



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARLUCE PEREIRA DAMASCENO LIMA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES
TRANSDÉRMICAS CONTENDO γ -TERPINENO COM ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA EM MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA**

TERESINA-PI

2018

MARLUCE PEREIRA DAMASCENO LIMA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES
TRANSDÉRMICAS CONTENDO γ -TERPINENO COM ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA EM MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO – Ponto Focal Piauí, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

TERESINA-PI

2018

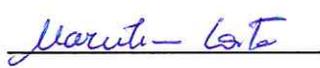
FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: MARLUCE PEREIRA DAMASCENO LIMA

TÍTULO DO PROJETO: “DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES TRANSDÉRMICAS CONTENDO γ -TERPINENO COM ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA EM MODELO ANIMAL 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)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u></u>
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Marcilia Pinheiro da Costa – UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Prof. Dr. Paulo César Ghedini - UFG (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 01 de novembro de 2018.

HORÁRIO: 14h30

LOCAL: Auditório do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais - Bloco 15

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

L732d Lima, Marluce Pereira Damasceno.
 Desenvolvimento e caracterização de formulações
 transdémicas contendo γ -terpineno com atividade
 antinociceptiva em modelo animal de dor neuropática / Marluce
 Pereira Damasceno Lima. – 2018.
 174 f.

 Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal
 do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia, Teresina, 2018.
 “Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Regina de Castro
 Almeida”.

 1. γ -terpineno. 2. Monoterpeno. 3. Microemulsão. 4. Via
 transdémica. 5. Neuropatia. I. Título.

CDD 615

À minha família, pelo amor
incondicional e pelo apoio em todos
os momentos!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante e por permitir que mais uma vitória fosse alcançada com coragem e perseverança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal Piauí, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Piauí (FAPPEPI), pelo apoio financeiro ao projeto executado.

À Secretaria de Estado da Educação por ter concedido afastamento das atividades laborais.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida pelo exemplo de dedicação, pela valiosa orientação, paciência e confiança em mim depositada.

Aos professores do RENORBIO, pelos conhecimentos e experiências transmitidas, em especial aos professores do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, pelos esclarecimentos e colaboração durante a realização dos protocolos experimentais.

Ao Prof^o Dr^o. André Luís Menezes Carvalho por toda a dedicação ao projeto e palavras de estímulo e pelas sugestões e correções nos trabalhos.

À equipe do Laboratório de Farmacologia da Dor (LafDor), Éverton Lopes, Celiane Piauilino, Ana Rita França, Carlos Reis Filho, Laércio Gomes, Flaviano, Matheus Rocha, Bóris Timah, Wiliam Amorim, pela disponibilidade e grande auxílio na execução dos experimentos. A convivência e amizade com todos eles que me ajudaram a crescer profissionalmente e como pessoa.

À minha mãe, Maria da Cruz Pereira Abade, e meu pai, Cristóvão Damasceno Lima, meus irmãos Anastácio Pereira Damasceno Lima e Rafael Pereira Damasceno Lima, pela compreensão, paciência e apoio em toda minha vida.

À Eldo José Rodrigues dos Santos, meu querido esposo, pelo amor, carinho, paciência e companheirismo durante todas as etapas dessa conquista.

Às minhas tias Anália Soares e Lucília Lima, meus primos e minha avó Maria Alves Lima pelo carinho e incentivo a ter dedicação aos estudos.

À Tamnata Ferreira Alixandre e Rejane Teixeira do Nascimento, pela companhia, carinho de suas amizades e ajuda durante a realização do curso.

Ao Professor Marcelo Sousa Lopes, pelo carinho, amizade, aconselhamentos e incentivo em realizar este curso de pós-graduação.

À Isadora Rosal pela valiosa ajuda em todos esses anos de forma incansável, com a mais pura amizade.

À Clédja Moreno, Flávia Procópio, Mercês Clementino, Adriana Mota, Cleide Oliveira, Sandra Silva, Ilara Riedel, Lindaura Angélica, Aparecida, Margareth Benvindo, Gema Galgânia, Taylan e toda a equipe de trabalho do Centro de Processamento de Dados da Secretaria Municipal de Saúde de Bom Jesus pelo apoio, incentivo e compreensão dos momentos de ausência.

Aos amigos e colegas que conquistei ao longo deste trajeto pelos momentos de descontração e apoio e que me ajudaram e incentivaram, das mais diferentes formas, em todas as etapas desta conquista.

A todos, muito obrigada.

LIMA, M.P.D. **Desenvolvimento e caracterização de formulações transdérmicas contendo γ -terpineno com atividade antinociceptiva em modelo animal de dor neuropática.** 2018, 174 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, 2018.

RESUMO

A dor é um dos mecanismos adaptativos e protetores mais importantes do corpo, englobando os estágios de transdução, transmissão, percepção e modulação. Especificamente para a dor neuropática, são utilizados fármacos comumente associados a efeitos adversos e tolerância. Diante disso, os produtos naturais como óleos essenciais e seus constituintes, representam alternativas promissoras para o tratamento dessa patologia. Da mesma forma, sistemas microemulsionados para liberação sistêmica de substâncias lipofílicas vêm ganhando destaque no campo da biotecnologia farmacêutica, principalmente quando administrados por via transdérmica. Assim, o presente estudo tem como objetivo desenvolver sistemas microemulsionados contendo γ -terpineno e investigar seu potencial toxicológico e antinociceptivo, por via transdérmica, em modelo animal de dor neuropática. Para a preparação das formulações microemulsionadas foi utilizado um diagrama de fases pseudo-ternário (DFPT) contendo labrasol®, plurool®, miristato de isopropila, γ -terpineno e água. O DFPT mostrou a formação de 15 microemulsões (MEs), das quais foram selecionadas quatro para caracterização e testes de estabilidade termodinâmica. As formulações apresentaram uma taxa de liberação cumulativa acima de 37%, em 24h, revelando um perfil de liberação controlada. As MEs selecionadas para análise foram classificadas como sistemas isotrópicos de óleo em água (condutividade = $9,56 \pm 0,01 \mu\text{S}/\text{cm}$), com gotículas na faixa nanométrica ($124,4 \pm 243,7 \text{ nm}$), índice de polidispersão entre 0,235 e 0,315 e potencial zeta variando entre -28,1 e -55,1. Foi evidenciado que maiores quantidades de fase oleosa produziram formulações com maior estabilidade termodinâmica. Assim, a partir desse estudo foram desenvolvidos sistemas microemulsionados promissores para a liberação controlada de γ -terpineno dos quais dois (F1 e F2) foram submetidos a avaliações de toxicidade e potencial antinociceptivo em camundongos. As formulações transdérmicas na dose de 2000 mg/kg não demonstraram nenhum sinal de toxicidade clínica-comportamental durante 14 dias de avaliação. Foi observado aumento significativo no limiar de retirada da pata na dose de 200 mg/kg das formulações F1 e F2, aos 60 e 120 min após a administração, evidenciando a ação antinociceptiva das formulações. Na avaliação de sensibilidade térmica F2 também mostrou ação antinociceptiva aos 60 min. Em animais submetidos ao tratamento sub-agudo, em protocolo de co-tratamento, ambas as formulações resultaram em aumento do limiar de retirada da pata a partir do 6º dia de tratamento, com exceção do 8º dia, nas doses de 200 mg/kg (F1 e F2) e 400 mg/kg (F2). Já no pós-tratamento, os animais tratados com F1 (100 e 200 mg/kg) a partir do 5º dia de tratamento, F1 (400 mg/kg) e F2 (100 mg/kg) a partir do 7º dia de tratamento e F2 (200 mg/kg) no último dia de tratamento, apresentaram redução do limiar nociceptivo mecânico. Além disso, houve aumento do escore de sensibilidade ao frio em animais tratados com F2 (200 mg/kg) a partir do 7º dia de tratamento e F2 (400 mg/kg) no último dia de tratamento. Assim, pode-se concluir que as formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno, apresentaram atividade antinociceptiva, com efeito terapêutico em administrações agudas e crônicas.

Palavras-chave: γ -terpineno. Monoterpeno. Microemulsão. Via transdérmica. Neuropatia. Dor crônica.

LIMA, M.P.D. **Development and characterization of transdermal formulations containing γ -terpinene with antinociceptive activity in animal model of neuropathic pain.** 2018, 174 p. Doctoral thesis. Postgraduate Program in Biotechnology by the Northeast Network of Biotechnology - RENORBIO, Focal Point Federal University of Piauí - UFPI, Teresina, 2018.

ABSTRACT

Pain is one of the body's most important adaptive and protective mechanisms, encompassing the stages of transduction, transmission, perception and modulation. Specifically for neuropathic pain, drugs commonly associated with adverse effects and tolerance are used. Therefore, natural products such as essential oils and their constituents represent promising alternatives for the treatment of this pathology. In the same way, microemulsion systems for systemic release of lipophilic substances have been highlighted in the field of pharmaceutical biotechnology, especially when administered transdermally. Thus, the present study aims to develop microemulsed systems containing γ -terpinene and to investigate its toxicological and antinociceptive potential, transdermally, in an animal model of neuropathic pain. For the preparation of the microemulsion formulations a pseudo-ternary phase diagram (DFPT) containing labrasol®, pluro®l, isopropyl myristate, γ -terpinene and water was used. DFPT showed the formation of 15 microemulsions (MEs), of which four were selected for characterization and tests of thermodynamic stability. The formulations had a cumulative release rate above 37% in 24 hours, revealing a controlled release profile. The MSs selected for analysis were classified as isotropic oil-in-water systems (conductivity = $9.56 \pm 0.01 \mu\text{S} / \text{cm}$), with droplets in the nanometric range ($124.4 \pm 243.7 \text{ nm}$), polydispersity index between 0.235 and 0.315 and zeta potential ranging from -28.1 to -55.1. It was evidenced that higher amounts of oil phase produced formulations with greater thermodynamic stability. Thus, promising microemulsion systems for the controlled release of γ -terpinene were developed from which two (F1 and F2) were submitted to toxicity and antinociceptive potential evaluations in mice. Transdermal formulations at the dose of 2000 mg / kg showed no sign of clinical behavioral toxicity during 14 days of evaluation. A significant increase in the paw withdrawal threshold was observed at the dose of 200 mg / kg formulations F1 and F2 at 60 and 120 min after administration, evidencing the antinociceptive action of the formulations. In the evaluation of thermal sensitivity F2 also showed antinociceptive action at 60 min. In animals submitted to sub-acute treatment in a co-treatment protocol, both formulations resulted in an increase in the paw withdrawal threshold from the 6th day of treatment, except for the 8th day, at doses of 200 mg / kg (F1 and F2) and 400 mg / kg (F2). In the posttreatment, F1-treated animals (100 and 200 mg / kg) from the 5th day of treatment, F1 (400 mg / kg) and F2 (100 mg / kg) from the 7th day of treatment F2 (200 mg / kg) on the last day of treatment, presented mechanical nociceptive threshold reduction. In addition, there was an increase in the cold sensitivity score in animals treated with F2 (200 mg / kg) from the 7th day of treatment and F2 (400 mg / kg) on the last day of treatment. Thus, it can be concluded that the microemulsion formulations containing γ -terpinene, presented antinociceptive activity, with therapeutic effect in acute and chronic administrations.

Key-words: γ -terpinene. Monoterpene. Microemulsion. Transdermal route. Neuropathy. Chronic pain.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Estrutura química do γ -terpineno	21
Figura 2: Organização esquemática do trabalho de tese.....	21

Revisão de Literatura

Figura 1: Circuito de mediação da dor fisiológica. As setas indicam o sentido ascendente da condução do estímulo doloroso.....	35
Figura 2: Via descendente da nocicepção (sistema opioide).....	37
Figura 3: Estrutura química do γ -terpineno	40
Figura 4. Tipos de microemulsões: A- óleo em água; B- bicontínua; C- água em óleo. Fase oleosa – cinza; Fase aquosa – branca.	44

Capítulo 1

Figura 1: Diagrama da pesquisa e triagem das patentes analisadas	66
--	----

Capítulo 2

Figura 1. Estrutura de célula de difusão de Franz	113
Figura 2. Diagrama de fases pseudo-ternário para o sistema contendo Labrasol + Plurol (Tensoativo/Co-tensoativo), miristato de isopropila + γ -terpineno (fase oleosa) e água.....	115
Figura 3. Sistemas obtidos a partir do DFPT de acordo com a classificação utilizada. A: emulsão branco-leitosa; B: emulsão branco-fluida; C: emulsão líquido opaca; e D: microemulsão.	116
Figura 4. Aspecto visual das micromulsões após o estresse térmico (A-antes e B-depois) e ciclo gelo-degelo (C-antes e D-depois).....	118
Figura 5. Viscosidade média das formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno nos tempos T0 (F1A, F2A, F3A e F4A) e T12 (F1B, F2B, F3B e F4B) frente ao ensaio de estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo)	124
Figura 6. Fotomicrografias de formulações contendo γ -terpineno e formulação veículo.....	125
Figura 7. Perfil de liberação <i>in vitro</i> de formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno	126
Figura 8. Curva de calibração para quantificação de γ -terpineno	127

Capítulo 3

Figura 1. Histopatologia da pele fina de camundongos expostos à administração transdérmica de formulações microemulsionadas de γ -terpineno (2000 mg/kg).....	152
Figura 2. Efeito do tratamento agudo com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do nervo ciático.....	153

Figura 3. Efeito do tratamento agudo com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o escore de sensibilidade térmica ao frio em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.....	154
Figura 4. Efeito do tratamento sub-agudo (co-tratamento) com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do nervo ciático.....	155
Figura 5. Efeito do tratamento sub-agudo (pós-tratamento) com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do nervo ciático.....	156
Figura 6. Efeito do tratamento sub-agudo (pós-tratamento) com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o escore de sensibilidade térmica ao frio em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.....	156
Figura 7. Efeito antioxidante de formulações transdérmicas de γ -terpineno em soro sanguíneo de camundongos com neuropatia induzida por ligadura parcial do nervo ciático.....	157
Figura 8. Efeito de formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre a atividade locomotora e relaxante muscular.....	158

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1	Eventos adversos de fármacos no tratamento de dor.....	38
----------	--	----

Capítulo 1

Tabela 1	Relação de patentes sobre microemulsão transdérmica para o tratamento da dor.....	83
----------	---	----

Capítulo 2

Tabela 1	Composição das formulações de sistemas de ME formados a partir do diagrama de fases pseudo-ternário.....	117
Tabela 2	Características físico-químicas das microemulsões contendo γ -terpineno nos tempos T0 e T12 frente ao ensaio de estabilidade preliminar.....	120
Tabela 3	Tamanho da gotícula, PDI e Potencial Zeta das microemulsões contendo γ -terpineno nos tempos T0 e T12 frente ao ensaio de estabilidade preliminar....	121
Tabela 4	Escolha da fase receptora para a cinética de liberação <i>in vitro</i> através da quantificação de γ -terpineno em meios de solubilização.....	125
Tabela 5	Valores da taxa de fluxo (J_{ss}) e do coeficiente de regressão (r^2) para a análise dos dados de liberação utilizando as equações cinéticas de ordem zero, primeira ordem e Higuchi.....	127

Capítulo 3

Tabela 1	Parâmetros clínico-comportamentais da análise da toxicidade aguda de formulações microemulsionadas de γ -terpineno (F1, F2 e veículo, 2000 mg/kg, via transdérmica).....	150
Tabela 2	Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos tratados com de formulações microemulsionadas de γ -terpineno (2000 mg/kg, via transdérmica, n = 5).....	151
Tabela 3	Avaliação da massa relativa dos órgãos de camundongos tratados com formulações de γ -terpineno (2000 mg/kg, via transdérmica, n = 5)	151

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
A61K	Preparações para Finalidades Médicas, Odontológicas ou Higiênicas.
AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
ACC	Córtex Singulado Anterior
ALT	Alanina transaminase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASIC	Canais Iônicos Sensíveis à Ácido
AST	Aspartato transaminase
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BR	Brasil
CAT	Catalase
CaV	Canal de Cálcio
CD	Ciclodextrina
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CH	Suiça
CN	China
COX	Ciclooxigenase
CPNC	Compressão parcial do nervo ciático
DAP	Diâmetro à Altura do Peito
DFPT	Diagrama de Fases Pseudo-ternário
DIU	Dispositivo Intrauterino
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBL	Emulsão Branco Leitosa
EBF	Emulsão Branco Flúida

EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
ELO	Emulsão Líquido Opaca
EPM	Erro padrão da média
EPO	European Patent Office
EUA	Estados Unidos da América
HMDS	Hexametildissiloxano
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
GSH	Glutathiona Reduzida
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	Interleucina
IN	Inglaterra
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IP	Intraperitoneal
IPP	Isopentenil Difosfato
IR	Índice de Refração
J_{ss}	Fluxo no Estado Estacionário
kJ	Kilojoule
K_r	Coefficiente de Liberação
LIMAV	Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados
LMN	Limiar nociceptivo mecânico
LSS	Labrasol ©
MDA	Mmalondialdeído Sérico
ME	Microemulsão
mGlutRI	Receptores Metabotrópicos Distintos de Glutamato I
mGlutR5	Receptores Metabotrópicos Distintos de Glutamato 5
NaV	Canal de Sódio dependente de Voltagem
NIH	Consórcio de Dor dos Institutos Nacionais de Saúde (EUA)
NMDA	N-metil-D-Aspartato

NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
NPPM	Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais
P38 MAPK	Proteína-cinase Ativada por Mitógeno P38
PDI	Índice de Polidispersão
PLA2	Fosfolipase A2
PE	Prostaglandina E
PIT	<i>Phase Inversion Temperature</i>
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandinas E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
r²	Coefficiente de Regressão
RPM	Rotação por Minuto
RNA	Ácido ribonucleico
SD	Desvio Padrão
SF	Separação de Fases
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
WO	Patente Internacional
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
TRPV1	Canal do Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1
US	<i>United States</i>
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>
ZnO	Óxido de Zinco
γ_i	Tensão Interfacial
ΔG	Variação da Energia de Gibbs
ΔS	Variação da Área Superficial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
REFERÊNCIAS	22
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Geral.....	28
2.2 Específicos.....	28
3. REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1 Dor: conceito, classificação e prevalência.....	30
3.2 Mecanismos fisiológicos e moleculares da nocicepção.....	31
3.3 Sensibilização de nociceptores periféricos	33
3.4 Projeções das fibras nociceptivas na medula espinhal.....	34
3.5 Tratamento farmacológico da dor.....	36
3.5.1 Plantas medicinais e seus constituintes.....	38
3.5.1.1 Gama-terpineno	39
3.5.2 Microemulsões.....	40
3.5.3 Via transdérmica	44
REFERÊNCIAS	46
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICROEMULSÕES COM PERSPECTIVAS PARA O TRATAMENTO DA DOR: UMA REVISÃO DE PATENTES	62
RESUMO	62
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1 Desenvolvimento de sistemas microemulsionados.....	66
3.2 Óleos vegetais em Microemulsões	70
3.3 Microemulsões para entrega de AINES.....	72
3.4 Microemulsões e a via transdérmica de administração	77
3.5 Outras substâncias incorporadas em microemulsões.....	80
3.6 Opinião dos especialistas	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DE MICROEMULSÕES CONTENDO γ - TERPINENO	105
RESUMO	105

ABSTRACT	105
1. INTRODUÇÃO.....	106
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	108
2.1 Material.....	108
2.2 Construção do diagrama de fases e preparação das MEs	108
2.3 Caracterização das microemulsões	109
2.3.1 Características organolépticas.....	109
2.3.2 Determinação de pH	110
2.3.3 Índice de refração.....	110
2.3.4 Condutividade elétrica	110
2.3.5 Tamanho de gotícula.....	110
2.3.6 Viscosidade	111
2.3.7 Microscopia de luz polarizada	111
2.4 Estabilidade Preliminar.....	112
2.5 Escolha da fase receptora (condição “ <i>sink</i> ”) e Cinética de liberação <i>in vitro</i>	112
2.5.1 Parâmetros da varredura espectrofotométrica.....	113
2.5.2 Modelo cinético de liberação	114
2.6 Análise estatística	114
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.1 Construção do DFPT	115
3.2 Testes de estabilidade	118
3.3 Propriedades físico-químicas das formulações.....	119
3.3.1 pH, Condutividade, Índice de refração e Teor.....	119
3.3.2 Tamanho da Gotícula, PDI e Potencial Zeta.....	121
3.3.3 Viscosidade.....	123
3.3.4 Microscopia de luz polarizada	124
3.4 Escolha da fase receptora.....	125
3.5 Cinética de liberação das formulações contendo γ -terpineno.....	126
4. CONCLUSÃO.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ATIVIDADE ANTONOCICEPTIVA DE MICROEMULSÕES TRANSDÉRMICAS DE γ -TERPINENO EM MODELO DE CONSTRIÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO.....	140
RESUMO	140
ABSTRACT	140
1. INTRODUÇÃO.....	141

2.	METODOLOGIA.....	143
2.1	Obtenção do γ -terpineno livre e formulações microemulsionadas	143
2.2	Animais	143
2.3	Administração transdérmica	144
2.4	Avaliação da toxicidade aguda da formulação transdérmica.....	144
2.5	Avaliação antinociceptiva de formulações transdérmicas de γ -terpineno	145
2.5.1	Indução da neuropatia por compressão parcial do nervo ciático	145
2.5.2	Testes comportamentais de nocicepção	146
2.5.3	Esquema de tratamento e protocolo de avaliação aguda	147
2.5.4	Esquema de tratamento e protocolos de avaliação sub-aguda	147
2.6	Investigação de atividade antioxidante de formulações transdérmicas de γ -terpineno	148
2.6.1	Preparação das amostras	148
2.6.2	Determinação da GSH	148
2.6.3	Determinação de MDA	148
2.7	Avaliação do efeito das formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre a atividade locomotora e relaxante muscular.....	148
2.7.1	Teste do Rota-Rod	148
2.7.2	Teste do Campo Aberto	149
2.8	Análise estatística	149
3.	RESULTADOS	149
3.1	Avaliação comportamental no teste de toxicidade aguda das formulações... ..	149
3.2	Avaliação histopatológica das amostras no teste de toxicidade aguda.....	151
3.3	Atividade antinociceptiva das formulações contendo γ -terpineno	152
3.4	Avaliação Antioxidante	157
3.5	Campo aberto e Rota rod	158
4.	DISCUSSÃO	159
5.	CONCLUSÃO.....	162
	REFERÊNCIAS	162
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	168
	PERSPECTIVAS	170
	APÊNDICE 1 – Patente em processo.....	172
	APÊNDICE 2 – Artigo Aceito	173
	APÊNDICE 3 – Artigo Submetido.....	174

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A dor é considerada um problema mundial de saúde que resulta em enormes prejuízos sociais e econômicos (SCHOPFLOCHER; TAENZER; JOVEY, 2011; GASKIN; RICHARD, 2012). Van-Hecke et al. (2014) apontam uma prevalência de dor na população mundial de 6,9% a 10%. Estima-se que mais de 100 milhões de americanos sofrem de dor crônica (DZAU; PIZZO, 2014).

