CURCUMINA EM MODELOS DE ANIMAIS DE DEPRESSÃO. **Revista de Farmacología de Chile**, v. 6, p. 37, 2013a.

PIRES, L. ; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; DE FREITAS, R. . Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013b.

PIRES, L. ; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; SATYAL, P.; DE FREITAS, R. . Neuropharmacological effects of carvacryl acetate on δ -aminolevulinic dehydratase, Na^+ , K^+ -ATPase activities and amino acids levels in mice hippocampus after seizures. **Chemico-Biological Interactions**, v. 226, p. 49-57, 2014a.

PIRES, L.; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; DE FREITAS, R. Is There a Correlation Between In Vitro Antioxidant Potential and In Vivo Effect of Carvacryl Acetate Against Oxidative Stress in Mice Hippocampus?. **Neurochemical Research**, v. 39, p. 758-769, 2014b.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; MELO, M.; DE SOUSA, D.; ARAÚJO, A.A.; ONOFRE, A.C.; GELAIN, D.P.; GONÇALVES, J.C.; ARAÚJO, D.A.; ALMEIDA, J.R.; BONJARDIM, L.R. Antinociceptive activity 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.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; OLIVEIRA, M.G.B.; SANTANA, M.F.; GUIMARÃES, A.G.; SIQUEIRA, J.S.; DE SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 583–586, 2011.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K.; SCHAEFER, U. *In vitro* studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 64, n. 2, p. 222-228, 2006.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de entomologia**, v. 53, n. 2, p. 304-307, 2009.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel. **Food Chemistry**, v. 69, p.167–174, 2000.

SAKURADA, T.; MIZOGUCHI, H.; KUWAHATA, H.; KATSUYAMA, S.; KOMATSU, T.; MORRONE, L.A.; CORASANITI, M.T.; BAGETTA, G.; SAKURADA, S. Intraplantar injection of bergamot essential oil induces peripheral antinociception mediated by opioid mechanism. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, p. 436–443, 2011.

SANTANA, M.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S.C.H.; OLIVEIRA, M.G.B.; GUIMARÃES, A.G.; CUNHA, E.S.; MELO, M.S.; SANTOS, M.R.V.; ARAÚJO, A.A.S.; BONJARDIM, L.R. P-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 1138- 1143, 2011.

SCHAIBLE, H.G. Pathophysiology of pain. **De Orthopade**. v. 36, n. 1, p. 8-16, 2006.

SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie**, v. 389, p. 237–243, 2004.

- SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicines usage. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2014.
- SHUBAYEV, V. I.; MYERS, R. R. Endoneurial remodeling by TNF- α and TNF- α releasing proteases. A apatial and temporal co-localization study in painful neuropathy. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 7, p. 28-36, 2002 .
- SIANI, A. C.; RAMOS, M. F.; MENEZES-DE-LIMA, O. JR.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNADEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G.; HENRIQUES, M. G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**., v. 66, n. 1, 57-69, 1999.
- SIDDALL, P.; LOESER, J. Pain following spinal cord injury. **Spinal Cord** , v. 39, p. 63–73, 2001.
- SIDDALL, P.; MCCLELLAND, J.; RUTKOWSKI, S.; COUSINS, M. A longitudinal study of the prevalence and characteristics of pain in the first 5 years following spinal cord injury. **Pain** , v. 103, p.249–257, 2003.
- SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.
- SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.; SOUZA, M.; DAMASCENO, B.; MEDEIROS, A. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 125-131, 2010.
- SILVA, G. B. R. F. **Desenvolvimento e caracterização físico-química e biofarmacêutica de nano e microemulsões lipídicas de uso intravenoso contendo metildiidrojasmonato**. 2013. 165 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- SILVA, J.D.F.; SILVA, Y.; PIATNICKI, C.; BOCKEL, W.; MENDONÇA, C. Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.
- SIMÕES, S.I. **Veiculação Transdérmica de Fármacos**. Moreira JR Editora, Lisboa, 2004; p. 200- 216, 2004.

SLATER T.F.; SAWYER B.C. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other alogenalkanes or peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. **Biochemical Journal** v. 123, p. 805–14, 1971.

SO, K.; HARAGUCHI, K.; ASAKURA, K.; ISAMI, K., SAKIMOTO, S.; SHIRAKAWA H.; MORI, Y.; NAKAGAWA, T.; KANEKO, S. Involvement of TRPM2 in a wide range of inflammatory and neuropathic pain mouse models. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, p. 237-243, 2015.

SOUTHWELL, I. A.; RUSSELL, M. F. Volatile oil comparison of cotyledon leaves of chemotypes of *Melaleuca alternifolia*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 4, p. 391-393, 2002.

STEIN, C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, n. 3, p. 179-187, set. 2013.

SUKHOTINSKY, I., DEVOR, M. Chapter 23 – Networks for the Modulation of Acute and Chronic Pain. In: FAINGOLD, C., BLUMENFELD, H. **Neuronal Networks in Brain Function, CNS Disorders, and Therapeutics**. p. 311-326, 2014.

SUTO, T.; EISENACH, J.; HAYASHIDA, K. Peripheral nerve injury and gabapentin, but not their combination, impair attentional behavior via direct effects on noradrenergic signaling in the brain. **Pain** , v. 155, p. 1935–1942, 2014.

SZABO, S.; TRIER, J.; BROWN, A.; SCHNOOR, J.; HOMAN, H.; BRADFORD, J. A quantification method for assessing the extent of experimental erosions and ulcers. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 13, p. 59 – 66, 1985.

TEIXEIRA, F.M. **Avaliação comparativa do efeito de fármacos antiinflamatórios com a acupuntura no modelo de dor pós-incisional em ratos**. 2010. 77p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

TONUSSI, C.R., FERREIRA, S.H. Rat knee- joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 421-7, 1992.

TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377-391, 2007.

TREDE, R.D.; JENSEN, T.; CAMPBELL, J.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY J.; GRIFFIN, J.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T.; SERRA, J.

Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, p. 1630- 1635, 2008.

TROTTA, M.; GASCO, M. R.; MOREL, S. Release of drugs from oil-water microemulsions. **Journal of controlled release**, v. 10, n. 3, p. 237-243, 1989.

TURKEZ, H.; AYDIN, E.; GEYIKOGLU, F.; CETIN, F. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene *in vitro* **Cytotechnology** , v. 67, p. 409–418, 2015.

VENÂNCIO, A.M.; MARCHIORO, M.; ESTAVAM, C.S.; MELO, M.S.; SANTANA, M.T.; ONOFRE, A.S.C.; GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, M.G.B.; ALVES, P.B.; PIMENTAL, H.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) leaf essential oil and (-)-linalool reduce orofacial nociception in rodents - a behavioral and electrophysiological approach. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v. 21, p. 1043–1051, 2011.

VIERCK, C.; YEZIERSKI, R. Comparison of operant escape and reflex tests of nociceptive sensitivity. **Neuroscience and Biobehavioral Review** , v. 51, p. 223–242, 2015.

VISCUSI, E.; DING, L.; ITRI, L. The Efficacy and Safety of the Fentanyl Iontophoretic Transdermal System (IONSYS_) in the Geriatric Population: Results of a Meta-Analysis of Phase III and IIIb Trials. **Drugs Aging**, v. 33, p. 901-902, 2016.

VON KORFF, M. R.; SAUNDERS, K.; THOMAS RAY, G.; BOUDREAU, D.; CAMPBELL, C.; MERRILL, J.; SULLIVAN, M. D.; RUTTER, C. M.; SILVERBERG, M. J.; BANTA-GREEN, C.; WEISNER, C. Defacto long-term opioid therapy for noncancer pain. **Clinical Journal of Pain**, v. 24, p. 521–527, 2008.

WAGNER, H.; WIERER, M.; BAUER, R. In vitro inhibition of prostaglandin biosynthesis by essential oils and phenolic compounds. **Medical Plant**, v. 52, p. 184–187, 1986.

WALLACE, V.C.; BLACKBEARD, J.; SEGERDAHL, A.; HASNIE, F.; PHEBY, T.; MCMAHON, S.; RICE, A.. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain. **Brain**, v.130, p.2688–702, 2007.

WALKER, S. M. Overview of neurodevelopment and pain research, possible treatment targets. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.28, p. 213-228, 2014.

WEINTRAUB, D.; BUCHSBAUM, R.; RESOR, S.; HIRSCH, L. Psychiatric and behavioral side effects of the newer antiepileptic drugs in adults with epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 10, p. 105-110, 2007.

XIAO, W.; BOROUJERDI, A.; BENNETT, G.; LUO, Z. Chemotherapyevoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type- 1 calcium channel subunit. **Neuroscience** , v. 144, p. 714–720, 2007.

XIAO-XIAO, H.; DONG-DONG G.; LING-ZHI, L.; LI-LI, L.;DIAN-MING, L.; CHEN-CHEN, Z.; YING, P.; SHAO-JIANG, S. Monoterpene and sesquillignan compounds from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 1-5, 2013.

YACUBIAN, E.M.T. Tratamento da epilepsia na infância. **Journal of Pediatrics**, v.78, n.1, p.19-27, 2002.

YALCIN, I.; CHOUCAIR-JAAFAR, N.; BENBOUZID, M.; TESSIER, L.; MULLER, A.; HEIN, L.; FREUND-MERCIER, M.; BARROT, M. Beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. **Annals Neurology** , v. 65, p. 218–225, 2009.

ZHANG, P., LIU, X.; ZHU, X.; CHEN, S.; ZHOU, D.; WANG, Y. Honokiol inhibits the inflammatory reaction during cerebral ischemia reperfusion by suppressing NK-kB activation and cytokine production of glial cells. **Neuroscience Letters**, v. 534, p. 123-7, 2013.

ZHANG, C.; LUO, H.; LIN, G.; ZHU, Z.; ZHANG, F.; ZHANG, J.; WU, Y.; LUO, J.; WANG, H. Transdermal patches for D-threo-methylphenidate (free base): Formulation aspects and in vivo pharmacokinetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology** , v. 35, p. 50-57, 2016.

ZHAO, Y.L.; CHEN, S.R.; CHEN, H.; PAN, H.L. Chronic Opioid Potentiates Presynaptic but Impairs Postsynaptic N-methyl-D-aspartic Acid receptor Activity in Spinal Cords: implications for opioid hyperalgesia and tolerance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 25073-85, 2012.

ZHU, J.; WEI, X.; FENG, X.; SONG, J.; HU, Y.; XU, J. Repeated administration of mirtazapine inhibits development of hyperalgesia/allodynia and activation of NF-kappaB in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience Letters** , v. 433, p. 33–37, 2008.



CAPÍTULO II

**Revisão de literatura: Dor neuropática como
efeito adverso de tratamentos medicamentosos e
sua descrição fisiopatológica**

(Artigo submetido na revista Life Science)

RESUMO

A dor é um dos sintomas mais incapacitantes relatados pelos pacientes em serviços de saúde, e costuma estar relacionada a diversas condições médicas. Contudo, ela pode ser consequência não somente de eventos patológicos, mas também de efeitos adversos de alguns tratamentos medicamentosos. Nesse caso, a dor neuropática, caracterizada como um déficit sensorial decorrente de lesões ou disfunção do sistema nervoso central (SNC) ou de nervos periféricos, é um dos tipos de dor que pode ser induzida pelo tratamento com alguns fármacos. Dessa forma, o presente trabalho teve como finalidade fazer uma pesquisa sobre quais classes de fármacos estão relacionados à dor neuropática como efeito colateral, bem como estabelecer o mecanismo fisiopatológico que explica essa relação. A revisão científica foi realizada nas bases científicas (Pubmed, Web of Science e ScienceDirect). Os dados revelam que há diversas classes de medicamentos que podem provocar dor neuropática como efeito adverso do tratamento. Estão incluídos nessa relação, por exemplo, os antineoplásicos, antirretrovirais, redutores do perfil lipídico, antimicrobianos e anticonvulsivantes. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento da dor neuropática como efeito adverso desses fármacos são diversos. No caso dos antineoplásicos, destacam-se o comprometimento da homeostase do cálcio, a suprarregulação dos receptores de potencial vanilóide e a produção de citocinas infamatórias. Nos antirretrovirais, destaca-se a ativação de receptores de inositol trifosfato e de rianodina, ativação de caspases devido alteração na homeostase do cálcio e aumento da expressão da proteína HuD. Para os antimicrobianos e anticonvulsivantes, destaca-se a alteração no metabolismo de vitaminas do complexo B, o que pode desencadear neuropatia. E quanto às estatinas, foram encontrados estudos que referem que essa classe pode desencadear dor neuropática, tendo como possíveis mecanismos fisiopatológicos o comprometimento da produção de farnesil-pirofosfato, proteínas geranylgeraniladas e ubiquinona devido inibição da HMG-CoA redutase. Outros autores apontam que as estatinas podem melhorar a dor neuropática, agindo por meio da inibição da iNOS, reduzindo, portanto, a produção de citocinas inflamatórias.

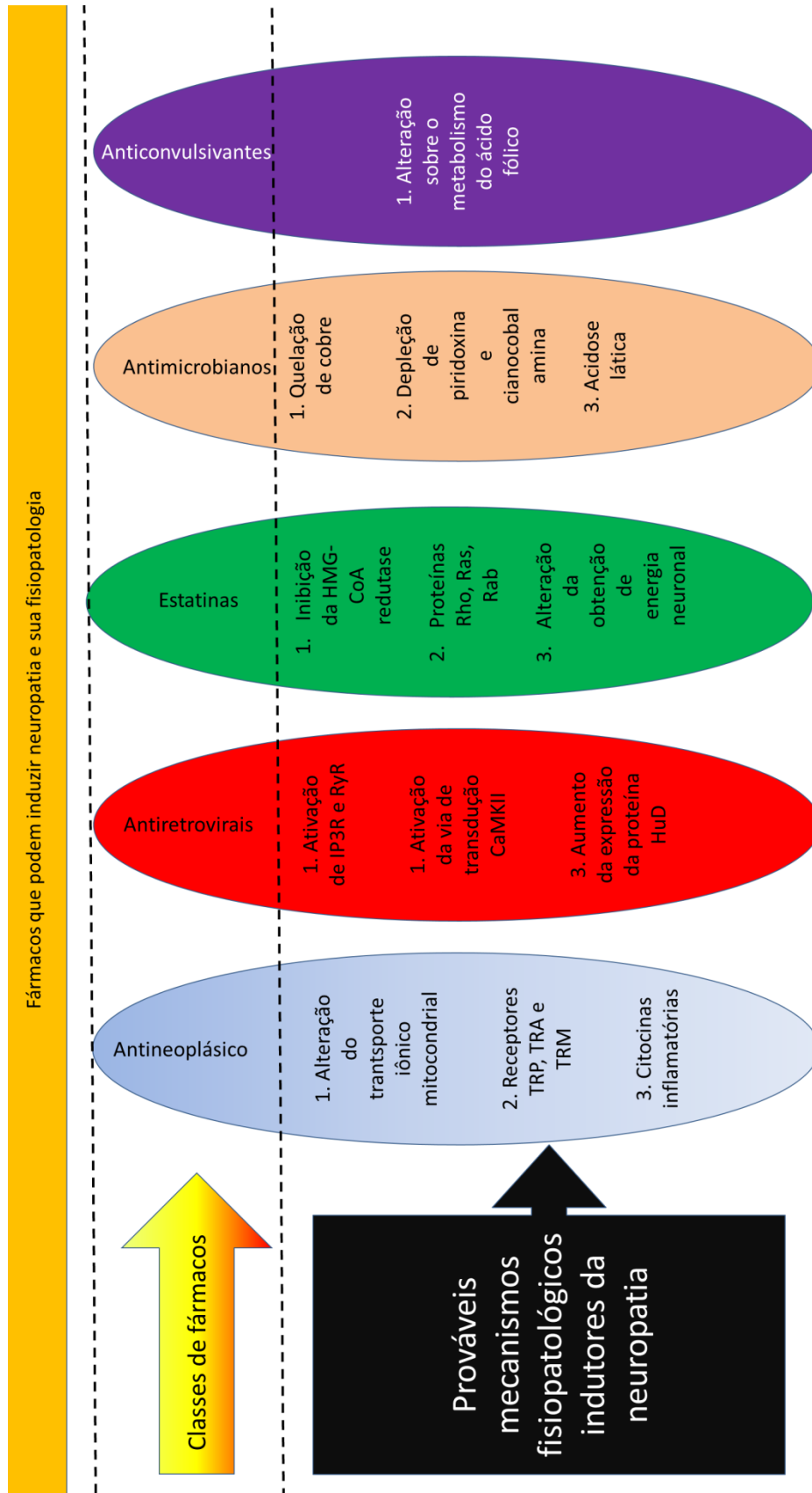
Palavras chave: anticonvulsivantes; antimicrobianos; antineoplásicos; antirretrovirais; dor neuropática; efeitos adversos; estatinas

ABSTRACT

Pain is one of the most incapacitating symptoms reported by patients and it is usually related to several medical conditions. Although, it cannot only be a result of pathological events itself but also due to side effects of some pharmacological treatments. At this rate, neuropathic pain, which is characterized as a sensory deficit resulting from lesions or dysfunction of the Central Nervous System (CNS) or peripheral nerves, is a type of pain which may be induced by treatment with specific drugs. Therefore, this paper has the purpose of mapping which classes of drugs are related to neuropathic pain as a side effect, as well as to establish the probable pathophysiological mechanism to explain the way this relation works. The scientific review was performed on Pubmed, Web of Science and ScienceDirect basis. The data reveals that there are several classes of drugs which can cause neuropathic pain as a side effect, especially when the treatment is in a long period. On this relation, there are antiretrovirals, antineoplastics, lipid profile reducers, antimicrobials and anticonvulsants, for example. The pathophysiological mechanisms involved in triggering neuropathic pain as an adverse effect of these drugs are diverse. In the case of the antineoplastic, the compromise of the calcium homeostasis, the superelevation of the transiente receptor potential vanilloid and the production of inflammatory cytokines are included. In antiretrovirals, the activation of inositol triphosphate and rianodine receptors, activation of caspases due to alteration in calcium homeostasis and increased HuD protein expression are highlighted. For antimicrobials and anticonvulsants, it is important to note the alteration in the metabolism of B vitamins, which can trigger neuropathy. As for statins, studies have shown that this class can trigger neuropathic pain, with the possible pathophysiological mechanisms involved in the production of farnesyl-pyrophosphate, geranylgeranylated proteins and ubiquinone due to inhibition of HMG-CoA reductase. Other authors suggest that statins may improve neuropathic pain by acting by inhibiting iNOS, thereby reducing the production of inflammatory cytokines.

Keywords: adverse effects ; anticonvulsants; antimicrobials; antineoplastics; antiretrovirals; neuropathic pain; statins

Figura 1: Resumo gráfico



1. INTRODUÇÃO

A dor corresponde a um sintoma que afeta pelo menos 20 a 30% da população geral e é um dos sintomas mais relatados em serviços de saúde. Dentre as principais causas, estão as condições inflamatórias, que são habitualmente tratadas com antiinflamatórios e opióides fracos, bem como síndromes dolorosas neuropáticas, que estão relacionadas a acometimento do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP). A dor neuropática costuma ser incapacitante e de difícil tratamento, pois não tende a responder a analgésicos convencionais e apenas parcialmente a antidepressivos, antiepilépticos ou opióides (BOUHASSIRA; ATTAL, 2016).

Além de condições patológicas que geram síndromes neuropáticas, tratamentos farmacológicos também podem desencadear dor neuropática como efeito adverso. É o caso, por exemplo, de medicamentos antirretrovirais, como os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos (NRTI), dentre os quais, zalcitabina (ddC), didanosina (ddI), lamivudina (3TC) e estavudina (d4T) (MARINOS, 2001; BIRBAL et al., 2016).

Outra classe de medicamentos que podem potencialmente causar dor neuropática são os antineoplásicos, como a vincristina, o paclitaxel, oxaliplatina, cisplatina e o bortezomib. Há relatos na literatura científica de que essa classe de fármacos sugere exercer efeito tanto direto quanto indireto em nervos sensoriais, alterando a amplitude do potencial de ação, velocidade de condução e induzir a dor. Assim, além da gravidade e cronicidade que a AIDS e o câncer já provocam, os pacientes ficam ainda predispostos a um sofrimento importante relacionado ao efeito adverso de seu tratamento, o que limita significativamente a resposta terapêutica (JAGGI; SINGH, 2012; DONVITO et al., 2016).

Adicionalmente, a dor neuropática como efeito colateral não fica restrita somente às duas classes de medicamentos citados acima. Os redutores do perfil lipídico, como as estatinas, têm também sido estudados como potenciais indutores de neuropatia periférica idiopática (GAIST et al., 2001, NOVAK et al., 2015).

Desta forma, considerando os dados acima, o objetivo deste artigo de revisão foi selecionar estudos que abordam a dor neuropática como efeito secundário a

tratamentos medicamentosos, bem como justificar o possível mecanismo de ação de cada classe particular de medicamento que seria responsável por esse efeito.

2. MÉTODOS

A revisão científica foi realizada nas bases *Pubmed*, *Web of Science*, *ScienceDirect* e *Scopus*. Para a busca na literatura científica, foram utilizadas as palavras-chave dor neuropática e as associações com os seguintes termos: efeito adverso, antineoplásicos, antirretrovirais, antimicrobianos, anticonvulsivantes e estatinas. Os idiomas selecionados para a pesquisa foram inglês, espanhol, francês e português. O período da pesquisa dos artigos se iniciou em julho de 2016 e finalizou em outubro de 2017.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fármacos com potencial para provocar dor neuropática

3.1.1 Antineoplásicos

Diversos quimioterápicos já têm sido relatados como causadores de dor neuropática, como o paclitaxel, oxiliplatina, cisplatina e bortezomib (JAGGI; SINGH, 2012; DONVITO et al., 2016; DUGGETT et al., 2016). A vincristina, por exemplo, é um alcaloide que provoca sensibilização de neurônios da medula espinhal (WENG et al., 2003; LORENZINI et al., 2016).

Já foi reportado que o paclitaxel e a vincristina, inclusive em baixas doses, podem provocar hipersensibilidade dolorosa. Alodinia mecânica e hiperalgesia com aumento dos reflexos de retirada no teste de von Frey em ratos tratados com vincristina tanto por via intraperitoneal (ip) quanto por via intravenosa (iv) diariamente, por 5 dias, também já foram reportadas. Dados eletrofisiológicos de neurônios localizados em L4-L5 da medula espinhal de ratos tratados com 0,1 mg/kg/dia ip demonstraram aumento significativo da sensibilidade a estímulos mecânicos nocivos pelos filamentos de von Frey, sugerindo um estado de sensibilização central (POLOMANO et al., 2001; WENG et al., 2003; FLATTERS; BENNETT, 2006; DONVITO et al., 2016).

O provável mecanismo fisiopatológico é referente à alteração funcional de neurônios no corno dorsal da medula e no processamento sensorial aferente primário. Isso culmina com um estado de sensibilização central, que corresponde a uma diminuição de influências inibitórias nesses neurônios sensoriais, bem como alterações sinápticas e intracelulares que acabam tornando permanente e espontânea a produção do sinal de dor no segmento medular correspondente (TANNER et al, 1998; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

Em ratos tratados com vincristina, por exemplo, foi observado que neurônios de ampla faixa dinâmica (*wide dynamics range* – WDR), que se projetam ao tronco encefálico e tálamo, demonstraram aumentos na atividade espontânea e na resposta à ativação aguda de fibras A e C. Esses neurônios WDR são de projeção, e normalmente recebem contatos monossinápticos de fibras A β , A δ e C, participando da transmissão do estímulo por meio da medula até centros supraespinhais (WENG et al., 2003; DREWES, 2006; D’MELLO et al., 2008; LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

Note-se que, dentre as fibras do tipo A, existem as do tipo A β e a A δ . As A β são encarregadas de conduzir estímulos de baixa intensidade e não nociceptivos. Já as do tipo A δ e do tipo C conduzem estímulos de alta intensidade e estímulo nociceptivo. Dessa forma, esta alteração funcional provocada pelo tratamento com a vincristina sugere um recrutamento de outras fibras sensitivas além das do tipo C - reconhecidamente transmissoras de sinais dolorosos, envolvendo, também fibras que transmitem sinais de pressão, temperatura e tato grosso e fino, ou seja, do tipo A β e A δ (WENG et al., 2003, KUNER et al., 2010; LEWIS; KRIUKELYTE, 2016).

Adicionalmente, foram também observados aumentos de pós-descargas de neurônios WDR para o estímulo elétrico e mecânico natural e respostas anormais de ``*Wind up*`` quando da comparação de ratos tratados com vincristina com os controle. Subconjuntos das fibras C dos neurônios desses ratos desenvolveram hiperresponsividade para o estímulo mecânico sustentado após o tratamento com vincristina. Foi sugerido, dessa forma, que, após estimulação mecânica, o excesso de pós-descargas observado no corno dorsal da medula, por meio de estudos eletrofisiológicos, poderia ser responsável pelo comportamento exagerado e sustentado de retirada da pata no teste de von Frey (WENG et al., 2003, MILAN, 2010).

Diversas têm sido as hipóteses para justificar as alterações funcionais induzidas pelos quimioterápicos nos neurônios sensitivos. Dentre elas, estão as alterações de funcionamento mitocondrial de células neuronais. O paclitaxel, por exemplo, tende a provocar aumento na permeabilidade das mitocôndrias, tornando-as mais susceptíveis à entrada indiscriminada de eletrólitos e espécies reativas de oxigênio, alterando seu funcionamento (FLATTERS; BENNETT, 2006; JAGGI; SINGH, 2012; DONVITO et al., 2016; DUGGETT et al., 2016). Já o bortezomib tende a induzir uma vacuolização intracitoplasmática em células satélites na raiz do gânglio dorsal da medula, provocando um comprometimento funcional da mitocôndria e do retículo endoplasmático e culminando com a ativação de uma via de apoptose por meio de caspases e desregulação da homeostase do cálcio. Além do bortezomib, a neuropatia induzida por vincristina e o paclitaxel também tem sido correlacionada a um comprometimento do fluxo de cálcio na membrana mitocondrial

(KIDD et al., 2002; NOBILE-ORAZIO, 2007; BROYL et al., 2010; CVALETTI; JAGGI; SIMGH, 2012; DONVITO et al., 2016).

O transporte de sódio também tem sido proposto como envolvido na indução da neuropatia induzida por quimioterápicos. Alguns estudos sugerem que a aplicação de oxiliplatina em neurônios do gânglio da raiz dorsal aumenta a corrente de sódio, que é antagonizada na presença de carbamazepina, um bloqueador do canal de sódio (ADELSBERGER et al., 2000). Tem sido proposto que um dos metabólitos da oxiliplatina altera as propriedades funcionais dos portões do canal de sódio mediados por voltagem, resultando em um estado aberto prolongado e hiperexcitabilidade de neurônios sensoriais (GROLLEAU et al., 2001).

Além disso, os canais de potássio também têm sido implicados na fisiopatologia da neuropatia induzida por quimioterápicos. Estudos *in vitro* realizados em fibras de nervo ciático, por exemplo, sugerem que a oxiliplatina induz alterações funcionais nos portões dos canais de potássio mediados por voltagem (KAGIAVA et al., 2008). Ela promoveria uma hiperexcitabilidade de fibras nervosas por meio da redução da expressão dos canais de potássio do tipo TREK1 e TRAAK e um aumento da expressão de canais pro-excitatórios, como os canais de hiperpolarização ativados (DESCOEUR et al. , 2011).

Além das causas citadas acima, alterações relacionadas aos receptores transitórios de potencial vaniloide (TRPV) também têm sido atribuídas como fatores fisiopatológicos da neuropatia induzida por quimioterápicos. Dentre esses receptores, o TRPV1, um receptor de capsaicina, que é ativado por estímulo químico doloroso, bem como o receptor transitório potencial de anquirina 1 (TRPA1) são exemplos. Tem sido demonstrado que o tratamento com cisplatina e oxiliplatina leva a uma suprarregulação do mRNA do TRPV1, do TRPA1 e do receptor de potencial transitório melastatina 8 (TRPM8) em neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula (DRG), predispondo a maior resposta à hiperalgesia térmica e à alodinia mecânica em camundongos (TA et al., 2010).

Outro receptor transitório de potencial vaniloide, o TRPV4, também exerce um papel significativo na hiperalgesia induzida por paclitaxel, visto que este antineoplásico pode induzir a uma suprarregulação do referido receptor. Isso foi sugerido em modelos de neuropatia periférica associada a vincristina e paclitaxel, uma vez que se constatou que a hiperalgesia mecânica foi reduzida em

camundongos *knockout* para o TRPV4 que haviam sido tratados com esses antineoplásicos (ALESSANDRI-HABER et al., 2008).

A inflamação também tem sido atribuída como envolvida na fisiopatologia da dor neuropática induzida por quimioterápicos. Células de Langerhans são ativadas com o tratamento com vincristina e paclitaxel, provocando dor neuropática (SIAU; BENNETT, 2006; DONVITO et al., 2016). As células de Langerhans são estimuladas a liberar $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ na raiz do gânglio dorsal lombar (LEDEBOER, 2007). Além disso, a administração intratecal de genes para IL-10 atenuou a supra-regulação de citocinas pro-inflamatórias induzida por paclitaxel, além de ter reduzido a expressão do mRNA de células CD11 β , um marcador de macrófagos e células dendríticas, sugerindo que os macrófagos são as potenciais fontes dessas citocinas pro-inflamatórias, que, por sua vez, sensibilizam as células aferentes sensoriais primárias e modificam o *input* sensorial para o corno dorsal da medula, facilitando a condução do estímulo doloroso (KAUR et al., 2010; MUTHURAMAN; SINGH, 2011; DONVITO et al., 2016). Dessa forma, a implicação do tratamento com quimioterápicos induzir hiperalgesia parece ser multifatorial e culmina com uma alteração funcional a nível central, envolvendo tanto neurônios primários aferentes quanto de neurônios da medula espinhal, além de mediadores inflamatórios.

3.1.2 Antiretrovirais

A neuropatia periférica é uma complicação neurológica comumente observada no HIV, afetando aproximadamente 30 a 67% dos pacientes infectados, podendo ocorrer tanto devido à toxicidade relacionada ao tratamento com antirretrovirais ou como consequência direta do próprio vírus. Dentre os fármacos mais correlacionados a essa condição, estão a didanosina, a estavudina e a zalcitabina. Alguns antirretrovirais mais modernos, como os inibidores da protease, também têm sugerido efeitos neurotóxicos. Dentre as condições neuropáticas desencadeadas por antirretrovirais, a polineuropatia sensorial distal ocorre comumente, cursando com sensação de queimação simétrica distal, aperto, dormências e parestesias (HULGAN et al., 2005; SANNA et al., 2015; WOLDEAMANUEL et al., 2016).

Os sintomas clínicos de neuropatia periférica induzida por inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeo (NRTI) são idênticos aos sintomas da dor neuropática axonal do neurônio sensitivo distal (DSPAN), incluindo sensação de queimação nos pés e pernas, câimbras, sensação vibratória e fraqueza nos músculos extensores do pé. Eletrofisiologicamente, os potenciais de ação do nervo sensorial são caracterizados por baixa amplitude e latência normal, consistente com degeneração axonal de neurônio sensorial. Biópsias de nervo sural de pacientes com neuropatia induzida por zalcitabina (ddC) têm demonstrado destruição axonal severa, proeminente nas fibras não mielinizadas (MARINOS et al., 2001, HUANG, 2016).