A dor é iniciada em decorrência da percepção de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos que sejam de intensidade suficiente para causar danos nos tecidos ou de qualidade que indiquem este dano. Ao perceberem esses estímulos, neurônios aferentes primários especializados e seus terminais nociceptores, transduzem esta informação através de potenciais de ação e liberação de neurotransmissores através do corno dorsal da medula espinhal, para posterior transmissão às estruturas supra-espinhais e, finalmente, para o cérebro (MERTENS et al., 2015).

De acordo com a sua duração, a dor pode ser classificada em aguda, de curta duração e frequentemente relacionada à lesão aguda ou trauma, atuando como um sistema de alerta no corpo, e crônica, uma condição patológica contínua ou intermitente com duração superior a três meses, que continua após o tempo previsto para a cicatrização dos tecidos (AZEVEDO et al., 2012; ORR; SHANK; BLACK, 2017).

A dor crônica está comumente associada a vários processos patológicos, incluindo condições psicológicas, diabetes e neoplasias (ELLISON, 2017; DAUGHERTY et al., 2018; NAWAZ et al., 2018; DAVIS, 2018). Considerando mecanismos fisiopatológicos, a dor crônica é comumente classificada como dor neuropática e surge de atividade neural anormal secundária a doença, lesão ou disfunção do sistema nervoso (KUMAR; KAUR; SINGH, 2018).

Atualmente, o tratamento medicamentoso da dor inclui drogas opióides, anticonvulsivantes, antidepressivos, anestésicos locais e inibidores seletivos da recaptção de serotonina e norepinefrina, que levam muitas vezes a reações adversas, desenvolvimento de tolerância, dependência e baixa eficácia. O avanço na compreensão de mecanismos subjacentes à dor neuropática levou à identificação de novos alvos intimamente relacionados à dor (YAN et al., 2017). Paralelamente, abordagens biotecnológicas baseadas em micro e nanosistemas se mostram alternativas promissoras para o tratamento da dor neuropática (BERROCOSO et al., 2017; JANJIC et al., 2018).

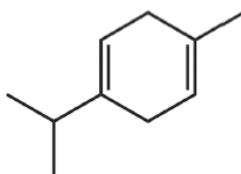
Nos últimos anos, as microemulsões atraíram interesse considerável para uso como potenciais sistemas de administração de medicamentos devido à sua fácil preparação, estabilidade, baixa viscosidade e melhoramento da solubilidade do fármaco por sua capacidade de incorporar uma ampla gama de fármacos com diferentes lipofilidades (CALLENDER et al., 2017; PINEROS et al., 2017; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2018).

Tem sido relatado na literatura, inúmeras atividades farmacêuticas e biológicas de óleos essenciais e seus constituintes como propriedades antinociceptivas, antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antimutagênicas, antidiabéticas, antivirais, antiinflamatórias e antiprotozoárias. Óleos essenciais são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, dentre os quais se destacam os terpenóides e os fenilpropanóides, principais constituintes que proporcionam aroma característico e propriedades biológicas aos óleos essenciais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; PARK et al., 2015).

A classe dos terpenoides inclui algumas das substâncias mais abundantes dos óleos essenciais. De acordo com o número de unidades de isopreno, o terpeno pode ser denominado monoterpeno, sesquiterpeno, diterpeno, sesterterpeno, triterpeno, tetraterpeno ou politerpeno (EL-ZAEDDI et al., 2016; KHAYYAT; ROSELIN, 2018). Monoterpenos estão entre os principais constituintes do óleo essencial de diversas plantas (cerca de 90%), e possuem atividades farmacológicas já descritas na literatura. A atividade antinociceptiva de monoterpenos como o citral (NISHIJIMA et al., 2014), o borneol (ALMEIDA et al., 2013), o linalol (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011) e o citronelol (BRITO et al., 2012; SANTOS et al., 2016) já foi evidenciada.

O γ -terpineno (1-isopropil-4-metilciclohexa-1,4-dieno), com fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ (**Figura 1**), é um monoterpeno muito comum em plantas aromáticas como *Origanum majorana* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Juniperus communis* L., *Lavandula latifolia* Medik, *Mentha spicata* L. e *Zingiber officinale* Roscoe (ERCIOGLU; VELIOGLU; BOYACI, 2018), com evidências de atividade antinociceptiva com ações sobre os sistemas opióide e colinérgico (PASSOS et al., 2015).

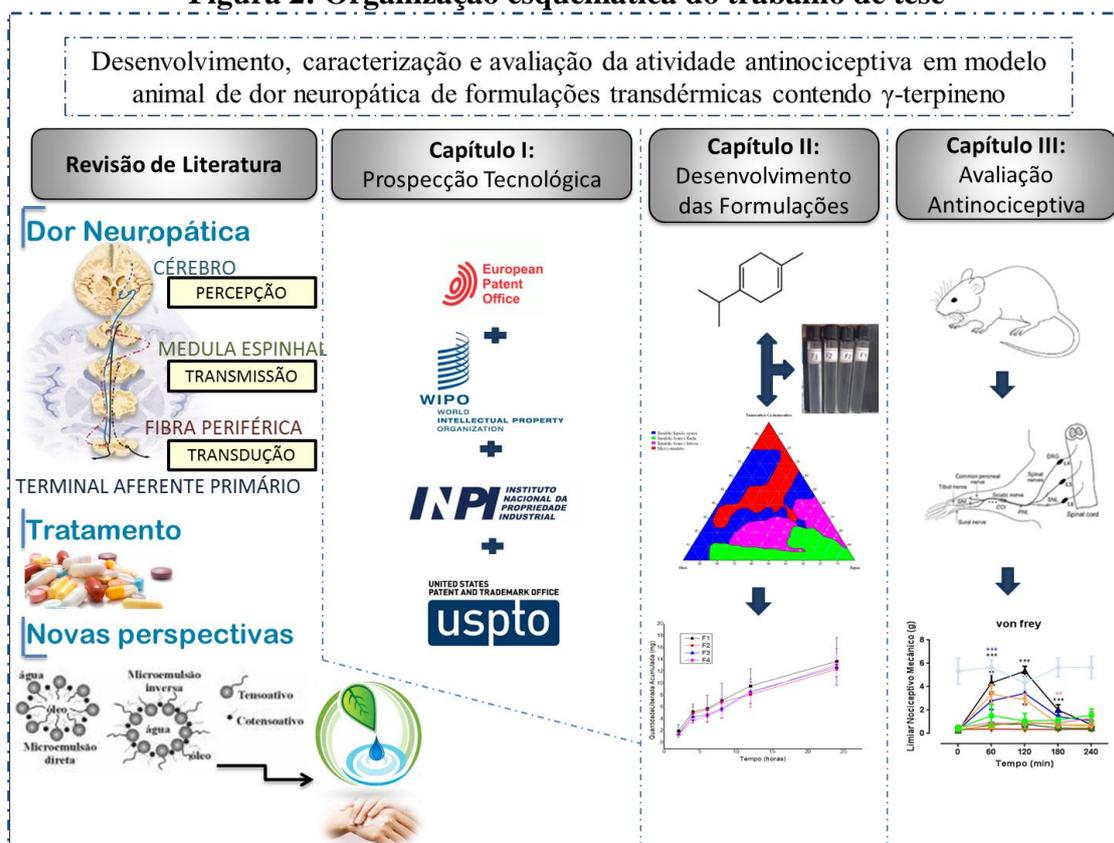
Figura 1: Estrutura química do γ -terpineno



Fonte: Aschmann; Arey; Atkinson, 2011.

Dessa forma, considerando o potencial terapêutico do γ -terpineno e a promissora ferramenta biotecnológica de sistemas microemulsionados, nesta tese foram desenvolvidas e analisadas microemulsões contendo esse monoterpene, avaliando sua atividade antinociceptiva no modelo de dor neuropática induzido por ligadura do nervo ciático em camundongos. A presente tese está apresentada em capítulos e a descrição resumida do que foi abordado em cada seção pode ser observada na Figura 2.

Figura 2: Organização esquemática do trabalho de tese



Inicialmente, foi realizada uma revisão de literatura científica, abordando a dor neuropática, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, os tratamentos convencionalmente aplicados e novas perspectivas terapêuticas.

O primeiro capítulo apresenta uma prospecção tecnológica com vistas a identificar os depósitos de patentes relacionados ao desenvolvimento de microemulsões para uso no tratamento de dor neuropática, por via transdérmica. Foram investigados depósitos de patentes de quatro bases de dados, evidenciando a crescente utilização de microemulsões como carreadoras de fármacos.

O segundo capítulo descreve o processo de desenvolvimento de formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno. Neste capítulo são apresentados testes de caracterização físico-química e estabilidade das microemulsões. Conforme os resultados obtidos, foram selecionadas quatro formulações para realização dos testes de cinética de liberação *in vitro* a fim de identificar o perfil de liberação cinética do γ -terpineno das formulações-teste e, posteriormente, realizar os testes *in vivo* expostos no capítulo III. Note-se, portanto, que os capítulos II e III se complementam.

Assim, o terceiro capítulo apresenta o estudo das propriedades antinociceptivas de duas formulações microemulsionadas de γ -terpineno, por via transdérmica, 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. Além disso, foi realizado um teste de toxicidade dérmica das formulações.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.R.G.S.; SOUZA, G.R.; SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.G.L.; JÚNIOR, R.G.O.; QUINTANS, J.S.S.; BARRETO, R.S.S.; BONJARDIM, L.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; QUINTANS, L.J. Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. **The Scientific World Journal**, v.2013, 808460, 5 pages, 2013.

ASCHMANN, S.M.; AREY, J.; ATKINSON, R. Formation of p-cymene from OH β γ -terpinene: H-atom abstraction from the cyclohexadiene ring structure. **Atmospheric Environment**, v.45, 4408-4411, 2011.

AZEVEDO, L.F.; COSTA-PEREIRA, A.; MENDONÇA, L.; DIAS, C.C.; CASTRO-LOPES, J.M. Epidemiology of chronic pain: a population-based nationwide study on its prevalence, characteristics and associated disability in Portugal. **Journal of Pain**, v.13, p.773–783, 2012.

BERROCOSO, E.; REY-BREA, R.; FERNÁNDEZ-ARÉVALO, M.; MICÓ, J.A.; MARTÍN-BANDERAS, L. Single oral dose of cannabinoid derivate loaded PLGA nanocarriers relieves neuropathic pain for eleven days. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.13, p.2623–2632, 2017.

BRITO, R.G.; GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.S.; SANTOS, M.R.V.; SOUSA, D.P.; BADAUE-PASSOS, D.; LUCCA, W.; BRITO, F.A.; BARRETO, E.O.; OLIVEIRA, A.P.; QUINTANS, L.J. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of Natural Medicines**, v.66, p.637–644, 2012.

CALLENDER, S.P.; MATHEWS, J.A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S.D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.526, p.425–442, 2017.

DAUGHERTY, D.J.; MARQUEZ, A.; CALCUTT, N.A.; SCHUBERT, D. A novel curcumin derivative for the treatment of diabetic neuropathy. **Neuropharmacology**, v.129, p. 26-35, 2018.

DAVIS, M.P. Cancer-Related Neuropathic Pain: Review and Selective Topics. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 32, p. 417–431, 2018.

DZAU, V.J.; PIZZO, P.A. Relieving pain in America: Insights from an institute of medicine committee. **Journal of the American Medical Association**, v. 312, p.1507-1508, 2014.

ELLISON, D.L. Physiology of Pain. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 29, p. 397-406, 2017.

EL-ZAEDDI, H.; MARTÍNEZ-TOMÉ, J.; CALÍN-SÁNCHEZ, A.; BURLÓ, F.; CARBONELL-BARRACHINA, A.A. Volatile composition of essential oils from different aromatic herbs grown in mediterranean regions of Spain. **Foods**, v.5, p. 41-54, 2016.

ERCIOGLU, E.; VELIOGLU, H.N.; BOYACI, I.H. Determination of terpenoid contents of aromatic plants using NIRS. **Journal Talanta**, v.178, p.716–721, 2018.

GASKIN, D.J.; RICHARD, P. The economic costs of pain in the United States. **Journal of Pain**, v. 13, n.8, p. 715–724, 2012.

JANJIC, J.M.; VASUDEV, K.; SALEEM, M.; STEVENS, A.; LIU, L.; PATEL, S.; POLLOCK, J.A. Low-dose NSAIDs reduce pain via macrophage targeted nanoemulsion delivery to neuroinflammation of the sciatic nerve in rat. **Journal of Neuroimmunology** v. 318, p.72–79, 2018.

KHAYYAT, S.A.; ROSELIN, L.S. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2018.

KUMAR, A.; KAUR, H.; SINGH, A. Neuropathic Pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 70 p. 206–216, 2018.

MERTENS, P.; BLONDC, S.; DAVIDD, R.; RIGOARD, P. Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: a focus on low back pain (part A). **Neurochirurgie**, v.61, S22–S34, 2015.

NAWAZ, N.U.A.; SAEED, M.; RAUF, K.; USMAN, M.; ARIF, M.; ULLAH, Z.; RAZI, N. Antinociceptive effectiveness of *Tithonia tubaeformis* in a vincristine model of chemotherapy-induced painful neuropathy in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1043–1051, 2018.

NISHIJIMA, C.M.; GANEV, E.G.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D.F.; ROCHA, L.R.M.; SANTOS, A.R.S.; HIRUMA-LIMA, C.A. Citral: A monoterpene

with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v.736, p.16–25, 2014.

ORR, P.M.; SHANK, B.C.; BLACK, A.C. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *critical Care Nursing Clinic of North America*, v.29, p.407–418, 2017.

PARK, Y.; JUNG, S.M.; YOO, S.A.; KIM, W.U.; CHO, C.S.; PARK, B.J.; WOO, J.M.; YOON, C.H. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* in mice. **Journal International Immunopharmacology**, v. 29, p.320–325, 2015.

PASSOS, F.F.B.; LOPES, E.M.; ARAÚJO, J.M.; SOUSA, D.P.; VERAS, L.M.C.; LEITE, J.R.S.A.; ALMEIDA, F.R.C. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, Article ID 829414, 9 pages, 2015.

PINEROS, I.; SLOWING, K.; SERRANO, D.R.; PABLO, E.; BALLESTEROS, M.P. Analgesic and anti-inflammatory controlled-released injectable microemulsion: Pseudo-ternary phase diagrams, in vitro, ex vivo and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, p.220–227, 2017.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; ROCHA, R.F.; CAREGNATO, F.F.; MOREIRA, J.C.F.; SILVA, F.A.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS, J.P.A.; MELO, M.S.; SOUSA, D.P.; BONJARDIM, L.R.; GELAIN, D.P. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. **Journal of Medicinal Food**, v.14, p. 630-639, 2011.

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

SANTOS, P.L.; BRITO, R.G.; OLIVEIRA, M.A.; QUINTANS, J.S.S.; GUIMARÃES, A.G.; SANTOS, M.R.V.; MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; ARAÚJO, A.A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Docking,

characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine**, v.23, p.948–957, 2016.

SCHOPFLOCHER, D.; TAENZER, P.; JOVEY, R. The prevalence of chronic pain in Canada. **Pain Research and Management**, v. 16, p. 445–450, 2011.

VAN-HECKE; AUSTIN, S.K.; KHAN, R.A.; SMITH, B.H.; TORRANCE, N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v.155, p.654–662, 2014.

YAN, Y.Y.; LI, C.Y.; ZHOU, L.; AO, L.Y.; FANG, W.R.; LI, Y.M. Research progress of mechanisms and drug therapy for neuropathic pain. **Life Sciences**, v.190, p. 68–77, 2017.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B.B. Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v.536, p.345–352, 2018.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

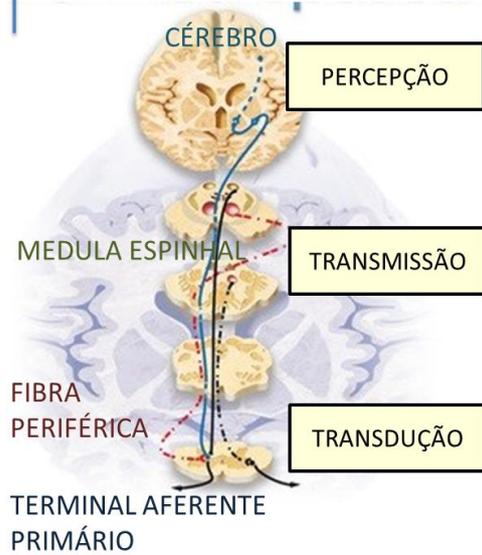
Investigar o potencial toxicológico e antinociceptivo de sistemas microemulsionados contendo γ -terpineno, por via transdérmica, em modelo animal de dor neuropática.

2.2 Específicos

- Investigar o estado da arte sobre o depósito de patentes relacionadas a sistemas microemulsionados como carreadores de monoterpenos para o tratamento da dor fundamentando o desenvolvimento de produto biotecnológico com esse enfoque;
- Construir um diagrama de fases pseudo-ternário para obtenção e identificação das regiões de microemulsão com a inclusão de γ -terpineno na fase oleosa;
- Caracterizar os sistemas obtidos, contemplando análises de pH, densidade, condutividade, índice de refração, tamanho das gotículas e potencial zeta;
- Avaliar a influência do γ -terpineno sobre a estabilidade preliminar de sistemas microemulsionados.
- Investigar o potencial toxicológico de microemulsões contendo γ -terpineno através do estudo de exposição dérmica aguda;
- Avaliar o efeito agudo e subagudo de microemulsões contendo γ -terpineno no modelo de neuropatia por compressão parcial do ciático;
- Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva na neuropatia por lesão do ciático (avaliação antioxidante);
- Determinar o efeito de microemulsões contendo γ -terpineno sobre a atividade locomotora e coordenação motora em camundongos.

Revisão de Literatura

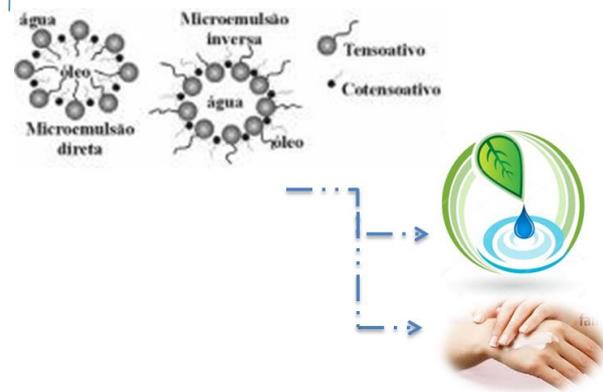
Dor Neuropática



Tratamento



Novas perspectivas



3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Dor: conceito, classificação e prevalência

A dor é uma experiência subjetiva individualizada, modulada por eventos passados, fatores genéticos, fisiológicos, psicológicos, sociais, culturais e ambientais. Pode ser classificada de acordo com a duração, mecanismo, localização e intensidade. Quanto à duração, ela pode ser aguda ou crônica. A dor aguda é geralmente curta e persiste apenas pelo período de duração do dano tecidual, representando uma reação fisiológica natural do organismo (CORMICK; LAW, 2016).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor crônica como aquela que persiste além do tempo normal de cicatrização do tecido (geralmente acima de 3 meses). De acordo com o Consórcio de Dor do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH), a dor crônica pode ser considerada de alto impacto ou persistente quando "causa restrição substancial da participação nas atividades trabalhistas, sociais e de autocuidado por seis meses ou mais" (DEYO et al, 2014; VON-KORFF et al., 2016).