Os mecanismos pelos quais os antirretrovirais contribuem para o desenvolvimento desta condição ainda não estão completamente elucidados. A fim de investigar o possível mecanismo fisiopatológico envolvido, alguns autores já testaram administrar fármacos que reduzem a concentração de íons Ca^{2+} intracelular em camundongos. Eles testaram a hipótese de que uma alteração na concentração de íons cálcio no citosol poderia contribuir para a neuropatia dolorosa desencadeada por ddC. Como já é sabido, ela induz a uma alodinia mecânica de longa duração e uma alodinia ao frio de curta duração. No entanto, essas condições foram abolidas pela administração intratecal de TMB-8, um bloqueador da liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares, o que corroborou a hipótese de que alterações na homeostase do cálcio poderiam estar envolvidas, pelo menos em parte, na fisiopatologia da dor neuropática induzida (SANNA et al., 2015).

A liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares é mediada por canais de cálcio e receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3Rs) e pelos receptores de rianodina (RyRs). O bloqueio de IP3Rs pela administração de heparina preveniu seletivamente a alodinia ao frio sem modificar a alodinia mecânica. Já a administração de rianodina preveniu tanto alodnia mecânica quanto a alodinia ao frio nos camundongos com alodinia induzida por ddC, indicando um importante papel nesse subtipo de canal de cálcio na hipersensibilidade dolorosa induzida por esse antirretroviral. Dessa forma, os achados desse estudo sugeriram que os RyRs, principalmente, poderiam mediar uma neuropatia induzida por ddC, e o suposto bloqueio terapêutico desses receptores preveniria essa condição, o que poderia

facilitar uma maior aderência medicamentosa dos pacientes em tratamento para HIV (SANNA et al., 2015).

A fim de investigar adicionalmente a via envolvida na modulação do cálcio intracelular induzida pelo tratamento com antirretroviral, também foi avaliado o papel da HuD, uma proteína de ligação do RNA (RBP), que está aumentada nos animais com neuropatia induzida por antirretrovirais (YOO et al., SANNA et al., 2014a, 2014b). A administração de ddC induziu um aumento na expressão da proteína HuD espinhal concomitantemente ao início da dor neuropática. A expressão da HuD também foi funcional, uma vez que o silenciamento dessa proteína preveniu tanto a alodinia mecânica quanto ao frio, sem modificar o limiar de dor, mesmo na ausência de dor neuropática. O fenótipo de silenciamento da HuD foi comparável àquele obtido pelo bloqueio dos RyRs. Existem 3 tipos de RyRs: os RyR1, RyR2 e RyR3. No estudo citado, os autores decidiram focar no RyR2, a isoforma mais expressa na medula espinhal de murinos. Além disso, os autores também corroboraram que a HuD se liga ao mRNA para produção do RyR2 (SANNA et al., 2015).

Além disso, também já foi demonstrado que um aumento na função da proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) na medula espinhal está envolvida na dor persistente das lesões nervosas e na inflamação (LUO et al., 2002; CHEN et al., 2009; KATANO et al., 2010). A CaMKII α tem demonstrado estar associada com os RyRs, e, quando ativada, induz a aumento nas concentrações de Ca^{2+} . Além disso, também sabendo que a ativação do RyR é capaz de estimular a CaMKII α , os autores testaram a hipótese de que a ativação do RyR pela ddC poderia também induzir uma ativação da CaMKII α . Eles observaram que a ddC aumentou a CaMKII α espinhal de forma modesta, mas esse aumento foi prevenido pelo silenciamento do RyR2, em camundongos *knockout* para esses receptores. Eles concluíram, assim, que a dor neuropática induzida por ddC provavelmente estaria envolvida com as vias do RyR2 mediadas pela estimulação do mRNA pela HuD, e que a modulação dessa via poderia prevenir o desenvolvimento da neuropatia (SANNA et al., 2015).

Têm sido relatados também estudos *in vitro* apontando que os NRTI's inibem a γ -DNA polimerase, responsável pela replicação do mtDNA. Estudos *in vivo* de pacientes tratados com NRTI's, principalmente o AZT, também relataram miopatia e

neuropatia induzidas por comprometimento mitocondrial devido depleção do mtDNA, deficiência da COX, infiltração inflamatória de macrófagos, acúmulo de gordura intracelular, alta produção de lactato e marcante depleção de fosfoscreatina provocada pelo comprometimento da fosforilação oxidativa (WALLACE et al., 1999; MARINOS et al., 2001; HULGAN et al., 2005; SANNA et al., 2016).

Os NRTIs exercem seu efeito terapêutico alterando o funcionamento da transcriptase reversa do HIV. Contudo, esses medicamentos, após fosforilados, também competem com a timidina trifosfato mitocondrial, que é um substrato natural do paciente, para se ligar à DNA polimerase- γ . Esta é uma enzima mitocondrial responsável pela replicação do DNA da mitocôndria (mtDNA). Depois de se ligarem à DNA polimerase- γ , os NRTIs são incorporados dentro do mtDNA, estendendo a cadeia e causando um dano permanente no mtDNA. Note-se que o comprometimento do mtDNA e consequente destruição mitocondrial é provocado em linfoblastos, mioblastos e linhagens de células neuronais. Deve ser notado, também, que as combinações de NRTIs podem ter um efeito neurotóxico sinérgico sobre a mitocôndria (MARINOS et al., 2001; KAGUNI, 2004; SANNA et al., 2016).

Em suma, pode-se concluir que o uso de antirretrovirais pode levar ao desenvolvimento de síndromes neuropáticas, o que pode dificultar a aderência medicamentosa por parte dos pacientes. Essa condição induzida pelos NRTI's parece ser multifatorial, envolvendo diversos mecanismos intracelulares.

3.1.3 Fármacos que agem sobre o sistema cardiovascular

Estão incluídos nessa categoria fármacos com efeito vasodilatador, como a hidralazina, a perexilina, e redutores do perfil lipídico, como as estatinas. A neuropatia sintomática chega a ocorrer em cerca de 0,1% dos pacientes tratados com perexilina, por exemplo, contudo, eletrofisiologicamente, condições subclínicas têm sido encontradas em cerca de 2/3 de pacientes estudados (SEBILLE, 1978; ARGOV, 2015; NOVAK et al., 2015; PATEL et al., 2015).

Sintomas sensoriais, incluindo dor e tensão muscular, são comuns, aparecendo em cerca de 3 semanas do início do tratamento com perexilina, que pode ser seguido de fraqueza nos músculos de membros distais e até nos proximais. Na maioria dos casos, os sintomas costumam ocorrer somente após

vários meses de tratamento. Papiloedema, disgeusia, surdez, distúrbios autonômicos e elevadas concentrações de proteína no líquido cefalorraquidiano também foram relatados. Estudos histológicos por biopsia de nervo periférico têm demonstrado desmielinização associada com degeneração axonal e inclusões paracristalinas nas células de Schwann e nas células endoteliais. Estudos bioquímicos têm demonstrado um aumento no conteúdo de gangliosídeos em nervos periféricos. Todavia, uma recuperação completa costuma ocorrer após vários meses da suspensão do tratamento (FRASER et al., 1977).

A hidralazina pode provocar uma neuropatia predominantemente sensorial nos pacientes, mas neuropatias subclínicas ou moderadas podem ocorrer em até 15% dos pacientes. Isso pode estar relacionado a um distúrbio no metabolismo da piridoxina, similarmente ao que ocorre com a isoniazida, já que esta compartilha uma estrutura química muito semelhante à hidralazina (ARGOV; MASTAGLIA, 1979; MAFUKIDZE et al., 2016).

A amiodarona também pode provocar ocasionalmente neuropatia periférica, potencialmente desmielinizante, assim como a disopiramida (ARGOV; MASTAGLIA, 1979).

Uma maior quantidade de estudos, todavia, tem sugerido que estatinas podem causar neuropatia periférica como efeito colateral (AHMAD, 1995; JEPPESEN et al., 1999; ARGOV, 2015). Em um estudo de série de casos, uma neuropatia axonal sensório motora foi encontrada em pacientes tratados com estatina. Já foi reportado que usuários desses medicamentos tinham um risco aumentado entre 4 e 14 vezes de desenvolver polineuropatia idiopática, quando comparada à população que não faz tratamento, e esse efeito adverso pode ocorrer especialmente em administrações de longo prazo (GAIST et al., 2001; GAIST et al., 2002; BHALLA et al., 2014; NOVAK et al., 2015).

Um dos principais achados são a degeneração de pequenas fibras nervosas. O padrão de comprometimento nervoso sugerido pode ser explicado por lesões simultâneas na raiz do gânglio dorsal e nos gânglios autonômicos, levando a disfunções sensoriais e autonômicas, respectivamente (SGHIRLANZONI et al., 2005; GORSON et al., 2008; GEMIGNANI et al., 2010).

Há vários mecanismos possíveis para explicar a gangliopatia induzida por estatinas. O comprometimento do metabolismo energético e protéico e a indução de necrose ou apoptose são hipóteses sugeridas (GAIST et al., 2002; KIORTSIS et

al., 2007; LEWINGTON et al., 2007; WILLEY; ELKIND, 2010; MILLAR; FLORAS, 2014; ARGOV, 2015). A degeneração dos gânglios periféricos induzida por estatina poderia envolver dano à bainha de mielina de pequenas fibras mielinizadas, provocado pela inibição da *hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase* (HMG-CoA), comprometendo sua conversão a mevalonato, que é crucial para a produção do colesterol (BHALLA et al., 2014; JONES et al., 2014; NORATA et al., 2014). O mevalonato é também um precursor do farnesil pirofosfato (FPP), que é essencial para a produção de ubiquinona e, por sua vez, do ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons (JONES et al., 2014; NORATA et al., 2014, WILKINSON et al., 2014). A depleção de FPP poderia também comprometer a produção de geranylgeranyl pirofosfato. Ambas as moléculas contribuem para a modificação pós-translacional de proteínas intracelulares específicas, como Rho, Ras e Rab, que, quando disfuncionais, podem levar a apoptose (JONES et al., 2014; NORATA et al., 2014).

Outros estudos sugerem, ainda, que a interferência com a síntese de colesterol por meio da inibição da HMG-CoA redutase poderia alterar a função da membrana de células neuronais, considerando que o colesterol é um componente ubíquo das membranas das células humanas. As estatinas também co-inibem a síntese da ubiquinona, que é a chave da cadeia enzimática da respiração mitocondrial, o que pode comprometer a utilização da energia neuronal e induzir neuropatia (GAIST et al, 2002).

Contrariamente às informações acima, é também hipotetizado que o tratamento com estatinas pode melhorar a dor neuropática. Além disso, alguns pesquisadores também supõem que a neuropatia possa ser causada não pelo tratamento com estatinas, mas devido a um efeito próprio da hiperlipidemia (GAIST et al, 2002; BHALLA et al., 2014). Shi et al., 2011, observaram que a administração sistêmica diária de estatina dos dias 0 ao 14 em roedores, por exemplo, preveniu completamente a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica. Tanto a rosuvastatina quanto a sinvastatina provocaram uma redução da expressão da IL-1 β no nervo ciático após sua ligadura, além de reduzirem a ativação microglial e de astrócitos.

Outro estudo que corrobora o possível efeito anti-hiperalgésico das estatinas pontuou que a atorvastatina (3, 10 e 30 mg/kg por gavagem oral por 14 dias, em ratos) reduziu os efeitos neuropáticos no modelo de dor neuropática por constrição nervosa crônica. É sabido que esse modelo provoca um aumento significativo nos

níveis de TNF- α , IL-1 β , PGE2 e fator de crescimento neuronal (NGF) no nervo ciático ligado e na medula espinhal, concomitantemente a uma hiperalgesia térmica e mecânica. Todavia, Pathak et al, 2013, observaram que essas alterações foram significativamente reduzidas pela administração oral de atorvastatina quando comparado aos ratos não tratados. Dessa forma, foi proposto que a atorvastatina atenua a dor neuropática por meio da inibição de citocinas, MMP-2 e NGF no nervo ciático e medula espinhal (PATHAK et al., 2013).

Alguns pesquisadores atribuem o fato de as estatinas melhorarem a dor neuropática a um efeito independente do colesterol, como, por exemplo, anti-inflamatório, antioxidante, efeitos neuromodulatórios, bem como mediados pelo aumento na atividade do NO. Cameron et al., 2003, demonstraram que a rosuvastatina atenuou a redução na vasodilação induzida por diabetes por meio do aumento da atividade do NO no *corpus cavernosum*. Ohsawa et al., 2011, sugeririam que o tratamento com sinvastatina em camundongos diabéticos aumenta a expressão da eNOS. O NO possui um papel dual, sendo tanto nociceptivo quanto antinociceptivo. Alguns autores sugerem que são os níveis reduzidos de NO na medula espinhal em camundongos diabéticos que levam a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e induzem a uma alodinia mecânica e hiperalgesia térmica. Chu et al, 2012, estudaram o papel dual da atorvastatina na expressão da NO sintase (NOS) em modelos de lesão nervosa e constataram que a inibição da expressão da iNOS e aumento na da eNOS na presença de atorvastatina demonstrou ser responsável pela atenuação da nocicepção e hiperalgesia térmica.

Diversos outros mecanismos que tentam justificar a melhora nas síndromes neuropáticas com o uso de estatinas são aceitos, como a inibição na translocação de GTPases, por exemplo. A RhoA é uma GTPase alvo da sinvastatina e está abundantemente presente na medula espinhal de camundongos diabéticos (OHSAWA et al., 2011). Foi demonstrado que a administração intratecal de mevalonato causa um decréscimo dose-dependente das latências para retirada da pata por estímulo térmico, indicando que o mevalonato induz uma hiperalgesia térmica. O tratamento com sinvastatina demonstrou atenuar a dor neuropática pela inibição da produção de mevalonato e isoprenóides, o que, por sua vez, inibe a translocação da RhoA. Isso sugere que o mevalonato é responsável pela translocação do RhoA do citosol para a membrana plasmática, estando envolvido no desenvolvimento da dor. Além disso, sugere-se que a inibição da RhoA pela

sinvastatina poderia ser um mecanismo que justificasse um possível efeito redutor da dor neuropática.

Dessa forma, ainda é controverso se o tratamento com redutores do perfil lipídico induz ou atenua uma possível síndrome neuropática, havendo tanto achados que justifiquem quanto que contrariem essa relação.

3.1.4 Antimicrobianos

Dentre os medicamentos dessa classe, estão incluídos os relacionados ao tratamento contra tuberculose, como a isoniazida, o etambutol, a etionamida, a nitrofurantoína e o metronidazol. Alguns deles podem causar neuropatia periférica ou óptica. A isoniazida, por exemplo, pode provocar uma neuropatia mista sensoriomotora periférica, que pode ser prevenida com suplementação de vitaminas do complexo B, em especial a piridoxina e a cianocobalamina (ARGOV, MASTAGLIA, 1979; DOBROZSI et al., 2014; MAFUKIDZE et al., 2016).

O etambutol é o menos neurotóxico, mas pode provocar neuropatia óptica, neuropatia sensoriomotora mista, ou então uma neuropatia predominantemente sensorial. A forma mais comum de neuropatia induzida pelo etambutol é um comprometimento não inflamatório da fibra axial, envolvendo fibras centrais do nervo óptico. O mecanismo de neuropatia óptica induzida por etambutol pode estar relacionado à quelação do cobre provocada por esse fármaco, comprometendo assim a atividade da enzima citocromo c oxidase, bem como o metabolismo mitocondrial no nervo óptico (KOZAK et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2013).

A etionamida e a isoniazida poderiam provocar neuropatia periférica, com um dos possíveis mecanismos justificado pela depleção de piridoxina. A nitrofurantoína também pode provocar neuropatia sensoriomotora, principalmente naqueles pacientes que têm insuficiência renal associada. Contudo, ainda é relatado, por meio de estudos eletrofisiológicos, uma alta incidência de neuropatia subclínica, até mesmo nos pacientes não nefropatas. Estudos histopatológicos têm demonstrado degeneração axonal em nervos periféricos e dano associado na medula espinhal em estudos *post-mortem*. (ARGOV, MASTAGLIA, 1979; SANFELIU et al., 1999; MAFUKIDZE et al., 2016).

Já foi também relatado na literatura científica que o linezolid pode provocar neuropatia periférica severa e dolorosa quando administrado em longo prazo. Estudos de condução nervosa indicaram uma neuropatia sensoriomotora axonal, porém com predominância da sensorial sobre a motora. A condição se caracteriza por uma síndrome dolorosa mais proeminente nas extremidades mais distais. Entorpecimento, parestesias ou hiperestésias, alodinia e ataxia podem estar associados. Algumas publicações também reportaram neuropatia óptica que tendeu à remissão após o fim do tratamento de longo prazo, enquanto que a neuropatia periférica não seguiu essa tendência. Sintomas associados podem coexistir, como visão borrada e alteração na percepção de cores. Contudo, a causa dessas neuropatias ainda não está bem estabelecida, mas tem sido proposto que a acidose láctica aumenta a possibilidade de toxicidade mitocondrial, similarmente ao que acontece com os análogos dos nucleosídeos (APODACA; RAKITA, 2003.). Essa toxicidade mitocondrial pode ser devido à inibição da síntese protéica mitocondrial. Além disso, deve ser considerado que o linezolid é estruturalmente semelhante aos IMAOS, e o tratamento com estes já tem sido correlacionado com neuropatia óptica, mas não periférica. Evidências sugerem que o fator de risco a ser mais considerado na neuropatia induzida por linezolid é o uso prolongado (SOURDILLE, 1964; LEIBOLD, 1971; HAMADA et al., 1979; BRESSLER et al., 2004; XERRI et al., 2015).

O metronidazol tem sido relatado na literatura científica como causador de neuropatia sensorial, com o tratamento com doses convencionais por 6 a 24 semanas. Estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que tanto fibras sensoriais quanto motoras poderiam ser afetadas com esse tratamento. Uma biopsia de nervo sural de um paciente demonstrou degeneração axonal afetando tanto as fibras de pequeno quanto de grande diâmetro. Contudo, a neuropatia é reversível após a retirada do fármaco (ARGOV; MASTAGLIA, 1979; HOBSON-WEBB et al., 2006; SINGH et al., 2015).

3.1.5 Anticonvulsivantes

No que tange à dor neuropática, os anticonvulsivantes costumam estar relacionados principalmente ao tratamento desta condição. Nesse caso, destacam-

se os gabapentanóides, como a gabapentina e a pregabalina (LEE et al., 2013; DING et al, 2014 SUTO et al., 2014; KREMER et al., 2016).

Contudo, o tratamento com alguns antiepilépticos também pode estar relacionado à indução de neuropatia. Casos isolados de neuropatia periférica associados a tratamento com fenitoína, por exemplo, têm sido reportados há vários anos. Está bem estabelecido que a exposição a altos níveis séricos de fenitoína poderia causar um comprometimento imediato, porém reversível, da condução nervosa. Seu uso prolongado está relacionado a um encolhimento axonal, bem como a aglomerados aleatórios de desmielinização nervosa, especialmente de nervos mais vulneráveis, como os de maior tamanho, como o nervo sural, por exemplo. A fisiopatologia da neuropatia induzida por fenitoína pode estar relacionada a alterações eletrofisiológicas, sendo observada redução na amplitude do potencial de ação sensorial com uma preservação relativa da condução da velocidade em casos de uso de fenitoína em doses terapêuticas, mas também podendo ser observada uma lentificação moderada da condução nervosa nos casos de uso em doses tóxicas (SHORVON; REYNOLDS, 1982; RAMIREZ et al., 1986; MAHON, 2016).

Um caso adicional a ser considerado é a relação de uso de anticonvulsivantes e a deficiência de ácido fólico, que provocaria uma disfunção nervosa periférica. Como já está bem estabelecido na literatura científica, é sabido que a deficiência de ácido fólico predispõe a neurotoxicidade. Episódios repetidos e prolongados de redução dos níveis de ácido fólico seriam, portanto, responsáveis pelo desencadeamento dessas neuropatias. Estudos eletrofisiológicos demonstraram reduções de até 22% na velocidade de condução nervosa em nervos periféricos de pacientes que faziam tratamento com fenitoína (SHORVON; REYNOLDS, 1982; MAHON, 2016; ZHAO et al., 2016).

4. CONCLUSÃO

Como pode ser constatado, existem várias fontes na literatura científica apontando a neuropatia periférica como uma condição secundária ao uso de alguns fármacos, sendo incluídos os antineoplásicos, os antirretrovirais, as estatinas, os antimicrobianos e os anticonvulsivantes. As estatinas, todavia, têm uma relação

dicotômica quanto a provocar ou melhorar síndromes neuropáticas, havendo alguns estudos sugerindo indução de dor neuropática, e outros sugerindo melhora desse sintoma.

REFERÊNCIAS

- ADELSBERGER, H., QUASTHOFF, S., GROSSKREUTZ, J., LEPIER, A., ECKEL, F., LERSCH, C. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na⁺ channel kinetics on rat sensory neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 406, p. 25–32, 2000.
- AHMAD, S. Lovastatin and peripheral neuropathy. **American Heart Journal**, v. 130, 1321, 1995.
- ALESSANDRI-HABER, N.; DINA, O.; JOSEPH, E.; REICHLING, D.; LEVINE, J. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. **Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 1046–1057, 2008.
- APODACA, A.; RAKITA, R.. Linezolid-induced lactic acidosis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 86–87, 2003.
- ARGOV, Z.; MASTAGLIA, F. Side Effects of Drugs Drug-induced peripheral neuropathies. **British Medical Journal**, v. 1, p. 663-666, 1979.
- ARGOV, Z. .Statins and the neuromuscular system: a neurologist's perspective. **European Journal of Neurology**, v. 22, p. 31–36, 2015.
- BIRBAL, S.; DHEDA, M.; OJEWOLE, E.; OOSTHUIZEN, F. Adverse drug reactions associated with antiretroviral therapy in South Africa. **African Journal of AIDS Research**, v.3, p. 243-248, 2016.
- BOUHASSIRA, D.; ATTAL, N. Translational neuropathic pain research: a clinical perspective. **Neuroscience**, p. 1-9, 2016.
- BRESSLER, A.; ZIMMER, S.; GILMORE, J.; SOMANI, J. Peripheral neuropathy associated with prolonged use of linezolid. **Lancet Infectious Disease**. v. 4, p. 528-531, 2004.
- BROYL, A.; CORTHALS, S.; JONGEN, J.; VAN DER HOLT, B.; KUIPER, R.; DE KNEGT, Y.; VAN DUIN, M.; EL JARARI, L.; BERTSCH, U.; LOKHORST, H.; DURIE, B.; GOLDSCHMIDT, H.; SONNEVELD, P. Mechanisms of peripheral neuropathy

associated with bortezomib and vincristine in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a prospective analysis of data from the HOVON-65/GMMG-HD4 trial.

Lancet Oncology, v. 11, p. 1057–1065, 2010.

BHALLA, S.; SINGH, N.; JAGG, A. Statins: Do They Aggravate or Ameliorate Neuropathic Pain? **The Journal of Pain**, v. 15, p. 1069-1080, 2014.

CAMERON, N.; COTTER, M.; INKSTER, M.; NANGLE, M. Looking to the future: Diabetic neuropathy and effects of rosuvastatin on neurovascular function in diabetes models. **Diabetes Research Clinical Practice**, v.61, p. 35-39, 2003.

CAVALETTI, G.; NOBILE-ORAZIO, E. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: still far from a painless gain. **Haematologica.**, v. 92, p. 1308-1310, 2007.

CHU, L.; CHEN, J.; YU, K.; CHENG, K.; WU, P.; WU, B. Neuroprotective and anti-inflammatory activities of atorvastatin in a rat chronic constriction injury model. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.25, p. 219-230, 2012.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, p.8-16, 2008.

DESCOEUR, J.; PEREIRA, V.; PIZZOCCARO, A.; FRANCOIS, A.; LING, B.; MAFFRE, V.; COUETTE, B.; BUSSEROLLES, J.; COURTEIX, C.; NOEL, J.; LAZDUNSKI, M.; ESCHALIER, A.; AUTHIER, N.; BOURINET, E. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodeling of ion channel expression in nociceptors. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, p. 266–278, 2011.

DING, L.; CAI, J.; GUO, X.; MENG, X.; XING, G. The antiallodynic action of pregabalin may depend on the suppression of spinal neuronal hyperexcitability in rats with spared nerve injury. **Pain Research and Management**, v. 19, p. 205–211, 2014.

DREWES, A. The physiology of pain. **Ugeskr Laeger**, v. 168, p. 1941-1943, 2006.

DOBROZSI, S.; FLOOD, V.; PANEPINTO, J.; SCOTT, J.; BRANDOW, A. Vitamin B12 Deficiency: The Great Masquerader. **Pediatric Blood and Cancer**, v.61, p. 753–755, 2014.

DONVITO, G.; WILKERSON, J.; DAMAJ, M.; LICHTMAN, A. Palmitoylethanolamide Reverses Paclitaxel-Induced Allodynia in Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, p. 310-318, 2016.

DUGGETT, N.; GRIFFITHS, L.; MCKENNA, O.; DE SANTIS, V.; YONGSANGUANCHAI, N.; MOKORI, E.; FLATTERS, S. Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful. **Neuroscience**, v. 333, p. 13–26, 2016.

FLATTERS, S.; BENNETT, G. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain**, v. 122, p. 247–257, 2006.

FRASER, D M; CAMPBELL, I W; MILLER, H C. **British Medical Journal**, v. 2, p. 675, 1977.

GAIST, D.; GARCÍA RODRÍGUEZ, L.; HUERTA, C.; HALLAS, J.; SINDRUP, S. Are users of lipid-lowering drugs at increased risk of peripheral neuropathy? **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, p. 931-933, 2001.

GAIST, D.; JEPPESEN, U.; ANDERSEN, M.; GARCÍA RODRÍGUEZ, L.; HALLAS, J.; SINDRUP, S. Statins and risk of polyneuropathy: a case-control study. **Neurology**, v. 58, p. 1333–1337, 2002.

GEMIGNANI, F.; GIOVANELLI, M.; VITETTA, F.; SANTILLI, D.; BELLANOVA, M.; ANDBRIN-DANI, F. Non-length-dependent small fiber neuropathy. A prospective case series. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 15, p. 57–62, 2010.

GORSON, K.; HERRMANN, D.; THIAGARAJAN, R.; BRANNAGAN, T.; CHIN, R.; ANDKINSELLA, L. Non-length-dependent small fiber neuropathy/ganglionopathy. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 79, p. 163–169, 2008.

GROLLEAU, F.; GAMELIN, L.; BOISDRON-CELLE, M.; LAPIED, B.; PELHATE, M.; GAMELIN, E. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, p. 2293–2297, 2001.

HAMADA, H.; SAITO, T.; TORII, J. A case of optic neuropathy due to treatment with monoamine oxidase inhibitor (safrazine). **Rinsho Shinkeigaku**, v. 19: 379–87, 1979.

HOBSON-WEBB, L.; ROACH, E.; DONOFRIO, P. Metronidazole: newly recognized cause of autonomic neuropathy. **Journal of Child Neurology**, v. 21, p. 429-431, 2006.

HUANG, W.; CALVO, M.; PHEBY, T.; BENNETT, D.; RICE, A. A rodent model of HIV protease inhibitor indinavir induced peripheral neuropathy. **Pain**, v. 158, n.1, p. 75-85, 2017.

HULGANA, T.; HAASA, D.; HAINESC, J.; RITCHIEC, M.; ROBBINS, G.; SHAFERG, R.; CLIFFORDH, D.; KALLIANPUR, A.; SUMMARC, M.; CANTERC, J. Mitochondrial haplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy: an adult AIDS clinical trials group study. **AIDS**, v. 19, p. 1341-1249, 2005.

JAGGI, A.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**, v. 291, p. 1-9, 2012.

JEPPESEN, U.; GAIST, D.; SMITH, S.; SINDRUP, S. Statins and peripheral neuropathy. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, p. 835-838, 1999.

JONES,J.;KIRSCH,H.;WORTMANN,R.; PILLINGER,M. The causesofdrug-inducedmuscletoxicity. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, p. 697–703., 2014.

KAGIAVA, A.; TSINGOTJIDOU, A.; EMMANOUILIDES, C.; THEOPHILIDIS, G. The effects of oxaliplatin, an anticancer drug, on potassium channels of the peripheral myelinated nerve fibres of the adult rat. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 1100–1106, 2008.

KAGUNI, L. DNA polymerase- γ , the mitochondrial replicase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 293–320, 2004.

KATANO, T.; NAKAZAWA, T.; NAKATSUKA, T.; WATANABE, M.; YAMAMOTO, T.; ITO, S. Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 609–616, 2010.

KAUR, G., JAGGI, A.S., SINGH, N., 2010. Exploring the potential effect of *Ocimum sanctum* in vincristine-induced neuropathic pain in rats. **Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury**, v. 5, p. 1-9, 2010.

KIDD, J.; PILKINGTON, M.; SCHELL, M.; FOGARTY, K.; SKEPPER, J.; TAYLOR, C.; THORN, P. Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 6504–6510, 2002.

KIORTSIS,D.;FILIPPATOS,T.;MIKHAILIDIS,D.;ELISAF,M.;LIBEROPOULOS, E. Statin-associated adverse effects beyond muscle and liver toxicity. **Atherosclerosis**, v. 195, p. 7–16, 2007.

KOZAK, S.; INDERLIED, C.; HSU, H.; HELLER, K.; SADUN, A. The Role of Copper on Ethambutol's Antimicrobial Action and Implications for Ethambutol-induced Optic Neuropathy. **Mycobacteriology**, v. 30, p. 83-87, 1998.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.

KREMER, M. SALVAT, E.; MULLER, A.; YALCIN, I.; BARROT, M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. **Neuroscience**, v. 338, p.183–206, 2016.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **Journal of Pain**, v 10, p. 895-926, 2009.

LEDEBOER, A.; JEKICH, B.; SLOANE, E.; MAHONEY, J.; LANGER, S.; MILLIGAN, E.; MARTIN, D.; MAIER, S.; JOHNSON, K.; LEINWAND, L.; CHAVEZ, R.; WATKINS, L. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. **Brain, Behavioral and Immunity**, v. 21, p. 686–698, 2007.

LEE, B.; JUN, I.; KIM, S.; PARK, J. Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. **Journal of Korean Medical Science** , v.28, p.308–314, 2013.

LEIBOLD, J. Drugs having a toxic effect on the optic nerve. **International Ophthalmology Clinics** , v. 11; p. 137–57, 1971.

LEWINGTON,S.;WHITLOCK,G.;CLARKE,R.;SHERLIKER,P.;EMBERSON,J.;QIZILB ASH,N.Bloodcholesterolandvascularmortalitybyage, sex, and blood pressure:ameta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. **Lancet**, v. 370, p. 1829–1839, 2007.

LEWIS; R.; KRIUKELYTE, I. Complex neuropathic pain states. **Pain**, v. 17, p. 571-574, 2016.