A dor neuropática se constitui em uma categoria de dor crônica definida pela IASP como "dor causada por uma lesão ou disfunção do sistema nervoso somatossensorial", que geralmente está associada a processos patológicos coexistentes, o que dificulta o tratamento (MERSKEY; BOGDUK, 1994; KUMAR; KAUR; SINGH, 2018). As características específicas da dor neuropática incluem a presença de alodinia (dor frente a um estímulo que normalmente não provocaria dor), hiperalgesia (aumento da sensibilidade à dor), além de sintomas como fraqueza, dormência e/ou formigamento (CORMICK; LAW, 2016).

A dor aguda pode tipicamente sinalizar danos corporais e iniciar respostas protetoras como mecanismos de hipervigilância (MEULDERS; VANDAEL; VLAEYEN, 2017). Entretanto, a dor crônica pode causar impactos psicossociais, afetar negativamente o desempenho físico (síndrome de incapacidade e desuso), o humor (depressão e ansiedade) e diminuir a auto-estima. Naturalmente, os indivíduos diferem de forma considerável no grau em que a gravidade da dor interfere nas atividades sociais (SCHAEFER et al., 2011; TUBACH et al., 2012; MEULDERS; BENNETT, 2018).

Diversos estudos tem sido realizados com o objetivo de obter informações sobre os tratamentos disponíveis para os sintomas de dor, seu uso, custos e eficácia

(HOOTEN; COHEN, 2015; MOTOV; NELSON, 2016; RIDDERIKHOF et al., 2018), bem como, para acompanhar as mudanças na prevalência ao longo do tempo (NAHIN, 2015; VON-KORFF et al, 2016), permitindo a avaliação das intervenções à nível de população e a identificação das necessidades emergentes.

As estimativas de prevalência para dor crônica variam amplamente, com valores mundiais de 30% a mais de 50% (FAYAZ et al., 2016). Sabe-se que mais de 40% da população americana adulta sofre de dor crônica ou recorrente. No entanto, estimativas de prevalência de dor crônica severa e incapacitante variam de 6% a 14% na população em geral (NAHIN, 2015), o que diminui a produtividade laboral das pessoas e gera consideráveis custos financeiros (GASKIN; RICHARD, 2012).

Também existe variação das estimativas da prevalência da dor crônica de acordo com a definição operacional do estado crônico. A definição de "dor persistente" é uma maneira mais consistente e precisa de medir a qualidade de vida relacionada à saúde. Estima-se que cerca de 39,4 milhões de adultos nos EUA relataram dor persistente em 2010 (KENNEDY et al., 2014).

No Brasil, Cabral et al. (2014) realizaram um levantamento epidemiológico transversal para determinar a prevalência de dor crônica e identificar fatores associados em pessoas com 15 anos ou mais de um segmento da cidade de São Paulo. Os autores observaram uma prevalência de 42% de dor crônica, sendo que os participantes apresentaram intensidade média de dor de 5,9 e incapacidade relacionada à dor de 4,1, numa escala de 0 a 10. Dor persistente esteve presente em 68,6% dos pacientes com dor crônica, e 32,8% da amostra da população apresentaram dor de alta intensidade ou alta interferência, o que afeta negativamente a qualidade de vida dos indivíduos.

No estudo associou-se a dor crônica com fatores como gênero feminino, idade igual ou superior a 30 anos, sintomas compatíveis com ansiedade e esforço físico intenso. Esses dados corroboram com o descrito por Gatchel et al. (2018) que afirmam que fatores biológicos como a idade, bem como, fatores psicossociais podem iniciar, manter e modular as respostas físicas ao estímulo doloroso.

3.2 Mecanismos fisiológicos e moleculares da nocicepção

A nocicepção pode ser dividida em quatro etapas: transdução, transmissão, percepção e modulação. A transdução é o processo de conversão de estímulos para os

potenciais de ação neuronal no receptor sensorial. A transmissão refere-se à propagação de potenciais de ação ao longo dos neurônios do receptor periférico para a medula espinhal e, em seguida, centralmente para o cérebro. A percepção ocorre contemporaneamente à integração do sinal no nível cortical do cérebro. Este processo envolve então várias regiões corticais, denominadas como matriz de dor, que influenciam todos os componentes da sensação de dor. O mecanismo complexo pelo qual a transmissão sináptica de sinais dolorosos é modificada é chamado de modulação (YAN et al., 2017).

Podem ser destacadas três porções do sistema nervoso que são responsáveis pela sensação e percepção da dor: I- as vias aferentes, que começam no sistema nervoso periférico, viajam para o nível da coluna vertebral no corno dorsal e depois se elevam para centros superiores no sistema nervoso central (SNC); II- os centros de integração localizados no tronco cerebral, diencéfalo e córtex cerebral; III- as vias eferentes que descem do SNC de volta à medula espinhal (MERTENS et al., 2015).

A entrada aferente de alta frequência ativa várias proteínas quinases nos neurônios da coluna vertebral, aumentando o efeito pós-sináptico da liberação de glutamato. Durante a despolarização persistente, o receptor de glutamato (N-metil-D-aspartato [NMDA]) é ativado, aumentando a concentração intracelular de cálcio. Este processo inicia várias cascatas de neurotransmissores e liberação de óxido nítrico (NO), através da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (SETH; GRAY, 2016).

A liberação de prostaglandinas (PGE2) pode ativar os canais de cálcio pré-sinápticos, através da cinase ativada por mitógenos P38 (P38 MAPK), fosfolipase A2 (PLA2) e ciclooxigenase (COX). Assim, inibidores de COX que inibem a enzima COX-2 bloqueiam a liberação de prostaglandinas e reduzem a hiperalgesia evocada por lesões (BROWN et al., 2015).

Durante a neurotransmissão realizada por nociceptores aferentes primários o processo de despolarização da membrana requer várias etapas adicionais geralmente referidas como iniciação do pico, propagação do potencial de ação e liberação do transmissor (MERTENS et al., 2015). Cada uma dessas etapas requer uma série de canais iônicos distintos posicionados com precisão em toda a membrana plasmática. A inter-relação entre cito-arquitetura e composição do canal iônico ou propriedades dos nociceptores resulta em uma capacidade extraordinária para codificar as propriedades

espaciais, temporais e de intensidade dos estímulos nocivos (CATERINA; GOLD; MEYER, 2005).

Após a lesão nervosa, há significativa regulação ascendente de uma variedade de canais de sódio (NaV 1.1 a NaV 1.9) no neuroma e no gânglio da raiz dorsal (GRD) dos axônios lesionados (LUIZ; WOOD, 2016; MINETT et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2009).

O estado de polarização dos terminais nervosos é regulado por canais de potássio. No potencial de ação, a abertura do canal de potássio leva à repolarização da membrana e, assim, reduz a probabilidade de descarga repetitiva. Ressalta-se também que vários canais de cálcio dependentes de voltagem (CaV) são expressos no GRD e sua regulação ascendente é percebida em situações de dor neuropática. Os canais de cálcio servem como transportadores de carga e podem levar ao aumento do influxo de cálcio (BUSSEROLLES et al., 2016; FOSSAT et al., 2010).

Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares subjacentes à condução nociceptiva mecânica. Apesar disso, são identificados vários canais de íons mecanosensoriais relacionados à transdução de estímulos mecânicos dolorosos, incluindo membros das famílias ASIC (LI; XU, 2015) e TRPV (LABUZ et al., 2016).

3.3 Sensibilização de nociceptores periféricos

Alterações nas propriedades de resposta a estímulos mecânicos e térmicos são resultantes da sensibilização de nociceptores periféricos mediada por alterações no processamento central da entrada sensorial (VON-HEHN; BARON; WOOLF, 2012).

No caso da dor espontânea, estímulos normalmente não-nocivos ativam o receptor sensibilizado devido a uma diminuição no limiar de resposta. O potencial de ação no terminal periférico resulta na liberação local do conteúdo do terminal aferente para fibras C, por exemplo, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P, que leva ao extravasamento plasmático (inchaço) e vasodilatação (vermelhidão) (BROWN et al., 2015).

Mecanismos periféricos em termos de sensibilização aos nociceptores resultam em hiperalgesia primária. Já a ativação de mecanorreceptores de baixo limiar através de uma mudança na modalidade da sensação evocada por estímulos não-nocivos (alodinia),

associada à sensibilidade à estímulos nocivos hiperativantes (hiperalgesia), caracterizam a hiperalgesia secundária. Ambas as mudanças são mediadas por alterações no processamento central da entrada sensorial (KREMER et al., 2016).

Células ativadas não neuronais, incluindo a microglia, podem estar envolvidas no mecanismo de alodinia. Populações substanciais de astrócitos e microglia são capazes de regular os níveis extracelulares de glutamato, bem como, liberar citocinas, mediadores lipídicos e trifosfato de adenosina (KIGUCHI; KOBAYASHI; KISHIOKA, 2012; THUAULT, 2016). A ativação de astrócitos perivasculares pode propagar a sensibilização neuronal em um volume ampliado espacialmente. A microglia também é interativa através do seu potencial para ser ativada por vários produtos liberados a partir de aferentes primários e outras células neuronais e não neuronais, como citocinas circulantes (IL-1 e TNF α) (BLOND et al., 2015).

As reorganizações principais no nível medular correspondem à perda de mecanismos inibitórios, levando a um aumento na atividade de interneurônios dorsais ou suas projeções e resultando em uma reconfiguração espacial e funcional das projeções centrais (BROWN et al., 2015).

3.4 Projeções das fibras nociceptivas na medula espinhal

A informação que gera uma sensação de dor entra no sistema nervoso central pela ativação de fibras aferentes de pequeno diâmetro, mielinizadas (grupo III-A ou A δ) ou não mielinizadas (grupo IV ou C) (YAN et al., 2017). Estes nociceptores polimodais são facilmente ativados de forma dependente da concentração por agentes específicos liberados de células locais ou células inflamatórias para o meio, os quais incluem uma variedade de aminas (5-hidroxitriptamina, histamina), mediadores lipídicos (prostaglandinas), cininas (bradicinina), citoquinas (interleucina-1 β) e enzimas (tripsina) (STEEDS, 2016).

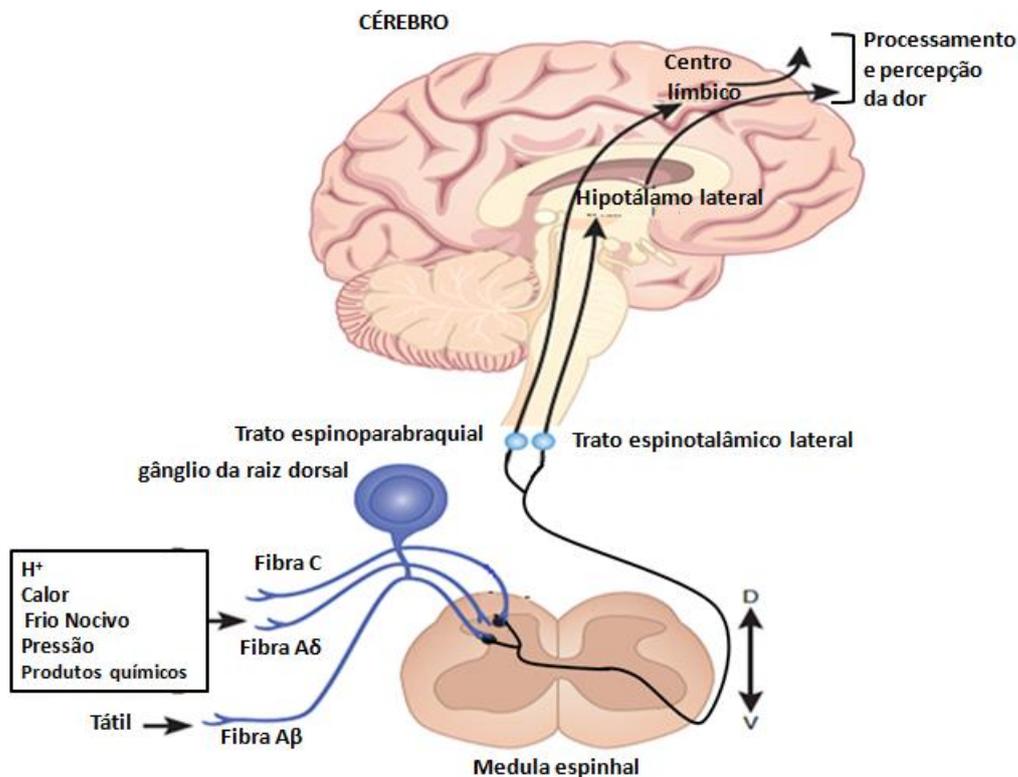
Axônios sensoriais são classificados de acordo com o estado de mielinização, velocidade de condução e diâmetro. Normalmente, a velocidade de condução é diretamente proporcional ao diâmetro do axônio e a presença de mielinização (MERTENS et al., 2015).

As fibras A β caracterizadas por serem aferentes mielinizados grandes e rápidos condutores, projetam-se na lâmina espinhal III e mais profundamente. Pequenos

axônios aferentes (fibras C) são amielinizados, conduzem muito mais devagar e geralmente ocorrem nas lâminas espinhais II e I, que é uma área amplamente composta de neurônios que respondem à nocicepção. Os terminais endoteliais destes aferentes mielinizados (fibras A) podem se estender até a lâmina II da medula espinhal após a lesão do nervo periférico. A excitação desses neurônios pode ocorrer através da estimulação de mecanorreceptores de baixo limiar (fibras A) desencadeando a percepção de estímulos dolorosos (BROWN et al, 2015).

Normalmente, terminações associadas a fibras C pequenas e não mielinizadas, respondem a uma série de estímulos, incluindo térmico, químico e mecânico. Estímulos mecânicos de baixa intensidade (isto é, mecanorreceptores) ativam as fibras A β (grupo II) (SETH; GRAY, 2016). As fibras que conduzem à velocidade de A δ podem responder a estímulos mecânicos ou térmicos de limiar alto ou baixo. Entretanto, a maior parte de axônios aferentes, chamados de "nociceptores C-polimodais", comumente são ativados por estímulos térmicos, químicos e mecânicos de alto limiar (HUDSPITH, 2016) (**Figura 1**).

Figura 1: Circuito de mediação da dor fisiológica. As setas indicam o sentido ascendente da condução do estímulo doloroso.



Fonte: adaptado de KUNER, 2010.

3.5 Tratamento farmacológico da dor

A identificação de alterações fisiopatológicas no sistema de dor, bem como, das alterações associadas na percepção da nocicepção são essenciais para um ótimo diagnóstico e tratamento farmacológico (KUMAR; KAUR; SINGH et al., 2018). As moléculas que medeiam a neurotransmissão pós-transdução servem como alvos para atenuar a dor após lesão tecidual e tratamento farmacológico dessa dor (MERTENS et al., 2015).

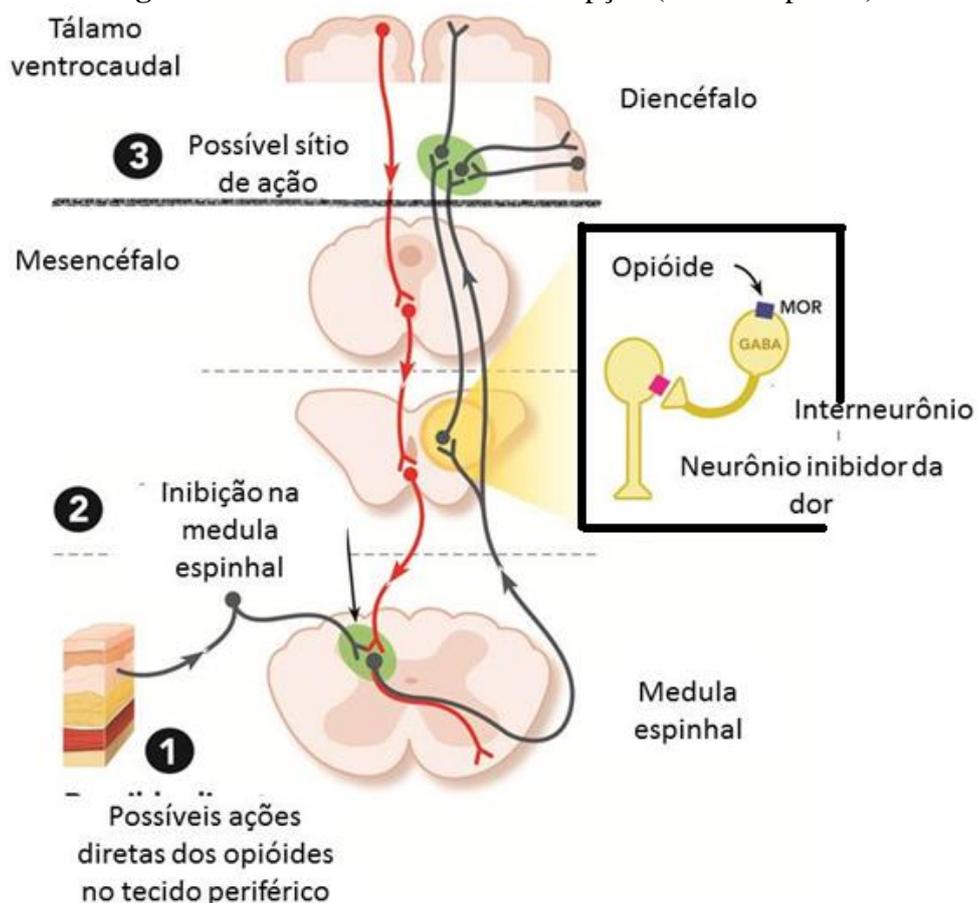
Múltiplas opções de manejo clínico possuem uma indicação validada para o tratamento da dor neuropática, incluindo analgésicos, antidepressivos tricíclicos, opióides, anestésicos locais, estabilizadores de membrana (gabapentina e pregabalina) e inibidores da recaptção de serotonina-noradrenalina. Entretanto, novos tratamentos medicamentosos, ensaios clínicos e padrões de qualidade para avaliação de evidências justificam a atualização das recomendações baseadas em evidências para o tratamento farmacológico da dor neuropática (FINNERUP et al., 2015).

O tratamento com antidepressivos requer administrações à longo prazo para aliviar a dor neuropática, o que sugere o recrutamento de mecanismos secundários a jusante, bem como a plasticidade molecular e neuronal de longo prazo. Esses fármacos agem por meio de vias descendentes noradrenérgicas, com o recrutamento periférico de noradrenalina a partir de fibras simpáticas surgindo nos gânglios da raiz dorsal (LE-CUDENNEC; CASTAGNE, 2014).

Já os gabapentinoides são eficazes contra a dor neuropática, tanto com administração aguda em altas doses como com administração repetida. Esses fármacos que têm como alvo a subunidade $\alpha_2\delta-1$ dos CaV, inibem as correntes de cálcio, diminuindo assim a liberação do transmissor excitatório e a sensibilização espinal. Os gabapentinoides também ativam o sistema inibitório da dor noradrenérgica descendente acoplado aos adrenoreceptores α_2 da coluna vertebral (KREMER et al., 2016).

Os opióides são tradicionalmente utilizados no tratamento da dor aguda. Seus efeitos ocorrem principalmente através do bloqueio mediado pelo receptor μ -opióide, da liberação de neurotransmissores e transmissão da dor (ROWBOTHAM; SERRANO-GOMEZ; HEFFERNAN, 2008) (**Figura 2**).

Figura 2: Via descendente da nocicepção (sistema opioide)



Fonte: adaptado AL-HASANI; BRUCHAS, 2011.

Os opióides mais utilizados na clínica são os agonistas de receptores μ -opioide, como morfina, hidromorfona ou hidrocodona. Várias controvérsias envolvem a administração de opióides na prática clínica, incluindo relações dose-resposta interindividuais altamente variáveis (MOTOV; NELSON, 2016), riscos de dependência, abuso e superdosagem em usos prolongados, bem como, alteração da sensação de nocicepção com o desenvolvimento da hiperalgesia, especialmente quando administrado em altas doses ao longo de períodos prolongados de tempo (PERRONE; NELSON; YEALY, 2015).

De acordo com Brown et al. (2015), o aumento anormal da excitabilidade dos neurônios sensoriais está acoplado à alterações fenotípicas na expressão de seus neurotransmissores. Isso pode explicar a resistência à terapia analgésica convencional.

Assim, o tratamento da dor neuropática ainda é insatisfatório, com um número substancial de pacientes com diminuição da qualidade de vida, com pouco ou nenhum benefício dos tratamentos disponíveis. Esse tipo de tratamento geralmente resulta em

pacientes refratários aos tratamentos convencionais (FINNERUP et al., 2015). Existem evidências de efeitos colaterais em todas as classes de fármacos citados (**Tabela 1**).