LORENZINI, K.; UPPUGUNDURI, C.; DESMEULES, J.; DAALI, Y.; ESCHER, M. Severe Vincristine-induced Neuropathic Pain in a CYP3A5 Nonexpressor With

Reduced CYP3A4/5 Activity:CaseStudy. BOSILKOVSKA, M.; **Clinical Therapeutics**, v. 38, 216-220, 2016.

LUO, F.; YANG, C.; CHEN, Y.; SHUKLA, P.; TANG, L.; WANG, L.; WANG, Z. Reversal of chronic inflammatory pain by acute inhibition of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, p. 267–275, 2008.

MAFUKIDZE, A.; CALNAN, M.; FURIN, J. Peripheral neuropathy in persons with tuberculosis. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases** , v. 2, p. 5–11, 2016.

MAHON, A.; Lacking the 'protective label' of diabetes: Phenytoin-induced distal symmetrical peripheral neuropathy. **A clinical case report**, v. 25, p. 225-228, 2016.

MARINOS C. SYMPOSIUM: HIV-PNS Peripheral neuropathy and antiretroviral drugs. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v.6, p. 14–20, 2001.

MILAN, S.; PETKOVIC, S.; TADIC, R. Electrophysiological evaluation of chronic neuropathic pain of spinal cord injury. **The Indian Journal of Neurotrauma**, v. 7, p. 47-54, 2010.

MILLAR,P.; FLORAS,J. Statins and the autonomic nervous system. **Clinical Sciences**, v. 126, p. 401–415, 2014.

MUTHURAMAN, A.; SINGH, N. Attenuating effect of hydroalcoholic extract of Acorus calamus in vincristine-induced painful neuropathy in rats. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 480–487, 2011.

NOVAK, P.; PIMENTEL, D.; SUNDAR, B.; MOONIS, M.; QIN, L.; NOVAK, V. Association of statins with sensory and autonomic ganglionopathy. **Frontiers of Aging Neuroscience**, v. 7, p. 191, 2015.

NORATA, G.; TIBOLLA,G.; CATAPANO, A. Statins and skeletal muscles toxicity: from clinical trials to every day practice. **Pharmacology Research**. v. 88, p. 107–113, 2014.

OLIVEIRA, Y.; BAB, J.; ANGOUÉA, J. BIGNOUMBAB, P.; NZENZEZ, J. La Communication brève Déficit en cuivre et neuropathie périphérique compliquant une gastrectomie Copper deficiency and peripheral neuropathy as an outcome of gastrectomy. **Revue de médecine interne**, v. 34, p. 234–236, 2013.

OHSAWA, M.; AASATO, M.; HAYASHI, S.; KAMEI, J. RhoA/Rho kinase pathway contributes to the pathogenesis of thermal hyperalgesia in diabetic mice. **Pain** , v.152, p. 114-122, 2011.

PATHAK, N.; BALAGANUR, V.; LINGARAJU, M.; MORE, A.; KANT, V.; KUMAR, D.; KUMAR, D.; TANDAN, S. Antihyperalgesic and Anti-inflammatory Effects of Atorvastatin in Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain in Rats. **Inflammation**. v. 36, p. 1468-1478, 2013.

POLOMANO, R.; CLARK, U.; MANNES, A.; BENNETT, G. A painful peripheral neuropathy in rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. **Pain** v. 94, p. 293–304, 2001.

RAMIREZ JA, MENDELL JR, WARMOLTS JR, GRIGGS RC. Phenytoin neuropathy: structural changes in the sural nerve. **Annals Neurology** , v. 19, p. 162-167, 1986.

SANFELIU, C.; WRIGHT, J.; KIM, S. Neurotoxicity of isoniazid and its metabolites in cultures of mouse dorsal root ganglion neurons and hybrid neuronal cell line. **NeuroToxicology** , v. 20, p. 935-944, 1999.

SANNA, M.; QUATTRONE, A.; GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N. PKC-mediated HuD – GAP43 pathway activation in a mouse model of antiretroviral painful neuropathy. **Pharmacology Research**, v. 81, p. 44–53, 2014a.

SANNA, M.D., QUATTRONE, A., MELLO, T., GHELARDINI, C., GALEOTTI, N. Increased expression of the RNA-binding protein HuD promotes neuroregeneration in antiretroviral neuropathy. **Experimentl Neurology**, v. 261, p. 343-353, 2014b.

SANNA, M.; PERONI, D.; QUATTRONE, A.; GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N. Spinal RyR2 pathway regulated by the RNA-binding protein HuD induces pain hypersensitivity in antiretroviral neuropathy. **Experimental Neurology**, v. 267, p. 53-63, 2015.

SANNA, M.; GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N. Blockade of the spinal BDNF-activated JNK pathway prevents the development of antiretroviral-induced neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 105, 00. 543-552, 2016.

SGHIRLANZONI, A.; PAREYSON, D.; ANDLAURIA, G. Sensoryneurondiseases. **Lancet Neurology**, v. 4, p. 349–361, 2005.

SHI, X.; LIM, T.; LEE, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, L. Statins alleviate experimental nerve injury-induced neuropathic pain. **Pain**, v. 152, p. 1033–1043, 2011.

SHORVON, S.; REYNOLDS, E. Anticonvulsant peripheral neuropathy: a clinical and electrophysiological study of patients on single drug treatment with phenytoin, carbamazepine or barbiturates. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 45, p. 620-626, 1982.

SIAU, C.; BENNETT, G. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. **Anesthesia and Analgesia**, v. 102, p. 1485–1490, 2006.

SINGH, J.; ATAM, V.; DINKAR, A. Acute Onset Sensory Polyneuropathy Due to Metronidazole Therapy. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 63, p. 87-88, 2015.

SOURDILLE, M. Optic neuritis caused by monoamine oxidase inhibitors. **Bulletin des Societes d'Ophtalmologie de France**, v. 64, p. 981–88, 1964.

SUTO, T.; EISENACH, J.; HAYASHIDA, K. Peripheral nerve injury and gabapentin, but not their combination, impair attentional behavior via direct effects on noradrenergic signaling in the brain. **Pain**, v. 155, p. 1935–1942, 2014.

TA, L.; BIEBER, A.; CARLTON, S.; LOPRINZI, C.; LOW, P.; WINDEBANK, A. 2010. Transient receptor potential vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1-15, 2010.

TANNER, K.; REICHLING, D.; LEVINE, J. Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. **Journal of Neuroscience**, v.18, p. 6480–6491, 1998.

WALLACE, D. BROWN, M., LOTT, M. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. **Gene**, v.238, p. 211–230, 1999.

WENG, H.; CORDELLA, J.; DOUGHERTY, P. Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia. **Pain**, v. 103, p. 131-138, 2003.

WANG, H.; LIU, Z.; YANG, W.; LIAO, A.; ZHANG, R.; WU, B.; WANG, H.; YAO, K.; LI, Y. Study on mechanism of bortezomib inducing peripheral neuropathy and the reversing effect of reduced glutathione. **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi** v. 32, p. 107–111, 2011.

WILKINSON, M.; LAFFIN, L.; DAVIDSON, M. Overcoming toxicity and side-effects of lipid-lowering therapies. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, p. 439–452, 2014.

WILLEY, J.; ELKIND, M. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in the treatment of central nervous system diseases. **Archives of Neurology**, v. 67, p. 1062–1067, 2010.

WOLDEAMANUEL, Y., KAMERMAN P., VELIOTES D., PHILLIPS T., ASBOE D., BOFFITO M., RICE A. Development, Validation, and Field-Testing of an Instrument for Clinical Assessment of HIV-Associated Neuropathy and Neuropathic Pain in Resource-Restricted and Large Population Study Settings. **PLoS One**, v. 11, p.1-23, 2016.

XERRI, O.; LEMAIRE, B.; NASSER, G.; ROUSSEAU-HUVEY, B.; ROUSSEAU, M. Journal français d'ophtalmologie lettre à l'éditeur **Neuropathie optique toxique grave liée au linézolide**, v. 38, p. 55—58, 2015.

YOO, S.; KIM, H.; KIM, P.; DONNELLY, C.; KALINSKI, A.; VUPPALANCHI, D.; PARK, M.; LEE, S.; MERIANDA, T.; PERRONE-BIZZOZERO, N.; PARK, M.; LEE, S.; MERIANDA, T.; PERRONE-BIZZOZERO, N.; TWISS, J. A HuD-ZBP1 ribonucleoprotein complex localizes GAP-43 mRNA into axons through its 3' untranslated region AU-rich regulatory element. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, p. 792-804, 2013.

ZHAO, Y.; HUANG, G.; CHEN, S.; GOU, Y.; DONG, Z.; ZHANG, X. Folic acid deficiency increases brain cell injury via autophagy enhancement after focal cerebral ischemia. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 38, p. 41–49, 2016.



CAPÍTULO III

Microemulsão de Terpinoleno: desenvolvimento, liberação, cinética e controle de qualidade

RESUMO

A utilização de monoterpenos é idealizada como uma alternativa com menos efeitos colaterais para o tratamento de diversas condições patológicas, dentre as quais a dor neuropática. Acrescentado a isso, a elaboração de formulações transdérmicas tem visado, dentre outros objetivos, conferir melhoras farmacocinéticas, como desvio de metabolismo de primeira passagem hepático, otimizando o aproveitamento do princípio ativo. Assim, este estudo visou elaborar formulações transdérmicas de terpinoleno em sistemas de microemulsões. Foi realizado um planejamento fatorial com as variáveis concentração do fármaco (5 e 10%), presença ou não de promotor químico, e técnica de incorporação. Caracterização físico-química, estabilidade preliminar da microemulsão, teste das características organolépticas e testes de validação, a fim de avaliar a especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez foram realizados. Nesse aspecto, os resultados foram favoráveis quanto a todas essas propriedades. A constante de linearidade foi favorável, sugerindo sensibilidade do método, ao identificar aumentos lineares da concentração do fármaco. A precisão, a exatidão e a robustez foram satisfatórias, com coeficientes de variância menor que 5%. Os pH's de todas as formulações classificadas como microemulsão (sete) foram ácidos e dentro da faixa ideal do pH da pele (entre 4,6 e 5,8). A condutividade sugeriu ser a microemulsão de óleo em água. A mensuração dos tamanhos das gotículas e o valor do índice de polidispersividade foram satisfatórios nas sete formulações. Ao teste de estabilidade térmica, as microemulsões não apresentaram variações extremas quanto ao pH e a condutividade. O teste da cinética *in vitro* nos permitiu selecionar duas das sete microemulsões que tiveram o melhor perfil de liberação do princípio ativo para a realização de testes *in vivo* referentes ao capítulo IV.

Palavras chave: formulação transdérmica, microemulsão, monoterpeno, terpinoleno

ABSTRACT

Preclinical studies have suggested that monoterpenes could be an alternative with fewer side effects for the treatment of several pathological conditions, among them neuropathic pain. In addition, the development of transdermal formulations has been aimed, among other objectives, at conferring pharmacokinetic improvements, such as diversion of hepatic first-pass metabolism, thus improving the use of the active principle. Thus, this study aimed to elaborate transdermal terpinolene formulations in microemulsion systems. A factorial planning was done with the variables drug concentration (5 and 10%), presence or not of chemical promoter, and technique of incorporation. Physical-chemical characterization, preliminary stability, organoleptic properties and validation tests, in order to evaluate the specificity, linearity, precision, accuracy and robustness were performed, with all the results favorable. PHs of all microemulsions were within or close to the ideal range of skin pH (between 4.6 and 5.8). The conductivity suggested to be oil-in-water microemulsion. Measurement of droplet sizes and polydispersity index was satisfactory in all microemulsions. In the thermal stability test, the microemulsions did not show extreme variations in pH and conductivity. The *in vitro* kinetics test allowed us to select two of the seven microemulsions which had the best active principle release profile for *in vivo* tests of Chapter IV.

Keywords: microemulsion; monoterpene; terpinolene; transdermic formulation

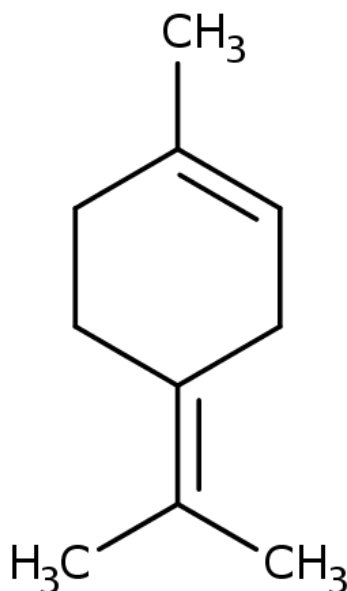
1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de sugerir efeitos terapêuticos de derivados de produtos naturais para diferentes condições patológicas e com um menor perfil de efeitos adversos (PIRES et al., 2013a). Dentre eles, destacam-se os óleos essenciais (OEs), que costumam ter em sua constituição compostos com propriedades terapêuticas bem estabelecidas. Já foram sugeridas, por exemplo, propriedades antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, antimutagênica, antidiabética, antiviral, analgésica e anti-inflamatória a alguns OEs (RAUT e KARUPPAYIL, 2014; MARTINO et al., 2015).

Do ponto de vista químico, os OEs podem ser compostos por terpenóides, incluindo monoterpenos e seus derivados, como carvacrol, timol, geraniol, eugenol, borneol e acetato de carvacrila. Esses, quando isolados, têm sugerido amplo potencial terapêutico, principalmente por suas atividades antioxidante, analgésica, ansiolítica, antidepressiva, anticonvulsivante e anti-inflamatória (PIRES et al., 2013b; PIRES et al., 2014a; PIRES et al., 2014b; GUIMARÃES et al., 2015).

O Terpinoleno (TPO) (**Figura 1**), cujo nome sistemático é 4-Isopropilideno-metilciclo-hex-1-eno, é um monoterpeno incolor, que acrescenta sabor artificial a alimentos, sem apresentar perigo à saúde. Ele é encontrado em espécies vegetais nas mais diversificadas regiões do globo, como a *Melaleuca alternifolia* C. – Austrália (SOUTHWELL e RUSSELL, 2002); *Pistacia integerrima* L. – Grécia, Índia e Irã (AHMAD, et al, 2010); *Tagetes erecta* L. – México, *Artemisia dracuncululus* L. – Irã (KAMIRI et al, 2015), dentre outras. No território nacional, ele está presente em algumas espécies como *Rosmarinus officinalis* L. – Pelotas (CLEFF et al, 2012) e *Tagetes patula* L. – Rio Grande do Sul (RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009). No nordeste brasileiro, é encontrado principalmente nas espécies *Chenopodium ambrosioides* L., *Citrus aurantium* L. e *Cuminum cyminum* L. (LOTA et al., 2001; GACHKAR et al., 2007; ALMANÇA et al., 2013).

Figura 1: Estrutura química do terpinoleno.



Quanto ao seu potencial terapêutico, há poucos estudos testando-o isoladamente. Na maioria deles, foram utilizados óleos essenciais de plantas que tinham o terpinoleno em sua constituição, sendo sugeridas propriedades antinociceptiva, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena desses (MOURA, 2012; CABRAL et al., 2015; AL-JABRI e HOSSAIN, 2014; EVRENDILEK, 2015; OLIVEIRA et al, 2015). Quanto a estudos utilizando o TPO isoladamente, GRAßMANN et al, 2005, encontraram atividade antioxidante desse monoterpeno.

Porém, apesar do promissor potencial terapêutico dos monoterpenos em geral, esses compostos podem sofrer metabolismo hepático de primeira passagem quando administrados por via oral, como quaisquer outros fármacos (XIAO-XIAO et al., 2013). Assim, a fim de melhorar a biodisponibilidade e, portanto, otimizar o efeito dos princípios ativos, formulações transdérmicas têm sido desenvolvidas atualmente. Além disso, alguns efeitos indesejáveis sobre o sistema gastrointestinal, como náuseas, dispepsia, diarreia, constipação, ulceração e sangramento na mucosa poderiam ser prevenidos com a administração transdérmica. Ademais, a via transdérmica oferece vantagem sobre a via

intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (NARUSE et al., 2014).

Para a elaboração de formulações transdérmicas, é essencial o desenvolvimento de sistemas de microemulsão (ME). As MEs são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por misturas de quatro componentes: água, óleo, tensoativo e co-tensoativo. São tipicamente formadas por duas fases: uma dispersa e uma contínua. A fase dispersa (interna) encontra-se distribuída em forma de gotículas no seio da fase contínua (externa). De forma geral, o sistema precisa de agentes emulsionantes ou surfactantes para estabilizar-se (DAMASCENO et al, 2011).

Sua fase interna corresponde a um microambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares (OLIVEIRA et al., 2004). Elas são geralmente caracterizadas como agregados esféricos, com diâmetros menores que 1400 Å, tipicamente 100 Å (YACUBIAN, 2002), estabilizadas por meio de um filme de componentes surfactantes (com ou sem co-surfactantes) localizados na interface óleo/água (LAWRENCE, 1994; ÜSTÜNDAĞ OKUR *et al.*, 2011).

As MEs apresentam grande potencial como sistemas de liberação e de direcionamento de fármacos, pelas propriedades de solubilizar fármacos hidrofílicos em meio lipofílico, lipofílicos em meio aquoso e anfifílicos na interface óleo/água (SILVA, 2009). A taxa de penetração pela pele de um fármaco topicamente administrado pode ser aumentada por meio do uso de intensificadores de permeação (WILLIAMS; BARRY, 2004), e as MEs costumam ser desenvolvidas para o aumento da biodisponibilidade de certos fármacos nas camadas mais profundas da pele.

A utilização das MEs na tecnologia farmacêutica tem despertado grande interesse como sistema de liberação de fármacos no organismo, principalmente pela facilidade de sua preparação e por apresentarem elevadas taxas de difusão e penetração na pele, além da maximização da estabilidade dos fármacos e cosméticos na estocagem (SILVA et al, 2015).

As MEs permitem liberação lenta do fármaco, proporcionando efeito prolongado, evitando-se assim atingir concentrações plasmáticas acima do

necessário. Isso torna, portanto, o tratamento mais seguro e com menos efeitos adversos (DALMORA; DALMORA; OLIVEIRA, 2001). São capazes de incorporar substâncias de acordo com as características do próprio fármaco, do transportador e do alvo que se pretende atingir.

Para o estudo das formulações, devem ser consideradas a polaridade, a afinidade e a solubilidade do fármaco, bem como as características destes transportadores – direcionamento do fármaco, liberação controlada e/ou prolongada e as características do órgão, tecido ou células que deverão receber esse fármaco (SILVA, 2013).

Para a elaboração das MEs, devem-se considerar também as misturas dos seguintes componentes: fase aquosa, fase oleosa, tensoativo e co-tensoativo. A estrutura formada é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos componentes utilizados e da razão entre os componentes. Existem basicamente três tipos de MEs: água em óleo (A/O), em que gotas de água ficam dispersas em óleo; óleo em água (O/A), em que gotas de óleo são dispersas em água; e bicontínuas, em que tanto água como óleo formam domínios que se comunicam, de modo que ambos se comportam como se fossem uma fase contínua (DAMASCENO et al, 2011).

O processo de liberação dos fármacos das MEs é caracterizado pela transferência do fármaco da fase dispersa para a fase contínua e pela difusão do fármaco da fase contínua para o meio externo. Dessa forma, a permeação do fármaco no sítio de ação será inicialmente influenciada pela concentração do fármaco na fase externa da ME. A diferença entre o mecanismo de liberação de fármacos das soluções em relação às MEs pode ser atribuída à partição do fármaco entre as gotículas dispersas no óleo e a fase contínua (TROTTA et al., 1989; SILVA et al, 2015).

Quanto às mensurações analíticas para elaboração das MEs, faz-se necessário que sejam seguidos parâmetros pré-estabelecidos para serem confiáveis, ou seja, seguir metodologias validadas. A validação consiste em um aspecto vital da garantia da qualidade de uma empresa, pois avalia a conformidade dos produtos farmacêuticos. Dessa forma, a validação de uma metodologia analítica tem como fim avaliar se o método desenvolvido é apropriado para o objetivo a qual se propõe (BARROS, 2002).

Dessa forma, considerando as propriedades do TPO, bem como seu potencial terapêutico, este estudo visou elaborar um sistema de MEs para o desenvolvimento de uma formulação transdérmica para este composto. Dentre as principais finalidades da elaboração desse sistema, está incluída a obtenção de melhorias farmacocinéticas, facilitando o controle de suas administrações e otimizando a absorção e distribuição do fármaco pelo organismo, além de aumento da aderência medicamentosa pelos pacientes, considerando a praticidade de sua aplicação. Um método analítico para a determinação do TPO na ME foi desenvolvido e as cinéticas para liberação *in vitro* do TPO foram realizadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias primas e Reagentes

Os componentes da microemulsão foram os seguintes: Labrasol - LAS[®] (PEG-8 Caprylic/CapricGlycerides, Brasquim, Brasil) lote: 41382, como tensoativo; Álcool Etilico Absoluto PA (Isotar, 99,8%, Brasil) lote: 0030415, como co-tensoativo, Miristato de Isopropila (Synth) lote: 52812 na fase oleosa e água deionizada para a fase aquosa. Os materiais foram disponibilizados pela Farmácia Escola da Universidade Federal do Piauí – UFPI. A substância utilizada para pesquisa e incorporada na ME foi o Terpinoleno (TPO), cedido pelo professor doutor Damião Pergentino de Sousa, membro do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba.

2.2 Equipamentos

O TPO foi quantificado por meio de espectrofotômetro UV-1800 da marca Shimadzu. As leituras foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1cm. Foram utilizadas uma balança analítica da marca Bioprecisa (Brasil) e vidrarias e micropipetas do laboratório de pesquisa da Farmácia Escola – UFPI.

2.3 Testes de validação

Os parâmetros avaliados neste trabalho estão descritos na RE 166/2017 como indicadores quantitativos do bom desempenho das técnicas. Eles são os seguintes: especificidade, sensibilidade do método, representada pelos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

2.3.1 Especificidade

A especificidade foi analisada por meio da varredura da ME e do ativo TPO (10%), em um intervalo de comprimento de onda de 200 a 800 nm, com o intervalo de 200-400 nm demonstrando as alterações mais proeminentes, por meio de espectrofotômetro UV-VIS. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm para a leitura das amostras, e Etanol como branco.

Foram realizadas varredura espectrofotométrica do TPO a 10% isoladamente, bem como da microemulsão veículo (MEV) e da formulação com o TPO incorporado. Em seguida, foi mensurado o comprimento de onda nas amostras que continham o TPO e na MEV. Note-se que a MEV é referente à microemulsão contendo todos os componentes das formulações, com exceção do TPO, que é o princípio ativo, e foi utilizada para fins comparativos quanto ao teste para identificação do comprimento de onda das formulações que continham o TPO.

Note-se que a MEV corresponde a todos os compostos das formulações, com exceção do princípio ativo, que é o TPO. A microemulsão veículo é composta pelos seguintes componentes, com seus respectivos percentuais: Labrasol (LAS) a 61,04%; etanol a 15,26%; Miristato de isopropila a 8,50% e Água a 15,20%.

2.3.2 Linearidade

Foram realizadas varreduras de 200-400 nm em triplicata das soluções de TPO com etanol nas diluições de 28 µg/mL, 42 µg/mL, 56µg/mL, 70 µg/mL e 84 µg/mL a partir de uma solução mãe a 1000µg/mL de TPO. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por meio do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (r^2),

adotando $r^2 > 0,99$ como valor mínimo para a aceitação. Para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo, foi adotada a análise de variância com teste unilateral, considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

A partir de 3 soluções padrões, foram construídas as curvas nas concentrações 28; 42; 56; 70 e 84 $\mu\text{g/mL}$. A curva de calibração foi construída posteriormente com a utilização do software Origin 8.1®

2.3.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

A partir da linearidade, foi calculado o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) conforme as equações abaixo:

Equação 1:

$$\text{LQ} = \text{DPa} \times 10/\text{IC}$$

Onde:

DPa é o desvio padrão da curva de calibração em triplicata.

IC é a inclinação da curva de calibração.

Equação 2:

$$\text{LD} = \text{DPa} \times 3/\text{IC}$$

Onde:

DPa é o desvio padrão da curva de calibração em triplicata.

IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

2.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi realizada em ensaios, em que foram investigados três níveis de concentração em triplicata das formulações. Um nível tem, deliberadamente, uma concentração baixa (80%), uma intermediária (100%), e o último, uma alta (110%) (MOURA; LIRA; MAGALHÃES, 2008).

A exatidão foi calculada por meio da fórmula:

Equação 3:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concent. média experimental} \times 100}{\text{concent. teórica}}$$

2.3.5 Precisão

A precisão intermediária (intercorrida) foi avaliada conforme a RE166/2017. As análises foram realizadas em dias diferentes (dois) e com analistas diferentes (dois), em um intervalo de 24 horas. Neste caso, o CV deve ter um valor máximo de 5,0%. Dentre as maneiras sugeridas pela resolução, optou-se por manter a concentração do ativo em 100% e realizar 6 leituras. Foi aplicada a análise estatística t-Student comparando os respectivos analistas (A e B), bem como os respectivos dias de análise (1 e 2).

2.3.6 Robustez

Este parâmetro foi avaliado pela verificação de possíveis alterações nos resultados por pequenas variações dos parâmetros analíticos. Os parâmetros selecionados foram o método de agitação da amostra (Manual *versus* Magnética), bem como a alteração da marca do solvente para a leitura (Etanol fabricado pela Vetec *versus* o fabricado pela Isofar). Por fim, foi calculada a média e o desvio padrão para cada procedimento.

2.3.7 Análise estatística para os testes de validação

A avaliação da precisão intermediária e robustez foram realizadas pela análise dos coeficientes de variação entre as médias obtidas e aplicação do teste t-Student (teste bilateral, $p < 0,05$). A linearidade do método foi submetida ao teste unilateral de análise de variância (ANOVA). Para a análise dos dados, foram utilizados os softwares Microsoft Office Excel®, OriginLab®, GraphpadPrism® e UV-Probe 2.42.

2.4 Condução do experimento com planejamento fatorial

A obtenção de uma solução requer o conhecimento de suas propriedades tecnológicas e/ou físico-químicas, bem como dos fatores que as influenciam, criando condições para avaliar a manutenção e a reprodutibilidade de sua qualidade. Essa qualidade do produto final pode ser influenciada por vários fatores,

que, por meio do uso do planejamento experimental fatorial, possibilita a escolha das condições ideais para a liofilização das MEs (LOPES et al., 2015).

Os projetos fatoriais são, em geral, os mais eficientes para a determinação do efeito de dois ou mais fatores sobre propriedades específicas relacionadas a uma determinada operação. Por meio de seu emprego, podem ser estabelecidas todas as possíveis combinações dos níveis de cada fator, e assim determinar quais fatores causam compatibilidade ou incompatibilidade. A realização de uma análise fatorial objetiva otimizar formulações farmacêuticas, empregando modelos estatísticos que permitem assegurar o resultado, diminuindo a possibilidade de erros aleatórios (LOPES et al., 2015).

Assim, considerando as informações acima, os experimentos foram realizados alternando as seguintes variáveis de processo: concentrações de TPO (5% e 10%); presença ou ausência de promotor de liberação e permeação; e momento da incorporação do TPO (antes ou depois de ser formulada a solução veículo) (Tabelas 1-3). Foi realizado um delineamento fatorial 2^3 como instrumento para comparar as diferentes variáveis de processo empregadas, conforme a **Tabela 1**. Esse tipo de delineamento considera três variáveis feitas em 8 formulações obtidas de diferentes maneiras, utilizando o cruzamento dos fatores com os níveis estabelecidos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Fatores de planejamento fatorial

| Fatores | Níveis |
|---|--------|
| (1) Concentração do Fármaco (TPO - princípio ativo) | 5% |
| | 10% |
| (2) Promotor de Liberação e Permeação | 0% |
| | 3% |
| (3) Técnica de incorporação do Fármaco | Antes |
| | Depois |

Os tratamentos podem ser observados nas **Tabelas 2 e 3**. Deve ser notado que, tendo como base os resultados obtidos durante o teste de validação, as formulações foram estabelecidas com base nas seguintes concentrações da

Formulação Veículo: Labrasol (LAS) a 61,04%; etanol a 15,26%; Miristato de isopropila a 8,50% e Água a 15,20%.

Tabela 2: Descrição do planejamento fatorial

| Tratamentos | 1 | 2 | 3 |
|-------------|-----|----|--------|
| F1 | 5% | 0% | Antes |
| F2 | 5% | 0% | Depois |
| F3 | 5% | 3% | Antes |
| F4 | 5% | 3% | Depois |
| F5 | 10% | 0% | Antes |
| F6 | 10% | 0% | Depois |
| F7 | 10% | 3% | Antes |
| F8 | 10% | 3% | Depois |

Tabela 3: Percentual de cada componente da ME, conforme o planejamento fatorial. As formulações foram estabelecidas com base nas seguintes concentrações: LAS 61,04%; etanol 15,26%; MIP 8,50% e Água 15,20%. A: incorporado antes do veículo; AO: ácido oleico; D: incorporando depois do veículo; LAS: labrasol; MIP: miristato de isopropila; TPO: terpinoleno.

| | TPO | LAS | Etanol | MIP | Água | AO |
|-----------|------|--------|--------|-------|--------|-------|
| F1 | A5% | 58,00% | 14,50% | 8,10% | 14,40% | 0% |
| F2 | D5% | 58,00% | 14,50% | 8,10% | 14,40% | 0% |
| F3 | A5% | 56,00% | 14,00% | 7,80% | 14,00% | 3,00% |
| F4 | D5% | 56,00% | 14,00% | 7,80% | 14,00% | 3,00% |
| F5 | A10% | 54,90% | 13,70% | 7,70% | 13,70% | 0% |
| F6 | D10% | 54,90% | 13,70% | 7,70% | 13,70% | 0% |
| F7 | A10% | 53,10% | 13,30% | 7,40% | 13,20% | 3,00% |
| F8 | D10% | 53,10% | 13,30% | 7,40% | 13,20% | 3,00% |

2.4.1 Preparação da microemulsão e incorporação do Terpinoleno

A microemulsão foi preparada a partir de agitação magnética a $25,0 \pm 2,0$ °C. O Labrasol (LAS[®]) foi utilizado como tensoativo, o Etanol como cotensoativo, o Miristato de Isopropila como fase oleosa e a água como fase aquosa. Foi pesada, em um frasco de vidro, a quantidade exata de etanol e a quantidade exata de labrasol e agitou-se por 10 minutos. Em seguida, foi adicionada a quantidade exata de miristato de isopropila e agitou-se por mais 30 minutos. Após a agitação da fase oleosa, foi adicionada uma quantidade exata de água e agitou-se por pelo menos uma hora (CARVALHO, 2012).

2.5 Caracterização físico-química

As MEs foram submetidas a testes de caracterização organoléptica, teor, pH, condutividade, tamanho de gotícula e teor do fármaco. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados dispostos em média aritmética.

2.5.1 Características organolépticas

Foram utilizadas as características de uma microemulsão como parâmetro para análise das amostras, por meio de tubos de ensaio transparentes, avaliando os aspectos da formulação como translucidez, uniformidade (sem separação de fases) e ausência de partículas estranhas. Após avaliação, foram classificadas como “conforme”, se de acordo, ou “não conforme”, no caso de a amostra estar em desacordo com as características de uma ME.

2.5.2 Teor

O teor das amostras foi realizado de acordo com a metodologia validada. Foi elaborada uma curva de calibração e, posteriormente, realizada a análise do teor da amostra, a 243 nm. As mensurações foram feitas por meio da varredura da microemulsão com posterior varredura do ativo TPO, utilizando espectrofotômetro UV-VIS, e cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm para a leitura das amostras, com o Etanol como branco.

2.5.3 Determinação do pH

O pH das amostras foi mensurado com Potenciômetro pH-3B, pH Meter Model, em triplicata, a temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) (BRASIL, 2010).

2.5.4 Condutividade

O teste foi realizado utilizando o Conduvívímetro, marca Marte, modelo MB-11, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, quinta edição (n=3) (BRASIL, 2010). Esse teste leva principalmente em consideração a condutividade elétrica predominante na contínua. Se esta, por exemplo, for predominantemente polar, esperam-se maiores valores quanto à condutividade, pois a água é um bom condutor elétrico. No entanto, se a fase contínua for predominantemente apolar, obter-se-ão valores menores, pois o óleo é um mal condutor de eletricidade.

A mensuração desse parâmetro visa, portanto, sugerir qual o tipo da microemulsão (água em óleo, ou óleo em água, por exemplo).

2.5.5 Tamanho de gotícula e índice de polidispersividade

O tamanho das gotículas e o índice de polidispersividade (PDI) foram determinados por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dyanamic Light Scattering*), também denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS), cuja técnica fornece o raio hidrodinâmico das partículas (DONG et al., 2016).

2.5.6 Estabilidade preliminar

O estudo da estabilidade preliminar foi conduzido pela análise dos seguintes parâmetros: características organolépticas, pH, condutividade elétrica e conteúdo. Na análise organoléptica das formulações, sua aparência, cor, homogeneidade, instabilidade e fase de separação foram observados (ANVISA, 2005). Os parâmetros foram analisados no começo no estudo e imediatamente após os testes de estresse térmico (ANVISA, 2005).

2.6 Teste de estabilidade ao estresse térmico

A fim de testar a estabilidade térmica, após a realização de todos os testes supracitados, cada formulação foi submetida a estresses térmicos em diferentes temperaturas. Esse teste emprega a temperatura como condição de tensão sobre a formulação.

Para tanto, as amostras foram acondicionadas em frascos plásticos transparentes de poliestireno fechados e submetidas ao aquecimento em banho ultratermostático (Nova Técnica Ltda, mod. 281 NT) na faixa de temperatura de 40 ± 2 a 80 ± 2 °C. O aumento da temperatura foi programado de 5 em 5° C, mantendo-se por trinta minutos em cada temperatura (BRACONI *et al.*, 1995). As amostras foram avaliadas macroscopicamente a cada aumento da temperatura e ao término a 80° C.

Para os testes de estresse térmico e análise macroscópica, empregou-se a seguinte nomenclatura para qualificá-los: **N** = Normal, sem alteração; **LM** = Levemente Modificada (apresentava-se com tendência em separar-se demonstrada pela visualização de uma tênue linha divisória); **M** = Modificada (quando ocorria acentuação dessa linha divisória, com separação de fases total) (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998).

Após esses procedimentos, as formulações foram avaliadas quanto às suas características organolépticas, e mensurados o teor, o pH e a condutividade, a fim de avaliar se continuaram a apresentar características semelhantes a antes do estresse térmico. Os métodos para as mensurações desses parâmetros foram idênticos aos feitos com as formulações antes do estresse térmico, e estão descritos nos **itens 2.5.1 a 2.5.4**.

2.7 Condições “SINK”

A taxa de dissolução intrínseca é determinada normalmente sob condições “SINK”, ou seja, em meio de dissolução com concentração do fármaco equivalente a até 10% da concentração de saturação. Para ser obtida a capacidade de o TPO se solubilizar em no mínimo 10 vezes a quantidade que é colocada no compartimento receptor para a realização da cinética de liberação *in vitro*, foi realizado um teste de solubilidade conduzido de acordo com a metodologia adaptada de Üstündağ Okur *et al.* (2011). Um excesso de TPO foi adicionado num

tubo contendo 3 mL de 5 amostras com os seguintes constituintes: **1.** Tampão fosfato (PBS) pH 7,4; **2.** PBS pH 7,4 e Lauril 5%; **3.** PBS pH 7,4 e Lauril 10%; **4.** PBS pH 7,4 e etanol e **5.** PBS pH 7,4 e etanol. Em seguida, houve o processamento com uma agitação a 100 rpm durante 72 horas a 37 ± 2 ° C. Subsequentemente, foi centrifugado durante 30 min a 3000 rpm, sendo em seguida retirado o sobrenadante e, após isso, a amostra foi filtrada. Em seguida, as alíquotas filtradas foram transferidas para um frasco volumétrico (BOERIS et al., 2000). As leituras foram feitas no comprimento de onda de UV $\lambda = 243$ nm, para posterior quantificação das amostras.

2.8 Cinética de liberação *in vitro*

Para o estudo da cinética de liberação *in vitro*, foram utilizadas células de difusão tipo Franz com área difusional de $1,5 \text{ cm}^2$, volume ± 12 mL, utilizando membranas artificiais de diálise. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 e Lauril 10%, representando a melhor condição “SINK” (meio de dissolução com concentração do fármaco equivalente a cerca de 1/3 da concentração de saturação), em um sistema composto de seis células individuais ligadas a um banho termostaticado a $37 \pm 0,5$ °C sob agitação constante de 100 rpm com um agitador magnético por um período de 24 horas (ROSA; VILHENA, 2012).

Em seguida, no compartimento doador da célula de Franz, 500 mg da formulação foram aplicadas diretamente sobre a membrana artificial de cada célula. As membranas foram cuidadosamente colocadas no compartimento doador para que elas estivessem em contato com a solução receptora. Todas as membranas foram imersas na mesma solução do meio receptor por doze horas antes do início do experimento. As amostras da solução receptora (3,0 mL) foram coletadas nos seguintes tempos: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0 e 24,0 horas. O volume total da fase receptora de cada célula (12 mL) foi completado após a coleta na mesma temperatura ($37 \pm 0,5$ °C) para manter as condições do experimento (CARVALHO, 2012). A quantidade de TPO liberada na câmara receptora foi quantificada por espectrofotometria por meio do método analítico validado.

Foram ainda aplicados dois modelos para mensuração da cinética de liberação: o de ordem zero e o Higuchi.

No modelo de ordem zero, a dissolução do fármaco a partir de uma formulação farmacêutica que não desagrega e que tem liberação lenta pode ser representada pela seguinte equação:

$$W_0 - W_t = Kt$$

Em que W_0 é a quantidade inicial do fármaco presente na formulação, W_t é a quantidade do fármaco na formulação em um determinado tempo t , e K é a constante de proporcionalidade. Dividindo essa equação por W_0 e simplificando:

$$f_t = K_0t$$

Em que $f_t = 1 - (W_t/W_0)$ e f_t representa a fração do fármaco dissolvido em um tempo t e K_0 a aparente taxa constante de dissolução ou a constante de liberação de ordem zero. Dessa forma, um gráfico da fração do fármaco dissolvido versus o tempo será linear se as condições prévias de estabilidade forem preenchidas (RAMTEKE et al., 2014).

Assim, o modelo de ordem zero considera a quantidade acumulada liberada de um fármaco versus o tempo (DASH et al., 2010).

No modelo Higuchi, o estudo da dissolução a partir de um sistema planar com uma matriz homogênea pode ser obtido pelas seguintes equações:

$$f_t = Q = A\sqrt{D(2C - C_s)} \text{ Cst} \quad Q = k.t^{0.5}$$

Em que Q é a quantidade de fármaco liberada no tempo t por unidade de área A , D é o coeficiente de difusão das moléculas do fármaco, C é a concentração inicial do fármaco, e C_s é a solubilidade do fármaco na matriz (COSTA; LOBO, 2001; RAMTEKE et al., 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção e seleção das microemulsões

Ambas concentrações (5% e 10%) de TPO se compatibilizaram com o sistema de microemulsões. Foram preparadas 5g do veículo e posteriormente o fármaco foi incorporado, apresentando-se visualmente compatível com a formulação. Além disso, o fármaco pôde ser incorporado tanto antes quanto após o veículo (**Tabelas 1 a 3**). Note-se que a formulação F5 (terpinoleno a 10%, sem acréscimo de promotor de liberação e permeação e incorporação antes do veículo) foi a única em que não houve incorporação, sendo, portanto, classificada como “não

conforme”, estando, portanto, em desacordo com as características de uma microemulsão (**Figura 2**).

Figura 2: Aspecto visual das microemulsões. A formulação F5 não incorporou (“não conforme”). O veículo corresponde à formulação não etiquetada na figura.



3.2 Validação do método analítico

Para a realização de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, a Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH) estabelece determinados padrões por meio da elaboração de guias, como o guia de validação de métodos, que tem sido utilizado também em outras áreas de estudo, além da farmacêutica. No Brasil, a resolução específica (RE) 166 de 24 de Julho de 2017 determina na publicação “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” as informações pertinentes à validação desses procedimentos. Os itens subsequentes se referem aos resultados da especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, que compõem a validação do método analítico selecionado (BRASIL, 2003).

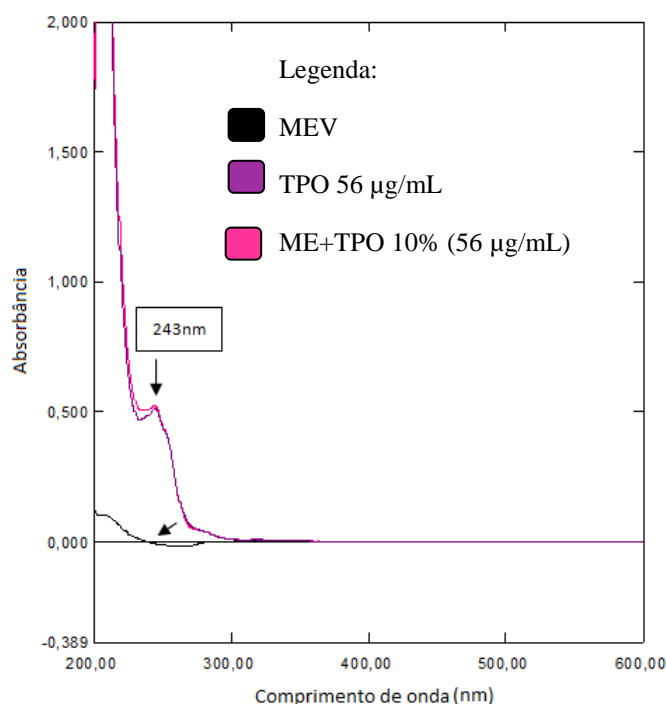
3.2.1. Especificidade

A especificidade corresponde à capacidade que o método possui de mensurar de forma exata um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise quantitativa (teor), a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não

contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (BRASIL, 2003).

Note-se que a leitura com faixa de comprimento de onda total variou entre 200 e 800 nm, e no intervalo de 200 a 400 nm foi observado pico de maior absorção. Adicionalmente, considerando a concentração do TPO, caso houvésemos selecionado a de 5%, em vez de 10%, não haveria interferência nos resultados, visto que ambas seguem uma diluição similar e proporcional. O pico máximo de absorção da substância foi a um comprimento de onda em 243 nm, sendo este, portanto, selecionado (RAMOS, 2014; RAMOS e CREMASCO, 2014). Conforme pode ser constatado na **Figura 3**, o método selecionado para o desenvolvimento das MEs apresentou alta especificidade, pois o pico com comprimento de onda de 243 nm foi observado somente nas amostras que continham TPO.

Figura 3: Varredura espectrofotométrica das MEs. TPO 56 $\mu\text{g/mL}$: Terpinoleno isoladamente, a 56 $\mu\text{g/mL}$; ME+TPO 56 $\mu\text{g/mL}$: Microemulsão com o ativo TPO 10% (56 $\mu\text{g/mL}$); MEV: Microemulsão Veículo.



3.2.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,990 (BRASIL, 2003).

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados às amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Seguindo as diretrizes acima, e, conforme o que pode ser observado na **Figura 4**, que representa a curva de calibração referente às concentrações de 28; 42; 56; 70 e 84 $\mu\text{g/mL}$ de TPO, não houve diferença significativa quando os pontos obtidos na reta foram comparados às concentrações teóricas, visto que o valor do F-crítico (3,7083) foi maior que o F calculado (1,5454), de acordo com a análise de variância ANOVA, para um intervalo de confiança de 95%. Ou seja, o parâmetro de linearidade seguiu as recomendações da RE 166/2017, e foram obtidos 5 pontos em concentrações crescentes. Após a construção do gráfico, os dados foram tratados estatisticamente e foi determinado o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular e soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear (**Figura 4**). A equação da reta obtida foi $y=0,0093x+0,0218$, em que o valor de x pode ser substituído pela absorbância para a quantificação do fármaco. O coeficiente de correlação obtido foi $r^2= 0,9987$. O valor do coeficiente de correlação está de acordo com a ANVISA, em que o limite mínimo aceitável é de 0,99 (BRASIL, 2003). O Limite de Detecção (LD) foi de 3,6999 e o Limite de Quantificação (LQ) foi 5,6059. O coeficiente de variação foi satisfatório para todas as concentrações mensuradas (<5%). Os resultados para a obtenção da curva de calibração podem ser observados na **Tabela 4**.

Figura 4: Curva de calibração do terpinoleno nas concentrações de 28; 42; 56; 70 e 84 µg/mL a 243 nm.

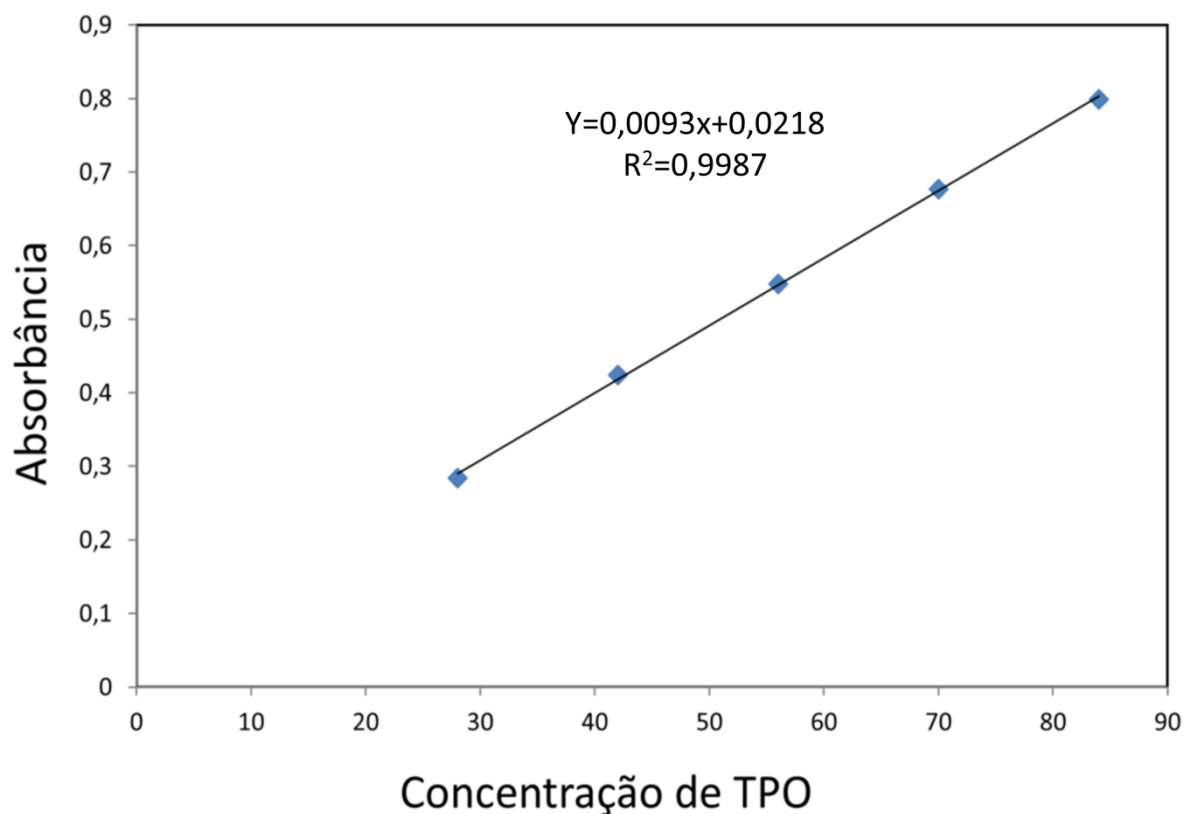


Tabela 4: Análise dos resultados das curvas analíticas do terpinoleno. Abs – Absorbância, CV – Coeficiente de variação, DP – Desvio padrão.

| Concentração (µg/mL) | Média das Abs (n=3) | DP | CV(%) |
|----------------------|---------------------|-------|-------|
| 28,00 | 0,276 | 0,010 | 3,77 |
| 42,00 | 0,416 | 0,009 | 2,08 |
| 56,00 | 0,541 | 0,006 | 1,14 |
| 70,00 | 0,681 | 0,013 | 1,96 |
| 84,00 | 0,793 | 0,009 | 1,13 |

3.2.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Corresponde à comparação dos resultados obtidos em uma nova metodologia selecionada com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão já tenha sido estabelecida (BRASIL, 2003). A RE 166/2017 preconiza que os desvios não podem exceder 20% para métodos analíticos.

Como é possível observar na quantificação do TPO, utilizando o comprimento de onda de 243nm na concentração de 56 µg/ml para a ME a 10%, foram obtidas formulações de baixa e alta concentração (80% e 110%) para análise dos parâmetros de exatidão. Com base nos resultados da especificidade e da linearidade, a concentração de 56 µg/mL foi considerada a padrão, sendo, portanto, o equivalente a 100%. Os resultados da exatidão podem ser observados na **Tabela 5**. Note-se que a concentração teórica referente a 80% de 56 µg/mL é 44,8 µg/mL e 110% de 56 µg/mL é 61,6 µg/mL (**Tabela 5**), e elas foram utilizadas propositalmente, a fim de se definir a exatidão do método. Os resultados foram satisfatórios, pois todos apresentaram um CV <5%. Isso indica que o método selecionado foi satisfatoriamente exato para detectar essas alterações propositas de concentração.

Tabela 5: Dados da Exatidão, expressa em porcentagem para a quantificação do terpinoleno em espectrofotômetro UV-VIS a 243nm. CV – Coeficiente de variação, DP – Desvio padrão.

| Concentração teórica (µg/mL) | Média (µg/mL) (n=3) | Exatidão (%) | DP | CV |
|------------------------------|---------------------|--------------|------|------|
| 44,8 | 43,74 | 97,62 | 0,98 | 1,00 |
| 56 | 54,54 | 97,39 | 3,79 | 3,89 |
| 61,6 | 63,49 | 103,06 | 1,55 | 1,50 |

3.2.4 Precisão

Nos ensaios avaliados tanto pelo analista A, quanto pelo analista B, nos dois dias de análise, os valores de CV foram inferiores a 5% (**Tabela 6**), comprovando assim a precisão do método analítico (BRASIL, 2003). Todos obtiveram $p > 0,05$ inferindo que não houve diferenças estatísticas entre as mensurações para o TPO, o que demonstra precisão quanto aos resultados.

Tabela 6: Análise da precisão, em dias diferentes, com analistas diferentes (n=6). DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

| | DIA 1 | | DIA 2 | |
|---|------------|------------|------------|------------|
| | Analista A | Analista B | Analista A | Analista B |
| Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$) | 56 | 56 | 56 | 56 |
| Concentração mensurada | 51,70 | 52,92 | 53,77 | 52,38 |
| DP | 1,56 | 1,32 | 2,24 | 2,03 |
| CV% | 3,02 | 2,49 | 4,17 | 3,87 |

3.2.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Na espectrofotometria, ela pode ser verificada pela variação do pH da solução, temperatura, diferentes fabricantes de solventes, luminosidade e diferentes tampões. Nela, é verificada a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. (BRASIL, 2003).

Os resultados demonstram que o método desenvolvido foi considerado robusto frente à variação dos parâmetros avaliados. Dentre a variação relacionada ao método de agitação, foram selecionadas agitação manual (AM) versus agitação magnética (AMg). E dentre a relacionada a diferentes fabricantes de um

componente, foi utilizado etanol da Vetec versus etanol da Isofar (**Tabela 7**). Não foram observados níveis de significância estatística durante o preparo das amostras, com valores de $p > 0,05$ e $CV < 5\%$, sendo possível constatar que o método resistiu às pequenas variações submetidas, demonstrando, portanto, resultado satisfatório quanto à robustez.

Tabela 7: Resultados obtidos no teste de robustez, nas condições de mudança de agitação e mudança de fabricantes de solventes. AM: agitação manual; AMg: agitação magnética; CT – Concentração Teórica de Terpinoleno; CV – Coeficiente de variação; M. – Marca do produto.

| Mudança de agitação | | | | | Mudança de fabricante de solvente (etanol) | | | |
|-----------------------------|-------|------|-------|------|--|------|-----------------|------|
| CT | AM | CV | AMg | CV% | M. | CV% | M. | CV% |
| ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | (n=3) | % | (n=3) | | Vetec (n=3) | | Isofar (n=3) | |
| 56 | 55,27 | 1,60 | 56,25 | 0,99 | 57,05 | 1,26 | 55,52 | 2,00 |

3.3 Caracterização físico-química

3.3.1 Características Organolépticas

Conforme pode ser observado na **Figura 2**, com exceção da formulação F5, todas as outras formulações, incluindo o veículo, apresentaram translucidez, uniformidade (sem separação de fases) e ausência de partículas estranhas, significando terem sido incorporadas. Assim, a F5 foi a única considerada como “não conforme”, e descartada para os testes subsequentes.

3.3.2 Teor

Conforme pode ser observado na **Tabela 8**, o teor de TPO foi mensurado, em triplicata, em cada uma das formulações caracterizadas como em conformidade para os parâmetros físico-químicos exigidos. Todos os resultados percentuais foram satisfatórios, pois estiveram na faixa de 90 a 110% e, portanto, em acordo com o exigido pela Farmacopéia brasileira (ANVISA, 2010). Não houve diferença

estatística significativa entre os valores do teor mensurados em triplicata. Isso sugere, portanto, confiabilidade do teste selecionado para a mensuração do teor do fármaco em cada formulação classificada como em conformidade quanto às características de uma microemulsão.

Tabela 8: Valores das médias do teor de Terpinoleno nas formulações F1, F2, F3, F4, F6, F7 e F8, mensurados em triplicata. DP – Desvio padrão.

| Amostras | Média do Teor % (n=3) | DP |
|----------|-----------------------|------|
| F1 | 103,76 | 3,76 |
| F2 | 102,14 | 2,78 |
| F3 | 107,97 | 1,17 |
| F4 | 104,74 | 2,67 |
| F6 | 105,53 | 2,12 |
| F7 | 104,52 | 2,69 |
| F8 | 96,81 | 2,56 |

3.3.3 Determinação do pH

Conforme pode ser observado na **Tabela 9**, as formulações contendo TPO, bem como o veículo, apresentaram pH ácido. Note-se que quando foi mensurado o pH do TPO isoladamente, uma média de 5,34 foi obtida. Dessa forma, as formulações resultaram em um pH compatível com sua incorporação. Ao ser adicionado TPO ao veículo, foi observada uma redução do valor pH, corroborando o pH ácido do monoterpene. Note-se, também, que o pH de todas as formulações estiveram bem próximos à faixa fisiológica de pH da pele (4,6 a 5,8), sugerindo, portanto, que elas apresentam baixo potencial para causar irritações na pele, quando se considera exclusivamente este parâmetro (DAMASCENO et al., 2011).

Tabela 9: Mensuração do pH das formulações Veículo, F1, F2, F3, F4, F6, F7 e F8. Média \pm DPM dos valores do pH mensurados em triplicata

| | Veículo | F1 | F2 | F3 | F4 | F6 | F7 | F8 |
|-------|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| Média | 6,43 | 5,34 | 6,15 | 5,5 | 5,83 | 6,03 | 5,71 | 5,52 |
| DP | 0,08 | 0,05 | 0,16 | 0,07 | 0,09 | 0,16 | 0,03 | 0,05 |

3.3.4 Condutividade

Esse teste é utilizado na tentativa de se classificarem as formulações com base na distribuição das fases, permitindo a determinação do valor da condutividade dos domínios polares ou apolares. Nota-se que a condutividade se eleva com o aumento da quantidade de água, já que esta é um bom condutor de eletricidade (LONGO, 2006).

Dessa forma, conforme pode ser observado na **Tabela 10**, as formulações apresentaram valores de condutividade sugerindo a predominância de água no meio externo, sendo, portanto, um sistema de ME de óleo em água (O/A). Note-se que a condutividade típica de solventes apolares, sugestivas de microemulsões de água em óleo, costuma variar entre 10^{-12} e 10^{-8} $\mu\text{S}/\text{cm}$, que são valores bem inferiores aos obtidos neste experimento. Isso ocorre devido ao óleo ser um mal condutor de eletricidade (BUMAJDAD; EASTOE, 2004).

Além disso, um pequeno decréscimo na condutividade da ME foi observado quando o TPO foi incorporado dentro do sistema, pois todas as formulações tiveram valor de condutividade inferior ao veículo. Isso poderia caracterizar mudanças estruturais na ME devido à incorporação do TPO, que é molécula hidrofóbica e, portanto, um condutor ruim de eletricidade (MO, ZHONG, ZHONG, 2000; MEHTA, KAUR, 2011). Ademais, Halle (1990) demonstra que o aumento na tamanho das gotículas na ME O/A poderia influenciar a flutuação de suas cargas e assim reduzir a condutividade. Seguindo esse raciocínio, os valores de condutividade (**Tabela 10**) pareceram se correlacionar com os resultados referentes aos valores dos tamanhos das gotículas (**Tabela 11**) de uma forma inversa, conforme previsto, quando se observa que as formulações que continham

TPO apresentaram um tendência a ter gotículas maiores do que as formulações sem TPO (Veículos) (**Tabela 11**) e que, além disso, as que continham TPO tenderam a apresentar valores menores de condutividade do que o veículo (**Tabela 10**).

Tabela 10: Valores da média de condutividade, mensurados em $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C. Média \pm DPM dos valores da condutividade mensurados em triplicata.

| | Veículo | F1 | F2 | F3 | F4 | F6 | F7 | F8 |
|-------|---------|------|-------|------|------|------|------|------|
| Média | 2,68 | 2,39 | 2,297 | 1,84 | 2,18 | 1,79 | 2,02 | 1,51 |
| DP | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,01 | 0,07 | 0,01 | 0,03 |

Tabela 11: Valores dos tamanhos das gotículas, em nanômetros, nas amostras de cada formulação. AO: ácido oleico; V: veículo.

| F1 | F2 | F3 | F4 | F6 | F7 | F8 | V sem AO | V com AO |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------------|
| 162,3 | 108,8 | 87,83 | 76,37 | 179,8 | 113,4 | 109,5 | 73,81 | 58,31 |

3.3.5 Teste de mensuração do tamanho das gotículas e PDI

Conforme pode ser observado na **Tabela 11** e, correlacionando esses valores com a **Tabela 12**, os tamanhos das gotículas das formulações em que houve incorporação do TPO estiveram dentro do considerado como adequado para classificar uma ME. O tamanho da gotícula de uma ME é muito reduzido, tipicamente entre 10-300nm, aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões, que é em torno de 1-10 μm (Kawakami et al., 2002a; Kawakami et al., 2002b). Por essa razão, MEs são relativamente translúcidas, ou seja, opticamente límpidas, o que se justifica pelo fato de o diâmetro médio das gotículas ser menor do que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente. Com isso, elas não espalham luz e o sistema fica transparente (Langevin, 1988).

Tabela 12: Comparação entre emulsões e microemulsões

| | Emulsão | Microemulsão |
|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Tamanho das gotículas dispersas | 1-10 μm | 10nm-300nm |
| Aparência | Turva e leitosa | Transparente e translúcida |
| Estabilidade | Termodinamicamente instável | Termodinamicamente estável |
| Tensão interfacial | Alta | Muito baixa |
| Quantidade de tensoativo | Baixa | Alta |

Por meio da análise da **Tabela 12**, pode ser observado que a tensão interfacial de uma ME é muito baixa quando comparada com a tensão interfacial de uma emulsão. Isso pode levar à formação espontânea das MEs e, conseqüentemente, a um pequeno tamanho das gotículas, em nível nanométrico, conferindo um aspecto transparente e uma estabilidade termodinâmica à formulação. Em contrapartida, as emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica (TENJARLA, 1999; BAGWE et al., 2001; DAMASCENO et al., 2011).

Um dos métodos mais utilizados para a caracterização de MEs é o DLS, sendo este selecionado como o modelo para mensuração do tamanho das gotículas nas formulações deste estudo. Ele corresponde a uma técnica não invasiva para mensurar as dimensões de partículas com tamanho menor que 1 μm . Quando essas gotículas são iluminadas por um feixe de luz laser, ocorre o espalhamento deste, que, sendo detectado em um ângulo determinado, varia em uma taxa dependente da velocidade de difusão da partícula, a qual, por sua vez, é governada pelo seu tamanho (ROSSETI, 2006). Dessa forma, há obtenção de informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas. Caso o sistema esteja em concentrações extremamente elevadas, a interpolação torna-se dificultada em razão das interações intergotículas, sendo necessário, nesses casos, fazer uma diluição para facilitar a sua identificação (FORMARIZ et al., 2006, DAMASCENO et al., 2011).

Como pode ser observado na **Tabela 11**, todas as formulações podem ser consideradas MEs, tendo como base o tamanho das gotículas. Deve ser notado que, conforme o esperado, as formulações tiveram aumento do tamanho de suas gotículas quando do acréscimo do TPO. Isso pode ser constatado ao se observar que as formulações veículo tiveram valores inferiores às formulações que continham o fármaco. Ainda assim, todas apresentaram as dimensões de gotículas dentro do intervalo aceito para caracterizar uma microemulsão, que varia entre 10-300 nm (DAMASCENO et al., 2011). O aumento no diâmetro das gotículas poderia sugerir que o fármaco acrescentado está localizado na camada interfacial de surfactantes, o que pode decrescer a curvatura da micela e assim modificar o tamanho das gotículas (GOMES, 2010).

Além do tamanho da gotícula, o PDI também foi mensurado pela técnica DLS. Note-se que esse parâmetro, quando se encontra abaixo de 0,5, indica homogeneidade quando se compara o tamanho de cada gotícula e/ou partícula da ME entre si (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011). Nesse caso, todas as formulações analisadas, inclusive o veículo com ácido oleico e sem ácido oleico, apresentaram o PDI em acordo com o exigido. Contudo, as formulações veículo apresentaram valores de PDI maiores do que as formulações em que o TPO estava presente. Assim, apesar de as formulações que continham TPO terem apresentado tamanho das gotículas maior que o veículo (**Tabela 11**), essas gotículas tenderam a apresentar tamanhos mais homogêneos quando comparadas entre si. A incorporação do TPO poderia, supostamente, ter ajudado a padronizar o tamanho das gotículas formadas, estabilizando assim a formulação (**Tabela 13**).