Tabela 1: Eventos adversos de fármacos no tratamento de dor

Classe	Limitações e efeitos adversos	Fonte
Opióides	Dependência física, curta janela terapêutica, náusea, vômitos, obstipação intestinal, sedação, depressão respiratória	Katz; Barkin, 2010
AINES	Dor abdominal, pirose, úlceras gástricas, diarreia, gastroduodenite, sangramentos, eventos cardiovasculares	Souza et al., 2013; Batlouni, 2010;
Antidepressivos	Boca seca, obstipação intestinal, aumento de peso, hipotensão ortostática, eventos cardiovasculares	Kremer et al., 2016; Deng et al., 2016
Anticonvulsivantes	Cefaléia, sedação, lentificação psicomotora, sonolência, edema periférico, ganho de peso, astenia, cefaléia e boca seca.	Weintraub et al., 2007; Ortinski; Meador, 2004

Frente a isso, novas alternativas para a terapêutica da dor neuropática se fazem necessárias, incluindo tratamento com substâncias de origem natural (ZULAZMI et al., 2015).

3.5.1 Plantas medicinais e seus constituintes

Os óleos essenciais têm sido largamente utilizados por suas propriedades antibacteriana, antiproliferativa, antifúngica (PADALIA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2017; MAHBOUBI, 2017), analgésica (NASIRI; MAHMODI; NOBAKHT, 2016), antinociceptiva (MARTINS et al., 2015), anti-inflamatória (SUN et al., 2016) e antioxidante (HEREDIA-GUERRERO et al., 2018).

Em geral, os óleos essenciais são constituídos por misturas químicas envolvendo várias dezenas a centenas de diferentes tipos de moléculas de baixo peso molecular. Apenas alguns têm um único componente em alta porcentagem (PANDEY; SINGH; TRIPATHI, 2014).

De acordo com Buchbauer e Wallner (2016) uma grande quantidade de óleos essenciais é rapidamente absorvida após administração dérmica, oral ou pulmonar e pode atravessar a barreira hematoencefálica, interagindo com receptores do SNC.

A metabolização dos constituintes de óleos essenciais pode ocorrer no fígado com a síntese de compostos polares, após um metabolismo enzimático de fase I limitado por conjugação com glucuronato ou sulfato. Segundo Buchbauer e Wallner (2016), existe um risco mínimo de acumulação dos compostos ativos no organismo, devido ao rápido metabolismo e ao tempo de meia-vida reduzido.

Do ponto de vista químico, os óleos essenciais são compostos principalmente de terpenóides e fenilpropanóides, incluindo poucos policetídeos e alcalóides. Os terpenóides formam uma grande família de derivados de unidades isoprênicas de C₅, e são classificados, dependendo do número de unidades de isopreno, como hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) e politerpenos [(C₅)_n, n pode ser de 9-30.000] (XIAO; ZHONG, 2016). Eles são formados por meio de intermediários do ácido mevalônico ou 1-deoxid-xilulose-5-fosfato, sendo que terpeno-sintetases são as principais enzimas responsáveis por catalisar a formação de monoterpenos a partir dos substratos difosfato de dimetilalilo (DMAPP), farnesil difosfato e geranylgeranyl difosfato (MENDES et al., 2014).

Os terpenos de óleos essenciais são frequentemente monoterpenos que representam cerca de 90 % dos óleos (NAGEGOWDA et al., 2010). Diterpenos podem estar presentes quando os óleos essenciais são extraídos com solventes orgânicos. Os fenilpropanóides e seus derivados são formados a partir do ácido chiquímico (YANG et al., 2009; ZHANG; LIU, 2015). Compostos derivados destas classes ou que pertencem a outros grupos químicos podem estar presentes em óleos, muitas vezes em quantidades inferiores.

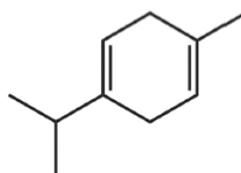
Vários monoterpenos, derivados de óleos essenciais tais como carvacrol, timol, geraniol, eugenol, borneol e γ -terpineno, entre outros, possuem grande potencial no campo médico, alimentício e industrial (BOUBAKER et al., 2016; FRATINI et al., 2014; RAI et al., 2017; ZHANG et al., 2016a; ZHANG et al., 2016b).

3.5.1.1 Gama-terpineno

Formado pela condensação de unidades isopentenil pirofosfato, o γ -terpineno (**Figura 3**) está entre os monoterpenos majoritários de óleos essenciais de plantas como *Ocimum gratissimum* L., *O. kilimandscharicum* Guerke (PANDEY; SINGH;

TRIPATHI, 2014), *Origanum majorana* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Zingiber officinale* Roscoe (ERCIOGLU; VELIOGLU; BOYACI, 2018; LIN; LEE; CHANG, 2016).

Figura 3: Estrutura química do γ -terpineno



Fonte: Aschmann, Arey e Atkinson (2011)

Assim como em outros monoterpenos, os substratos iniciais para a biossíntese de γ -terpineno são o precursor simples do isopentenil difosfato C_5 (IPP) e seu isômero DMAPP, que nas plantas superiores são produzidos a partir de duas vias independentes localizadas em compartimentos intracelulares separados, no citosol pela via do ácido mevalônico e nos plastídios pela via do metileritritol fosfato (MENDES et al., 2014).

O γ -terpineno é o precursor direto de outros monoterpenos, podendo formar p-cimeno [1-metil-4- (1-metiletil) benzeno ou 4-isopropiltolueno] a partir da reação OH + γ -terpineno, após abstração de dois átomos do anel (ASCHMANN; AREY; ATKINSON, 2011).

Baldissera et al. (2016) demonstraram que esse monoterpene apresenta efeito tripanocida de forma dependente da dose. Tem eficácia também no tratamento antibacteriano e na inibição da resistência a drogas e formação de biofilme de bactérias orais (MILADI et al., 2017).

Além disso, o γ -terpineno possui semelhança estrutural com outros monoterpenos que apresentam efeito antinociceptivo, tais como limoneno e α -felandreno, indicando seu potencial efeito farmacológico. Isso corrobora com o descrito por Passos et al. (2015) que evidenciaram atividade antinociceptiva do γ -terpineno em modelos de nocicepção química através do envolvimento de sistemas colinérgico e opióide.

3.5.2 Microemulsões

Como já foi mencionado, óleos essenciais e seus constituintes são amplamente utilizados, entretanto, as desvantagens de instabilidade no processo de preparação e

armazenamento devido à sua baixa solubilidade em água têm limitado suas aplicações (RODRÍGUEZ et al., 2016). Frente a isso, muito se tem pesquisado sobre sistemas que melhorem a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos (HADZIR et al., 2013; FROELICH et al., 2017).

As microemulsões (MEs) são sistemas que conseguem uma capacidade de solubilização considerável para fármacos pouco solúveis e garantem maior estabilidade termodinâmica (SINTOV, 2015; XING et al., 2016).

Conceitualmente, microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos compostos por dois líquidos imiscíveis (usualmente óleo e água), estabilizados por um filme interfacial de tensoativos. As propriedades físico-químicas dos componentes utilizados, bem como, a razão entre eles influenciam a estrutura formada (DAMASCENO et al., 2011).

Durante a formação de uma ME, ocorre a mistura de dois líquidos imiscíveis, na qual um deles é disperso no interior do outro. Adicionando-se um tensoativo ao sistema, este tende a se estabilizar resultando em um sistema homogêneo com a formação de uma fase interna, dispersa ou descontínua, apresentando gotículas de tamanho nanométrico. Sem a adição do tensoativo, o sistema tende a separar as fases sendo possível visualizar novamente os dois líquidos separados (CALLENDER et al., 2017).

Segundo a teoria da solubilização a formação de uma ME ocorre por meio de um intumescimento de micelas, no qual a água é solubilizada nas micelas reversas ou o óleo é solubilizado em micelas normais (MOHD-SETAPAR; MAT; MOHAMAD-AZIZ, 2012; SAVASTANO; ORTIZ, 1991). Outros autores elucidam teorias mais complexas para a formação de uma ME, como a teoria da tensão interfacial e da termodinâmica (RIAZI; MOSHFEGHIAN, 2009).

Um dos pré-requisitos para a formação de MEs é um baixo valor de tensão interfacial ($\gamma_i < 10^{-3}$ dina/cm) (HO et al., 1996). Durante a formação da ME o tensoativo adsorvido na área interfacial causa uma pressão bidimensional que diminui a pressão interfacial. Consequentemente, a tensão superficial se aproxima de 0 (zero), favorecendo a dispersão de uma fase na outra. Dessa forma, sabe-se que para a formação de MEs não se torna adequada a utilização de tensoativos muito hidrofílicos ou lipofílicos já que estes não diminuem de forma eficiente a tensão interfacial do sistema (MILLER; AKSENENKO; FAINERMAN, 2017).

De acordo com a teoria termodinâmica das MEs, a energia livre de Gibbs (G) deve se tornar negativa para a formação espontânea de uma ME termodinamicamente estável (MARTÍNEZ-BALBUENA et al., 2017). Em temperatura constante, a tensão interfacial deve reduzir a um ponto que a energia livre do sistema também reduza. Esse fenômeno pode ser expresso conforme a equação:

$$\Delta G = \gamma_i \times \Delta S$$

onde, ΔS é a mudança da área interfacial. Considerando que para a formação da ME, a γ_i tem uma tendência para se aproximar de zero, conseqüentemente, a ΔG também tende a zero. Dessa forma, o sistema se torna termodinamicamente estável (DAMASCENO et al, 2011; RADKE, 2015).

Outro fator importante para a formação de uma ME é o valor do EHL que também pode indicar a extensão da preferência de migração na interface entre fases oleosas e aquosas (PASQUALI; MELINA; BREGNI, 2008). A posição geométrica dos tensoativos na interface óleo/água pode influenciar a curvatura e a fluidez da interface (LU; WEERASOORIYA; POPE, 2014; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2018).

Apesar de não ser obrigatória para a formação de MEs, a adição de um co-tensoativo também é capaz de reduzir a energia livre na interface óleo/água e a tensão através da penetração no filme de tensoativo (MAULVI et al., 2017). Além disso, co-tensoativos atuam também modificando o valor do EHL do sistema de tensoativo para um valor ótimo e adequado para a formação de MEs (FERNANDES et al., 2013).

Avaliando o papel do co-tensoativo para a liberação transdérmica de hidrocortisona usando óleo de eucalipto e ME à base de Tween 80, Maghraby (2008) evidenciou a expansão da zona de ME no DFPT para as preparações contendo co-tensoativo. Estas se mostraram menos viscosas e com aumento da liberação do fármaco, de forma dependente da viscosidade.

O comportamento do tensoativo quanto ao EHL leva em consideração a contribuição relativa da fração hidrofílica e hidrofóbica da molécula do tensoativo. É sabido que, tensoativos com EHL entre três e oito favorecem a formação de uma ME água em óleo, enquanto tensoativos com EHL entre oito e 18 favorecem a formação de uma ME óleo em água (SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014; ROYER et al., 2018).

Em MEs óleo em água o EHL situa-se entre 12 e 18 (KAWAKAMI et al., 2002). Esse valor pode ser alcançado com a adição de co-tensoativos no sistema (DAMASCENO et al., 2011). Os co-tensoativos atuam em consórcio com os tensoativos para reduzir ainda mais a tensão interfacial e introduzir um elemento de flexibilidade no filme interfacial (TALEGAONKAR; NEGI, 2015).

Apesar de tensoativos iônicos serem frequentemente utilizados na produção de ME, eles apresentam limitações em produtos farmacêuticos, para as quais os tensoativos de escolha são os não iônicos e/ou anfotéricos, por apresentarem baixa toxicidade às membranas celulares, baixa irritabilidade, elevada estabilidade química e por promoverem uma grande permeabilidade do fármaco através da pele (GRAMPUROHIT; RAVIKUMAR; MALLYA 2011).

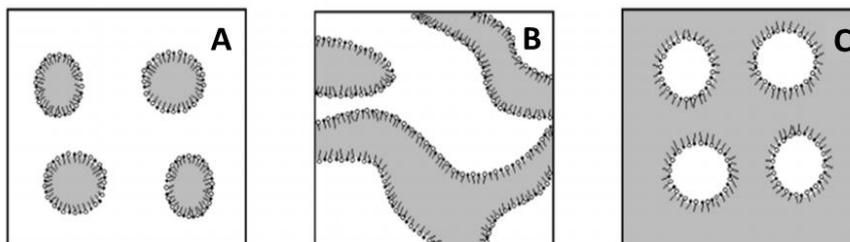
Geralmente, tensoativos não-iônicos são os mais utilizados em indústrias químicas e farmacêuticas. Entretanto, comportamentos sinérgicos do sistema de tensoativos mistos podem ser explorados para reduzir a quantidade total de tensoativos, por fornecerem propriedades físico-químicas mais flexíveis na solubilização, além de reduzir o custo e o impacto ambiental (MA et al., 2015a).

Igualmente importante, a utilização de intensificadores de penetração nas formulações microemulsionadas podem aumentar o coeficiente de difusão do fármaco no estrato córneo aumentando a concentração eficaz do fármaco no veículo e melhorando a partição entre a formulação e o estrato córneo (WILLIAMS; BARRY, 2012). Intensificadores de penetração transdérmica interagem com a bicamada lipídica principalmente em dois locais, os grupos de cabeças polares e as caudas hidrofóbicas do lipídio intercelular (LAN et al, 2016).

Recentes avanços sobre a aplicabilidade clínica de sistemas micromulsionados são relatados enfatizando sua utilização como carreador de moléculas insolúveis em água. Assim, o número de produtos farmacêuticos baseados em novos sistemas carreadores de fármacos tem aumentado significativamente nos últimos anos (CALLENDER et al., 2017)

As MEs contém estruturas internas formadas em consequência da mistura dos componentes das fases oleosa e aquosa com tensoativos e co-tensoativos. As propriedades físico-químicas desses componentes, bem como a razão entre eles influencia o tipo de estrutura formada e, conseqüentemente, o tipo de ME (**Figura 3**).

Figura 4. Tipos de microemulsões: A- óleo em água; B- bicontínua; C- água em óleo.
Fase oleosa – cinza; Fase aquosa – branca.



Fonte: adaptado de Damasceno et al., 2011

Existem sistemas micromulsionados em que moléculas hidrossolúveis estão localizadas no interior de reduzidas gotículas esféricas de água e envolvidas por moléculas de tensoativos em um meio contínuo de óleo. Nesse caso, o sistema é conhecido como sendo do tipo água em óleo e, a fase aquosa é denominada interna, dispersa ou descontínua, enquanto que o óleo compõe a fase externa, dispersante ou contínua. Em MEs água em óleo, são formadas micelas reversas que se constituem em nanogotas esféricas de água, envolvidas por uma monocamada de moléculas de tensoativos, dispersas em um solvente de baixa polaridade (MA et al., 2015b; PENG et al., 2016).

Contrariamente, o sistema é caracterizado como óleo em água quando moléculas lipossolúveis estão localizadas no interior de reduzidas gotículas esféricas de óleo e envolvidas por moléculas de tensoativos em um meio contínuo de água.

Além desses dois tipos de MEs, pode haver a formação de estruturas não-esféricas, conhecidas como bicontínuas, observadas quando o volume da fase interna é aumentado gradativamente por titulação, durante a migração entre os dois tipos de ME óleo em água para água em óleo e vice-versa, ou quando o volume das duas fases está próximo.

3.5.3 Via transdérmica

Estudos recentes sobre sistemas microemulsionados para liberação transdérmica de fármacos e outras substâncias terapêuticas evidenciam os benefícios da via transdérmica para administração de fármacos (ALKRAD; TALHOUNI, 2018; SINTOV et al., 2015; YEHA et al., 2017). Fármacos administrados por via oral ou intravenosa

podem estar associados à desvantagens como efeitos colaterais relacionados ao trato gastrointestinal (dispepsia, náusea, vômito, flatulência e lesões à mucosa gástrica) e ao sistema nervoso central (cefaleia, tontura, tremor, ansiedade e confusão) (ÇAKMAK et al., 2012).

Além disso, após a administração oral, alguns fármacos sofrem intenso metabolismo de primeira passagem, gerando metabólitos sem ação farmacológica e alcançando baixa biodisponibilidade (NEIRINCKX et al., 2010). A administração parenteral é um método invasivo e doloroso, o que gera menor adesão do paciente e requer um profissional qualificado para sua aplicação, (CAVALCANTI et al., 2016).

Sistemas transdérmicos de liberação de drogas são geralmente projetados para casos em que a pele não é o alvo da ação farmacológica, de forma que a droga deve ser absorvida e atravessar a derme e a epiderme, especialmente a barreira do estrato córneo, incluindo as glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e os folículos capilares e passar para camadas dérmicas mais profundas para alcançar a circulação sanguínea sistêmica (LEE; MAIBACH, 2006).

O estrato córneo representa a principal barreira física para permeação de substâncias na pele (SILVA et al., 2009). Entretanto, muitas alternativas biotecnológicas estão sendo estudadas a fim de permitir que o fármaco seja absorvido através da pele e consiga atravessar o estrato córneo para produzir efeito farmacológico sistêmico. Suksaeree et al. (2015), demonstraram a utilização de emplastos produzidos por quitosana e álcool polivinílico para liberação controlada de (E)-4-(3',4'-dimetoxifenil)-but-3-en-1-ol (composto D), que é o principal composto ativo de *Zingiber cassumunar* Rxb, com atividade antiinflamatória.

A propriedade de barreira do estrato córneo está intimamente relacionada com o arranjo estrutural de lipídios intercelulares (LAN et al., 2016). A grande quantidade de tensoativo presente nas MEs interage com o estrato córneo, desestruturando a bicamada lipídica e facilitando a permeabilidade dos fármacos (SILVA et al., 2010).

Para fins de tratamento farmacológico da dor neuropática, as MEs são úteis por permitirem absorção sistêmica do fármaco carregado (KOGAN et al., 2006) .

A permeabilidade da pele para moléculas do fármaco está geralmente associada às suas propriedades físico-químicas, tais como lipofilicidade, tamanho molecular, solubilidade, entre outras. Para isso, é ideal que as substâncias destinadas a sistemas de

liberação transdérmica sejam de baixo peso molecular (200-500 Da) e não irritante (MITRAGOTRI et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ALKRAD, J.A.; TALHOUNI, A.A. In vivo and in vitro study of transdermal application of diclofenac sodium using nonionic microemulsions as colloidal drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.43, p.27-33, 2018.

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

ARAÚJO, F.M.; DANTAS, M.C.S.M.; SILVA, L.S.; AONA, L.Y.S.; TAVARES, I.F.; SOUZA-NETA, L.C. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops & Products**, v.105, p.203–206, 2017.

ASCHMANN, S.M.; AREY, J.; ATKINSON, R. Formation of p-cymene from OH β g-terpinene: H-atom abstraction from the cyclohexadiene ring structure. **Atmospheric Environment**, v.45, p.4408-4411, 2011.

BALDISSERA, M.D.; GRANDO, T.H.; SOUZA, C.F.; GRESSLER, L.T.; STEFANI, L.M.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. In vitro and in vivo action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v.162, p.43-48, 2016.

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.

BLOND, S.; MERTENS, P.; DAVIDD, R.; ROULAUDD, M.; RIGOARD, P. From “mechanical” to “neuropathic” back pain concept in FBSS patients. A systematic review

based on factors leading to the chronification of pain (part C). **Neurochirurgie**, v.61, S45–S56, 2015.

BOUBAKER, H.; KARIMA, H.; HAMDAOUI, A.E.; MSANDAA, F.; LEACHB, D.; BOMBARDAC, I.; VANLOOT, P.; ABBADD, A.; BOUDYACHA, E.H.; AOUMAR, A.A.B. Chemical characterization and antifungal activities of four Thymus species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v.86, p.95–101, 2016.

BUCHBAUER, G.; WALLNER, I.M.. Óleos essenciais: propriedades, composição e efeitos na saúde. En: Caballero, B., PM Finglas e F. Toldrá (eds.). Enciclopédia de alimentos e saúde. **Academic Press**, Oxford, Reino Unido, p.558-562, 2016.

BUSSEROLLES, J.; TSANTOULAS, C.; ESCHALIER, A.; GARCIA, J.A.L. Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas, **PAIN**, v.157, S7–14, 2016.

CABRAL, D.M.C.; BRACHER, E.S.B.; DEPINTOR, J.D.P.; ELUF-NETO, J. Chronic Pain Prevalence and Associated Factors in a Segment of the Population of São Paulo City. **The Journal of Pain**, v.15, p.1081-1091, 2014.

CALLENDER, S.P.; MATHEWS, J.A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S.D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.526, p.425–442, 2017.

CATERINA, M.; GOLD, M.; MEYER, R. Molecular biology of nociceptors, Chapter 1. The neurobiology of pain: (molecular and cellular neurobiology). **Oxford University Press**, 2005.

CAVALCANTI, A.L.M.; REIS, M.Y.F.A.; SILVA, G.C.L.; RAMALHO, Í.M.M.; GUIMARÃES, G.P.; SILVA, J.A.; SARAIVA, K.L.A.; DAMASCENO, B.P.G.L. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: In vitro release and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.506, p.351–360, 2016.

ÇAKMAK, S.K.; ÇAKMAK, A.; GÖNÜL, M.; KILIÇ, A.; GÜL, Ü. Pentoxifylline use in dermatology. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v.11, p.422–432, 2012.

CORMICK, T.; LAW, S. Assessment of acute and chronic pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.17, p.421-424, 2016.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica E Aplicada**, v.32, n.1, 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.

DEYO, R.A; DWORKIN, S.F; AMTMANN, D.; ANDERSSON, G.; BORENSTEIN, D.; CARRAGEE, E.; CARRINO, J.; CHOU, R.; COOK, K.; DELITTO, A.; GOERTZ, C.; KHALSA, P.; LOESER, J.; MACKKEY, S.; PANAGIS, J.; RAINVILLE, J.; TOSTESON, T.; TURK, D.; KORFF, M.von.; WEINERYY, D.K. Report of the NIH Task Force on Research Standards for Chronic Low Back Pain. **The Journal of Pain**, v.15, n.6, p.569-585, 2014.

ERCIOGLU, E.; VELIOGLU, H.N.; BOYACI, I.H. Determination of terpenoid contents of aromatic plants using NIRS. **Journal Talanta**, v.178, p.716–721, 2018.

FAYAZ, A.; CROFT, P.; LANGFORD, R.M.; DONALDSON, L.J.; JONES, G.T. Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies. **BMJ Open**, v.6, n.6, 2016.

FERNANDES, C.P.; MASCARENHAS, M.P.; ZIBETTI, F.M.; LIMA, B.G.; OLIVEIRA, R.P.R.F.; ROCHA, L.; FALCÃO, D.Q. HLB value, an important parameter for the development of essential oil herbal medicines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, p.108-114, 2013.

FINNERUP, N.B.; ATTAL, N.; HAROUTOUNIAN, S.; NICOL, E.; BARON, R.; DWORKIN, R.H.; GILRON, I.; HAANPÄÄ, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T.S.; KAMERMAN, R.R.; LUND, K.; MOORE, A.; RAJA, S.N.; RICE, A.S.C.; ROWBOTHAM, M.; SENA, E.; SIDDALL, P.; SMITH, B.H.; WALLACE, M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurology**, v.14, n.2, p.162-173, 2015.

FOSSAT, P.; DOBREMEZ, E.; BOUALI-BENAZZOUZ, R.; FAVEREAUX, A.; BERTRAND, S.S.; KILK, K.; LÉGER, C.; CAZALETS, J.R.; LANGEL, U.; LANDRY, M.; NAGY, F. Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v.30, p.1073–1085, 2010.

FRATINI, F.; CASELLA, S.; LEONARDI, M.; PISSERI, F.; EBANI, V.V.; PISTELLI, L.; PISTELLI, L. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. **Fitoterapia**, v.96, p.1–7, 2014.

FROELICH, A.; OSMALEK, T.; SNELA, A.; KUNSTMAN, P.; JADACH, B.; OLEJNICZAK, M.; ROSZAK, G.; BIAŁAS, W. Novel microemulsion-based gels for topical delivery of indomethacin: Formulation, physicochemical properties and in vitro drug release studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.507, p.323-336, 2017.

GASKIN, D.J.; RICHARD, P. The Economic Costs of Pain in the United States. **The Journal of Pain**, v.13, n.8, p.715-724, 2012.

GATCHEL, R.J.; REUBEN, D.B.; DAGENAIS, S.; TURK, D.C.; CHOU, R.; HERSHEY, A.; HICKS, G.; LICCIARDONE, J.C.; HORN, S.D. Agenda for the Prevention of Pain and Its Impact: Report of the Work Group on the Prevention of Acute and Chronic Pain of the Federal Pain Research Strategy. **The Journal of Pain** (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.02.015>.

GRAMPUROHIT, N.; RAVIKUMAR, P.; MALLYA, R. Microemulsions for topical use - a review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v.45, p.100–107, 2011.

HADZIR, N.M; BASRI, M.; RAHMAN, M.B.A.; SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; BASRI, H. Phase Behaviour and Formation of Fatty Acid Esters Nanoemulsions Containing Piroxicam. **AAPS PharmSciTech**, v.14, n.1, 2013.

HEREDIA-GUERRERO, J.A.; CESERACCIU, L.; GUZMAN-PUYOL, S.; PAUL, U.C.; ALFARO-PULIDO, A.; GRANDE, C.; VEZZULLI, L.; BANDIERA, T.; BERTORELLI, R.; RUSSO, D.; ATHANASSIOU, A.; BAYER, I.S. Antimicrobial, antioxidant, and waterproof RTV silicone-ethyl cellulose composites containing clove essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v.192, p.150–158, 2018.

HO, H.; HSIAO, C.C.; SHEU, M.T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.85, p.138-143, 1996.

HOOTEN, W.M.; COHEN, S.P. Evaluation and Treatment of Low Back Pain: A Clinically Focused Review for Primary Care Specialists. Symposium on pain medicine. **Mayo Clinic Proceedings**, v.90, n.12, p.1699-1718, 2015.

HUDSPITH, M.J. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**. v.17, p.425-430, 2016.

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

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 Controlled Release**, v.17, n.81, p.65-74, 2002a.

KIGUCHI, N.; KOBAYASHI, Y.; KISHIOKA, S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. **Current Opinion Pharmacology**, v.12, p.55-61, 2012.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.16, p.123-126, 2006.

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.

KUMAR, A.; KAUR, H.; SINGH, A. Neuropathic pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. **Pharmacological Reports**, v.70, p.206–216, 2018.

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

LABUZ, D.; SPAHN, V.; CELIK, M.O.; MACHELSK, H. Opioids and TRPV1 in the peripheral control of neuropathic pain—defining a target site in the injured nerve. **Neuropharmacology** v. 101, p.330–340, 2016.

LAN, Y.; WANG, J.; HE, S.; LI, S.; TAN, P.; LIN, H.; WU, Q. Transdermal permeation of *Zanthoxylum bungeanum* essential oil on TCM components with different lipophilicity. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v.3, p.157-167, 2016.

LE-CUDENNEC, C.; CASTAGNE, V. Face-to-face comparison of the predictive validity of two models of neuropathic pain in the rat: analgesic activity of pregabalin, tramadol and duloxetine. **European Journal Pharmacology**, v.735, p.17–25, 2014.

LEE, C.M.; MAIBACH, H.I. Deep Percutaneous penetration of the muscles and joints. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.95, p.1405-1413, 2006.

LI, W.G.; XU, T.L. Acid-sensing channels: a novel therapeutic target for pain and anxiety. **Current Pharmaceutical Design**, v.21, p.885–894, 2015.

LIN, P.C.; LEE, J.J.; CHANG, I.J. Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.24, p.464-470, 2016.

LU, J.; WEERASOORIYA, U.P.; POPE, G.A. Investigation of gravity-stable surfactant floods. **Fuel**, v.124, p.76–84, 2014.

LUIZ, A.P.; WOOD, J.N. Sodium channels in pain and cancer: new therapeutic opportunities, **Advances In Pharmacology**, v.75, p.153–178, 2016.

MA, Y.; YUAN, X.Z.; PENG, X.; WANG, H.; HUANG, W.; BAO, S.; LIU, H.; XIAO, Z.; ZENG, G. The pseudo-ternary phase diagrams and properties of anionic–nonionic mixed surfactant reverse micellar systems. **Journal of Molecular Liquids**, v.203, p.181–186, 2015a.

MA, Y.J.; YUAN, X.Z.; PENG, X.; WANG, H.; HUANG, H.J.; BAO, S.; LIU, H.; XIAO, Z.H.; ZENG, G.M. The pseudo-ternary phase diagrams and properties of anionic–nonionic mixed surfactant reverse micellar systems. **Journal of Molecular Liquids**, v.203, p.181–186, 2015b.

MA, Y.H.; CHEN, X.B.; WANG, F.; WANG, N.; BAI, T.C. Phase diagrams for pseudo-ternary system of {IPM (1) + [CTAB (21) + butan-1-ol (22)] (2) + water (3)} at temperature 303.15 K. **Journal of Molecular Liquids**, v.209, p.603–610, 2015.

MAGHRABY, G.M.E. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v.355, p.285–292, 2008.

MAHBOUBI, M. *Artemisia sieberi* Besser essential oil and treatment of fungal infections. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.89, p.1422–1430, 2017.

MAULVI, F.A.; DESAI, A.R.; CHOKSI, H.H.; PATILA, R.J.; RANCHA, K.M.; VYASA, B.A.; SHAH, D.O. Effect of surfactant chain length on drug release kinetics from microemulsion-laden contact lenses. **International Journal of Pharmaceutics**, v.524, p.193–204, 2017.

MARTÍNEZ-BALBUENA, L.; ARTEAGA-JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ-ZAPATA, E.; MÁRQUEZ-BELTRÁN, C. Applicability of the Gibbs Adsorption Isotherm in the analysis of surface tension experimental data for ionic and nonionic surfactants. **Advances in Colloid Science and Interface**, v.247, p.178-184, 2017.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, F.; GUTIÉRREZ-BECERR, A.; CASILLAS, N.; GRADZIELSKI, N.; ESCALANTE, J.; BÁRCENA-SOTO, M. Characterization of reverse microemulsion formed with functionalized surfactants based on ferricyanide ions. **Colloids and Surfaces A**, v.541, p.10–16, 2018.

MARTINS, D.F.; EMER, A.A.; BATISTI, A.P.; DONATELLO, N.; CARLESSO, M.G.; MAZZARDO-MARTINS, L.; VENZKE, D.; MICKE, G.A.; PIZZOLATTI, M.G.; PIOVEZAN, A.P.; SANTOS, A.R.S. Inhalation of *Cedrus atlantica* essential oil alleviates pain behavior through activation of descending pain modulation pathways in a mouse model of postoperative pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v.17, p.530–38, 2015.

MENDES, M.D.; BARROSO, J.D.; OLIVEIRA, M.M.; TRINDADE, H. Identification and characterization of a second isogene encoding -terpinene synthase in *Thymus caespititius*. **Journal of Plant Physiology**, v.171, p.1017–1027, 2014.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Second Edition. Seattle, WA: **IASP PRESS**, p.212, 1994.

MEULDERS, A.; BENNETT, M.P. The Concept of Contexts in Pain: Generalization of Contextual Pain-Related Fear Within a de Novo Category of Unique Contexts. **The Journal of Pain**, v.19, n.1, p.76-87, 2018.

MEULDERS, A.; VANDAEL, K.; VLAHEYEN, J.W.S. Generalization of Pain-Related Fear Based on Conceptual Knowledge. **Behavior Therapy**, v.48, ed.3, p.295-310, 2017.

MERTENS, P.; BLONDC, S.; DAVIDD, R.; RIGOARD, P. Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: a focus on low back pain (part A). **Neurochirurgie**, v.61, S22–S34, 2015.

MILADI, H.; ZMANTAR, T.; KOUIDHI, B.; QURASHI, Y.M.A.A.; BAKHROUF, A.; CHAABOUNI, Y.; MAHDOUANI, K.; CHAIEB, K. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and g-terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v.112, 156-163, 2017.

MILLER, R.; AKSENEENKO, E.V.; FAINERMAN, V.B. Dynamic interfacial tension of surfactant solutions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.247, p.115–129, 2017.

MITRAGOTRI, S.; ANISSIMOV, Y.G.; BUNGECE, A.L.; FRASCHD, H.F.; GUYE, R.H.; HADGRAFTF, J.; KASTINGG, G.B.; LANEF, M.E.; ROBERTS, M.S. Modelos matemáticos de permeabilidade da pele: uma visão geral. **International Journal Pharmaceutical**, v.418, p.115 – 129, 2011.

MINETT, M.S.; FALK, S.; SANTANA-VARELA, S.; BOGDANOV, Y.D.; NASSAR, M.A.; HEEGAARD, A.M.; WOOD, J.N. Pain without nociceptors? Nav1.7-independent pain mechanisms. **Cell Reports**, v.6, p.301–312, 2014.

MOHD-SETAPAR, S.H.; MAT, H.; MOHAMAD-AZIZ, S.N. Kinetic study of antibiotic by reverse micelle extraction technique. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.43, p.685–695, 2012.

MOTOV, S.M.; NELSON, L.S. Advanced Concepts and Controversies in Emergency Department Pain Management. **Anesthesiology Clinics**, v.34, n.2, p.271-285, 2016.

NAGEGOWDA, D.A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Letters**, v.584, p.2965–2973. 2010.

NAHIN, R. L. Estimates of Pain Prevalence and Severity in Adults: United States, 2012. **The Journal of Pain**, v.16, n.8, p.769-780, 2015.

NASIRI, A.; MAHMUDI, M.A.; NOBAKHT, Z. Effect of aromatherapy massage with lavender essential oil on pain in patients with osteoarthritis of the knee: A randomized controlled clinical trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v.25, p.75-80, 2016.

NEIRINCKX, E.; VERVAET, C.; BOEVER, S.; REMON, J.P.; GOMMEREN, K.; DAMINET, S.; BACKER, P.; CROUBELS, S. Species comparison of oral bioavailability, first-pass metabolism and pharmacokinetics of acetaminophen. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.113–119, 2010.

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

PADALIA, R.C.; VERMA, R.S.; CHAUHAN, A.; SINGH, V.R.; GOSWAMI, P.; SINGH, S.; VERMA, S.K.; LUQMAN, S.; CHANOTIYA, C.S.; DAROKAR, M.P. *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm. from northern India: Potential source of zerumbone rich essential oil for antiproliferative and antibacterial applications. **Industrial Crops & Products**, v.112, p.749-754, 2018.

PANDEY, A.K.; SINGH, P.; TRIPATHI, N.N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asia Pacific Journal Of Tropical Medicine**, v.4, n.9, p.682-694, 2014.

PASQUALI, R.C.; TAUROZZI, M.P.; BREGNI, C. Some considerations about the hydrophilic–lipophilic balance system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.356, p.44–51, 2008.

PASSOS, F.F.B.; LOPES, E.M.; ARAÚJO, J.M.; SOUSA, D.P.; VERAS, L.M.C.; LEITE, J.R.S.A.; ALMEIDA, F.R.C. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, Article ID 829414, 9 pages, 2015.

PENG, X.; XU, H.; YUAN, X.Z.; LENG, L.; MENG, Y. Mixed reverse micellar extraction and effect of surfactant chain length on extraction efficiency. **Separation and Purification Technology**, v.160, p.117–122, 2016.

PERRONE, J.; NELSON, L.S.; YEALY, D.M. Choosing analgesics wisely: what we know (and still need to know) about long-term consequences of opioids. **Annals of Emergency Medicine**, v.65, n.5, p.500–2, 2015.

RADKE, C.J. Gibbs adsorption equation for planar fluid–fluid interfaces: Invariant formalism. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.222, p.600–614, 2015.

RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A.P.; DERIT, M.; ZACCHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v.519, p.67–78, 2017.

RIAZI, M.R.; MOSHFEGHIAN, M. A thermodynamic model for LLE behavior of oil/brine/ionic-surfactant/alcohol co-surfactant systems for EOR processes. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.67, p.75–83, 2009.

RIDDERIKHOF, M.L.; LIRK, P.; GODDIJN, H.; VANDEWALLE, E.; SCHINKEL, E.; VAN-DIEREN, S.; KEMPER, E.M.; HOLLMANN, M.W.; GOSLINGS, J.C. Acetaminophen or Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Acute Musculoskeletal Trauma: A Multicenter, Double-Blind, Randomized, Clinical Trial. **Annals of Emergency Medicine**, v.71, n.3, p.357–368, 2018.

RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M.J.; RUIZ, M.A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v.83, p.41–59, 2016.

ROYER, M.R.; NOLLET, M.; CATTÉ, M.; COLLINET, M.; PIERLOT, C. Towards a new universal way to describe the required hydrophilic lipophilic balance of oils using the phase inversion temperature of C10E4/n-octane/water emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.536, p.165-171, 2018.

ROWBOTHAM, D.J.; SERRANO-GOMEZ, A.; HEFFERNAN A. Clinical pharmacology: opioids. P.E. Macintyre (Ed.), Clinical pain management (acute pain) (2nd edition), **Hodder & Stoughton** Limited, London, pp. 68-79, 2008.

SAVASTANO, C.A.; ORTIZ, E.S. Effect of changing hydrodynamic conditions on the rate of processes at liquid-liquid interfaces: metal ion extraction and water solubilization by reversed micelles. **Chemical Engineering Science**, v.46, n.3, p.741- 749, 1991.

SCHAEFER, C.; CHANDRAN, A.; HUFSTADER, M.; BAIK, R.; MCNETT, M.; GOLDENBERG, D.; GERMWIN, R.; ZLATEVA, G. The comparative burden of mild, moderate and severe fibromyalgia: results from a cross-sectional survey in the United States. **Health and Quality of Life Outcomes**, v.9, n.71, 2011.

SETH, B.; GRAY, L. Genesis of chronic pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.17, p.431-435, 2016.

SETYA, S.; TALEGAONKAR, S.; RAZDAN, B.K. Nanoemulsions: formulation methods and stability aspects. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p.2214-2228, 2014.

SILVA, J.A.; BEDOR, D.C.G.; DAMASCENO, B.P.G.L.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P. Physicochemical characterization and development of a microemulsion system for transdermal use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, p.1-8, 2010.

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. **Quimica Nova**, v.32, n.6, p.1389-93, 2009.

SIQUEIRA, S.R.; ALVES, B.; MALPARTIDA, H.M.; TEIXEIRA, M.J.; SIQUEIRA, J.T. Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. **Neuroscience**, v.164, p.573–577, 2009.

SINTOV, A.C. Transdermal delivery of curcumin via microemulsion, **International Journal Of Pharmaceutics**, v.481, p.97–103, 2015.

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

STEEDS, C.E. The anatomy and physiology of pain. Surgery. **Basic Science**, v. 34, p. 55-59, 2016.

SUKSAEREE, J.; CHAROENCHAI, L.; MADAKA, F.; MONTON, C.; SAKUNPAK, A.; CHAROONRATANA, T.; PICHAYAKORN, W. Zingiber cassumunar blended patches for skin application: formulation, physicochemical properties, and in vitro studies. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.10, p.341-349, 2015.

SUN, L.; ZONG, S.B.; LI, J.C.; LV, Y.Z.; LIU, L.N.; WANG, Z.Z.; ZHOU, J.; CAO, L.; KOU, J.P.; XIAO, W. The essential oil from the twigs of *Cinnamomum cassia* Presl alleviates pain and inflammation in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.194, p.904–912, 2016.

TALEGAONKAR, S.; NEGI, L.M. Chapter 14: nanoemulsion in drug targeting. In: Devarajan, P., Jain, S. (Eds.), *Targeted Drug Delivery: Concepts and Design*. **Springer, London, UK**, pp. 433, 2015.

THUAULT, S. A peripheral messenger for chronic pain, **Nature Neuroscience**. v.19, n.1, 2016.

TUBACH, F.; RAVAUD, P.; MARTIN-MOLA, E.; AWADA, H.; BELLAMY, N.; BOMBARDIER, C.; FELSON, D.T.; HAJJAJ-HASSOUNI, N.; HOCHBERG, M.; LOGEART, I.; MATUCCI-CERINIC, M.; van de LAAR, M.; van der HEIJDE, D.;

DOUGADOS, M. Minimum clinically important improvement and patient acceptable symptom state in pain and function in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, chronic back pain, hand osteoarthritis, and hip and knee osteoarthritis: Results from a prospective multinational study. **Arthritis Care & Research**, v.64, p.1699-1707, 2012.

VON-HEHN, C.A.; BARON, R.; WOOLF, C.J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**, v.73, p.638–652, 2012.

VON-KORFF, M.; SCHER, A.I.; HELMICK, C.; CARTER-POKRAS, O.; DODICK, D.W.; GOULET, J.; HAMILL-RUTH, R.; LERESCHE, L.; PORTER, L.; TAIT, R.; GREGORY, T.; VEASLEY, C.; MACKEY, S. United states national pain strategy for population research: concepts, definitions, and pilot data. **The Journal of Pain**, v.17, n.10, p.1068-1080, 2016.

XIAO, H.; ZHONG, J.J. Production of useful terpenoids by higher-fungus cell factory and synthetic biology approaches. **Trends in Biotechnology**, v.34, n.3, 2016.

XING, Q.; SONG, J.; YOU, X.; XU, D.; WANG, K.; SONG, J.; GUO, K.; LI, P.; WU, C.; HU, H. Microemulsions containing long-chain oil ethyl oleate improve the oral bioavailability of piroxicam by increasing drug solubility and lymphatic transportation simultaneously. **International Journal of Pharmaceutics**, v.511, p.709–718, 2016.

YAN, Y.Y.; LI, C.Y.; ZHOU, L.; AO, L.Y.; FANG, W.R.; LI, Y.M. Research progress of mechanisms and drug therapy for neuropathic pain. **Life Sciences**, v.190, p.68–77, 2017.

YANG, Z.; SAKAI, M.; SAYAM, H.; SHIMENO, T.; YAMAGUCHI, K.; WATANABE, N. Elucidation of the biochemical pathway of 2-phenylethanol from shikimic acid using isolated protoplasts of rose flowers. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.887—891, 2009.

YEHIA, R.; HATHOUT, R.M.; ATTIA, D.A.; ELMAZAR, M.M.; MORTADA, N.D. Antitumor efficacy of an integrated methyl dihydrojasmonate transdermal

microemulsion system for breast cancer cells: in vitro and in vivo studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.155, p.512-521, 2017.

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.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advanced. Drugs Delivery. Reviews**, v.64, p.128-137, 2012

ZHANG, X.; LIU, C.J. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Molecular Plant**, v.8, p.17–27, 2014.

ZHANG, Z.; YANG, T.; ZHANG, Y.; WANG, L.; XIE, Y. Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly, *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products**, v.81, p.147–151, 2016a.