Tabela 13: Valores do Índice de Polidispersividade das formulações F1, F2, F3, F4, F6, F7 e F8, bem como do Veículo com ácido oleico e sem ácido oleico. AO: ácido oleico; V: veículo.

| F1 | F2 | F3 | F4 | F6 | F7 | F8 | V sem AO | V com AO |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|
| 0,173 | 0,381 | 0,266 | 0,294 | 0,212 | 0,170 | 0,177 | 0,485 | 0,456 |

3.4 Teste de estabilidade ao estresse térmico

Após serem submetidas aos estresses térmicos de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C, por 30 minutos em cada temperatura, todas as formulações analisadas (F1, F2, F3, F4, F6, F7, F8 e Veículo) continuaram a demonstrar translucidez, sem haver separação de fases (**Figura 5**). Foram assim classificadas como **N** (sem alteração macroscópica), sendo, então, submetidas aos demais testes.

Figura 5: Aspecto visual das microemulsões após o TET (teste de estresse térmico).



3.4.1 Teor

Conforme pode ser observado na **Tabela 14**, após o teste do estresse térmico, todos os resultados percentuais foram satisfatórios, pois se mantiveram na faixa de 90 a 110% e, portanto, em acordo com o exigido pela Farmacopéia brasileira (ANVISA, 2010).

Tabela 14: Valores do teor de terpinoleno antes e depois do estresse térmico, expressos em médias, nas formulações F1, F2, F3, F4, F6, F7 e F8, mensurados em triplicata, antes de depois do teste do estresse térmico. As mensurações foram feitas por meio da varredura da microemulsão com posterior varredura do ativo TPO, a 243 nm de comprimento de onda, utilizando espectrofotômetro UV-VIS, e cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm para a leitura das amostras, com o Etanol como branco.

| Amostras | Teor antes do estresse térmico | | Teor após o estresse térmico | |
|----------|--------------------------------|------|------------------------------|------|
| | Média % | DP | Média % | DP |
| F1 | 103,76 | 3,76 | 99,90 | 4,02 |
| F2 | 102,14 | 2,78 | 97,08 | 3,38 |
| F3 | 107,97 | 1,17 | 103,92 | 3,42 |
| F4 | 104,74 | 2,67 | 103,96 | 2,07 |
| F6 | 105,53 | 2,12 | 99,67 | 5,75 |
| F7 | 104,52 | 2,69 | 103,22 | 4,32 |
| F8 | 96,81 | 2,56 | 95,29 | 2,16 |

3.4.2 Valores do pH

Conforme pode ser observado na **Tabela 15**, os valores da média do pH de cada formulação se mantiveram ácidos e bastante semelhantes aos obtidos nos testes de estabilidade preliminar. Todavia, quando feita a comparação entre esses resultados e os dos testes preliminares, foi observado que os das formulações F1, F3, F4 e F7 após o estresse térmico se mantiveram sem significância estatística quando comparados aos resultados de antes do estresse térmico, o que sugere que as formulações apresentaram-se estáveis, considerando-se exclusivamente o valor do pH quando comparado com os resultados de antes do estresse térmico. Ainda que tenha havido diferença estatística significativa quando foram comparados os resultados de F2, F3 e F8 ($p < 0,05$), o pH de todas elas se manteve ácido e próximo dos resultados de antes do estresse térmico.

Tabela 15: Comparação dos pH's antes e após o estresse térmico, em médias \pm DPM, das formulações, com o respectivo valor de p. ET: Estresse Térmico.

| | Veículo | F1 | F2 | F3 | F4 | F6 | F7 | F8 |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Antes ET | 6,43 \pm 0,08 | 5,34 \pm 0,05 | 6,15 \pm 0,16 | 5,5 \pm 0,07 | 5,83 \pm 0,09 | 6,03 \pm 0,16 | 5,71 \pm 0,03 | 5,52 \pm 0,05 |
| Após ET | 6,31 \pm 0,04 | 5,4 \pm 0,28 | 5,67 \pm 0,01 | 5,11 \pm 0,01 | 5,98 \pm 0,05 | 6,03 \pm 0,03 | 6,01 \pm 0,01 | 5,96 \pm 0,02 |
| Valor de p | 0,070 | 0,794 | 0,003 | 0,049 | 0,138 | 0,926 | 0,089 | 0,002 |

3.4.3 Valores da condutividade

Apesar de terem apresentado diferença significativa quando os valores da condutividade após o estresse térmico foram comparados aos de antes, ainda assim as MEs apresentaram resultados sugestivos de óleo em água. Antes do estresse térmico, eles variaram entre 1,51 a 2,68 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ou seja, indicando ME de óleo em água. Após o teste, eles variaram entre 2,15 a 6,36 $\mu\text{S}/\text{cm}$, permanecendo bem superiores aos valores de MEs de água em óleo, que costumam variar entre 10^{-12} e 10^{-8} $\mu\text{S}/\text{cm}$. Não houve, portanto, alteração na classificação das microemulsões, mesmo após o teste do estresse térmico (**Tabela 16**).

Tabela 16: Comparação das condutividades antes e após o estresse térmico, expressas em médias, com o respectivo valor de p. DP: desvio padrão; ET: Estresse Térmico.

| | Veículo | F1 | F2 | F3 | F4 | F6 | F7 | F8 |
|-----------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|------|--------|
| Antes do ET | 2,68 | 2,39 | 2,29 | 1,84 | 2,18 | 1,79 | 2,02 | 1,51 |
| DP antes do ET | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,01 | 0,07 | 0,01 | 0,03 |
| Depois do ET | 3,66 | 3,67 | 4,67 | 2,15 | 2,98 | 2,45 | 6,36 | 3,91 |
| DP depois do ET | 0,16 | 0,04 | 0,06 | 0,04 | 0,06 | 0,03 | 0,12 | 0,03 |
| Valor de p | 0,0081 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0007 | 0,0007 | 0 | 0,0009 |

3.5 Cinética de liberação *in vitro* do TPO na ME

O TPO demonstrou ser muito solúvel em tampão fosfato com pH 7,4 associado a Lauril Sulfato de Sódio a 10%, com solubilidade superior a 6,0 mg/mL. Dessa forma, pode ser observado na **Figura 6** e **Tabela 17** que as formulações F8 e F7 alcançaram o maior patamar de quantidade liberada acumulada em 24 horas (Q24), em valores absolutos. Isso poderia se dever, pelo menos em parte, ao acréscimo de ácido oleico, que é um promotor de liberação e permeação. É importante pontuar, também, que tanto a F7 quanto a F8, além de terem o ácido oleico como promotor de liberação e permeação em sua constituição, continham o TPO na maior concentração (10%) (**Tabela 3**). Note-se, também, que, dentre as formulações que continham TPO a 5%, a F4 foi a que sugeriu melhor resultado quanto à quantidade liberada acumulada em valores absolutos e percentuais (**Figura 6** e **Tabelas 3** e **17**). Os valores percentuais de Q24 para a F4 foram maiores do que os da F8, embora os valores absolutos de Q24 da F8 tenham sido maiores do que os da F4. Isso aconteceu porque F8 contém TPO a 10%, enquanto que F4 contém TPO a 5%, e os cálculos percentuais levam em conta as concentrações de TPO nas formulações.

Figura 6: Quantidade de TPO liberada nas sete formulações, por meio de membrana de diálise em relação ao tempo em minutos.

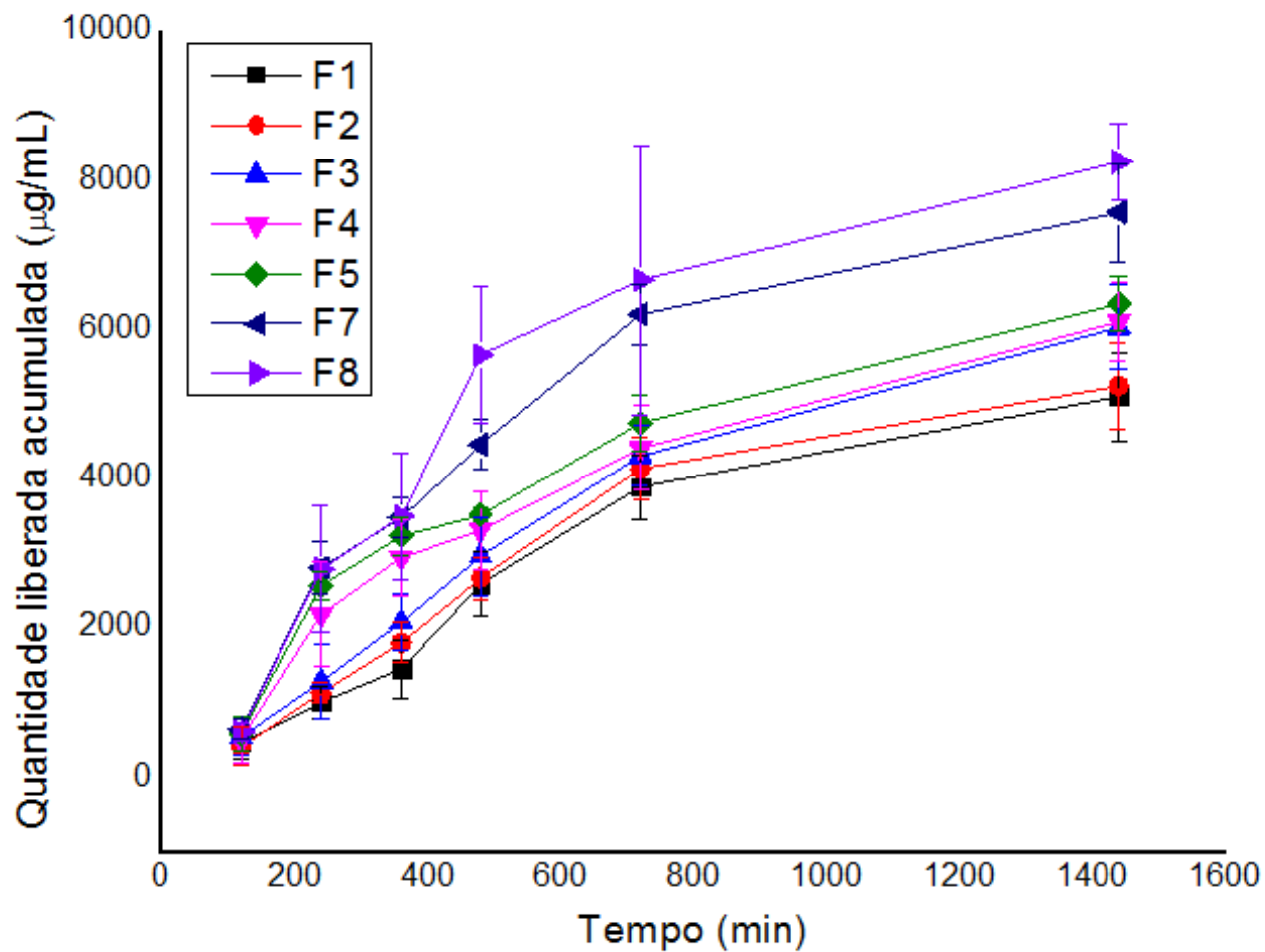


Tabela 17: Valores da quantidade de terpinoleno liberada em 24h (Q24) para F1, F2, F3, F4, F6, F7 e F8.

| Formulação | Q24 (μg) | % |
|----------------|-----------------------|-------|
| F1 (TPO a 5%) | 5111,78 | 25,41 |
| F2 (TPO a 5%) | 5251,89 | 26,11 |
| F3 (TPO a 5%) | 6037,57 | 29,78 |
| F4 (TPO a 5%) | 6115,78 | 30,29 |
| F6 (TPO a 10%) | 6352,12 | 15,65 |
| F7 (TPO a 10%) | 7574,44 | 18,63 |
| F8 (TPO a 10%) | 8255,58 | 20,50 |

Quanto aos modelos para descrever a dissolução do TPO nos testes de cinética de liberação, foram utilizados dois: o de ordem zero e o Higuchi. Ambos são comumente aplicados para o estudo de sistemas transdérmicos (DASH et al., 2010).

O modelo cinético de ordem zero é utilizado para descrever a dissolução do fármaco a partir de sistemas cuja velocidade de liberação independe de sua concentração na forma farmacêutica. No modelo de Higuchi, também conhecido como pseudo-ordem zero, o processo de liberação do fármaco é baseado na lei de difusão de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo e os dados obtidos consideram o percentual cumulativo do fármaco liberado (DASH et al., 2010).

Minhaz et al., 2010, por exemplo, usaram diferentes modelos para estudos de cinética (ordem zero, primeira ordem e equação de Higuchi), e encontraram que o Higuchi teve maior ajuste, e com melhor correlação para o estudo de formulações de *Ketorolac* em cápsulas de liberação prolongada (MINHAZ et al., 2010). O modelo Higuchi é baseado em diferentes hipóteses, dentre elas, a de que a difusão do fármaco se direciona em somente uma dimensão; as partículas do fármaco são muito menores do que a espessura do sistema; a difusão do fármaco pelas membranas é constante; e o fato de apresentar uma perfeita condição “SINK” (RAMTEKE et al., 2014).

Os dados obtidos com esses modelos consideram o percentual cumulativo do fármaco liberado. Assim, como pode ser constatado na **Tabela 18**, F4 e F8 foram as

formulações que obtiveram melhores resultados em ambos os modelos, o que nos permitiu selecioná-las para os testes *in vivo*, realizados no estudo do Capítulo IV.

Tabela 18: Aplicação dos modelos de ordem zero e Higuchi

| Formulação | Modelo Cinético | |
|----------------|-----------------|---------|
| | Ordem Zero | Higuchi |
| F1(TPO a 5%) | 0,9549 | 0,9714 |
| F2 (TPO a 5%) | 0,9355 | 0,9555 |
| F3 (TPO a 5%) | 0,9784 | 0,9893 |
| F4(TPO a 5%) | 0,9874 | 0,9953 |
| F6 (TPO a 10%) | 0,9785 | 0,9894 |
| F7 (TPO a 10%) | 0,9388 | 0,9583 |
| F8 (TPO a 10%) | 0,9885 | 0,9959 |

É importante salientar, também, que, assim como F7 e F8, a F4 tinha em sua constituição o ácido oleico como promotor de liberação e permeação (**Tabela 3**). Os promotores de liberação e permeação são compostos químicos inativos farmacologicamente, mas que podem permear ou interagir com constituintes do estrato córneo, quando incorporados numa formulação transdérmica e, deste modo, diminuir a resistência da pele à difusão do fármaco (BARRY, 1987; WALTERS, 1989; MARTINS; VEIGA, 2002). Um promotor de liberação e permeação deve incrementar a atividade termodinâmica do fármaco, resultando daí aumento do seu fluxo.

Assim, os resultados acima referentes à cinética de liberação nos permitem pontuar que, das formulações que continham TPO a 5%, a que teve maior quantidade total liberada de TPO foi a F4, e das que continham TPO a 10%, foi a F8. Dessa forma, essas foram as duas formulações selecionadas para aplicação dos testes *in vivo*.

4. CONCLUSÃO

O método selecionado para o desenvolvimento das MEs de TPO neste estudo apresentou resultados promissores, gerando sete formulações transdérmicas em adequação com as normas exigidas e somente uma classificada como não conforme (F5). Foram demonstrados resultados satisfatórios para as formulações classificadas como em conformidade quanto à caracterização físico-química, estabilidade preliminar, características organolépticas, testes de validação, cinética de liberação e estabilidade ao estresse térmico. Dessa forma, as amostras F4 e F8, que, além dos resultados acima, apresentaram os melhores resultados quanto ao teste da cinética de liberação para TPO a 5% e a 10%, respectivamente, foram selecionadas para a realização de testes pré-clínicos *in vivo* subsequentes.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. S.; WAHEED, A.; FARMAN, M.; QAYYUM, A. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Pistacia integerrima* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, p. 250-253, 2010.
- AL-JABRI, N. N.; HOSSAIN, M. A. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 247-253, 2014.
- ALMANÇA, C.; POZZATTI, P. ; CASAGRANDE, F.; SILV FILHO, J.; BISSI, B.; BARBOSA, B.; PORFÍRIO, L. Eficácia in vitro de extratos de *Chenopodium ambrosioides* sobre teleóginas de *Rhicephalus (Boophilus) microplus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.43-49, 2013.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução - RE nº 166, de 24 de julho de 2017 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Brasília, 2003.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005 – Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade*. Brasília, 2005.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1, ed. 5, Brasília, 2010.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, p. 175-177, 2002.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Trad. ORTEGAI. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 504-536, 2005.

AZZINI, R.G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. São Paulo, 1999. 169p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal Controlled Release**, Amsterdam, v.6, p. 85-97, 1987.

BAGWE, R.; KANICKY, J.; PALLA, B.; PATANJALI, P.; SHAH, DO. Improved drug delivery using microemulsions: Rationale, recent progress, and new horizons. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 18, p. 77-140, 2001.

BOERIS, M.S.; LUCO, J.M.; OLSINA, R.A. Simultaneous spectrophotometric determination of phenobarbital, phenytoin and methylphenobarbital in pharmaceutical preparations by using partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, n.2, p.259-271, 2000.

BRACONI, F.L.; OLIVEIRA, I.S.; BARONI, M.N.F.; ROCHA FILHO, P.A. Aplicação cosmética do óleo de canola. In: CONGRESSO LATINO MERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 12, 1995, São Paulo. **Anais: Associação Brasileira de Cosmetologia**, 1995, p. 6-19.

BRASIL. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**.

BUMAJDAD, A.; EASTOE, J. Conductivity of water-in-oil microemulsions stabilized by mixed surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 274, p. 268–276, 2004.

- CABRAL, C.; Poças, J.; Gonçalves, M. J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M. T.; Salgueiro, L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 56-61, 2015.
- CARVALHO, A. L. M.; CUNHA, C.P.; CRUZ, E.T.L.; SILVA, J.A.; LIRA, A.A.M.; SANTANA, D.. Spectrophotometric determination of zidovudine loaded microemulsion and application in assay of in vitro release kinetics. **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v. 31, p. 1052-1056, 2012.
- CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; MADRID, I.; FONSECA, A. O.; ALVES, G. H.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 1, 2012.
- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.
- DALMORA, M. E. A.; DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 222, p. 45-55, 2001.
- DAMASCENO, B.; SILVA, J.; OLIVEIRA, E.; SILVEIRA, W.; ARAÚJO, I.; OLIVEIRA, A.; EGITO, E. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 32, p. 9-18, 2011.
- DASH, S.; MURTHY, P.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research**, v. 67, p. 217-223, 2010.
- DONG, X.; ZHU, Q.; DAI, Y.; HE, J.; PAN, H.; CHEN, J.; ZHENG, Z.P. Encapsulation artocarpanone and ascorbic acid in O/W microemulsions: Preparation, characterization, and antibrowning effects in apple juice. **Food Chemistry**, v. 192, p. 1033–1040, 2016.
- EVRENDILEK, G. A. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, n. 2, p. 35-41, 2015.

- FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba**. 1998. 147p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.
- FORMARIZ TR, SARMENTO VHV, SILVA-JUNIOR AA, SCARPA MV, SANTILLI CV, OLIVEIRA AG. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids Surf, B: Biointerfaces**, v.1, p. 54-61, 2006.
- GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, p. 898-904, 2007.
- GOMES, F.E.S. **Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais bioativos**. 174 p. 2010. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2010.
- GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M.A.; ALVES R DOS, S.; MENEZES PDOS, P.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.; BEZERRA, D.P.; QUINTÁNS-JÚNIOR, L.J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.
- KAWAKAMI, K.; YOSHIKAWA, T.; MOROTO, Y.; KANAOKA, E.; TAKAHASHI, K.; NISHIHARA, Y.; MASUDA, K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs - I. Prescription design. **Journal of Controlled Release**, v. 17, p. 65-74, 2002a.
- KAWAKAMI, K.; YOSHIKAWA, T.; HAYASHI, T.; NISHIHARA, Y.; MASUDA, K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs - II. *In vivo* study. **Journal of Controlled Release**, v. 17, p. 75-82, 2002b.
- KLOSE, D.; DELPLACE, C.; SIEPMANN, J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.404, n.1-2, p.75-82, 2011.
- LANGEVIN D. Microemulsions. **Accounts of Chemical Research**, v. 21, p. 255-60, 1988.

- LAWRENCE, M.J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.**, v.19, n.3, p.257-269, 1994.
- LONGO, Daniela Paula. **Obtenção, caracterização e estudo de liberação in vitro e permeação in vivo de sistemas microestruturados contendo cafeína.** 2006. 130 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- LOPES, G.; NASCIMENTO, M.; CIRÍACO, S.; LEAL, L.; BERTINEZ, V.; CARVALHO, A. Influence of process variables in obtaining ibuprofen hard gelatin capsules in university pharmacy. **Boletim Informativo Geum**, v. 6, p. 59-62, 2015
- LOTA, M.L.; SERRA, D.; JACQUEMOND, C.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. **Flavour and Fragrance Journal**, v., 16, p. 89–96, 2001.
- MARTINO, L.; NAZARRO, R.; MANCINI, E.; DE FEO, V. Essential Oils from Mediterranean Aromatic Plants. In: **The Mediterranean Diet**, p. 649–661, 2015.
- MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** , v. 38, n. 1, 2002
- MEHTA, S.K.; KAUR, G. **Microemulsions: thermodynamic and dynamic properties.** In: TADASHI, M. (Ed.). Thermodynamics. Croatia: In Tech., 2011.
- MINHAZ, A.; ISLAM, S.; RAHMAN, H. In vitro release study of Ketorolac from extended release capsules filled with semisolid matrix of Glyceryl esters of fatty acids. **Bangladesh Pharmaceuthical Journal**, v. 13, p. 25-30, 2010.
- MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonate + n-heptane + n-butanol + water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.493, n.1-2, p.100-107, 2000.
- MONTGOMERY, D.C. **Diseño y análisis de experimentos.** México: Iberoamérica, 1991.
- MORTAZAVI, S.A.; PISHROCHI, S.; AZAR, Z.J. Formulation and *in-vitro* evaluation of tretinoin microemulsion as a potential carrier for dermal drug delivery. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.12, n.4, p.599-609, 2013.

MORGAN, ED. **Chemometrics: Experimental Design**. London: John Wiley, 1995.

MOURA, M.P.S.; LIRA, M.C.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 621-627, 2008.

MOURA, J.B. **Avaliação da atividade antinociceptiva do terpinoleno em roedores e possíveis mecanismos de ação envolvidos**. 2012. 119p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Farmacologia), UFPI.

NARUSE, M.; OGAWARA, K.; KIMURA, T.; KONISHI, R.; HIGAKI, K. Development of transdermal therapeutic formulation of CNS5161, a novel NMDA receptor antagonist, by utilizing pressure-sensitive adhesives II: Improved transdermal absorption and evaluation of efficacy and safety. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 86-94, 2014.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.27, n.1, p.131-138, 2004.

OLIVEIRA, P. F.; ALVES, J. M.; DAMASCENO, J. L.; OLIVEIRA, R. A. M.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 183-188, mar-abr. 2015.

PIRES, L. F.; FREITAS, R. M ; RODRIGUES, A. C. T. . EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ATIVIDADE SEROTONINÉRGICA DA CURCUMINA EM MODELOS DE ANIMAIS DE DEPRESSÃO. **Revista de Farmacología de Chile**, v. 6, p. 37, 2013a.

PIRES, L. F.; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; DE FREITAS, R. . Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013b.

PIRES, L. F.; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; SATYAL, P.; DE FREITAS, R. . Neuropharmacological effects of carvacryl acetate on δ -aminolevulinic dehydratase, Na^+ , K^+ -ATPase activities and

amino acids levels in mice hippocampus after seizures. **Chemico-Biological Interactions**, v. 226, p. 49-57, 2014a.

PIRES, L. F.; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; DE FREITAS, R. Is There a Correlation Between In Vitro Antioxidant Potential and In Vivo Effect of Carvacryl Acetate Against Oxidative Stress in Mice Hippocampus?. **Neurochemical Research**, v. 39, p. 758-769, 2014b.

POLONINI, H.; DOS SANTOS, F.; VAZ, U.; BRANDÃO, M.; RAPOSO, N.; FERREIRA, A. Development and validation of analytical method for determination of simvastatin in capsules. **Química Nova**, v. 34, p. 516-519, 2011.

RAMOS, A.M. **Separação de piperonal contido em uma solução de síntese a partir do óleo essencial de *Piper hispidinervum* C. CD. por cromatografia líquida de alta eficiência com injeção empilhada**. 2014. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas.

RAMOS, A.M.; CREMASCO, M.A. Separação sequencial de piperonal por cromatografia líquida de alta eficiência. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis. **Anais**. Santa Catarina, 2014.

RAMTEKE K., DIGHE P., KHARAT A., PATIL S. Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 388-396, 2014.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

ROSA, M.F.; VILHENA, R.O. Intrinsic dissolution: concepts and applications on pharmaceutical industry. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 49 - 61, 2012.

ROSSETI FC. **Microemulsões como sistema de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrassulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 2006. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.

SOUTHWELL, I. A.; RUSSELL, M. F. Volatile oil comparison of cotyledon leaves of chemotypes of *Melaleuca alternifolia*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 4, p. 391-393, 2002.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 304-307, 2009.

SHAH, V. P.; MAIBACH, H. I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**, Plenum Press: New York, 2003.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SILVA, G. **Desenvolvimento e caracterização físico-química e biofarmacêutica de nano e microemulsões lipídicas de uso intravenoso contendo metildiidrojasmonato**. 2013. 165p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

SILVA, J.D.F.; SILVA, Y.; PIATNICKI, C.; BOCKEL, W.; MENDONÇA, C. Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.

TENJARLA S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 16, p. 461-521, 1999.

ÜSTÜNDAĞ OKUR, N.; APAYDIN, S.; YAVAŞOĞLU, N.U.K.; YAVAŞOĞLU, A.; KARASULU, H.Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v.416, n.1, p.136-144, 2011.

WALTERS, K. A. Penetration enhancers and their use in transdermal therapeutic systems. In: HADGRAFT, J., GUY, R. H., eds. Transdermal drug delivery: Developmental issues and research initiatives. **New York: Marcel Dekker**, p. 197-246, 1989.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 603-618, 2004.

XIAO-XIAO, H.; DONG-DONG G.; LING-ZHI, L.; LI-LI, L.; DIAN-MING, L.; CHEN-CHEN, Z.; YING, P.; SHAO-JIANG, S. Monoterpene and sesquiterpene compounds

from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 1-5, 2013.

YACUBIAN, E.M.T. Tratamento da epilepsia na infância. **Journal of Pediatrics**, v.78, n.1, p.19-27, 2002.

CAPÍTULO IV

Efeito antinociceptivo do terpinoleno livre e de formulação transdérmica em um modelo de dor neuropática

RESUMO

A literatura científica tem demonstrado que os monoterpenos são fortes candidatos para aplicação do tratamento de vários processos patológicos, sobretudo condições dolorosas. O terpinoleno (4-isopropilideno-1-metilciclohexeno) é um monoterpene frequentemente encontrado nos óleos essenciais (OEs) das plantas *Pinus mugo* L., *Melaleuca alternifolia* (Maiden e Betcher) Cheel e *Cuminum cyminum* L. e, no nordeste brasileiro, em espécies como *Chenopodium ambrosioides* L. e *Citrus aurantium* L. OEs contendo esse monoterpene já foram pesquisados quanto às suas propriedades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e analgésica em modelos de dor aguda. Dessa forma, este estudo visou avaliar a ação do terpinoleno (TPO), tanto em sua forma livre (100 e 200 mg/kg via oral) quanto transdérmica (Formulações contendo TPO a 5 e a 10%, sendo equivalentes às de 100 e 200 mg/kg via oral, aplicadas via tópica no dorso do animal), sobre um modelo de dor neuropática. As comparações foram feitas quanto à redução dos sinais e sintomas de neuropatia, nível de efeitos centrais e ao efeito antioxidante. Para tanto, foi utilizado o modelo de dor neuropática induzida por ligadura do nervo ciático, bem como testes que sugerem interferência do fármaco sobre o sistema nervoso central, demonstrando ou não alteração na locomotricidade e na coordenação motora (teste do campo aberto e Rota rod, respectivamente). Foram mensurados também os níveis de malondialdeído, glutathiona reduzida e superóxido dismutase. Os resultados sugerem que o terpinoleno, tanto livre por via oral, quanto em Formulação Transdérmica, apresenta efeito antinociceptivo-símile, e que sua Formulação Transdérmica não provocou efeitos adversos relacionados a locomotricidade e coordenação motora, sendo, portanto, um fármaco promissor para o tratamento de síndromes neuropáticas.

Palavras chave: dor neuropática, formulação transdérmica, monoterpene, terpinoleno

ABSTRACT

The scientific literature has suggested monoterpenes as new options for the treatment of various pathological processes, especially painful conditions. Terpinolene (4-isopropylidene-1-methylcyclohexene) is a monoterpene frequently found in essential oils (EOs) of *Pinus mugo* L., *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel and *Cumminum cyminum* L. and in northeast Brazil in species such as *Chenopodium ambrosioides* L. and *Citrus aurantium* L. EOs containing this monoterpene have already been investigated for their antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and analgesic properties in acute pain models. Thus, this study aimed to evaluate the action of terpinolene (TPO), both in its free form (100 and 200 mg / kg orally) and transdermal (Formulations containing 5 and 10% TPO, being equivalent to those of 100 and 200 mg / kg orally, applied topically on the animal's back) on a model of neuropathic pain. Comparisons were made regarding reduction of signs and symptoms of neuropathy, level of central effects and antioxidant effect. For this, the neuropathic pain model induced by sciatic nerve ligation was used, as well as tests which suggest interference of the drug on the central nervous system, to evaluate alteration in locomotricity and motor coordination (open field test and Rota rod, respectively). The levels of malondialdehyde, reduced glutathione and superoxide dismutase were also measured. The results suggest terpinolene, both orally and in Transdermal Formulation, has an antinociceptive-like effect, and its Transdermal Formulation did not cause adverse effects related to locomotricity and motor coordination, being a promising drug for the treatment of neuropathic syndromes.

Keywords: monoterpene, neuropathic pain, terpinolene, transdermal formulation

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial. Essa experiência é necessária para a proteção contra estímulos prejudiciais ao tecido (BINGHAM et al., 2009; GANGANDHARAN, KUNER, 2013).

Ao contrário da dor aguda, a dor crônica (inflamatória ou neuropática) pode persistir por meses ou até anos após a cicatrização da lesão original (BINGHAM et al., 2009; COSTIGAN et al., 2009; NICE, 2010). A dor neuropática é causada por uma condição que afeta o sistema somatossensorial, e está relacionada com sensações de queimação e parestesia (formigamento, cócegas e picadas), por exemplo (TREEDE et al., 2008; PHILLIPS, 2009).

Na dor crônica, pode haver hiperalgesia - uma resposta aumentada aos estímulos nódicos térmicos e mecânicos -, bem como alodinia, em que respostas nociceptivas ocorrem normalmente a estímulos inócuos, como toque leve. Essa seria denominada alodinia mecânica (JI; XU; GAO, 2014).