ZHANG, Z.; YANG, T.; MI, N.; WANG, Y.; LI, G.; WANG, L.; XIE, Y. Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.106, p.157-160, 2016b.

ZULAZMI, A.A.; GOPALSAMY, B.; FAROUK, A.A.O.; SULAIMAN, M.R.; BHARATHAM, B.H.; PERIMAL, E.K. Antiallodynic and antihyperalgesic effects of zerumbone on a mouse model of chronic constriction injury-induced neuropathic pain. **Fitoterapia**, v.105, p.215–221, 2015.

Capítulo 1

Prospecção Tecnológica



Tabela 1. Relação de patentes sobre microemulsão transdérmica para o tratamento da dor

n.º da Patente	Título	Inventores (Companhia/Instituição)	País de proteção	Ano	CIP	Enfoque principal
US20150258023	Microemulsion e sub-microemulsion process e compositions	Lamm et al (2015) (STIEFEL WEST COAST LLC)	US	2015		
US20060057168	Microemulsion process and composition	Lamm e Hurling (2006) (TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW, LLP)	US	2006	A61K	Processo de desenvolvimento
US20140127320	Delivery of biologically active agents using volatile hydrophobic solvents	Salimone et al (2014) (ROCHEL INDUSTRIES, LLP)	US	2014		
US20110021592	Organic nanoparticles obtained from microemulsions by solvent evaporation	Magdani, Nore, Geobon (2011) (WENSTON & STRAWN LLP)	US	2011		
US20130237613	Sugar-based surfactant microemulsions containing essential oils for cosmetic and pharmaceutical use	Sauggo (2013) (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH)	US	2013		
BR1020170148009	Formulação a base de óleo de copaiba biodegradáveis para uso oral e tópico associada com aplicações terapêuticas na analgesia, inflamação e cicatrização	MACIEL et al (2018)	BR	2018	A61K	Óleos essenciais em microemulsões
CN104306447	<i>Trigonostemon wifordii</i> essential oil microemulsion gel and preparation method thereof	Liubing et al (2015) (GUANGZHOU UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE)	CN	2015		
US8455067	Transdermal patch for nonsteroidal antiinflammatory drug(s)	Pyu e Min (2002) (SANG A PHARMACEUTICAL CO)	US	2002	A61K	Microemulsões para entrega de AINES



DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICROEMULSÕES COM PERSPECTIVAS PARA O TRATAMENTO DA DOR: UMA REVISÃO DE PATENTES

Destaques

- Substâncias com potencial para o tratamento da dor podem ser incorporadas à sistemas microemulsionados.
- Microemulsões são sistemas promissores para carreamento e entrega sistêmica de substâncias bioativas.
- Sistemas microemulsionados podem ser utilizados para incorporar substâncias hidrofilicas e lipofílicas para o tratamento da dor.
- A via transdérmica de administração constitui uma alternativa viável para a reduzir efeitos colaterais comumente associados à fármacos utilizados na terapêutica da dor.

RESUMO

Microemulsões são sistemas translúcidos, termodinamicamente estáveis, muito utilizados para entrega sistêmica de fármacos. O presente estudo é o primeiro a relacionar o potencial biotecnológico de sistemas microemulsionados para fins terapêuticos, por via de administração transdérmica, para o tratamento da dor, configurando-se como uma prospecção tecnológica que evidencia as possibilidades profiláticas e terapêuticas dessa patologia. As patentes foram pesquisadas nas bases de dados Organização Mundial da Propriedade Intelectual (World Intellectual Property Organization - WIPO), Escritório Europeu de Patentes (European Patent Office - Espacenet), Escritório de Marcas e Patentes dos Estados Unidos (United States Patent and Trademark Office - USPTO) e Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). Os critérios de inclusão foram patentes publicadas contendo “microemulsão” e “transdérmica” como palavras-chave no título ou no resumo. Foram encontradas 208 patentes. Entretanto, foram selecionadas apenas as patentes que apresentavam no seu resumo ou na sua descrição alguma menção do uso do sistema microemulsionado, objeto da invenção, para o tratamento da dor. Para as patentes encontradas foram adotados critérios que excluísam Foram excluídas as patentes duplicadas e que não relatavam o uso farmacológico das MEs especificamente para o tratamento da dor. Assim, foram selecionadas dezesseis patentes que foram descritas no presente estudo. Foram encontradas patentes que enfocam especificamente do processo de desenvolvimento de sistemas microemulsionados, que tratam também da inclusão de óleos vegetais em microemulsões, que colocam as microemulsões como sistemas para entrega de AINES e outras substâncias, além de microemulões para serem administradas por via transdérmica. Esses trabalhos reforçam a aplicabilidade terapêutica das MEs biocompatíveis para compostos hidrofílicos e lipofílicos para o tratamento da dor aguda e crônica.

Palavras-chaves: Microemulsão. Tratamento da Dor. Prospecção tecnológica. Biotecnologia.

ABSTRACT

Microemulsions are thermodynamically stable, translucent systems widely used for systemic delivery of drugs. The present study is the first to relate the biotechnological potential of microemulsion systems for therapeutic purposes, by means of transdermal administration, for the treatment of pain, constituting as a technological prospect that evidences the prophylactic and therapeutic possibilities of this pathology. Patents were searched in the World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patent Office (Espacenet), United States Patent and Trademark Office (United States Patent and Trademark Office - USPTO) and National Institute of Intellectual Property (INPI). The inclusion criteria were published patents containing "microemulsion" and "transdermal" as keywords in the title or abstract. 208 patents were found. However, criteria were adopted that excluded duplicate patents and did not report pharmacological use of MEs specifically for the treatment of pain. Thus, we selected sixteen patents that were described in the present study. Patents have been found that focus specifically on the development process of microemulsion systems, which also address the inclusion of plant oils in microemulsions, which place microemulsions as delivery systems for NSAIDs and other substances, as well as microemulsions for transdermal administration. These studies reinforce the therapeutic applicability of biocompatible MEs to hydrophilic and lipophilic compounds for the treatment of acute and chronic pain.

Key-words: Microemulsion. Treatment of Pain. Technological prospecting. Biotechnology.

1. INTRODUÇÃO

Termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidas, as ME são sistemas constituídos por dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, com estabilidade garantida por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água (DANIELSSON; LINDMAN, 1981; HATZOPOULOS et al., 2013). A existência de domínios lipofílicos e hidrofílicos em MEs permite a solubilização de moléculas hóspedes insolúveis em água ou óleo dentro do seu núcleo, ou na interface das gotículas manométricas (LAWRENCE; REES, 2000).

Esses sistemas foram descobertos por Hoar e Schulman, em 1943, e passaram a atrair considerável atenção em vista de seu uso em muitos produtos, como cremes alimentícios (MITSOU et al., 2016), cosméticos (VOLPE et al., 2018) e como carreadores de fármacos (DAMASCENO et al., 2011; CALLENDER et al., 2017; KAUR; MEHTA, 2017; SINDHU et al., 2018). Neste último ramo, as MEs podem aumentar a solubilização, dissolução e biodisponibilidade de fármacos. Além disso, podem permitir liberação prolongada e transporte de fármacos por via oral (LI et al.,

2014;), parenteral (REN et al., 2012), dérmica (SHARMA et al., 2016), transdérmica (CARVALHO et al., 2016; ALKRAD; TALHOUNI, 2018), pulmonar (MULLA et al., 2017), ocular (LIDICH; ASERIN; GARTI, 2016; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2018), bucal (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018; PADULA et al., 2018) e vaginal (BACHHAV; PATRAVALE, 2009). Na via transdérmica, as nanoestruturas podem funcionar como veículos para o transporte de bioativos através das membranas humanas devido à capacidade de aumentar a permeabilidade da pele a moléculas bioativas (SINTOV, 2015; HATHOUT; NASR, 2013).

Devido à sua alta solubilidade em água, menor tamanho de gotícula e melhoria da biodisponibilidade de fármacos, MEs são frequentemente preferidas em comparação com emulsões convencionais (MOGHIMIPOUR; SALIMI; EFTEKHARI, 2013). Fatores como métodos simples de preparação, baixo consumo de energia e pouca necessidade de material, que reduzem o custo de produção, também fornecem justificativa econômica para amplas aplicações desse sistema (TRIVEDI et al., 2012).

Callender et al. (2017) relatam o uso de MEs predominantemente na liberação de drogas lipofílicas (79,4%), por meio de microemulsões óleo-em-água produzidas com tensoativos não-iônicos (90%) para administração oral ou tópica. São encontrados trabalhos relacionando o uso de MEs para o tratamento farmacológico de neoplasias (DEHGHANI et al., 2017), dor aguda e crônica, doenças inflamatórias (ZANG et al., 2017; MAESTRELLI; BRAGAGNI; MURA, 2016; PINEROS et al., 2017) e infecções microbianas (KAUR; MEHTA, 2017; MA; DAVIDSON; ZHONG, 2016).

A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à percepção da dor, bem como à sensibilização periférica e central, pode fornecer a base para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017). Para o tratamento da dor crônica alguns AINES podem ser utilizados como adjuvantes analgésicos em associação com fármacos opióides com vistas a reduzir os requerimentos de opióides e fornecer uma abordagem multimodal da analgesia. Muitos artigos e depósitos de patentes relatam o uso de microemulsões para entrega sistêmica de AINES (FABREGAT-CID et al., 2011; DALE; STACEY, 2016; HERNÁNDEZ-PORRAS et al., 2017).

O uso de sistemas microemulsionados como carreadores de fármacos para o tratamento da dor pode superar limitações associadas às diversas classes desses fármacos. Eventos adversos como baixa estabilidade química, baixa permeabilidade à

membranas biológicas e graves efeitos de toxicidade são facilmente revertidos pelo uso de sistemas de transporte apropriados para a entrega dos compostos ativos. O desenvolvimento biotecnológico de sistemas em nanoescala para entrega local ou sistêmica de moléculas terapêuticas destinadas ao controle da dor constitui uma área de pesquisa em constante crescimento (MAESTRELLI; BRAGAGNI; MURA, 2016). Paralelamente a isso, a via transdérmica também se torna uma promissora alternativa para a redução de efeitos adversos na farmacoterapia da dor. Silva et al. (2008) desenvolveram uma ME contendo diclofenaco dietilamina como princípio ativo e mostraram a eficiência desse sistema em atravessar as barreiras epidérmicas para atingir as concentrações sistêmicas necessárias ao efetivo efeito farmacológico.

Assim, esta revisão de patentes apresenta uma prospecção tecnológica sobre o uso de MEs para o tratamento da dor, por via transdérmica, evidenciando as possibilidades profiláticas e terapêuticas dessa patologia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

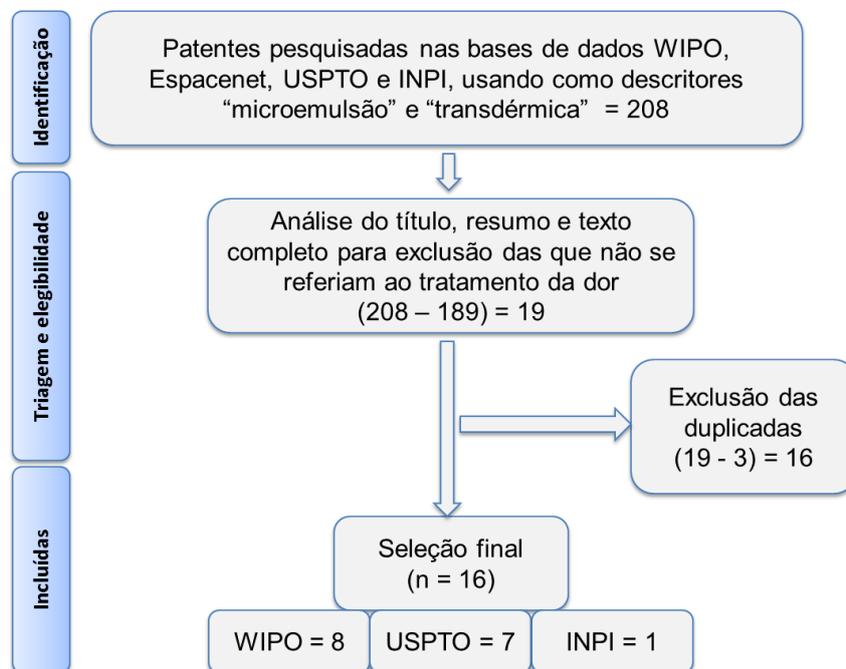
As patentes foram pesquisadas em quatro bases de dados: Organização Mundial da Propriedade Intelectual (*World Intellectual Property Organization - WIPO*), Escritório Europeu de Patentes (*European Patent Office - Espacenet*), Escritório de Marcas e Patentes dos Estados Unidos (*United States Patent and Trademark Office - USPTO*) e Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). A seleção de patentes foi baseada nos seguintes critérios de inclusão: patentes publicadas contendo “microemulsão” e “transdérmica” como palavras-chave no título ou no resumo, sem restrição de ano de publicação. Esses descritores foram pesquisados em português nas bases de dados INPI, e em inglês nas demais bases, foram selecionadas apenas as patentes que apresentavam no seu resumo ou na sua descrição alguma menção do uso do sistema microemulsionado, objeto da invenção, para o tratamento da dor. Foram excluídas as patentes duplicadas e que não relatavam o uso farmacológico das MEs especificamente para o tratamento da dor.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca nas quatro bases de dados retornou 208 patentes sobre microemulsões transdérmicas. Entretanto, após a adoção dos critérios de inclusão e exclusão foram

selecionadas dezesseis patentes descritas a seguir e relacionadas de acordo com seu enfoque principal.

Figura 1: Diagrama da pesquisa e triagem das patentes analisadas



3.1 Desenvolvimento de sistemas microemulsionados

Das dezesseis patentes analisadas, quatro tratam apenas do processo de desenvolvimento de sistemas micromulsionados, elencando aspectos de caracterização e possibilidades de utilização como carreadores de fármacos ou moléculas insolúveis em água com atividade farmacológica, incluindo o tratamento da dor. Larm et al. (2015) patentearam uma invenção (US20150258023) que descreve uma microemulsão do tipo óleo em água ou uma composição emulsionada submicrônica para administração dérmica de pelo menos uma substância farmacologicamente ativa. A composição inclui uma fase oleosa dispersa ao longo de uma fase aquosa, a fase oleosa incluindo pelo menos um óleo animal, mineral ou vegetal, um siloxano, um ácido graxo, um composto de halogênio e um álcool alcoxilado e pelo menos um tensoativo lipofílico. A fase aquosa é composta de pelo menos um tensoativo hidrofílico, água e, opcionalmente, um composto anfifílico.

O sistema descrito na patente mencionada acima apresenta as características peculiares de microemulsões, sistemas coloidais termodinamicamente estáveis, consistindo de fases oleosa e aquosa, com tamanho de gotículas dispersas tipicamente

com escala de tamanho nanométrico, estabilizadas por surfactantes e co-surfactantes (FANUN, 2012; CALLENDER et al., 2017).

Os autores da invenção destacam ainda que o ingrediente farmacologicamente ativo pode ser adequadamente incorporado em uma ou ambas as fases de óleo e/ou água. A fase de incorporação mais apropriada dependerá das características de solubilidade do ingrediente farmacologicamente ativo e do perfil de liberação da formulação. Além de permitir a entrega de drogas hidrofílicas e lipofílicas, as MEs melhoram a solubilidade do fármaco, garantem longa vida de prateleira e melhor relação custo-efetividade. Froelich et al. (2017) desenvolveram géis à base de microemulsão com indometacina e avaliaram os fatores que afetam suas características mecânicas e a liberação do fármaco. Eles observaram que os géis investigados revelaram características de liberação bastante prolongadas que podem estar relacionadas à estrutura específica dos sistemas projetados.

MEs se constituem também em sistemas de liberação controlada, apresentando perfis de liberação que se adequam a modelos matemáticos estabelecidos, como por exemplo, o modelo de ordem zero, modelo de primeira ordem, modelo de tempo de raiz quadrada de Higuchi, modelo de Korsmeyer-Peppas e modelo de Weibull. Cinco modelos matemáticos de liberação foram testados em um estudo feito por Premarathne, Karunaratne e Perera (2016) que desenvolveram um novo sistema de formulações micromulsionadas para entrega de diclofenaco com um significativo potencial para a indústria farmacêutica. Nesse trabalho, os perfis de liberação das formulações exibiram uma cinética de liberação de primeira ordem e o processo foi identificado como um modelo de liberação controlada por difusão para as primeiras oito horas.

Para essa invenção, também é destacada a possibilidade de adição de um intensificador de penetração/permeação, como o propilenoglicol. No entanto, esse componente pode, em alguns casos, interromper ou desestabilizar a formulação. Relacionado à este fato, destaca-se que o efeito da adição de terpenos na fase oleosa de microemulsões já foi investigado, evidenciando que as repetidas unidades de isopreno permitem que os terpenos sejam utilizados como intensificadores de penetração com baixa toxicidade em comparação com os intensificadores de penetração sintéticos (LIU; CHANG; HUNG, 2011).

Outro depósito de patente que descreve o processo de preparação de uma microemulsão ou emulsão submicrônica está sob número US20060057168, de Larm et

al. (2006), no qual são elencadas as faixas de temperatura utilizadas em cada etapa do processo.

A invenção US20140127320 patenteada por Salamone et al. (2014) também se refere à uma composição microemulsionada e ao método adaptado para administração de agentes hidrofílicos, biologicamente ativos, por via transdérmica. A microemulsão desenvolvida se caracteriza como reversa e opticamente transparente.

Nessa invenção, foi utilizado um solvente volátil e hidrofóbico, não irritante em contato com a pele intacta ou sob injúria. Tais solventes são particularmente úteis porque podem ser aplicados sem causar desconforto ao paciente. Além disso, a baixa tensão superficial facilita o fluxo por via transdérmica. Devido ao seu baixo calor de vaporização, esses solventes volatilizam rapidamente, depositando no local desejado as substâncias biologicamente ativas solubilizadas. Podem ser usados como solventes hidrofóbicos não irritantes para a pele os solventes de silicone como o hexametildissiloxano (HMDS) (calor de vaporização 34,8 KJ / mol), o isooctano (calor de vaporização 33,26 kJ / mol), que proporcionam excelente lubrificação e conforto.

De todos os fluidos de silicone, o hexametildissiloxano possui a mais rápida taxa de evaporação, a menor viscosidade e a menor tensão superficial, com a maior espalhabilidade. Entretanto, para que substâncias orgânicas ou inorgânicas biologicamente ativas dissolvam-se em solventes de silicone é necessário realizar o processo de preparação de microemulsão descrito por Salamone et al. (2014).

Ainda com relação ao desenvolvimento de microemulsões, destaca-se que novas abordagens de formulação baseada em nanotecnologia estão sendo desenvolvidas para melhorar a biodisponibilidade de fármacos (FIROOZA; NAFISIB; MAIBACH, 2015; FÜREDI et al., 2017; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2017). Magdassi, Netivi, Goshen (2011) depositaram um patente na qual descrevem um processo para a preparação de um pó redispersável de nanopartículas de um composto orgânico insolúvel em água (US20110021592). A primeira etapa desse processo se constitui na preparação de uma microemulsão de óleo em água compreendendo um composto orgânico insolúvel em água, um solvente orgânico volátil imiscível em água, água e pelo menos um tensoativo. Para a formação das nanopartículas, o processo segue com a remoção, por secagem, pulverização ou liofilização, dos solventes e da água de modo a formar o pó redispersível compreendendo as referidas nanopartículas, em uma forma particulada. Ao

final do processo, a solubilidade do composto orgânico insolúvel em água deve ser pelo menos cerca de cinco vezes maior do que na forma não processada.

Diversos trabalhos descrevem procedimentos para síntese de nanopartículas utilizando microemulsões (SALABAT; NABIYOUNI; FAR, 2011; SALABAT; SOLEIMANI, 2014; SOLEIMANI; SALABAT; TABOR, 2014). Tanimoghdam e Salabat (2018) desenvolveram um novo método para produção de nanopartículas de ouro funcionalizadas com tiol a partir de microemulsão usando brometo de tetraoctilamônio como um surfactante catiônico. Essa preparação consiste em misturar duas microemulsões contendo um precursor de íons de ouro e um agente redutor. Após a mistura das microemulsões, ocorre uma troca de reagentes entre micelas durante colisões brownianas com água. Há forças de van der Waals atraentes e forças osmóticas e elásticas repulsivas entre as micelas reversas. A troca de reagente reduz os íons metálicos pelo agente redutor e cria colóides de ouro estabilizados.

Apesar das recentes aplicações de microemulsões na síntese de nanomateriais, esse método apresenta baixo rendimento de nanopartículas e dificuldade de desemulsificação. Diante disso, Wang et al. (2014) sintetizaram nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) a partir de microemulsões em um sistema de reatores de microcanais, o que possibilitou o controle do tamanho e forma das partículas, impedindo a agregação das nanopartículas e a deposição de partículas nos microcanais do reator. Na abordagem, os reagentes em solução aquosa são confinados em gotículas extremamente pequenas, nas quais ocorre uma nucleação uniforme.