O tratamento farmacológico preferencial para dor aguda inclui anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e os opióides (DWORKIN et al., 2007; MARNETT, 2009; LI, 2012; ZHANG, 2012). Para o tratamento de dor crônica, são usados principalmente antidepressivos e anticonvulsivantes gabapentanóides. Dentre os antidepressivos, estão incluídos os tricíclicos, como a amitriptilina, bem como os inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina, como a duloxetina, e dentre os anticonvulsivantes, estão incluídos a pregabalina e a gabapentina (LEE et al., 2013; DING et al., 2014; SUTO et al., 2014; KREMER et al., 2016).

Contudo, devido aos frequentes efeitos adversos dos fármacos acima, têm sido desenvolvidos vários estudos a fim de descobrir novas opções para o tratamento de dor. Dentre as alternativas, estão os produtos naturais, merecendo destaque os óleos essenciais - misturas complexas de substâncias de baixa massa molecular extraídos de plantas - e seus constituintes (DWORKIN et al., 2007).

O terpinoleno (TPO), cujo nome sistemático é 4-Isopropilideno-metilciclohex-1-eno, é um monoterpeneo incolor, que acrescenta sabor artificial a alimentos, sem apresentar perigo à saúde. Ele é encontrado no óleo essencial das plantas *Chenopodium ambrosioides* L., *Citrus aurantium* L. e *Cuminum cyminum* L.,

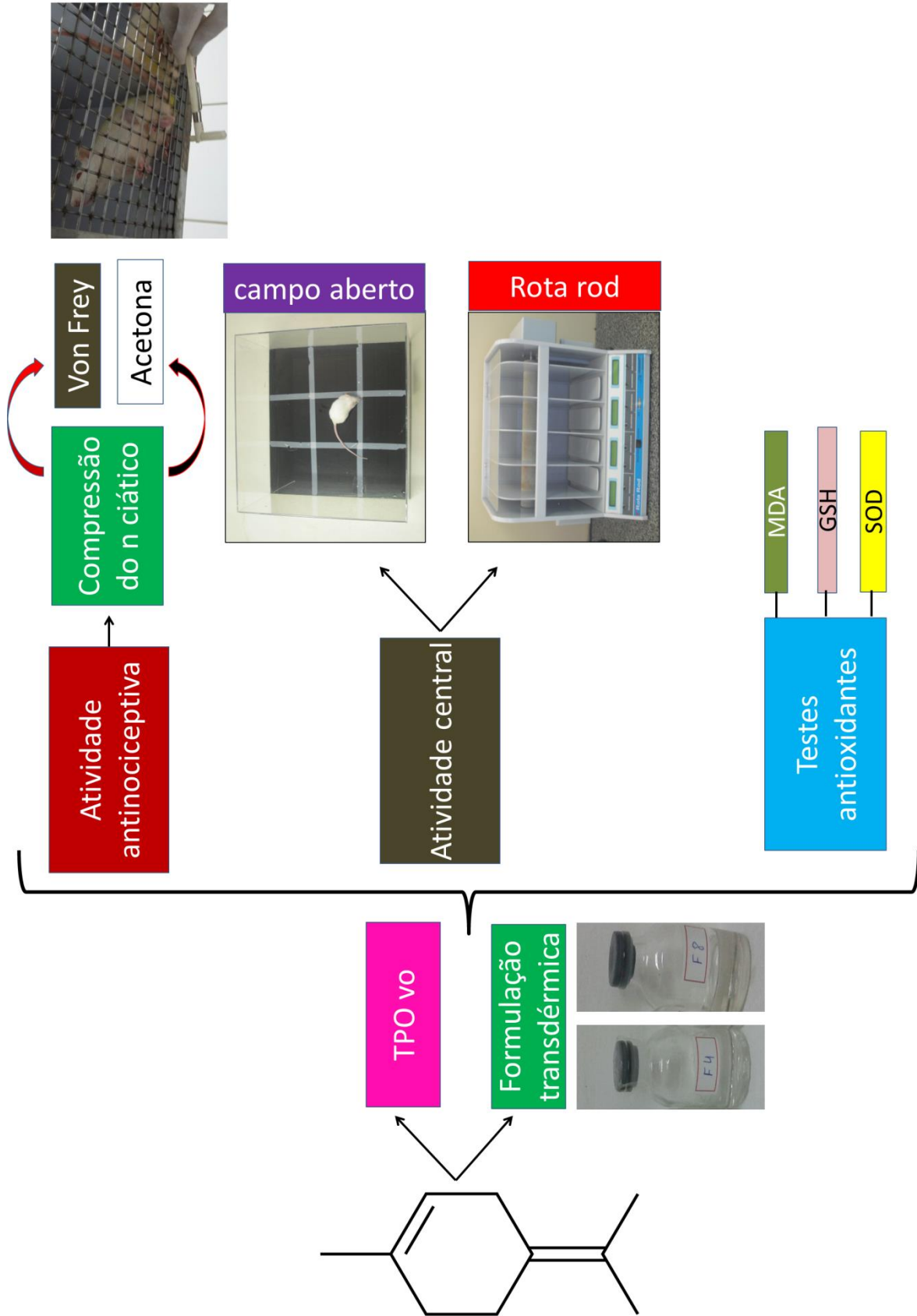
vulgarmente conhecidas como mastruz (erva de santa maria), laranja amarga e cominho, respectivamente (LOTA et al., 2001; GACHKAR et al., 2007; ALMANÇA et al., 2013).

Quanto ao seu potencial terapêutico, já foram sugeridas propriedades antinociceptiva, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante. Note-se que a administração da forma livre do TPO também já sugeriu uma margem de segurança confiável quanto à sua dose letal por via oral, em camundongos e ratos (DL50 de 3800 e 3790 mg/kg, respectivamente) (MASTEN; TICE, 1999; MOURA, 2012).

Dessa forma, levando em conta esse potencial terapêutico, este artigo visou testar o tratamento com a forma livre, bem como com a formulação transdérmica de terpinoleno (FTPO), em um modelo de dor neuropática induzida em camundongos.

Para os testes experimentais, foi utilizado o modelo de neuropatia por ligadura do nervo ciático. Em seguida, foram realizados o teste de von Frey e o teste da Acetona para nocicepção térmica, bem como foram avaliados os possíveis efeitos colaterais sobre o sistema nervoso central, como alteração na locomotricidade e na coordenação motora, por meio do teste do campo aberto e do Rota Rod, respectivamente. Foi ainda testado um possível efeito antioxidante, por meio da mensuração dos níveis de malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH) e superóxido dismutase (SOD) (**Figura 1**).

Figura 1: Resumo Gráfico



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Terpinoleno

O TPO foi fornecido pelo Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, membro do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. Esse monoterpene possui grau de pureza $\geq 85\%$ (Sigma, EUA). Sua formulação transdérmica foi elaborada, conforme pode ser constatado por meio dos resultados referentes ao capítulo III, na Farmácia Escola da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob a supervisão do Professor Doutor André Luis Menezes Carvalho.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos, machos, da linhagem *Swiss* (25-30g, n=6-8), obtidos do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da UFPI. Os animais foram abrigados a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e comida, e aclimatizados pelo menos uma hora antes da realização dos testes, sendo utilizados somente uma vez ao longo dos experimentos. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEEA/UFPI Nº 82/2014) e foram realizados de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e as diretrizes éticas para a investigação de dor experimental em animais inconscientes (ZIMMERMANN, 1983).

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais como modelo experimental foram realizados conforme as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Os estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstração de efeitos consistentes dos procedimentos empregados e dos tratamentos com drogas. Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados com superdosagem de tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.) de acordo com o estabelecido pela Resolução Nº 1.000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, tendo como responsável técnico a Médica Veterinária, Camila Ernanda Sousa de Carvalho, CRMV Nº. 1173. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEEA/UFPI Nº 82/2014).

2.3 Fármacos e produtos químicos

As seguintes substâncias foram usadas: terpinoleno (TPO), pregabalina, adquirada por meio do laboratório Achê, morfina e diazepam (adquiridos do laboratório Cristália, SP, Brasil). Para a elaboração da solução contendo TPO para ser administrada por via oral, foi utilizado Tween 80 a 2% como suspensão, em 0,9% de NaCl (10 mL/kg). As doses foram determinadas como miligramas de TPO por quilograma de peso corporal (mg/kg).

As doses administradas por via oral (vo) de TPO foram de 100 e 200 mg/kg, e as formulações transdérmicas contendo TPO (FTPO's) foram as seguintes: FTPO 5%, referente à F4 do capítulo III, que corresponde à formulação que continha TPO a uma proporção de 5% quanto aos componentes da microemulsão; e a FTPO 10%, referente à F8 do capítulo III, e que corresponde à formulação que continha TPO a uma proporção de 10% quanto aos componentes da microemulsão.

Note-se que, para todos os testes *in vivo*, as formulações transdérmicas foram aplicadas, de forma tópica, no dorso dos animais, após tricotomia. Estas foram realizadas em um camundongo por vez, anestesiado e colocado numa plataforma adequada. Os volumes de administração foram ajustados para que a FTPO 5% equivallesse à dose de 100 mg/kg vo e a FTPO 10% equivallesse à dose de 200 mg/kg vo. As FTPO's, após as respectivas aplicações nos dorsos dos camundongos, foram absorvidas sistemicamente, sem a necessidade de passagem pelo trato gastrointestinal, como acontece com as administrações por via oral.

Para a comparação dos grupos em que o TPO foi administrado por via oral, o grupo controle consistiu em veículo administrado por via oral, contendo Tween 80 a 2% como suspensão, em 0,9% de NaCl (10 mL/kg), enquanto que o grupo controle ao qual as FTPO's foram comparadas consistiu em Formulação Veículo administrada por via transdérmica. Essa formulação continha todos os compostos das Formulações que foram elaboradas por meio do sistema de microemulsão descrito no capítulo III, com exceção do princípio ativo, que é o TPO.

O controle positivo utilizado para os testes com administrações agudas foi a morfina por via intraperitoneal (ip), e, para os testes com administrações subagudas, a pregabalina por vo.

2.4 Indução da neuropatia por constrição parcial do nervo ciático

Sob anestesia com cloridrato de xilazina (20 mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal), os animais (n=5-9) foram submetidos à compressão do nervo ciático. Neste caso, o nervo ciático foi exposto por meio da separação do músculo bíceps femoral esquerdo com pinça romba e, em seguida, liberado do tecido conjuntivo circundante. Usando uma pinça para levantar o nervo, um pedaço de fio de seda foi amarrado ao nervo, de forma a comprimir 1/3 do seu diâmetro original. Terminado o procedimento, a pele foi suturada e o animal tratado com solução tópica de clorexidina (a 2%) e colocado em gaiola metabólica com assepsia prévia. Neste caso, a redução no limiar de dor se manifestou como uma leve hiperalgesia, ou seja maior sensibilidade à dor quando o animal for submetido ao estímulo mecânico (MOSCONI; KRUGER, 1996; IKEDA et al., 2009).

2.5 Divisões dos grupos e administrações dos fármacos

Antes de serem feitas as respectivas administrações dos fármacos, sejam agudas, sejam subagudas, os camundongos passaram primeiramente por uma confirmação quanto a ter realmente havido indução de neuropatia com o modelo de compressão parcial do nervo ciático (CPC).

Para tanto, foi indispensável o desenvolvimento de um grupo Sham. Esse termo corresponde à simulação do procedimento, ou seja, era induzida uma ferida operatória na pata traseira direita do camundongo devidamente anestesiado, igualmente aos outros grupos, sem, contudo, provocar uma compressão do nervo ciático. Esse grupo foi formado para fins comparativos, com o intuito de confirmar se o modelo adotado para indução da neuropatia (CPC) realmente deixou os animais neuropáticos. Essa confirmação foi feita por meio da comparação do grupo controle com o grupo Sham, nos testes de von Frey e da Acetona, por meio da resposta nociceptiva nos dias pós-operatórios 2, 4, 6 e 8. Cada fármaco foi, portanto, aplicado a partir do oitavo dia, depois de confirmado que o CPC realmente deixou os animais neuropáticos.

No camundongos em que foram feitas administrações agudas, tanto no teste de von Frey, quanto no da Acetona (descritos abaixo), as mensurações foram realizadas nos tempos 0, 60, 120, 180 e 240 minutos do oitavo dia, após as respectivas aplicações. Os animais foram distribuídos nos grupos Controle (n=6 a 8/grupo), Sham (simulação do procedimento), TPO (vo) nas doses de 100 mg/kg vo e 200 mg/kg, FTPO 5% e FTPO 10% por via transdérmica e, por fim, morfina 5 mg/kg (ip), sendo esta última considerada o Controle positivo.

Para os testes de administração subaguda, tanto no de von Frey, quanto no da Acetona (descritos abaixo), os animais foram distribuídos nos grupos Controle (Veículo transdérmico) (n=6 a 8/grupo), Sham, TPO nas doses (100 mg/kg vo) e (200 mg/kg vo), FTPO's a 5% e 10% por via transdérmica e Pregabalina (10 mg/kg v.o) – considerada o Controle positivo. Os grupos foram avaliados antes do procedimento cirúrgico (dia 0) para registro do escore basal de resposta nociceptiva e nos dias pós-operatórios 2, 4, 6 e 8. A partir do 8º dia, foram administradas as substâncias de acordo com cada grupo respectivo, por 8 dias.

2.6 Mensuração da nocicepção mecânica

Os animais foram submetidos à avaliação nociceptiva mecânica com utilização dos filamentos de von Frey (CHAPLAN et al., 1994) para mensurar a alodinia mecânica. Para tanto, foram previamente alocados em caixas de acrílico individuais sobre uma tela, em uma plataforma elevada que permite o livre acesso à pata traseira direita do animal. Após os camundongos estarem ambientados ao aparato, uma série de monofilamentos calibrados para produzir forças na ordem de gramas foram aplicados sob a pata traseira direita por 8 segundos ou até o animal apresentar uma resposta nociceptiva como retirada ou lambida da pata.

Dessa forma, o parâmetro mensurado neste teste corresponde ao limiar de retirada na pata onde são aplicados os filamentos. Espera-se que os camundongos com neuropatia e sem tratamento, como é o caso do grupo controle, por exemplo, tendam a ter seu limiar de retirada da pata significativamente reduzido quando comparado ao camundongo não neuropático, como é o caso do Sham, por exemplo.

2.7 Mensuração da nocicepção térmica

A nocicepção térmica foi avaliada por meio do teste de sensibilidade térmica ao frio (10 °C, teste da acetona) (FLATTERS; BENNET, 2004). Os animais foram acondicionados na mesma plataforma descrita anteriormente. Após os animais estarem ambientados, foi feita a instilação de 100 µL de acetona (100%) sobre a pata traseira direita. A resposta foi avaliada por meio de uma escala em escores de 0 a 3 de acordo com a resposta nociceptiva, sendo 0, nenhuma resposta; 1, rápida retirada, chacoalhar da pata; 2, retirada prolongada da pata ou repetidos chacoalhares da pata; e 3, repetidos chacoalhar da pata com lambida da pata.

Dessa forma, os animais com neuropatia e sem tratamento tendem a apresentar uma maior pontuação nesse escore, quando comparados aos animais não neuropáticos.

2.8 Medida da performance motora

2.8.1 Teste do campo aberto

O aparato para o teste de campo aberto consiste de uma caixa de acrílico com paredes transparentes (30 cm X 30 cm X 15 cm) e um piso preto dividido em nove quadrantes iguais. Um dia antes do experimento, os camundongos foram colocados na caixa para adaptação. Os camundongos foram tratados com TPO (100 e 200 mg/kg, vo), FTPO's a 5% e 10%, Veículo transdérmico (grupo Controle) ou Diazepam (4 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de se iniciar o experimento. O número de cruzamentos (quadrantes atravessados com todas as patas) foram contados durante uma sessão de 5 minutos (LAPA; SOUCCAR; LIMA-LANDMAN, 2003).

2.8.2 Teste do Rota Rod

O *Rota Rod* (Equipamento Insight, modelo RR-2002) consiste de uma barra com diâmetro de 2,5 cm, subdividido em quatro compartimentos por discos de 25 cm e com velocidade de 14 rotações por minuto. Os camundongos foram submetidos a uma triagem 24 horas antes do experimento, a fim de eliminar os animais que não permaneceram na barra por três períodos consecutivos de 60 segundos. Os

camundongos foram tratados com TPO (100 e 200 mg/kg, vo), FTPO's a 5% e 10%, Veículo transdérmico (grupo Controle) ou Diazepam (4 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes do experimento. Os resultados foram expressos como o tempo, em segundos, que os animais permaneceram no Rota Rod e o tempo de corte foi de 60 s (DUHAM; MIYA, 1957).

2.9 Testes de atividade antioxidante

O teste para a atividade antioxidante foi realizado mensurando-se os níveis de Malondialdeído (MDA), Glutathiona Reduzida (GSH) e Superóxido Dismutase (SOD), por meio de espectrofotometria. Os valores foram comparados nos grupos FTPO's a 5% e 10%, Sham e Pregabalina com o Controle. Note-se que as coletas foram feitas no último dia de avaliação da nocicepção, após terem sido feitas todas as comparações nos testes de von Frey e Acetona, com administrações subagudas.

O material utilizado para as amostras foi o soro referente à coleta de sangue da veia retroorbital dos camundongos, devidamente anestesiados com cloridrato de xilazina (20 mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal). Após coletado 1 ml de sangue para cada amostra, este foi centrifugado a 3500 rpm, por 5 minutos, para a obtenção do soro.

A descrição detalhada das mensurações dos níveis e MDA, GSH e atividade da SOD é feita nos itens subsequentes.

2.9.1 Análise dos níveis de Malondialdeído

As concentrações de MDA no soro foram mensuradas de acordo com AYALA et al., 2014. Resumidamente, alíquotas (500 µL) do soro foram centrifugadas durante 15 minutos a 4 °C, em seguida, 250 µL de cada sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de ácido fosfórico a 1% (H₃PO₄) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6% (solução aquosa). Em seguida, esta mistura foi agitada e aquecida em banho-maria durante 45 minutos. Posteriormente, as amostras foram levadas imediatamente a um recipiente com água gelada, sendo adicionados 4 mL de n-butanol. As amostras foram agitadas, e a camada de butanol foi separada por centrifugação durante 15 min e a absorbância foi lida em 520 e 535 nm no espectrofotômetro. As concentrações de MDA foram expressas como mmol/mL de soro.

2.9.2 Análise das concentrações de Glutathiona Reduzida

Inicialmente, 400 µL de cada sobrenadante de soro foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 400 µL do sobrenadante foi adicionado a 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de ácido ditio-nitrobenzoico DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro (SILVA et al, 2015). As concentrações de GSH foram expressas em mmol/L de soro.

2.9.3 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase

Para determinação da atividade da enzima SOD, foi utilizado o método descrito por Das, Samanta e Chayne (2000). Assim, primeiramente, 100 µL da amostra de soro foram adicionados a 1110 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), 75 µL de L-metionina (20 mM), 40 µL de Triton X-100 (1% v/v), 75 µL de cloreto de hidroxilamina (10 mM) e 100 µL de EDTA (50 µM). Em seguida, foi feita incubação em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 80 µL de riboflavina (50 µM) e as amostras foram expostas a luz durante 10 minutos. Ao fim, 100 µL do ensaio foram adicionados a 100 µL do reagente de Griess e, após 10 minutos em temperatura ambiente, a densidade óptica (absorbância) foi mensurada

por espectrofotometria em leitor de placas (BioTek EL800), utilizando um filtro de 550 nm (GREEN et al., 1982).

A curva de calibração foi feita tendo por padrão o NaNO_2 (nitrito de sódio) nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125 e 0 μMol diluídos em água destilada. Uma unidade da atividade da enzima é definida como a quantidade de SOD capaz de inibir em 50 % a formação de nitrito. O cálculo é feito por meio da fórmula $\text{SOD} = v_0/v_1$; em que v_0 é a absorbância do controle e v_1 é a absorbância do teste. Neste método, 36 ng de SOD inibem 50% da formação do nitrito.

2.10 Análise estatística

Conforme a metodologia empregada em cada teste, foram utilizados métodos de análise estatística pertinentes, especialmente ANOVA seguida do Teste de Tukey ou outro, quando apropriado, para comparações múltiplas, sendo estabelecido um nível de significância ($p < 0,05$).

Para a constatação de que o modelo experimental induziu a neuropatia, foram feitas comparações do grupo controle com o Sham. Após confirmada a indução da neuropatia, foram feitos os respectivos tratamentos com os fármacos correspondentes aos grupos. Nos testes de von Frey e Acetona, foi utilizada ANOVA duas vias, e as comparações dos grupos foram feitas com o grupo controle/veículo. Já nos testes do campo aberto e Rota rod, foi utilizada ANOVA uma via, e as comparações dos grupos em tratamento foram feitas, também, com o grupo controle/veículo. Para os testes antioxidantes, o grupo controle (animais neuropáticos) foi comparado com o grupo Sham (animais não neuropáticos), a fim de correlacionar se a neuropatia estaria associada, pelo menos em parte, à alteração da atividade antioxidante, sendo, também utilizada ANOVA uma via. Além disso, também foram feitas comparações dos grupos em tratamento com o grupo controle/veículo, a fim de verificar se os respectivos tratamentos poderiam alterar a atividade antioxidante.

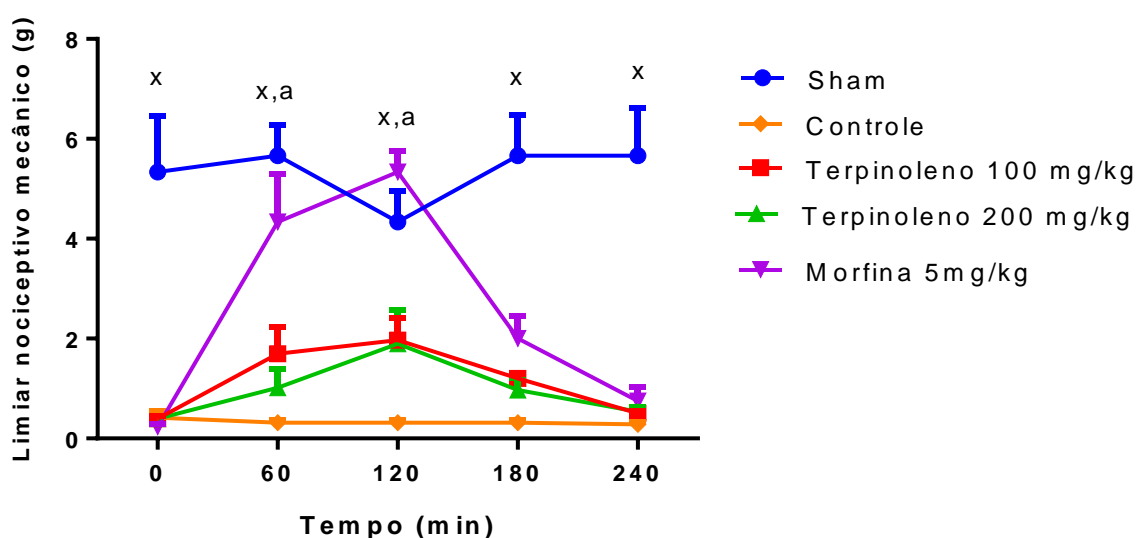
3. RESULTADOS

3.1 Teste de von Frey com administrações agudas

Os resultados referentes ao teste de von Frey com administrações agudas de TPO (vo) a 100 e 200 mg/kg não sugeriram efeito antinociceptivo, considerando

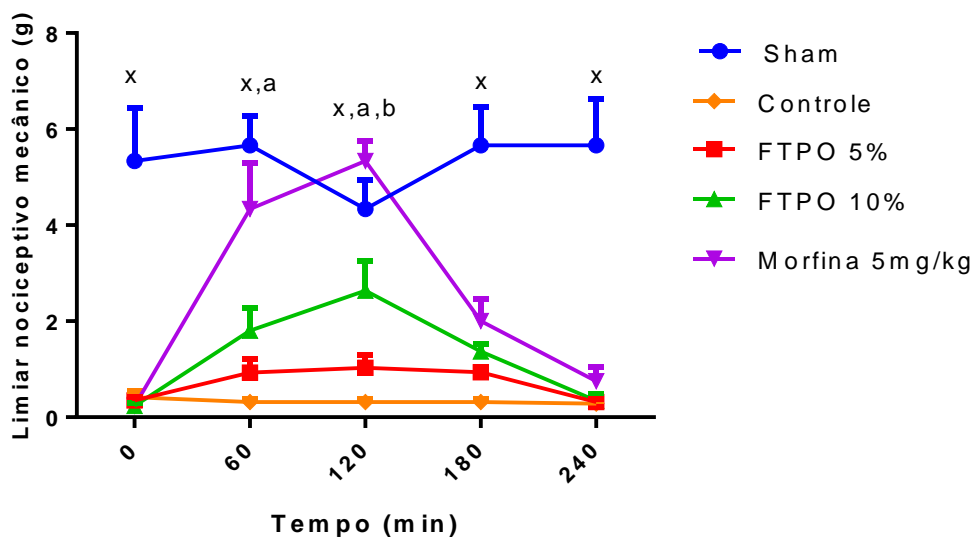
como parâmetro o limiar nociceptivo mecânico referente à pata traseira direita. Como pode ser observado na **Figura 2**, não houve significância estatística quando da comparação dos grupos TPO e Controle, embora tenha havido diferença estatística quando da comparação entre Morfina ip e Controle nos tempos de 60 e 120 minutos. Aos 60 minutos, a média dos limiares nociceptivos para o grupo tratado com morfina foi de $4,33 \pm 0,95$, enquanto a do controle foi $0,32 \pm 0,05$, o que representa um aumento percentual de 1153,12% para o grupo tratado com morfina ($p < 0,0001$). Aos 120 minutos, a média dos limiares nociceptivos para o grupo tratado com morfina foi de $5,33 \pm 0,42$, enquanto a do controle foi $0,32 \pm 0,05$, o que representa um aumento percentual de 1565,62% para o grupo tratado com morfina ($p < 0,0001$)

Figura 2: Limiar nociceptivo no tratamento agudo com TPO (vo), a 100 e 200 mg/kg, pelo teste de von Frey. Dados expressos em média \pm E.P.M.: x: $p < 0,001$ quando o grupo Sham foi comparado ao Controle; a: $p < 0,001$ quando o grupo em que foi administrada Morfina ip foi comparado ao Controle (ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: veículo por via oral; Terpinoleno 100 mg/kg: terpinoleno administrado por via oral, a uma dose de 100 mg/kg; Terpinoleno 200 mg/kg: terpinoleno administrado por via oral, a uma dose de 200 mg/kg; Morfina 5 mg/kg (ip): controle positivo.



Todavia, foi observado um aumento significativo no limiar de dor quando da administração aguda da FTPO a 10% versus o grupo Controle, 120 minutos após a administração de FTPO 10%. Nesse caso, o grupo tratado com a FTPO a 10% teve uma média de limiar de $2,63 \pm 0,61$, enquanto o grupo Controle teve média de $0,32 \pm 0,05$ ($p < 0,05$). Isso correspondeu a um aumento de 721,87% no limiar para o grupo de camundongos tratados com FTPO 10% (**Figura 3**).

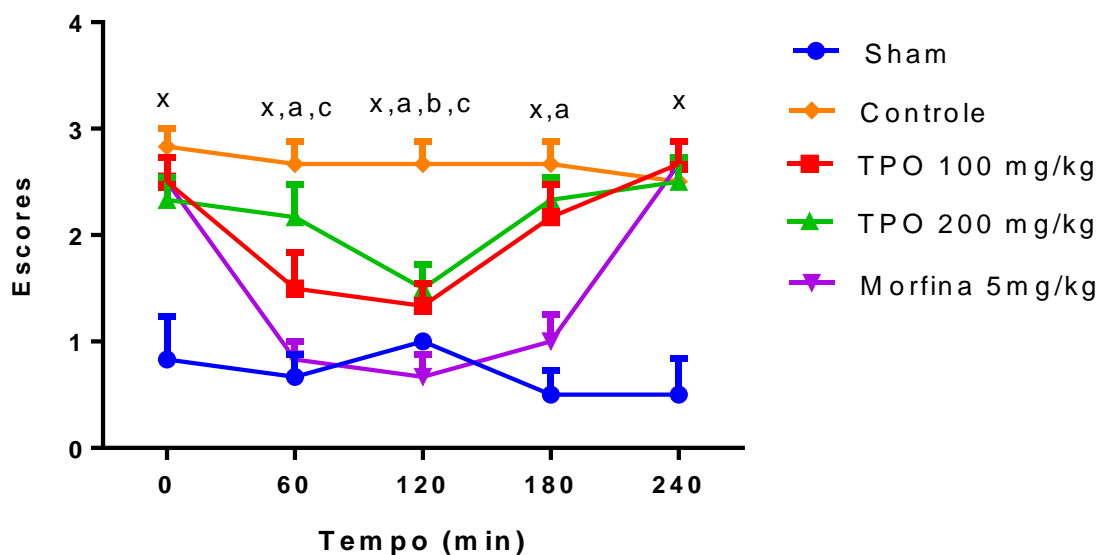
Figura 3: Limiar nociceptivo no tratamento agudo com FTPO, a 5 a 10%, após a ligadura do nervo ciático, pelo teste de von Frey. x: $p < 0,001$ quando o grupo Sham foi comparado ao Controle; a: $p < 0,001$ quando o grupo em que foi administrada Morfina ip foi comparado ao Controle; b: $p < 0,05$ quando o grupo tratado com a FTPO 10% foi comparado ao Controle (ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: Formulação veículo transdérmica; FTPO 5%: Formulação de Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação de Terpinoleno a 10%; Morfina 5 mg/kg (ip): controle positivo.



3.2 Teste da acetona sobre a nociceção térmica com administrações agudas

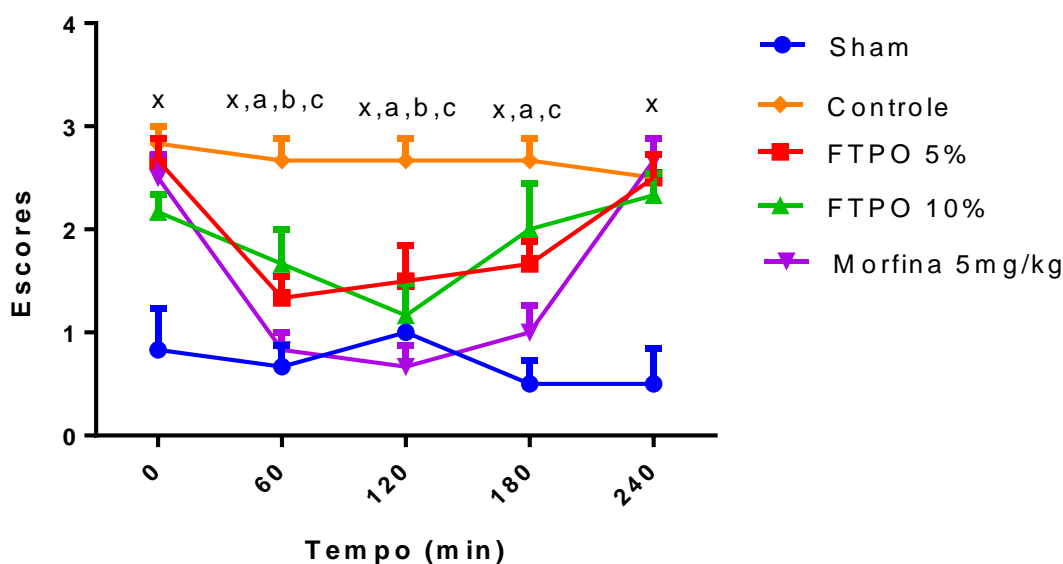
Nesse teste, aos 60 minutos da administração de TPO 100 mg/kg vo, foi observada uma redução significativa no escore quando comparado ao Controle. Nesse caso, o grupo tratado com TPO 100 mg/kg apresentou média de escore de $1,50 \pm 0,34$, enquanto que o grupo Controle apresentou média de escore de $2,67 \pm 0,21$, ou seja, houve uma redução de 43,82% no escore ($p < 0,01$). Aos 120 minutos, o grupo em que foi administrado TPO 100 mg/kg vo apresentou média de $1,33 \pm 0,21$, enquanto o grupo Controle teve média de $2,67 \pm 0,21$ ($p < 0,01$), representando uma redução de 50,19% no escore. Durante este período, o grupo em que foi administrado TPO 200 mg/kg teve média de $1,50 \pm 0,224$ e o Controle, $2,67 \pm 0,21$ ($p < 0,01$), representando uma redução de 43,82% (**Figura 4**).

Figura 4: Efeito do Teste da Acetona sobre a nociceção térmica no tratamento agudo com TPO (vo), a 100 e 200 mg/kg, após ligadura do nervo ciático. Dados expressos em média \pm E.P.M.: x: $p < 0,001$ quando o grupo Sham foi comparado ao Controle; a: $p < 0,001$ quando o grupo em que foi administrada Morfina ip foi comparado ao Controle; b: $p < 0,01$ quando o grupo que foi tratado com TPO 200 mg/kg foi comparado ao grupo Controle; c: $p < 0,01$ quando o grupo tratado com TPO 100 mg/kg foi comparado ao Controle (ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: veículo por via oral; TPO 100 mg/kg: Terpinoleno via oral a 100 mg/kg; TPO 200 mg/kg: Terpinoleno via oral a 200 mg/kg; Morfina 5 mg/kg (ip): controle positivo.



Quanto às formulações transdérmicas, as alterações começaram a ser observadas a partir de 60 minutos. O grupo em que foi administrada a FTPO a 5% apresentou média de escore de $1,33 \pm 0,21$, enquanto o grupo Controle apresentou média de escore de $2,67 \pm 0,21$ ($p < 0,01$), representando uma redução de 50,19% no escore. O grupo tratado com FTPO a 10% apresentou média de escore de $1,67 \pm 0,33$ ($p < 0,05$ quando comparado ao Controle), o que representou uma redução de 37,45% no escore. Aos 120 minutos, o grupo tratado com FTPO a 5% teve média de escore de $1,50 \pm 0,34$, enquanto o Controle manteve média de $2,67 \pm 0,21$ ($p < 0,05$), representando uma redução de 43,82% no escore. O grupo tratado com a FTPO a 10% apresentou média de $1,17 \pm 0,31$ ($p < 0,01$), representando uma redução de 56,18% no escore. Aos 180 minutos, o grupo tratado com a FTPO a 5% apresentou média de $1,67 \pm 0,21$ versus $2,67 \pm 0,21$ do Controle ($p < 0,05$), representando uma redução de 37,45% no escore (**Figura 5**).

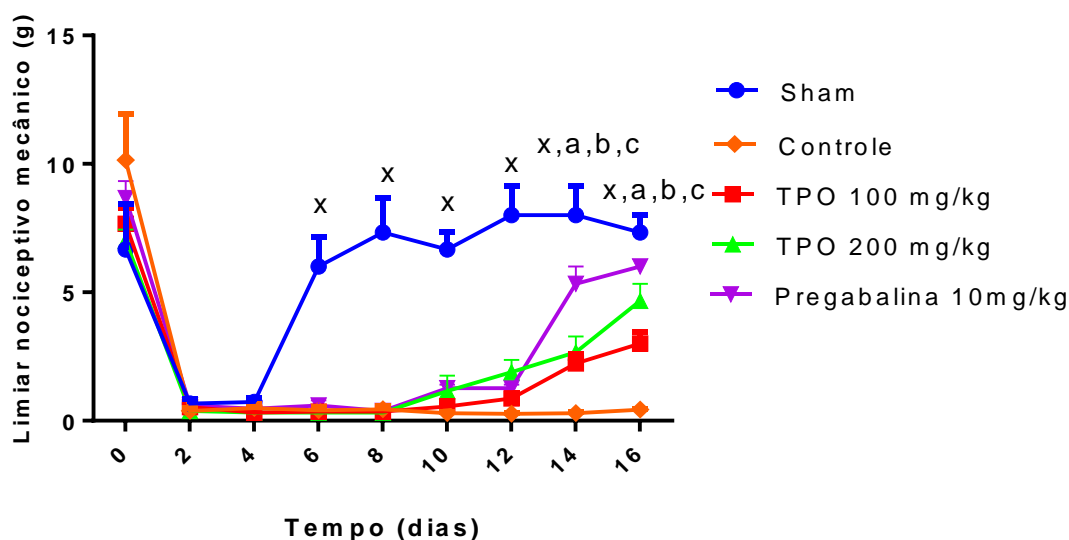
Figura 5: Efeito do Teste da Acetona sobre a nocicepção térmica no tratamento agudo com FTPO, a 5 e a 10%. Dados expressos em média \pm E.P.M.: x: $p < 0,001$ quando o grupo Sham foi comparado ao Controle; a: $p < 0,001$ quando o grupo Morfina (ip) foi comparado ao Controle; b: $p < 0,05$ quando o grupo FTPO 10% foi comparado ao Controle; c: $p < 0,05$ quando o grupo FTPO 5% foi comparado ao grupo Controle (ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: Formulação veículo transdérmica; FTPO 5%: Formulação Transdérmica de Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação Transdérmica de Terpinoleno a 10%; Morfina 5 mg/kg (ip): controle positivo.



3.3 Teste de von Frey com administrações subagudas

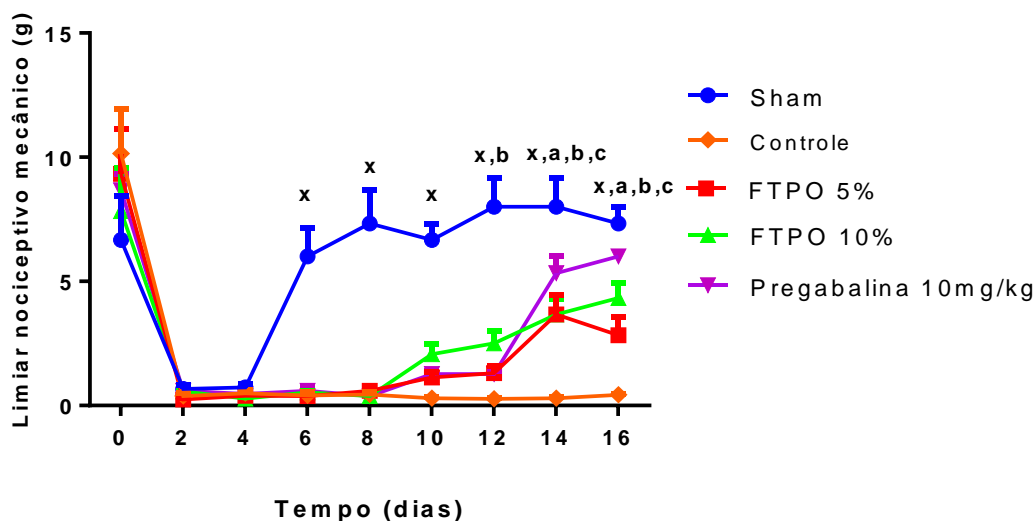
No teste de von Frey, o grupo tratado com TPO na dose de 100 mg/kg seguiu uma tendência similar ao grupo tratado com Pregabalina 10 mg/kg, a partir do 7º dia de tratamento (dia 14), apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo Controle. Isso sugere, portanto, um efeito antinociceptivo semelhante ao do fármaco padrão-ouro. Nesse caso, o limiar foi $2,23 \pm 0,37$ para o grupo tratado com TPO 100 mg/kg, enquanto que para o grupo Controle foi $0,29 \pm 0,05$. Isso demonstra uma melhora de 668,97% no limiar ($p < 0,05$). No dia 16, o grupo tratado com TPO 100 mg/kg apresentou um limiar de $3,00 \pm 0,45$ e o Controle, $0,43 \pm 0,03$. Isso demonstra uma melhora de 597,67% no limiar ($p < 0,05$). Similarmente, o grupo tratado com TPO 200 mg/kg também teve melhora significativa no limiar nociceptivo nos dias 14 e 16. No dia 14, o limiar do grupo TPO 200 mg/kg foi de $2,67 \pm 0,61$, enquanto do Controle foi de $0,29 \pm 0,67$, havendo uma melhora de 820,68% ($p < 0,01$). No dia 16, o grupo TPO 200 mg/kg teve limiar de $4,67 \pm 0,67$, enquanto o Controle foi $0,43 \pm 0,03$, havendo uma melhora de 986,04% ($p < 0,01$) (**Figura 6**).

Figura 6: Limiar nociceptivo no tratamento subagudo com TPO (vo), a 100 e 200 mg/kg, após a ligadura do nervo ciático, pelo teste de von Frey. Dados expressos em média \pm E.P.M; x: $p < 0,001$ quando o grupo Sham foi comparado ao Controle; a: $p < 0,001$ quando o grupo Pregabalina 10 mg/kg foi comparado ao Controle; b: $p < 0,01$ quando o grupo TPO 200 mg/kg foi comparado ao Controle; c: $p < 0,05$ quando o grupo TPO 100 mg/kg foi comparado ao Controle (ANOVA duas vias seguida do Teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: veículo por via oral; TPO 100 mg/kg: Terpinoleno via oral a 100 mg/kg; TPO 200 mg/kg: Terpinoleno via oral a 200 mg/kg; Morfina 5 mg/kg (ip): controle positivo.



Para as formulações transdérmicas, no dia 12, o grupo Controle apresentou limiar de $0,263 \pm 0,05$, enquanto o grupo tratado com FTPO 10% teve média de $2,5 \pm 0,5$, expressão um aumento de limiar de 950,57% ($p < 0,05$). No dia 14, o Controle apresentou limiar de $0,30 \pm 0,05$, e os grupos tratados com FTPO's a 5 e a 10% apresentaram, respectivamente limiares de $3,67 \pm 0,80$ e $3,67 \pm 0,61$. Ambos demonstraram um aumento de limiar de 1165,52%, portanto ($p < 0,01$). No dia 16, o grupo Controle apresentou limiar de $0,43 \pm 0,03$, e as FTPO's de 5 e 10% apresentaram, respectivamente, $2,83 \pm 0,75$ e $4,33 \pm 0,61$, com melhora do limiar de 558,14% e 906,97%, respectivamente ($p < 0,01$) (**Figura 7**).

Figura 7: Limiar nociceptivo no tratamento subagudo com FTPO, a 5 e a 10%, após a ligadura do nervo ciático, pelo teste de von Frey. Dados expressos em média \pm E.P.M.: x: $p < 0,001$ quando o grupo Sham foi comparado ao Controle; a: $p < 0,001$ quando o grupo Pregabalina 10 mg/kg foi comparado ao Controle; b: $p < 0,05$ quando o grupo FTPO 10% foi comparado ao Controle; c: $p < 0,01$ quando o grupo FTPO 5% foi comparado ao Controle (ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: Formulação veículo transdérmica; FTPO 5%: Formulação Transdérmica de Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação Transdérmica de Terpinoleno a 10%; Morfina 5 mg/kg (ip): controle positivo.

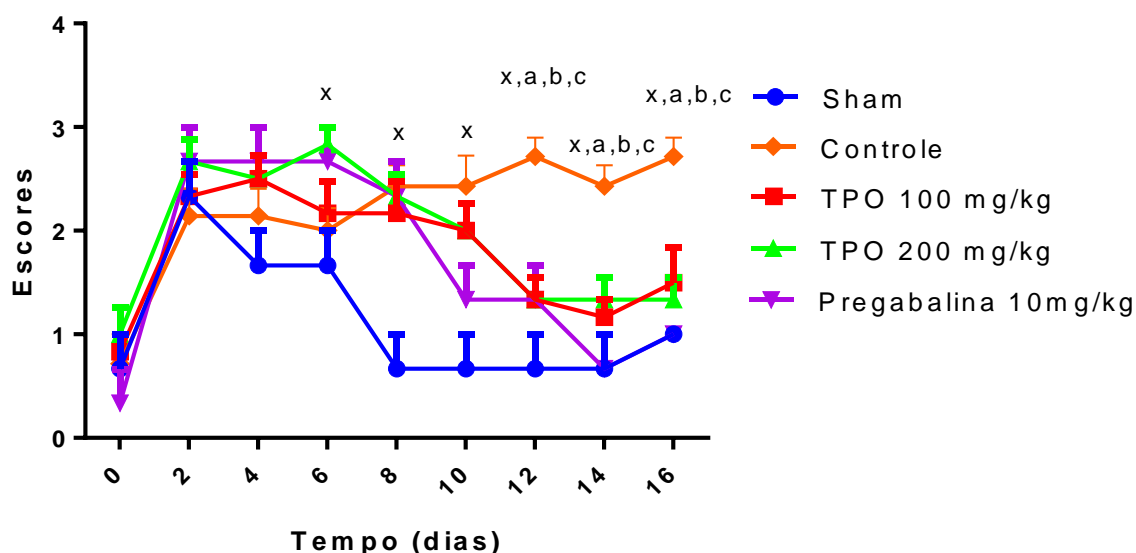


3.4 Teste da acetona sobre a nocicepção térmica com administrações subagudas

Nesse teste, o grupo tratado com TPO em ambas as doses apresentou escores com diferença significativa quando comparado ao Controle a partir no dia 12 (equivalente ao quinto dia de tratamento). Nesse caso, tanto o grupo tratado com TPO 100 mg/kg, quanto o tratado com TPO 200 mg/kg apresentaram média de $1,33 \pm 0,21$ enquanto que o grupo Controle apresentou média de escore de $2,71 \pm 0,18$, ou seja, para este dia, houve uma melhora de 50,92% no escore ($p < 0,01$). No dia 14, os valores foram de $1,17 \pm 0,17$ para o grupo tratado com TPO 100 mg/kg e $1,33 \pm 0,21$ para o tratado com TPO 200 mg/kg. O do Controle teve pontuação de $2,43 \pm 0,20$. Isso implica uma melhora do escore de 51,85% ($p <$

0,01) para o grupo tratado com 100 mg/kg de TPO e de 45,26% para o tratado com 200 mg/kg ($p < 0,01$). No dia 16, o grupo TPO 100 mg/kg teve escore de $1,50 \pm 0,34$ e o de 200 mg/kg, $1,33 \pm 0,21$, enquanto o Controle teve escore de $2,71 \pm 0,18$. Houve, portanto, melhoras de 44,65% para o TPO 100 e de 50,92% para o TPO 200 ($p < 0,01$) (**Figura 8**).

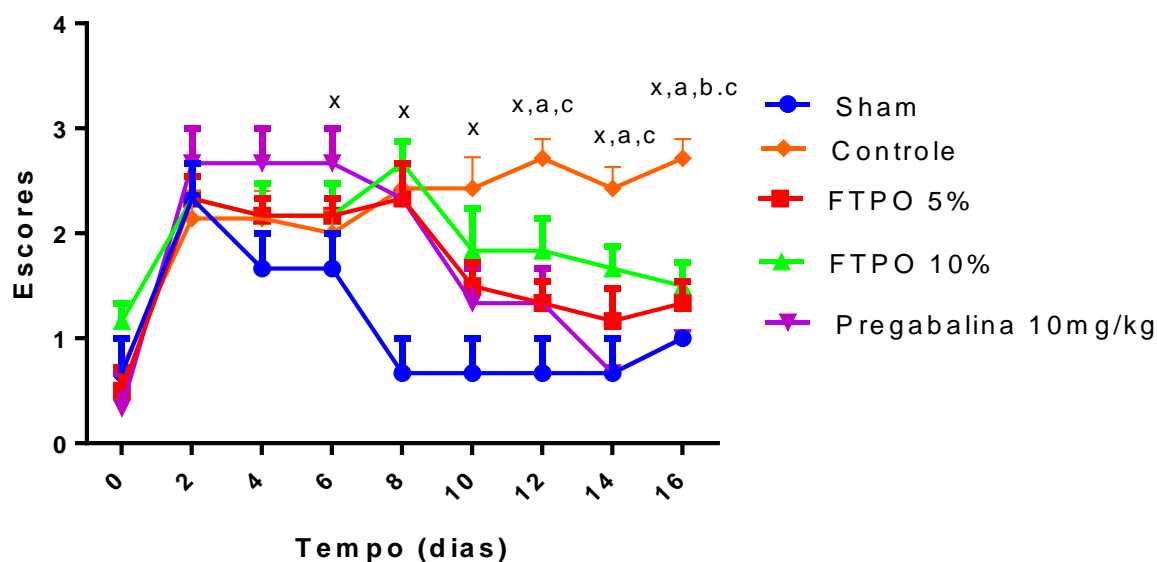
Figura 8: Efeito do Teste da Acetona sobre a nocicepção térmica com TPO (vo) no tratamento subagudo, com as mensurações realizadas do dia 0 ao 16, com TPO 100 e a 200 mg/kg. Dados expressos em média \pm E.P.M.: x: $p < 0,001$ quando o grupo Sham foi comparado ao Controle; a: $p < 0,05$ quando o grupo Pregabalina 10 mg/kg foi comparado ao Controle; b: $p < 0,01$ quando o grupo TPO 200 mg/kg foi comparado ao Controle; c: $p < 0,01$ quando o grupo TPO 100 mg/kg foi comparado ao Controle (ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: veículo por via oral; TPO 100 mg/kg: Terpinoleno via oral a 100 mg/kg; TPO 200 mg/kg: Terpinoleno via oral a 200 mg/kg; Morfina 5 mg/kg (ip): controle positivo.



Quanto às formulações, a partir do dia 12, já foram observados resultados significativos quando comparado ao Controle. Nesse dia, o grupo tratado com FTPO 5% apresentou escore de $1,33 \pm 0,21$, enquanto o Controle, $2,71 \pm 0,18$,

havendo melhora de 50,99% ($p < 0,01$). No dia 14, o grupo tratado com FTPO 5% apresentou escore de $1,17 \pm 0,31$, enquanto o Controle, $2,43 \pm 0,20$, havendo melhora de 51,85% ($p < 0,01$). No dia 16, o grupo tratado com FTPO 5% apresentou escore de $1,33 \pm 0,21$, e o tratado com a FTPO 10%, $1,50 \pm 0,22$, enquanto o Controle, $2,71 \pm 0,18$, havendo melhora de 50,92% e 44,65%, respectivamente ($p < 0,01$) (**Figura 9**).

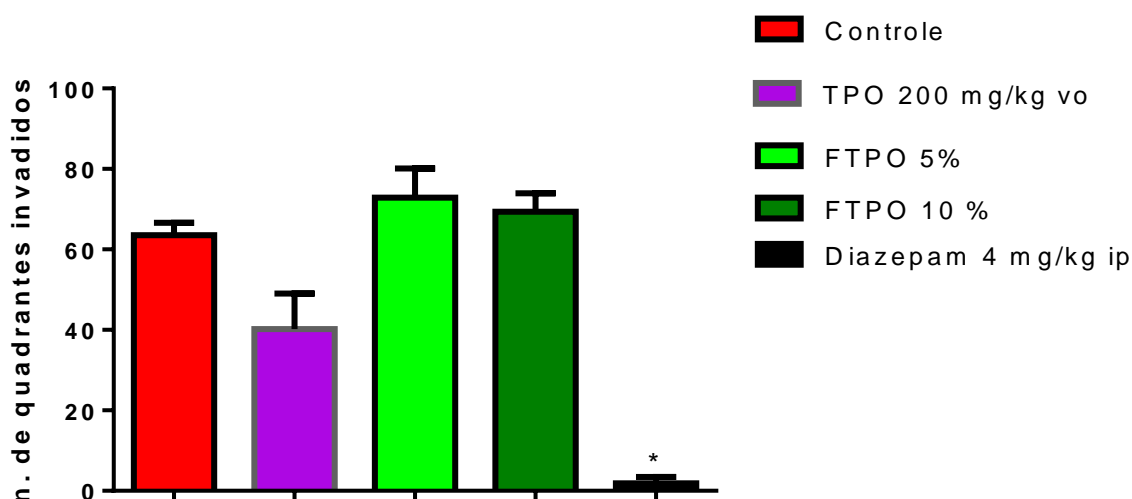
Figura 9: Efeito do Teste da Acetona sobre a nocicepção térmica, com administrações subagudas de FTPO, a 5 e a 10%. Dados expressos em média \pm E.P.M.: x: $p < 0,001$ quando o grupo Sham foi comparado ao Controle; a: $p < 0,05$ quando o grupo Pregabalina 10 mg/kg foi comparado ao Controle; b: $p < 0,01$ quando o grupo FTPO a 10% foi comparado ao Controle; c : $p < 0,01$ quando o grupo FTPO a 5% foi comparado ao Controle (ANOVA duas vias, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: Formulação veículo transdérmica; FTPO 5%: Formulação Transdérmica de Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação Transdérmica de Terpinoleno a 10%; Morfina 5 mg/kg (ip): controle positivo.



3.5 Teste do campo aberto

A **Figura 10** demonstra os efeitos do TPO no teste do campo aberto. Os camundongos submetidos ao tratamento com Diazepam 4 mg/kg apresentaram redução de 97,12% do número de cruzamentos, quando comparado ao Controle (veículo) ($p < 0,0001$). Todavia, os tratamentos feitos com TPO, seja a 200 mg/kg vo, seja com as duas Formulações Transdérmicas, não tiveram alteração da atividade locomotora espontânea quando comparado ao Controle.

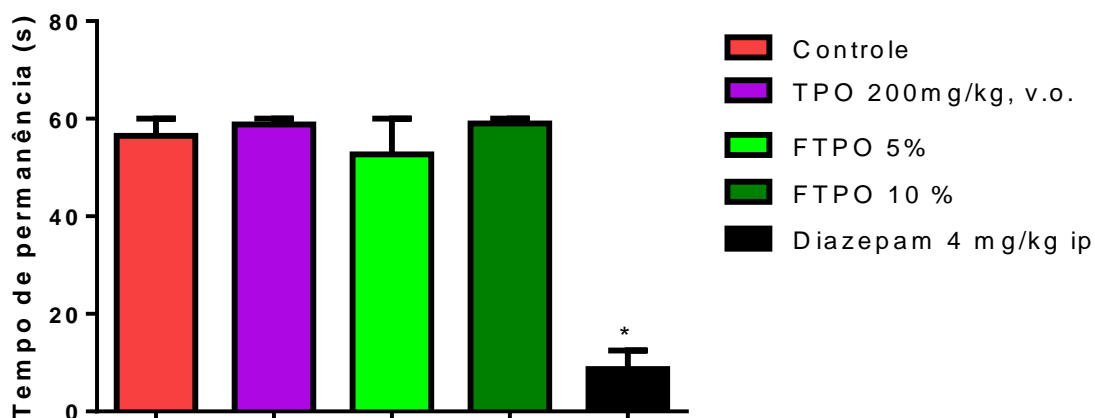
Figura 10: TPO 200 mg/kg (vo) e FTPO's no teste do campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de cruzamentos dos camundongos ($n=8$ por grupo) utilizados nos experimentos. * $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo Controle (ANOVA uma via e teste de comparação múltipla de Bonferroni). Controle: formulação veículo transdérmica; TPO 200 mg/kg vo: Terpinoleno 200 mg/kg administrado por via oral; FTPO 5%: Formulação Transdérmica contendo Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação Transdérmica contendo Terpinoleno a 10%; Diazepam 4 mg/kg ip: controle positivo.



3.6 Teste do Rota-rod

A **Figura 11** demonstra que o grupo de camundongos tratados com Diazepam 4 mg/kg teve uma redução de 84,65% sobre o tempo na barra giratória quando comparado ao Controle ($p < 0,0001$) e os grupos tratados com TPO, seja 200 mg/kg vo, seja com as duas Formulações, não apresentou diferença estatística quando comparado ao Controle.

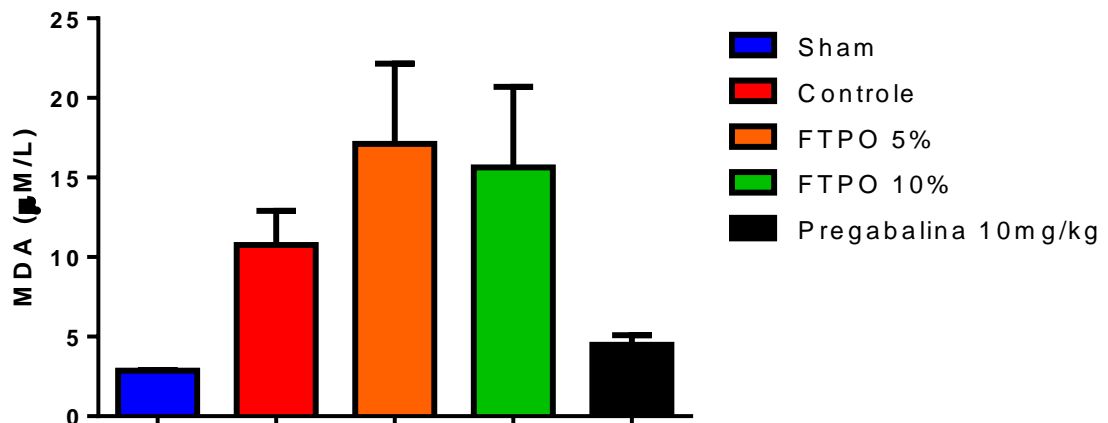
Figura 11: TPO 200 mg/kg (vo) e FTPO's no teste do *Rota rod*. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de permanência sobre a barra giratória ($n=10$ camundongos por grupo). * $p < 0,0001$, quando comparados ao grupo Controle (ANOVA uma via e teste e teste de comparação múltipla de Bonferroni). Controle: formulação veículo transdérmica; TPO 200 mg/kg vo: Terpinoleno 200 mg/kg administrado por via oral; FTPO 5%: Formulação Transdérmica contendo Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação Transdérmica contendo Terpinoleno a 10%; Diazepam 4 mg/kg ip: controle positivo.



3.7 Níveis de Malondialdeído

Conforme a **Figura 12**, não foi observada diferença estatística significativa quando os dois grupos referentes às FTPO's, bem como o grupo tratado com Pregabalina, foram comparados ao Controle (veículo transdérmico).

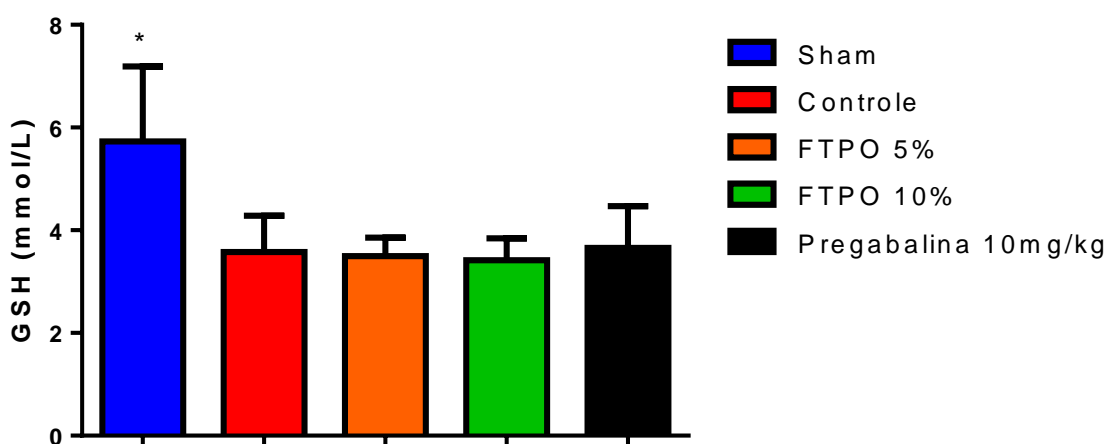
Figura 12: Mensuração do efeito das FTPO's sobre níveis de MDA. Dados expressos em média \pm E.P.M (ANOVA uma via, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: Formulação Veículo Transdérmica; FTPO 5%: Formulação de Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação de Terpinoleno a 10%; Pregabalina 10 mg/kg: controle positivo.



3.8 Níveis de Glutathiona Reduzida

Conforme pode ser observado na **Figura 13**, houve uma redução significativa da atividade da glutathiona reduzida (GSH) quando da comparação do grupo Sham (grupo sem neuropatia) com o Controle (grupo com neuropatia), sugerindo que a neuropatia induzida está, pelo menos em parte, correlacionada com redução dos níveis de GSH. Contudo, nem as duas FTPO's nem o grupo tratado com Pregabalina (controle positivo) tiveram significância estatística quanto a esse parâmetro quando comparados ao Controle.

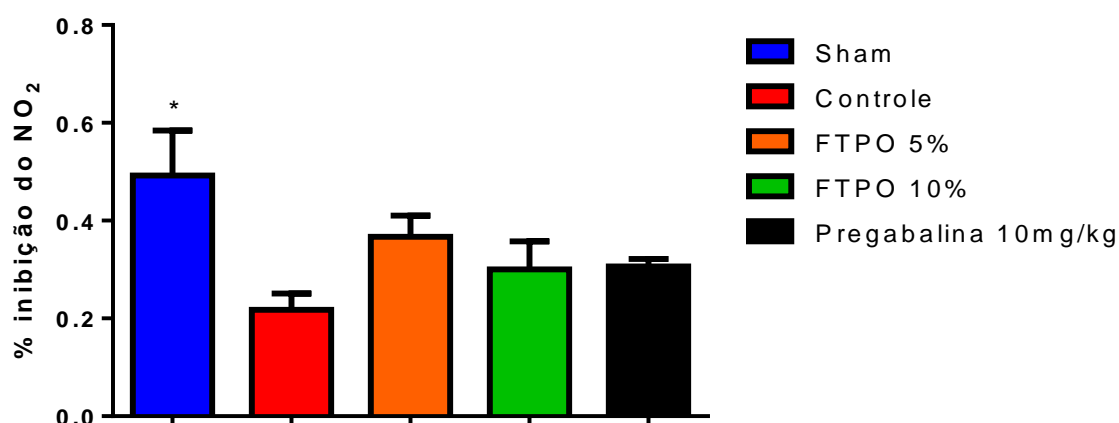
Figura 13: Mensuração do efeito das FTPO's sobre níveis de GSH. Dados expressos em média \pm E.P.M. *: $p < 0,05$ quando comparado ao Controle (ANOVA uma via, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: Formulação Veículo Transdérmica; FTPO 5%: Formulação de Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação de Terpinoleno a 10%; Pregabalina 10 mg/kg: controle positivo.