Em todas as patentes analisadas, é mencionado que durante a formação da microemulsão pode ser adicionado um co-solvente ou polímero. A otimização das propriedades macroscópicas das microemulsões, como volume, composição e viscosidade, pode envolver o uso de diferentes concentrações de co-solvente (TAGAVIFAR et al., 2018). Um co-solvente age como um co-tensioativo facilitando a obtenção de soluções translúcidas e termodinamicamente estáveis (CHIAPPISI; NOIREZ; GRADZIELSKI, 2016).

Além disso, fenômenos de agregação que ocorrem em uma mistura ternária formada por dois solventes mutuamente imiscíveis, A e B, e um terceiro que é simultaneamente miscível com A e B, também podem cumprir os requisitos para a formação de microemulsões livres de surfactantes. Isso ocorre em misturas líquidas ternárias contendo dois álcoois, sendo algumas vezes denominada de emulsificação

espontânea (FISCHER et al., 2015; LUCIA et al., 2017). O chamado anfossolvente, uma substância anfifílica, mas não um surfactante, é um solvente que é completamente ou pelo menos parcialmente miscível com as fases água e óleo, não podendo formar micelas em soluções a granel ou filmes ordenados na interface água-óleo, isto é, não possui as características dos surfactantes clássicos (HOU; XU, 2016).

As patentes que descrevem os processos de obtenção de sistemas microemulsionados destacam que pode ser incorporado ao sistema qualquer composto orgânico insolúvel em água e farmacologicamente ativo, incluindo fármacos analgésicos. Isso corrobora com os diversos estudos que mostram aumento da eficácia biofarmacêutica de substâncias ativas incorporadas em microemulsões (FROELICH et al., 2017; SEOK; LEE; PARK, 2018; LOPES et al., 2010; ALKRAD; TALHOUNI, 2018).

3.2 Óleos vegetais em Microemulsões

Novos estudos estão surgindo em que óleos à base de petróleo são substituídos por óleos vegetais e surfactantes com baixa ou nenhuma toxicidade para o meio ambiente, oferecendo novas opções na formulação de microemulsões (WANG et al., 2013; WANG et al., 2014). Óleos vegetais, também chamados de óleos essenciais, são compostos de misturas de triglicerídeos de cadeia longa, utilizados como matéria-prima em muitos campos, incluindo alimentício, cosmético e farmacêutico (SHARIFI-RAD et al., 2017; KEJLOVÁ et al., 2010; KHAYYAT; ROSELIN, 2018).

Óleos essenciais se constituem em misturas complexas de metabólitos secundários de plantas, dentre os quais os terpenos são os mais abundantes. Estes podem ser definidos como pequenos hidrocarbonetos orgânicos que podem ser cíclicos ou acíclicos, saturados ou insaturados, apresentando geralmente fórmula molecular $(C_5H_8)_n$. De acordo com o número de unidades de isopreno presentes na estrutura do terpeno, este pode ser denominado monoterpênóide, sesquiterpênóide, diterpênóide, sesterpênóide, triterpênóide, tetraterpênóide ou politerpênóide (EL-ZAEDDI et al., 2016; KHAYYAT; ROSELIN, 2018).

Das patentes analisadas, três enfatizam o uso de óleos essenciais no processo de desenvolvimento de microemulsões (US20130237613, BR1020170148009 e CN104306447). A patente brasileira de autoria de MACIEL et al. (2018) enfatiza o uso

de óleo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke e *C. multijuga* Hayne) objetivando a otimização da ação terapêutica desse óleo essencial na administração por via oral e tópica, em processo de reparo tecidual cutâneo, com ação fitoterápica analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante. Os bioformulados microemulsionados do óleo de copaíba foram avaliados via protocolos experimentais *in vivo* em feridas cutâneas, bem como, através de protocolos de dor aguda sendo evidenciada inibição de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, apresentando atividades anti-inflamatória, cicatrizante e analgésica satisfatórias.

A copaíba, *Copaifera* ssp., Fabaceae, é uma planta típica da flora brasileira, distribuída do norte ao sul do Brasil, comumente encontrada em florestas primárias e secundárias. É uma árvore caducifólia a semidecídua, com altura máxima de aproximadamente 15 a 30m e 50 a 80 cm de diâmetro na altura do peito (DAP) (COSTA et al., 2015). O óleo de copaíba, extraído de diversas espécies do gênero *Copaifera*, é amplamente utilizado para fins medicinais, com atividade anti-inflamatória (GONÇALVES et al., 2014; GOMES et al., 2010), anti-helmíntica (COSTA et al., 2017), cicatrizante (SANTOS et al., 2011) e dor (SARAIVA et al., 2015).

O óleo da resina do tronco de copaíba é conhecido por sua ação cicatrizante, antipsoriática, efeitos anti-genotóxicos e capacidade antioxidante (GELMINI et al., 2013). O extrato da folha de copaíba também contém polifenóis com propriedades antioxidantes e antitumorais (COSTA-MACHADO; BASTOS e FREITAS, 2013; SANTOS et al., 2010). Evidências também apontam que o fruto apresenta propriedades antioxidantes (BATISTA et al., 2016).

Já a patente chinesa, desenvolvida por Lisheng et al. (2015), descreve um gel de microemulsão de *Tripterygium wilfordii-caulis sinomenii* e seu modo de preparação, que envolve passos de dissolução do óleo essencial na fase oleosa, misturando uniformemente com o surfactante, o agente co-tensioativo e a água para obter uma microemulsão, regulando o valor de pH e com agitação uniforme.

Estudos recentes revelaram que o tratamento com extratos *T. wilfordii-caulis sinomenii* inibe a angiogênese da artrite reumatóide, sendo muito usado como fitoterápico na medicina tradicional chinesa (ZHANG; LI; GAO, 2017; WANG et al., 2017b). WANG et al. (2012) produziram um sistema microemulsionado de entrega transdérmica de *T. wilfordii* com o objetivo de resolver problema de toxicidade reprodutiva masculina frente à exposição oral de *T. wilfordii*.

Wang et al. (2015) relataram a formação de microemulsões utilizando óleos vegetais como fases oleosas. Entretanto, devido à complexidade estrutural de óleos naturais comparados com sistemas de microemulsão comuns, onde hidrocarbonetos lineares são usados como óleo, existe certa dificuldade em encontrar sistemas com uma grande zona de microemulsão (RIVERA-RANGEL et al., 2018).

Outro fato a se considerar é que óleos essenciais e/ou alguns de seus constituintes como os terpenos também podem ser utilizados como intensificadores de penetração devido às suas baixas toxicidades em comparação com os intensificadores de penetração sintéticos (BIRUSS; KAHLIG; VALENTA, 2007). Analisando os efeitos das relações limoneno/água nas características físico-químicas de carreadores de curcumina, Liu, Chang e Hung (2011) evidenciaram o aumento das taxas de permeação cutânea da curcumina em comparação com a microemulsão sem o monoterpeneo limoneno.

3.3 Microemulsões para entrega de AINES

A dor crônica representa um dos motivos mais frequentes para a demanda por atendimento médico entre a população, sendo definida como aquela que persiste além do tempo esperado de cura de uma lesão e pode perpetuar-se mesmo na ausência dela (FABREGAT-CID et al., 2011).

O tratamento de escolha para dor crônica frequentemente inclui opióides (LI et al., 2017; RAMOS-RANGEL et al., 2017). No entanto, o manejo de diversos tipos de dor crônica, como a dor pós-operatória, pode ocasionar reações adversas e até mesmo eficácia reduzida devido a uma aparente associação do uso de opióides com o aumento da tolerância e hiperalgesia (DYM; BOWLER; ZEIDAN, 2016). Essa situação de hiperalgesia e alodinia induzida por opióides é caracterizada por um estado de facilitação da transmissão nociceptiva que resulta na diminuição da curva dose-resposta (FABREGAT-CID et al., 2011; BEAL; WALLACE, 2016). Nesses casos, o alívio da dor deve ser cuidadosamente adaptado através de um plano de manejo que pode incluir adjuvantes como anti-inflamatórios não-esteroidais – AINEs (CASALENGUA et al., 2016).

A eficácia terapêutica dos AINEs pode ser melhorada com a utilização de diferentes veículos para encapsulamento ou incorporação, para posterior carreamento

desses fármacos e liberação sistêmica, principalmente, quando o tamanho de gotícula do sistema se enquadra em nanoescala (BADRI et al., 2016). As principais vantagens de sistemas microemulsionados, confirmadas por estudos *in vitro* e *in vivo*, incluem melhora da estabilidade, liberação controlada e aumento da biodisponibilidade do fármaco, melhorando a eficácia terapêutica (MAESTRELLI; BRAGAGNI; MURA et al., 2016). A incorporação de AINEs em sistemas microemulsionados também permite a superação de problemas como má solubilidade aquosa além de diminuir a toxicidade sistêmica (ARIDA; AL-TABAKHA, 2007).

O uso de microemulsões contendo AINEs para o tratamento da dor pode promover maior adesão do paciente ao tratamento uma vez que essas formulações são produzidas de forma a apresentarem reduzido tamanho de gotícula e cinética de liberação controlada. Além disso, AINEs incorporados a sistemas microemulsionados, administrados por via oral, apresentam a capacidade de absorção e biodisponibilidade aumentadas, por atravessar a camada de muco continuamente renovada que cobre o trato gastrointestinal e conduzir sistemicamente o fármaco incorporado (LAFFLEUR et al., 2014). Esses fatores estão associados às propriedades físico-químicas dos constituintes do sistema microemulsionado, tensoativo e co-tensoativo, fase oleosa e fase aquosa, que permitem que a substância ativa atravesse com maior facilidade as membranas biológicas e, conseqüentemente, tenha sua biodisponibilidade melhorada, tanto administrados por via oral, como por via transdérmica (LIUZZI et al., 2016).

A invenção GB2362825, desenvolvida por Pyo e Min (2002) trata de um adesivo transdérmico para drogas antiinflamatórias não-esteroidais, contendo alquilpirrolidona, um polietilenoglicol hidrofílico e tensoativo não-iônico hidrofílico difundido em uma base para adesivo transdérmico. Da mesma forma, as patentes IN274/DEL/2008 de autoria de Chandra e Sharma (2008) e US20100173876 de autoria de Lichtenberger e Shiqiang (2010) se referem à microemulsões para uso como carreadores de AINEs para administração transdérmica.

Os AINEs afetam vários graus de modulação da dor por meio da inibição da síntese de prostaglandina (PG). As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico via ciclooxigenase (COX) e possuem, dentre outros efeitos, ação pró-inflamatória. A isoforma COX-2 é responsável por sintetizar as prostaglandinas pró-inflamatórias e é o alvo de AINEs inibidores da COX-2 (JOSE, 2014; GRIM et al., 2014; LIU et al., 2018).

Evidências apontam que a ação analgésica de alguns AINES como o paracetamol, administrado sistemicamente pode ser atribuída a liberação aumentada de neurotransmissores de receptores espinais 5-HT 3, 5-HT 7 (DOGRUL et al., 2012), 5-HT 1A e 5-HT 1B (ROCA-VINARDELL et al., 2018) mediados por via serotoninérgica descendente, responsável pela modulação da dor no nível molecular espinal.

A isoforma COX-2 transforma o ácido araquidônico em prostaglandina E2 (PGE2). Esta, por sua vez, pode ativar diretamente os nociceptores através dos receptores da prostaglandina E (PE), sendo geralmente considerada um agente sensibilizante porque aumenta a sensibilização dos nociceptores ao diminuir o limiar dos canais de sódio resistentes à tetrodoxina, modula o canal do receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1) para sensação de calor, e sensibiliza os neurônios aferentes primários à bradicinina (ST-JACQUES; MA, 2014). Após a liberação de bradicinina pelos mastócitos, o limiar de calor é reduzido, o que causa a dor de longa duração associada à inflamação (FUSARO et al., 2010).

Além disso, a ativação de células imunológicas recrutadas no local da inflamação leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (ZAKERI; YAZDI, 2017). Certas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β também facilitam a sensibilização central e a hiperalgesia, uma vez que neurônios nociceptivos possuem receptores para essas citocinas em sua superfície, e a neutralização dessas citocinas pode resultar em redução rápida da dor antes da atenuação da inflamação (CIOATO et al., 2016; RABELO et al., 2016).

Gruber-Schoffnegger et al. (2013) demonstraram que a inibição da sinalização do TNF- α atenua a hipersensibilidade em modelos de neuropatia em roedores. Hoje sabe-se que a IL-6 é uma citocina que transfere sinais imunológicos periféricos para o SNC e contribui para o desenvolvimento da dor neuropática (SUN et al., 2017). Já o mecanismo pelo qual a IL-1 β contribui para a indução e manutenção da dor envolve um complexo multiproteico denominado inflamassoma que, após oligomerização, induz a ativação de pró-caspase1, iniciando o processamento de pró-IL-1 β (ZHANG et al., 2016).

Outros importantes mediadores inflamatórios estão relacionados com a modulação da dor periférica e central. O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no SNC, que está envolvido na dor aguda e crônica. Ferrari et al. (2014) descobriram que o glutamato desempenha um papel modulatório no gânglio da raiz

dorsal após hiperalgesia mecânica periférica inflamatória, ativando receptores N-metil-d-aspartato (NMDARs) nas células gliais satélites resultando em excitabilidade neuronal. Por isso, os NMDARs são receptores propostos como alvos farmacológicos para o tratamento da dor neuropática (NIESTERS; DAHAN, 2012). Entretanto, recentemente foi demonstrado que dois receptores metabotrópicos distintos de glutamato, mGlutRI e mGlutR5, podem induzir efeitos opostos, com mGlutRI desempenhando um papel pro-nociceptivo e mGlutR5 exercendo uma efeito antinociceptivo (RADWANI et al., 2017).

Os receptores centrais de GABA A também desempenham um papel na mediação da alodinia mecânica, principalmente induzida pelas grandes fibras A β mielinizadas após a inflamação. Nesse caso, o efeito anti-nociceptivo mediado pelo receptor é o resultado da ação inibidora, enquanto que o receptor GABA central exerce um efeito pró-nociceptivo, resultado da ação excitatória posterior à inflamação (KIM et al., 2017).

Como pode ser observado, muitos mediadores da cascata inflamatória induzem direta ou indiretamente uma resposta nociceptiva, tornando-os alvos farmacológicos também para o tratamento e manejo tanto da dor aguda como da dor crônica (PICCINELLI et al., 2017; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017; KHAN et al., 2018). Já foi relatado na literatura que os AINEs são eficazes no tratamento da dor lombar crônica e também da dor crônica causada pela osteoartrite (MYERS et al., 2014). Os AINEs são úteis no tratamento da dor pós-operatória desencadeada por mediadores inflamatórios, como bradicinina, PGE2 e citocinas, que são liberadas após dano tecidual (FUJITA et al., 2012; GUPTA; BAH, 2016).

Há também algumas evidências de que os AINEs são modestamente eficazes no tratamento da dor orofacial em camundongos com potencial envolvimento das vias colinérgica, serotoninérgica e opióide (MIRANDA et al., 2016) e como tratamento de primeira linha para disfunções temporomandibulares (DYM; BOWLER; ZEIDAN, 2016).

Os inventores definem que na microemulsão objeto da invenção podem ser usados AINEs como cetoprofeno, flurbiprofeno, piroxicam, tenoxicam, diclofenaco ou ferbinac. Já foi evidenciado que esses AINEs apresentam efeitos antinociceptivos e analgésicos na dor aguda e crônica. Abbas et al., (2018) demonstraram efeito analgésico do cetoprofeno oral antes da inserção do dispositivo intrauterino (DIU) de cobre na

percepção da dor durante o procedimento de inserção. Cetoprofeno também apresentou efeito analgésico frente a dor lombar mecânica (SERINKEN et al., 2016) e efeito antinociceptivo dose-dependente em condições de obesidade (JARAMILLO-MORALES et al., 2016).

Também é relatado que o diclofenaco é um AINE que tem sido amplamente utilizado no tratamento da dor e tem mostrado efeito antinociceptivo em modelos de dor neuropática (IBRAHIM et al., 2018). Em associação com a codeína, o diclofenaco apresenta eficácia na analgesia preventiva, com controle sobre a dor e o edema no período pós-operatório de cirurgia de extração do terceiro molar (LIMA et al., 2018).

Outro depósito de patente que se refere ao uso de microemulsões como carreadores de AINES é de autoria norte-americana, depositada por Lichtenberger (2015) sob o número US20150011507. Nessa invenção, são propostas composições compreendendo óleos de lecitina e AINEs para proteger o trato gastrointestinal e proporcionar aumento da atividade terapêutica.

O uso crônico de AINEs pode causar hipersensibilidade, tolerância e complicações no trato gastrointestinal (CAMPOVERDE et al., 2016). De acordo com Bjarnason et al. (2018), os mecanismos de indução de danos gastrointestinais por AINEs através de processos mediados pela COX e independentes de COX incluem a interação dos AINEs com os fosfolípidos da mucosa gástrica com posterior desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, que inicia alterações bioquímicas que prejudicam a função da barreira gastrointestinal e provocam agressores luminiais, resultando em erosões e úlceras, com potenciais complicações de sangramento, perda de proteína, formação de estenose e perfuração.

Para prevenir esse efeito adverso são recomendáveis medidas de gastroproteção como o uso de inibidores da bomba de prótons (VELASCO-ZAMORA; GÓMEZ-REYES; USCANGA, 2016). Ramírez et al. (2018) ressaltam que o consumo de AINEs e sua coexistência com infecção por *Helicobacter pylori* exibe um efeito sinérgico ou aditivo que favorece o aparecimento da úlcera péptica. Nestes pacientes, se a erradicação da *H. pylori* for realizada antes de se iniciar o tratamento com AINEs, o risco de desenvolvimento de úlcera é diminuído, embora a erradicação do *H. pylori* não exclua a necessidade de tratamento gastroprotetor em pacientes que necessitam de AINEs.

A patente US20150011507, depositada por Lichtenberger (2015), trata de um fluido transportador não-aquoso de AINEs, que inclui uma concentração de óleo de lecitina como tensoativo que atua reduzindo os efeitos adversos dos AINEs no trato gastrointestinal, aumentando sua biodisponibilidade. A lecitina é uma mistura complexa de fosfatídeos, que consistem principalmente de fosfatidilcolina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina e fosfatidilinositol combinados com diferentes quantidades de substâncias como triglicerídeos e ácidos graxos. As principais fontes de lecitina são soja e gema de ovo (RAUT et al., 2012).

Um dos constituintes do óleo de lecitina usado na invenção é a fosfatidilcolina (PC), um componente importante da camada de muco gastrointestinal que possui propriedades antiinflamatórias intrínsecas (EHEHALT et al., 2010). Olson, Diebel e Liberati (2014) realizaram um estudo *in vitro* com células epiteliais intestinais e demonstraram que a suplementação com PC exógena protege contra a lesão da barreira intestinal, evidenciando uma diminuição de 3 a 4 vezes nas citocinas pró-inflamatórias, TNF α e IL-6.

Além da ação gastroprotetora da lecitina, essa molécula também apresenta propriedades emulsionantes. Configurada como um agente tensoativo multifuncional de baixo peso molecular, a molécula de lecitina pode ser dividida em uma porção de ácido graxo, que é atraída por drogas lipofílicas, e uma porção de ácido fosfórico, que é atraída por drogas hidrofílicas. Por causa desses dois aspectos, as moléculas de lecitina se organizam na fronteira entre líquidos imiscíveis, como óleo e água. Este arranjo reduz a tensão interfacial entre o óleo e a água e produz emulsões relativamente estáveis (MORAN-VALERO et al., 2017; WANG et al., 2017; RIEHM et al., 2017).

3.4 Microemulões e a via transdérmica de administração

O sistema de entrega transdérmica de drogas é um método menos invasivo, mais confortável e conveniente para a entrega local e sistêmica de medicamentos. Pode proporcionar muitas vantagens, incluindo diminuição do efeito do metabolismo de primeira passagem do fármaco, prevenção de irritação gastrointestinal, fornecimento sustentado do fármaco para proporcionar padrão plasmático estável, diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos e maior adesão do paciente (LIN et al., 2018).

A substância terapêutica aplicada na pele só pode atuar quando permeia pelo menos sua camada mais externa, o estrato córneo, que oferece resistência à penetração dificultando a eficácia terapêutica do fármaco (PETCHSANGSAI et al., 2014). Várias substâncias ativas podem ser incorporadas em sistemas microemulsionados devido à elevada capacidade de solubilização. As microemulsões são capazes de penetrar através das membranas biológicas, uma vez que seus componentes podem interagir com as camadas lipídicas do estrato córneo e alterar sua integridade estrutural, levando a um aumento na permeação transdérmica do fármaco (AZEEM et al., 2009; KUPPER et al., 2017).

Esta propriedade pode estar relacionada com a presença de surfactantes e co-surfactantes atuando como intensificadores de absorção, bem como, com a grande área interfacial resultante do pequeno diâmetro da gotícula e boa capacidade de umectação. Vale ressaltar que altas concentrações de surfactante e/ou agente co-tensoativo, podem causar irritação na pele. Por isso, há um interesse crescente no uso de surfactantes não-iônicos, que são supostamente menos tóxicos e irritantes do que outros tipos de surfactantes (TODOSIJEVI et al., 2015).