3.9 Atividade da Superóxido Dismutase

Conforme pode ser observado na **Figura 14**, houve diferença estatística significativa quando da comparação do grupo Sham com o Controle ($p < 0,05$), sugerindo que os camundongos neuropáticos apresentaram redução da atividade dessa enzima quando comparado aos não neuropáticos. Contudo, não houve diferença estatística quando os restantes dos grupos foram comparados ao Controle, nem mesmo com o grupo tratado com a Pregabalina.

Figura 14: Mensuração do efeito das FTPO's sobre atividade da SOD. Dados expressos em média \pm E.P.M. *: $p < 0,05$ quando comparado ao Controle (ANOVA uma via, seguida do teste de Tukey). Sham: simulação do procedimento; Controle: Formulação Veículo Transdérmica; FTPO 5%: Formulação de Terpinoleno a 5%; FTPO 10%: Formulação de Terpinoleno a 10%; Pregabalina 10 mg/kg: controle positivo.



4. DISCUSSÃO

Vários efeitos terapêuticos de produtos naturais já têm sido sugeridos na literatura científica, dentre os quais, atividade analgésica, anti-inflamatória, ansiolítica, anticonvulsivante, antidepressiva e antioxidante (DE SOUSA et al., 2006; BATISTA et al., 2008; GOMES et al., 2010; DE SOUSA et al., 2011; RIELLA et al., 2012; PIRES et al., 2013a). Em especial, os monoterpenos e seus derivados têm sido citados frequentemente quanto à ação terapêutica em experimentos que simulam condições patológicas do sistema nervoso (PIRES et al., 2013b; PIRES et al. 2014a; PIRES et al., 2014b).

Considerando os achados científicos acima, a fim de ser testada uma possível atividade antinociceptiva do TPO, o teste de filamentos de von Frey foi selecionado como um dos métodos, pois é utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, sendo bastante aplicado de forma experimental (JENSEN et al., 1986; CUNHA et al., 2004). Particularmente, o teste de von Frey é usado para

avaliar a sensibilidade tecidual provocada pela neuropatia induzida experimentalmente, por meio do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica) (LE BARS et al., 2001; SILVA et al, 2013). Os filamentos de von Frey, que oferecem uma calibração de força em uma determinada porção de um membro de um indivíduo, são usados para testar a sensibilidade mecânica. Em modelos de roedores, comportamentos defensivos são monitorados. No caso particular deste estudo, foi mensurado o limiar de retirada da pata que sofreu a ligadura do nervo ciático (GREGORY et al., 2013; KIM et al., 2014).

Conforme os resultados, foi sugerido efeito antinociceptivo do TPO no teste de von Frey, mesmo com administrações de dose única. Contudo, este efeito pôde ser observado somente quando da administração transdérmica do TPO a 10%, mas não por via oral (**Figura 3**). Este resultado demonstrou ser promissor, considerando que medicamentos tipicamente utilizados para tratar dor neuropática na prática clínica, como os antidepressivos (AD) e anticonvulsivantes (incluídos, mais especificamente, os AD tricíclicos, a duloxetina e a pregabalina), não têm efeito analgésico para tratamento de dor aguda, e requerem administrações diárias repetidas (LEE et al., 2013; DING et al, 2014; SUTO et al., 2014; KREMER et al., 2016). Seguindo uma tendência diferente, a FTPO 10% já provocou aumento do limiar doloroso no teste de von Frey, bastando somente uma administração transdérmica (**Figura 3**).

Para complementar e corroborar os resultados do teste de von Frey, o teste da nocicepção térmica com a acetona também foi realizado, a fim de avaliar a sensibilidade ao frio após a indução experimental da neuropatia. Assim, para a verificação da alodinia ao frio, que é também um sinal clínico característico na dor neuropática, foi utilizado o modelo descrito por Flatters e Bennett, 2006. O teste se utiliza da propriedade volátil da acetona para induzir a sensação de frio (10 °C), avaliando assim a função das fibras responsáveis pela sensibilidade térmica (frio) (CÂMARA, 2009).

Nesse teste, foi observado que tanto o TPO (vo) quanto transdérmico sugeriram efeito antinociceptivo, mesmo com administrações agudas. Conforme o **item 3.2**, os grupos tratados tanto com 100 quanto com 200 mg/kg (vo) de TPO apresentaram efeito significativo quanto à redução do escore no teste da acetona sobre a nocicepção térmica, sendo a de 100 mg/kg significativa 60, 120 e 180 minutos após a administração, e a de 200 mg/kg, 120 minutos após a administração

(**Figura 4**). Já no que tange às administrações transdérmicas, foi observado que a Formulação a 5% reduziu significativamente os escores do teste da acetona sobre a nocicepção térmica aos 60, 120 e 180 minutos após a administração, e a Formulação a 10%, 60 e 120 minutos após (**Figura 5**).

Esses resultados foram promissores, ao se considerar o possível efeito antinociceptivo com administrações agudas de TPO, bem como ao demonstrar que a elaboração das formulações transdérmicas foi bem sucedida. Deve ser considerado que, apesar de a FTPO 10% ter apresentado diferença significativa no teste de von Frey quando comparado ao Controle em 120 minutos após a administração, as administrações orais não demonstraram essa diferença. Este resultado poderia ser hipoteticamente justificado devido às administrações orais sujeitarem o TPO ao metabolismo hepático de primeira passagem, enquanto que sua administração transdérmica pouparia a degradação de parte do fármaco, aumentando, portanto, sua biodisponibilidade (POND; TOZE, 1984). Caso esta tendência venha a ser concretizada em estudos clínicos, formulações transdérmicas desse monoterpene poderiam otimizar o tratamento para dor neuropática, além de reduzir possíveis efeitos adversos, principalmente sobre o sistema gastrointestinal (XIAO-XIAO et al., 2013).

Além dos resultados citados, foram também sugeridos efeitos antinociceptivos com a administração subaguda do TPO. Quanto às administrações orais, o TPO, tanto na dose de 100 quanto 200 mg/kg, aumentaram o limiar nociceptivo no teste de von Frey a partir do sétimo dia de administração - referente ao dia 14 do teste - ou seja, no mesmo dia em que a Pregabalina também iniciou sua ação terapêutica. Adicionalmente, esse efeito perdurou até o último dia do experimento. Ambas as formulações transdérmicas também demonstraram atividade significativa quanto ao aumento do limiar nociceptivo. Há de se considerar que já foi sugerido efeito antinociceptivo com a FTPO de 10% a partir do dia 12, ou seja, quinto dia de tratamento e, portanto, antes mesmo de quaisquer das doses de TPO apresentarem efeito significativo, bem como da própria Pregabalina (controle positivo) (**Figuras 6 e 7**). Ademais, os efeitos terapêuticos de ambas as formulações perduraram até o último dia do experimento. Isso poderia ser novamente justificado, pelo menos em parte, ao fato de a formulação transdérmica de terpinoleno fazer com que esse fármaco não sofra metabolismo hepático de primeira passagem, como acontece quando administrado por vi oral, o que pode

conferir um melhor aproveitamento do TPO e uma resposta mais precoce, portanto (POND; TOZE, 1984; XIAO-XIAO et al., 2013)

Também foi observado que os animais tratados com TPO por via oral nas duas doses (100 e 200 mg/kg) tiveram melhora significativa quanto à alodinia ao frio, quando comparado ao grupo Controle, em administrações subagudas. Esse efeito foi observado a partir do quinto dia de tratamento – referente ao dia 12 - para ambas as doses de TPO, similarmente ao que houve com a Pregabalina, que também teve início do seu efeito a partir desse dia. Note-se que o efeito antinociceptivo do TPO em ambas as doses vo, bem com da Pregabalina perdurou até o último dia do experimento (**Figura 8**). Isso reforça, portanto, um possível efeito modulador da neuropatia induzida pela ligadura do nervo ciático. Quanto às formulações transdérmicas para a alodinia ao frio, ambas apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas ao Controle, com a FTPO 5% apresentando efeito a partir do quinto dia de tratamento, similarmente à Pregabalina e às administrações de TPO (vo), e perdurando até o último dia de tratamento, enquanto que a FTPO 10% teve seu efeito significativo no dia 16, quando comparado ao controle (**Figura 9**).

Quanto à alteração sobre a atividade locomotora dos animais, já era esperado que o diazepam causasse comprometimento dessa função, identificado pela redução do número de quadrantes cruzados no teste do campo aberto, bem como redução do tempo de permanência na barra giratória do teste *Rota-rod* (**Figuras 10 e 11**), refletindo uma lentificação psicomotora e efeito miorreaxante, que são justificados, pelo menos em parte, pela ação GABAérgica do diazepam (PIRES et al., 2013b). Todavia, quando comparado ao Controle, não houve alteração no número de quadrantes cruzados nos grupos tratados com TPO (vo) ou por via transdérmica, sugerindo que o TPO, apesar de apresentar efeitos antinociceptivo-símile, provavelmente não apresenta efeito retardador da atividade locomotora.

Assim, os resultados acima nos permitem pontuar que, além de o TPO administrado por via oral sugerir efeito antinociceptivo, as formulações também seguiram a mesma tendência, indicando, portanto, que a elaboração delas foi bem sucedida tanto para 5% quanto para 10% de TPO. Isso sugere que esse monoterpeno poderia ser administrado não somente por via oral, mas também

transdérmica para o tratamento de neuropatias e sem provocar efeito deletério sobre a atividade locomotora.

É importante salientar que há diversas condições clínicas que limitam a administração de fármacos por via oral, como por exemplo, insuficiência hepática e distúrbios gastrointestinais. Nesse caso, a administração transdérmica do TPO permite que ele desvie do metabolismo hepático de primeira passagem, havendo, portanto, um menor risco de sobrecarga do fígado. Adicionalmente, há na literatura científica relatos comuns de pacientes cuja mucosa gastrointestinal não tolera determinados fármacos, sobretudo analgésicos e antiinflamatórios, que são frequentemente utilizados para o tratamento da dor (XIAO-XIAO et al., 2013). Isso dificulta a aderência medicamentosa. Ademais, a via transdérmica oferece vantagem sobre a via intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (NARUSE et al., 2014). Note-se, também, que as vias de administração oral e parenteral frequentemente são de difícil aplicação na população pediátrica, considerando principalmente a recusa do paciente, bem como a fato de provocar dor, respectivamente. Assim, formulações de fármacos para administração transdérmica podem ser uma boa solução para essas limitações (YACUBIAN, 2002).

Quanto ao teste de atividade antioxidante, não foi observado nenhum resultado significativo quando da administração de TPO, seja vo, seja por via transdérmica, sugerindo que o efeito antinociceptivo-símile do TPO não está correlacionado com a atividade antioxidante e efeito sequestrador de radicais livres refletida pelos níveis de MDA, GSH e da atividade da SOD (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1991; . GUTTERIDGE, 1993; BLAKE, WINYART, 1995; ROSE et al., 1995).

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo nos permitem concluir que o TPO, seja por via oral, seja por via transdérmica, apresentou pronunciada atividade antinociceptiva-símile, com as formulações transdérmicas sugerindo efeito terapêutico até mesmo com administrações agudas. Esse efeito não foi acompanhado de lentificação locomotora dos camundongos, o que sugere que, além de promissoras para o

tratamento da dor neuropática, as formulações de TPO, bem como o TPO (vo), possuem potencial para também serem bem tolerados. Assim, caso esta tendência venha a ser concretizada em estudos clínicos, formulações transdérmicas desse monoterpene poderiam otimizar o tratamento da dor neuropática, além de reduzir possíveis efeitos adversos e limitações existentes em outras vias de administração.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N. S.; WAHEED, A.; FARMAN, M.; QAYYUM, A.; Analgesic and anti-inflammatory effects of *Pistacia integerrima* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, p. 250-253, 2010.

AL-JABRI, N. N.; HOSSAIN, M. A. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 247-253, 2014.

ALDAHMAH, B. A., EL-NAGAR, D. M., IBRAHIM, K. E., METWALY, M. S. Biotin amelioration of nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n.3, p. 243-358, 2015.

ALMANÇA, C.; POZZATTI, P. ; CASAGRANDE, F.; SILVA FILHO, J.; BISSI, B.; BARBOSA, B.; PORFÍRIO, L. Eficácia in vitro de extratos de *Chenopodium ambrosioides* sobre teleóginas de *Rhicephalus (Boophilus) microplus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.43-49, 2013.

ALMEIDA, P. C.; SILVA, D. A. Antiinflamatórios não esteroidais mais dispensados em uma farmácia de manipulação do município de Itaperuna - Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v.4, n.1, 2013.

AMI, N.; OKAMOTO, A.; OSHIMA, H. Analgesic effect of magnetic stimulation on paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in mice. **Brain Research**, v. 1461, p. 24-29, 2012.

ARORA, N.; CAO, M.; JAVAHERI, S. Opioids, Sedatives, and Sleep Hypoventilation. **Sleep Medicine Clinics**, v. 9, p. 391–398, 2014.

- AYALA, A.; MUNOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-31, 2014.
- BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.; JESSEL, T. (Editores). **Principles of Neuroscience**. New York: Appleton and Lange, 2000. p. 472–491.
- BATISTA, P. A.; WERNER, M. F. P.; OLIVEIRA, E.C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L. F. S.; SANTOS, A. R. S. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. **Neuroscience letters**, v.440, p. 299-303, 2008.
- BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects - Review Article. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.4, p.522-529, 2010.
- BINGHAM, B.; AJIT, S.; BLAKE, D.; SAMAD, T. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 5, p. 28-37, 2009.
- BRIDGESTOCK, C.; RAE, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 480-483, 2013.
- BLAKE, D.; WINYARD, P. G.; **Immunopharmacology of Free Radical Species**, Academic Press, New York, 1995, 301p.
- CABRAL, C.; Poças, J.; Gonçalves, M. J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M. T.; Salgueiro, L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidante and anti-inflammatory essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 56-61, 2015.
- CÂMARA, C.C. **Estudo dos efeitos antinociceptivos, comportamentais e regenerativos do tratamento com gabapentina em modelo experimental de dor neuropática**. 2009. 220p. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Farmacologia), UFC.
- CHAPLAN, S. R.; BACH, F.; POGREL, J.; CHUNG, J.; YAKSH, T. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.
- CHRYSTIE, P.; OWEN, M. Opioids in the management of persistent, non-cancer pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 12, n. 2, p. 44-45, 2011.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; MADRID, I.; FONSECA, A. O.; ALVES, G. H.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, 2012.

COELHO-DE-SOUZA, L. N.; GOMES, S. T.; ABDON, A. P. V.; CAMPOS, A. R. Physical therapists understanding and attitudes toward non-steroid anti-inflammatory drugs. **Revista Dor**, v.14, n.1, p.44-47, 2013.

COSTIGAN, M., SCHOLZ, J., WOOLF, C.J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v.32, p.1-32, 2009.

CUNHA TM, VERRI WA, VIVANCOS GG, MOREIRA IF, REIS S, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , v. 37, p. 401 – 407, 2004.

DAS, K; SAMANTA, L; CHAINY, G. B. D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, vol 37, p. 201-204, 2000.

DE SOUSA D.P.; GONÇALVES, J.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.; DE ALMEIDA, R.N. Study of Anticonvulsant Effect of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233–2252, 2011.

DING, L.; CAI, J.; GUO, X.; MENG, X.; XING, G. The antiallodynic action of pregabalin may depend on the suppression of spinal neuronal hyperexcitability in rats with spared nerve injury. **Pain Research and Management**, v. 19, p. 205–211, 2014.

DWORKIN, R.H.; O'CONNOR, A.B.; BACKONJA, M.; FARRAR, J.T.; FINNERUP, N.; JENSEN, T.; KALSO, E.; LOESER, J.; MIASKOWSKI, C.; NURMIKKO, T.; PORTENOY, R.; RICE, A.; STACEY, B.; TREEDE, R.; TURK, D.; WALLACE, M. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**, v.132, n.3 p. 237-251, 2007.

EVRENDILEK, G. A. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, n. 2, p. 35-41, 2015.

FURIA, T.E.; BELLANCA, N. **Fenaroli's Handbook Flavor Ingredients**. CRC Press, Cleveland, Ohio, 2ed., v. 2, 523p., 1975.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, p. 898-904, 2007.

GANGADHARAN, V.; KUNER, R. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. **Disease models & mechanisms**, v. 6, p. 889–95, 2013.

GOMES, P.B.; FEITOSA, M.L.; SILVA, M.I.G.; NORONHA, E.C.; MOURA, B.A.; VENÂNCIO, E.T.; RIOS, E.R.V.; DE SOUSA, D.P.; DE VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; DE SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, p. 287–293, 2010.

GRABMANN, J.; HIPPELI, S.; SPITZENBERGER, R.; ELSTNER, E. F. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6–7, p. 416-423, 2005.

GREENE, S. A. Chronic Pain: Pathophysiology and Treatment Implications. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 5-9, 2010.

GREGORY, N.; HARRIS, A.; ROBINSON, C.; DOUGHERTY, P.; FUCHS, P.; SLUKA, K. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **Journal of Pain**, v. 14, p. 1255–69, 2013.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M.A.; ALVES R DOS, S.; MENEZES PDOS, P.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.; BEZERRA, D.P.; QUINTÁNS-JÚNIOR, L.J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.

GUTTERIDGE, J. M. C.; Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Free Radical. **Research Communication**, v. 19, p. 141, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**, Clarendon Press, Oxford, 1991, 543p.

IKEDA, T.; ISHIDA, Y.; NAONO, R.; TAKEDA, R.; ABE, H.; NAKAMURA, T.; NISHIMORI, T. Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. **Neuroscience Research**, v.63, p. 42-6, 2009.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Part III: Pain terms, a current list with definitions notes on usage classification of chronic pain, in: MERSKEY, H.; BOGDUK, N (Editores), **IASP Task Force on Taxonomy**, 2 ed, Seattle: IASP Press, 1994. p. 209-214.

JENSEN K, ANDERSEN HO, OLESEN J, LINDBLOM U. Pressurepain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain** , v. 25, p. 313 – 323, 1986.

JI, L.; XU, Z.; GAO, Y. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews/Drug Discovery**, v.13, p. 533-548, 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KAMIRI, A.; HADIAN, J.; FARZANEH, M.; KHADIVI-KHU, A. Phenotypic diversity and volatile composition of Iranian *Artemisia dracunculus*. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 315–323, mar. 2015.

KAPUR, B. M.; LALA, P. K., SHAW, J. L.V. Pharmacogenetics of chronic pain management. **Clinical Biochemistry**, n.47, p. 1169–1187, 2014.

KIM, H.; KIM, T.; NOVOTNY, B.; KHAN, N.; AKSAMIT, J.; SIEGEL, S.; MIRANPURI, G.; RESNICK, D. Thermalhyperalgesia assessment for rats after spinal cord injury: developing a valid and useful pain index. **The Spine Journal**, v. 14, p. 984–989, 2014.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pain pathophysiology. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KREMER, M. SALVAT, E.; MULLER, A.; YALCIN, I.; BARROT, M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. **Neuroscience**, v. 338, p.183–206, 2016.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.

KRAYCHETE, D. C., GARCIA, J. B. S., SIQUEIRA, J. T. T. Recommendations for the use of opioids in Brazil: Part IV. Adverse opioid effects. **Revista Dor**, v. 15, n. 3, p. 215-223, 2014.

LAPA, J. A. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. SMBP, Gráfica Metrópole, Florianópolis, 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacological Review** , v. 53, p. 597 – 652, 2001.

LEE, B.; JUN, I.; KIM, S.; PARK, J. Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. **Journal of Korean Medical Science**, v.28, p.308–314, 2013.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009.

LINDENLAUB T.; SOMMER C. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies **Acta Neuropathologica**, v. 105, p. 593–602, 2003.

LI, J.; ZHANG, Y. Emerging drug targets for pain treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 681, p. 1-5, 2012.

LIPINSKI, L. J.; HÖEHR, N.; MAZUR, S. J.; DIANOV, G. L.; SENTURKER, S.; DIZDAROGLU, M.; BOHR, V. A.; **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 3153, 1999.

LORENZ, M,D.; COATES, J.R.; KENT, M. Pain. In:_____ **Handbook of veterinary neurology**. 5 ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011. p. 413-431.

LOTA, M.L.; SERRA, D.; JACQUEMOND, C.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 89–96, 2001.

MARNETT, J. The COXIB Experience: A Look in the Rearview Mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 265-290, 2009.

MARTINO, L.; NAZARRO, R.; MANCINI, E.; DE FEO, V. Essential Oils from Mediterranean Aromatic Plants. In: **The Mediterranean Diet**, p. 649–661, 2015.

MASTEN, S.; TICE, R. **Terpinolene [CASRN586-62-9] Review of Toxicological literature**. National Institute of Environmental Health Sciences, 1999.

MISERA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for SOD. *J BiolChem* v. 247, p. 3170–5, 1972

MOSCONI, T.; KRUGER, L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. **Pain.**, v. 64, p. 37-57, 1996.

MOURA, J.B. **Avaliação da atividade antinociceptiva do terpinoleno em roedores e possíveis mecanismos de ação envolvidos**. 2012. 119p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Farmacologia), UFPI.

NARUSE, M.; OGAWARA, K.; KIMURA, T.; KONISHI, R.; HIGAKI, K. Development of transdermal therapeutic formulation of CNS5161, a novel NMDA receptor antagonist, by utilizing pressure-sensitive adhesives II: Improved transdermal absorption and evaluation of efficacy and safety. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 86-94, 2014.

NICE Clinical Guideline 96. **Neuropathic pain: the pharmacological management of neuropathic pain in adults in non-specialist settings**. Draft for consultation, p. 155, 2010.

OLIVEIRA, P. F.; ALVES, J. M.; DAMASCENO, J. L.; OLIVEIRA, R. A. M.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 183-188, 2015.

OPDYKE, D. Fragrance raw materials monographs: Terpinolene. **Food Cosmetics Toxicology**, v. 14, p. 877-878, 1988.

PASSOS, G.; FERNANDES, E.; DA CUNHA, F.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M.; CALIXTO, J. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the

essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PHILLIPS, C.J. The cost and burden of chronic pain. **Review Pain**, v. 3, p. 2-5, 2009.

PIRES, L. F.; FREITAS, R. M ; RODRIGUES, A. C. T. . Efeito antidepressivo e atividade serotoninérgica da curcumina em modelos de animais de depressão. **Revista de Farmacología de Chile**, v. 6, p. 37, 2013a.

PIRES, L. F.; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; DE FREITAS, R. . Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013b.

PIRES, L. F.; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; SATYAL, P.; DE FREITAS, R . Neuropharmacological effects of carvacryl acetate on δ -aminolevulinic dehydratase, Na^+ , K^+ -ATPase activities and amino acids levels in mice hippocampus after seizures. **Chemico-Biological Interactions** (Print), v. 226, p. 49-57, 2014a.

PIRES, L. F.; COSTA, L.; DE ALMEIDA, A.; SILVA, O.; CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D.; DE FREITAS, R. Is There a Correlation Between In Vitro Antioxidant Potential and In Vivo Effect of Carvacryl Acetate Against Oxidative Stress in Mice Hippocampus?. **Neurochemical Research**, v. 39, p. 758-769, 2014b.

POND, S.; TOZE, T. First-Pass Elimination Basic Concepts and Clinical Consequences. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 9, p. 1-25, 1984.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 304-307, 2009.

RIELLA, K.R.; MARINHO, R.R.; SANTOS, J.S.; PEREIRA-FILHO, R.N.; CARDOSO, J.C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; THOMAZZI, S.M. Anti-inflammatory and

cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v.143, p.656-663, 2012.

SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie**, v. 389, p. 237–243, 2004.

SCHAIBLE, H.G. Pathophysiology of pain. **Orthopade**, v. 36, n. 1, p. 8-16, 2006.

SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicines usage. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2014.

SHUBAYEV, V. I.; MYERS, R. R. Endoneurial remodeling by TNF- α and TNF- α releasing proteases a apatial and temporal co-localization study in painful neuropathy. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 7, p. 28-36, 2002.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F.; MENEZES-DE-LIMA, O. JR.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNADEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G.; HENRIQUES, M. G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, 57-69, 1999.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.; SOUZA, M.; DAMASCENO, B.; MEDEIROS, A. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 125-131, 2010.

SILVA, V. G.; SILVA, R.; DAMASCENO, S.; CARVALHO, N.; PRUDÊNCIO, R.; ARAGÃO, K.; GUIMARÃES, M.; CAMPOS, S.; VÉRAS, L.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J.; BARBOSA, A.; MEDEIROS, J. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

SILVA, R.O., DAMASCENO, S.; BRITO, T.; DIAS, J.; FONTENELE, A.; BRAÚNA, I.; JÚNIOR, J.; MACIEL, J.; DE PAULA, R.; RIBEIRO, R.; SOUZA, M.; FREITAS, A.; MEDEIROS, J.; SILVA, D.; BARBOSA, A. Polysaccharide fraction isolated from *Passiflora edulis* inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 7, p. 1017-1027, 2015.

SOUTHWELL, I. A.; RUSSELL, M. F. Volatile oil comparison of cotyledon leaves of chemotypes of *Melaleuca alternifolia*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 4, p. 391-393, 2002.

SLATER T.F.; SAWYER B.C. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other alogenalkanes or peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. **Biochemical Journal**, v. 123, p. 805–14, 1971.

STEIN, C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, n. 3, p. 179-187, 2013.

SUKHOTINSKY, I., DEVOR, M. Chapter 23 – Networks for the Modulation of Acute and Chronic Pain. In: FAINGOLD, C., BLUMENFELD, H. **Neuronal Networks in Brain Function, CNS Disorders, and Therapeutics**. p. 311-326, 2014.

SUTO, T.; EISENACH, J.; HAYASHIDA, K. Peripheral nerve injury and gabapentin, but not their combination, impair attentional behavior via direct effects on noradrenergic signaling in the brain. **Pain** , v. 155, p. 1935–1942, 2014.

SZABO, S.; TRIER, J.; BROWN, A.; SCHNOOR, J.; HOMAN, H.; BRADFORD, J. A quantification method for assessing the extent of experimental erosions and ulcers. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 13, p. 59 – 66, 1985.

TEIXEIRA, F.M. **Avaliação comparativa do efeito de fármacos antiinflamatórios com a acupuntura no modelo de dor pós-incisional em ratos**. 2010. 77p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

TONUSSI, C.R., FERREIRA, S.H. Rat knee- joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 421-7, 1992.

TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377-391, 2007.

TREEDE, R.D.; JENSEN, T.; CAMPBELL, J.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY J.; GRIFFIN, J.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T.; SERRA, J. Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, p. 1630- 1635, 2008.

VON KORFF, M. R.; SAUNDERS, K.; THOMAS RAY, G.; BOUDREAU, D.; CAMPBELL, C.; MERRILL, J.; SULLIVAN, M. D.; RUTTER, C. M.; SILVERBERG, M. J.; BANTA-GREEN, C.; WEISNER, C. Defacto long-term opioid therapy for noncancer pain. **Clinical Journal of Pain**, v. 24, p. 521–527, 2008.

WALLACE, V.C.; BLACKBEARD, J.; SEGERDAHL, A.; HASNIE, F.; PHEBY, T.; MCMAHON, S.; RICE, A.. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain. **Brain**, v.130, p.2688–702, 2007.

WALKER, S. M. Overview of neurodevelopment and pain research, possible treatment targets. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.28, p. 213-228, 2014.

XIAO-XIAO, H.; DONG-DONG G.; LING-ZHI, L.; LI-LI, L.; DIAN-MING, L.; CHEN-CHEN, Z.; YING, P.; SHAO-JIANG, S. Monoterpene and sesquiterpene compounds from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 1-5, 2013.

YACUBIAN, E.M.T. Tratamento da epilepsia na infância. **Journal of Pediatrics**, v.78, n.1, p.19-27, 2002.

ZHANG, P., LIU, X.; ZHU, X.; CHEN, S.; ZHOU, D.; WANG, Y. Honokiol inhibits the inflammatory reaction during cerebral ischemia reperfusion by suppressing NK-kB activation and cytokine production of glial cells. **Neuroscience Letters**, v. 534, p. 123-7, 2013.

ZHAO, Y.L.; CHEN, S.R.; CHEN, H.; PAN, H.L. Chronic Opioid Potentiates Presynaptic but Impairs Postsynaptic N-methyl-D-aspartic Acid receptor Activity in Spinal Cords: implications for opioid hyperalgesia and tolerance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 25073-85, 2012.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109–110, 1983.

Considerações
 finais e
 perspectivas

A partir dos resultados obtidos, é possível fazermos as seguintes considerações:

- ✓ A revisão de literatura referente ao Capítulo I descreve a fisiopatologia da dor neuropática, seu tratamento convencional e perspectivas de tratamentos alternativos, envolvendo óleos essenciais e seus compostos, dentre eles o Terpinoleno, com a descrição das propriedades farmacológicas e biológicas desse monoterpene, apontando-o como favorável para tratamento de dor neuropática, bem como para o desenvolvimento de formulações transdérmicas contendo-o como princípio ativo.
- ✓ A revisão de literatura abordada no Capítulo II apontou que as categorias de fármacos que mais frequentemente provocam dor neuropática são os antineoplásicos, os antirretrovirais, as estatinas, os antimicrobianos e os anticonvulsivantes, com mecanismos fisiopatológicos diversos, incluindo desbalanço iônico, vias de sinalização indutoras de apoptose, disfunção mitocondrial, ativação de receptores de potencial vanilóide e alteração do metabolismo de vitaminas do complexo B.
- ✓ Houve resultados promissores quanto ao método selecionado para o desenvolvimento das MEs de TPO, gerando sete formulações transdérmicas bem sucedidas quanto à caracterização físico-química, estabilidade preliminar, características organolépticas, testes de validação, cinética de liberação e estabilidade ao estresse térmico, sendo selecionadas F4 e F8 para a realização de testes pré-clínicos *in vivo* do Capítulo IV.
- ✓ O Terpinoleno, seja administrado por via oral, seja por via Transdérmica, promoveu efeito antinociceptivo-símile quando avaliado no modelo CPC de síndrome neuropática, em administrações agudas e subagudas, sem contudo afetar a atividade e a coordenação psicomotora, mostrando-se uma molécula promissora como analgésico, levando em consideração a combinação de eficácia, segurança, biodisponibilidade e estabilidade.

A partir dos resultados obtidos, tem-se como perspectivas a continuação da investigação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do TPO livre e de formulação transdérmica:

- ✓ Avaliar os mecanismos adicionais de ação terapêutica do TPO, considerando os testes que já realizados.
- ✓ Avaliar, dando continuidade aos testes antioxidantes, se o efeito antinociceptivo do TPO estaria correlacionado, pelo menos em parte, a uma ação sequestradora de radicais livres e ativadora de enzimas antioxidantes adicionais.
- ✓ Avaliar a segurança da aplicação das Formulações Transdérmicas do TPO, em especial na região da pele onde são aplicadas, realizando, dentre outros, testes de irritabilidade do tecido da pele.
- ✓ Comparar estatisticamente as diferenças de resultados terapêuticos entre as administrações livre (via oral) e transdérmica, considerando principalmente parâmetros farmacocinéticos.
- ✓ Após ser corroborado o efeito antinociceptivo do TPO em testes pré-clínicos, testar esse efeito em estudos clínicos.