Em sistemas microemulsionados, a fase interna pode atuar como um reservatório para o ingrediente farmacêutico ativo, que se difunde através da fase externa para o local de ação. Como resultado, o gradiente de concentração entre a fase contínua e a pele é mantido no mesmo nível. Assim, os sistemas de administração de fármacos baseados em microemulsão também podem ser utilizados para o ajuste da cinética de entrega de fármaco (FROELICH et al., 2017; LAWRENCE; REES, 2000).

Das patentes analisadas, duas apresentam como enfoque principal a via transdérmica para administração da microemulsão. A patente chinesa CH20130315969, de autoria de Barnikol-Keuten e Gulik (2013), refere-se a um sistema de aplicação que consegue dispersar a microemulsão em gotículas utilizando o gás oxigênio pressurizado, produzindo assim uma microemulsão atomizada enriquecida com oxigênio. Ao aplicar a microemulsão na pele do paciente a partir do referido sistema de aplicação, a substância medicinal penetra no estrato córneo, entregando assim por via percutânea a substância medicinal ao paciente.

A invenção reivindica o uso de um dispositivo pressurizado para aplicação da microemulsão. Essa tecnologia utiliza princípios conceituais de transporte pneumático e consiste em um ejetor *venturi* que pode formar campos de vácuo para transportar

partículas através do efeito venturi, caracterizado pela utilização de força motriz advinda da pressão exercida no tudo de gás pressurizado (XU; LIU; PANG, 2016). Tubos ejetores venturi tem sido amplamente utilizados na indústria devido a sua estrutura simples e baixo custo (JI et al., 2015).

Através das gotículas extraordinariamente pequenas do atomizador de alto desempenho, a microemulsão carregada com a substância ativa é aplicada à pele em forma finamente dividida. Devido à baixa tensão superficial da microemulsão, surge um enorme efeito de espalhamento nesta conexão. A camada córnea da pele e a microemulsão possuem estruturas semelhantes, como lamelas ou túbulos, formados a partir de bicamadas lipídicas. Por isso, a aplicação finamente dispersa das gotas presumivelmente resulta em "fusão" da microemulsão com a camada córnea de acordo com o princípio "*similia similibus*". O princípio da similitude terapêutica já foi empregado na medicina homeopática e terapêutica de forma geral (CARLUCCI; DAMONTE; SCOLARO, 2011; TEIXEIRA, 2011).

Como resultado da fusão, as estruturas supracitadas dissolvem-se e as substâncias ativas podem difundir-se na pele. O oxigênio usado como gás propulsor, assim como as substâncias ativas, é introduzido na camada da pele, o que resulta em aumento na pressão parcial de oxigênio na pele, estimulando fortemente o fluxo microcirculatório que, conseqüentemente, difunde o princípio ativo convectivamente para dentro do tecido (BARNIKOL-KEUTEN; GULIK, 2013).

Já a invenção US20050266085, de autoria norte-americana (WARNER; ZHANG, 2005), descreve formulações de emulsão e microemulsão gelificadas para administração de medicamentos por via dérmica, incluindo a via transdérmica. A emulsão gelificada contendo a droga foi formada por arrefecimento do gel térmico abaixo do ponto de fusão. Já o método de preparo da microemulsão contendo o fármaco inclui: a) formação de uma fase oleosa compreendendo um fármaco lipofílico e um óleo, sendo o referido fármaco pelo menos cinco vezes mais solúvel no óleo utilizado do que em água; b) formação de uma fase aquosa; c) emulsificação da fase aquosa com a fase oleosa na presença de pelo menos um tensoativo para formar a microemulsão e d) incorporação da microemulsão em um sistema gelificado de entrega dérmica.

O fármaco pode ser incorporado ao sistema de microemulsão em várias etapas do processo, entretanto, geralmente o fármaco é introduzido nas microemulsões por pré-dissolução na fase oleosa. Schwarz et al. (2012) adicionou o fármaco em pó à mistura

de fase oleosa e tensoativos antes da adição da fase aquosa. Posteriormente, a água destilada foi adicionada gota a gota sob agitação magnética. Da mesma forma, Zhang e Michniak-Kohn (2018) dissolveram o fármaco clotrimazol na mistura de miristato de isopropila (fase oleosa), Labrasol (tensoativo) e Cremophor EL (co-tensoativo) com o auxílio de sonicação e, em seguida, foi adicionada água e misturado por agitação em vórtice.

3.5 Outras substâncias incorporadas em microemulsões

Além das patentes descritas, foram encontradas três invenções que enfatizam sistemas microemulsionados nos quais são incorporadas outras substâncias diferentes das que já foram mencionadas. No entanto, os próprios autores ressaltam que essas microemulsões também podem ser carreadoras de fármacos para o tratamento da dor para administração por via transdérmica.

A invenção WO/2006/061827, de Nissim, Aserin e Kogan (2006), refere-se a composições farmacêuticas na forma de microemulsões contendo carbamazepina, evidenciando propriedades de liberação prolongada da microemulsão.

Lu e Shower (2004) patentearam um sistema de transporte de lipoproteínas artificiais para materiais bioativos, US20040234588. A invenção compreende uma microemulsão como veículo para um agente bioativo, especialmente um polinucleotídeo, por exemplo, DNA ou RNA, que está dissolvido dentro ou disperso em um ou mais núcleos lipídicos ou do lipídio anfifílico ou que está associado à superfície da microemulsão.

Já a invenção norte-americana US6191105, de Ekwuribe et al. (2001), trata de uma formulação terapêutica compreendendo uma microemulsão água-em-óleo incluindo uma fase lipofílica e uma fase hidrofílica, com equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) entre 3 e 7. O agente terapêutico da composição é preferencialmente a insulina de tal modo que essa substância tem uma resistência *in vivo* melhorada à degradação enzimática, em relação à insulina isolada. As composições de microemulsão dessa invenção podem ser úteis tanto em aplicações terapêuticas, como não-terapêuticas, por exemplo, de diagnóstico.

3.6 Opinião dos especialistas

Micromemulsões representam sistemas anfifilicamente transparentes, opticamente isotrópicos e termodinamicamente estáveis, constituídas por duas fases imiscíveis, água e óleo (BARDHAN et al., 2013). São sistemas introduzidos como veículos promissores para a liberação transdérmica de fármacos (HATHOUT et al., 2010; SINTOV, 2015; YEHA et al., 2017).

Esse fato pode ser confirmado quando se observa os resultados da seleção das patentes descritas nesse trabalho que mostraram o potencial de utilização de sistemas microemulsionados para incorporação de substâncias na terapêutica da dor (tabela 1).

O aumento do interesse pelas microemulsões deriva de seus potenciais benefícios em relação às formulações tradicionais, destacando-se grande área interfacial com alta capacidade de solubilização, melhoramento da penetração através das membranas biológicas, alta estabilidade e facilidade de preparo (LOPES et al., 2010). Callender et al. (2017) destacam o grande desafio para a pesquisa com MEs em regiões como a América do Norte e a Europa nos últimos cinco anos e reforçam os potenciais benefícios econômicos que poderiam estar associados ao uso de MEs na distribuição de medicamentos.

O estrato córneo representa uma importante barreira à penetração de numerosas substâncias exógenas na pele, incluindo agentes ativos. Diante disso, as microemulsões representam um veículo adequado para aumentar a permeabilidade transdérmica de fármacos devido à presença de tensoativos que diminuem a tensão superficial do sistema associado ao pequeno tamanho da gotícula (SINTOV, 2015).

Devido à presença de diferentes domínios de polaridade variável, as microemulsões podem incorporar uma ampla gama de moléculas de fármaco tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas. Além disso, as microemulsões melhoram a solubilização de drogas lipofílicas e fornecem proteção contra oxidação e hidrólise.

Diversos estudos demonstram a eficácia da incorporação de fármacos para o tratamento da dor tanto aguda como crônica (CASALENGUA et al., 2016; ROCAVINARDELL et al., 2018).

Dentre os fármacos utilizados para o tratamento da dor crônica, estão os AINEs, uma vez que diversas condições patológicas de origem inflamatória estão associadas à percepção da dor, de forma que a compreensão dos mecanismos moleculares

subjacentes à associação entre mediadores inflamatórios e a sensibilização periférica e central pode fornecer a base para o seu tratamento (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

Também existem evidências da inclusão de óleos essenciais no desenvolvimento de microemulsões para o tratamento da dor. Esses compostos são utilizados tanto pelo seu potencial terapêutico (MACIEL et al., 2018), como por sua ação como intensificador de permeação na pele (LIU; CHANG; HUNG, 2011). De forma geral, as microemulsões são sistemas alternativos para entrega transdérmica de fármacos utilizados no tratamento da dor, devido às características físico-químicas de seus constituintes que propiciam melhoria da solubilidade e estabilidade de substâncias bioativas incorporadas nesses sistemas contribuindo para o aumento da eficiência terapêutica.

Esses sistemas são cada vez mais utilizados na farmacoterapia de diversas patologias devido ao seu baixo custo de preparação, boa estabilidade e alta biodisponibilidade, atuando como sistemas carreadores de fármacos. Entretanto, a microestrutura do sistema, seus constituintes e métodos de desenvolvimento devem ser adequadamente escolhidos, considerando fatores como propriedades físico-químicas da substância a ser incorporada.

Vale destacar que a incorporação de fármacos em sistemas microemulsionados constitui uma importante estratégia farmacêutica para superar questões de solubilidade, que influencia fortemente a farmacocinética e a farmacodinâmica das drogas (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2015).

Embora sejam descritas invenções que tratam de microemulsões com potencial para o tratamento da dor por via transdérmica, e o papel desempenhado pela estrutura do sistema microemulsionado tenha sido comprovadamente reconhecido, os mecanismos de transporte transdérmico associados às microestruturas do sistema ainda devem ser elucidados e investigações adicionais são necessárias para explorar plenamente o potencial das microemulsões na entrega transdérmica de substâncias bioativas.

Tabela 1. Relação de patentes sobre microemulsão transdérmica para o tratamento da dor

n°. da Patente	Título	Inventores (Companhia/Instituição)	País de proteção	Ano	CIP	Enfoque principal
US20150258023	Microemulsion e sub-micron emulsion process e compositions	Larm et al. (2015) (STIEFEL WEST COAST LLC)	US	2015		
US20060057168	Microemulsion process and composition	Larm e Harding (2006) (TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW, LLP)	US	2006	A61K	Processo de desenvolvimento
US20140127320	Delivery of biologically-active agents using volatile, hydrophobic solvents	Salamone et al. (2014) (ROCHAL INDUSTRIES, LLP)	US	2014		
US20110021592	Organic nanoparticles obtained from microemulsions by solvent evaporation	Magdassi; Netivi; Goshen (2011) (WINSTON & STRAWN LLP)	US	2011		
US20130237613	Sugar-based surfactant microemulsions containing essential oils for cosmetic and pharmaceutical use	Sangu (2013) (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH)	US	2013		
BR1020170148009	Formulados a base de óleo de copaíba biodisponibilizados para uso oral e tópico associado com aplicações terapêuticas na analgesia, inflamação e cicatrização	MACIEL et al. (2018) -----	BR	2018	A61K	Óleos essenciais em microemulsões
CN104306447	<i>Tripterygium wilfordii-caulis sinomenii</i> microemulsion gel and preparation method thereof	Lisheng et al. (2015) (GUANGZHOU UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE)	CN	2015		
US6455067	Transdermal patch for nonsteroidal antiinflammatory drug(s)	Pyo e Min (2002) (SANG A PHARMACEUTICAL CO LTD)	US	2002	A61K	Microemulsões para entrega de AINES

IN274/DEL/2008	Microemulsion	Chandra e Sharma (2008) -----	IN	2008		
US20100173876	Oil-based nsaid compositions and methods for making and using same	Lichtenberger e Shiqiang (2010) (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)	US	2010		
US20150011507	Compositions comprising lecithin oils and NSAIDs for protecting the gastrointestinal tract and providing enhanced therapeutic activity	Lichtenberger (2015) (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)	US	2015		
CH20130315969	Medicament and System for the Percutaneous Preparation of Medicaments	Barnikol-Keuten e Gulik (2013) (MEDDROP TECHNOLOGY)	CH	2013	A61K	Via de administração transdérmica
US20050266085	Gelled emulsion and microemulsion formulations for dermal drug delivery	Warner e Zhang (2005) (THORPE NORTH & WESTERN, LLP)	US	2005		
WO/2006/061827	Microemulsion comprising carbamazepine having solubility	Nissim; Aserin; Kogan (2006) (NUTRALEASE LTD)	WO	2006		
US20040234588	Artificial lipoprotein carrier system for bioactive materials	Lu e Shower (2004) (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC)	US	2004	A61K	Microemulsões como carreadoras de outras substâncias
US6191105	Hydrophilic and lipophilic balanced microemulsion formulations of free-form and/or conjugation-stabilized therapeutic agents such as insulin	Ekwuribe et al. (2001) (PROTEIN DELIVERY, INC.)	US	2001		

Fonte: elaborado pelo autor. Abreviações: US-Estados Unidos, BR-Brasil, CN-China, IN-Inglaterra, CH-Suíça, WO-Patente Internacional, A61K-preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.M.; ALI, S.S.; SALEM, M.N.; SABRY, M. Effect of oral ketoprofen on pain perception during copper IUD insertion among parous women: A randomized double-blind controlled trial. **Middle East Fertility Society Journal**, 2018.

ALKRAD, J.A.; TALHOUNI, A.A. In vivo and in vitro study of transdermal application of diclofenac sodium using nonionic microemulsions as colloidal drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.43, p.27-33, 2018.

ARIDA, A.I.; AL-TABAKHA, M.M. Encapsulation of ketoprofen for controlled drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.66, p.48-54, 2007.

AZEEM, A.; KHAN, Z. I.; AQIL, M.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; TALEGAONKAR, S. Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, p.535–547, 2009.

BEAL, B.R.; WALLACE, M.S. An Overview of Pharmacologic Management of Chronic Pain. **Medical Clinics For North America**, v.100, p.65–79, 2016.

BJARNASON, I.; SCARPIGNATO, C.; HOLMGREN, E.; OLSZEWSKI, M.; RAINSFORD, K.D.; LANAS, A. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Gastroenterology**, v.154, p.500–514, 2018.

BACHHAV, Y.G.; PATRAVALE, V.B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.365, p.175–179, 2009.

BADRI, W.; MILADI, K.; NAZARI, Q.A.; GREIGE-GERGES, H.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview,

progress, challenges and prospects. **International Journal of Pharmaceutics**. v.515, p.757-773, 2016.

BARDHAN, S.; KUNDU, K.; SAHA, S.K.; PAUL, B.K. Physicochemical studies of mixed surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.402, p.180–189, 2013.

BARNIKOL-KEUTEN, D.; GULIK, D. Medicament and System for the Percutaneous Preparation of Medicaments. CH20130315969 (2013).

BATISTA, A.G.; FERRARI, A.S.; CUNHA, D.C.; SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.B.; CORREA, L.C.; PRADO, M.A.; CARVALHO-SILVA, L.B.; ESTEVES, E.A.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M.R. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. **Food Chemistry**, v.197, p.1153–1159, 2016.

BIRUSS, B.; KAHLIG, H.; VALENTA, C. Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones. **International Journal of Pharmaceutics**, v.328, p.142–151, 2007.

CALABRESE, F.; ROSSETTI, A.C.; RACAGNI, G.; GASS, P.; RIVA, M.A.; MOLTENI, R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity, *Front. Cell. Neuroscience*, v.8, p.430, 2014.

CALLENDER, S.P.; MATHEWS, J.A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S.D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.526, p.425–442, 2017.

CAMPOVERDE, K.C.; GINER-MUNOZ, M.T.; VALDEZ, L.M.; VOLQUEZ, M.R.; BLASCO, J.L.; MACHINENA, A.; PLAZA, A.M. Hypersensitivity reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs and tolerance to alternative drugs. **Anales Pediatría (Barc)**.v.84, p.148-153, 2016.

CARVALHO, A.L.M.; SILVA, J.A.; LIRA, A.A.M.; CONCEIÇÃO, T.M.F.; NUNES, R.S.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C.; SARMENTO, V.H.V.; LEAL, L.B.

SANTANA, D.P. Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal zidovudine delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.188-2193, 2016.

CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; SCOLARO, L.A. Virus driven evolution: A probable explanation for “Similia Similibus Curantur” philosophy. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p.798–802, 2011.

CASALENGUA, M.L.T.; HOLGADO, J.S.; DÍAZ, M.B.H.; PEÑA, M.P.A. Uso de opioides en pacientes con dolor crónico. **Terapêutica em APS**, v.23, p.607-16, 2016.

CHIAPPISI L, NOIREZ L, GRADZIELSKI M. A journey through the phase diagram of a pharmaceutically relevant microemulsion system. **Journal Colloid Interface Science**, v.473, p.52–9, 2016.

CHANDRA, A.; SHARMA, P.K. Microemulsion. IN274/DEL/2008, 2008.

CIOATO, S.G.; MEDEIROS, L.F.; MARQUES-FILHO, P.R.; VERCELINO, R.; SOUZA, A.; SCARABELOT, V.L.; OLIVEIRA, C.; ADACHI, L.N.S.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I.L.S. Long-lasting effect of transcranial direct current stimulation in the reversal of hyperalgesia and cytokine alterations induced by the neuropathic pain model. **Brain Stimulation**, v.9, p.209–217, 2016.

COSTA, J.C.; VALLADÃO, G.M.R.; PALA, G.; GALLANI, S.U.; KOTZENT, S.; CROTTI, A.E.M.; FRACAROLLI, L.; SILVA, J.J.M.; PILARSKI, F. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v.471, p.72–79, 2017.

COSTA, M.S.; FERREIRA, K.E.B.; BOTOSSO, P.C.; CALLADO, C.H. Growth analysis of five Leguminosae native tree species from a seasonal semideciduous lowland forest in Brazil. **Dendrochronologia**, v.36, p.23–32, 2016.

COSTA-MACHADO, A. R. M.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Dynamic maceration of *Copaifera langsdorffii* leaves: a technological study using fractional factorial design. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, p.79–85, 2013.

DALE, R.; STACEY, B. Multimodal treatment of chronic pain. **Medical Clinics Of North America**, v.100, p.55–64, 2016.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador paramoléculas insolúveis. **Revista De Ciências Farmacêuticas Básica E Aplicada**, v.32, n.1, p.9-18, 2011.

DANIELSSON, I.; LINDMAN, B. The definition of microemulsion, **Colloids and Surfaces**, v.3, p.391–392, 1981.

DOGRUL, A.; SEYREK, M.; AKGUL, E.O.; CAYCI, T.; KAHRAMAN, S.; BOLAY, H.. Systemic paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT(7) receptors. **European Journal Of Pharmacology**, v.677, p.93–101, 2012.

DYM, H.; BOWLER, D.; ZEIDAN, J. Pharmacologic treatment for temporomandibular disorders. **Dental Clinics Of North America**, v.60, p.367–379, 2016.

EHEHALT, R.; BRAUN, A.; KARNER, M.; FÜLLEKRUG, J.; STREMMEL, W. Phosphatidylcholine as a constituent in the colonic mucosal barrier—physiological and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.1801, p.983-993, 2010.

EKWURIBE, N. N.; RAMASWAMY, M.; RADHAKRISHNAN, B.; ALLAUDEEN, H.S.S. Hydrophilic and lipophilic balanced microemulsion formulations of free-form and/or conjugation-stabilized therapeutic agents such as insulin. US6191105 (2001).

EL-ZAEDDI, H.; MARTÍNEZ-TOMÉ, J.; CALÍN-SÁNCHEZ, A.; BURLÓ, F.; CARBONELL-BARRACHINA, A.A. Volatile composition of essential oils from different aromatic herbs grown in mediterranean regions of Spain. **Foods**, v.5, p. 41-54, 2016.

FABREGAT-CID, G.; ASENSIO-SAMPER, J. M.; VILLANUEVA-PÉREZ, V.; LÓPEZ-ALARCÓN, M. D.; ANDRÉS-IBÁÑEZ, J. Manejo perioperatorio del dolor en

el paciente en tratamiento crónico con opiáceos. **Revista Espanola De Anestesiologia Y Reanimacion**, v.58, p.25-33, 2011.

DEHGHANI F.; FARHADIAN, F; GOLMOHAMMADZADEH, S; BIRIAEE, A.; EBRAHIMI, M.; KARIMI, M. Preparation, characterization and in-vivo evaluation of microemulsions containing tamoxifen citrate anti-cancer drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, p.479–489, 2017.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p.306–313, 2012.

FERRARI, L.F.; LOTUFO, C.M.; ARALDI, D.; RODRIGUES, M.A.; MACEDO, L.P.; FERREIRA, S.H.; PARADA, C.A. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, p.18363–18368, 2014.

FISCHER, V.; MARCUS, J.; TOURAUD, D.; DIAT, O.; KUNZ, W. Toward surfactant-free and water-free microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.453, p.186–193, 2015.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. **Materials Science & Engineering C**, v.86, p.129–143, 2018.

FROELICH, A.; OSMALEK, T.; SNELA, A.; KUNSTMAN, P.; JADACH, B.; OLEJNICZAK, M.; ROSZAK, G.; BIAŁAS, W. Novel microemulsion-based gels for topical delivery of indomethacin: formulation, physicochemical properties and in vitro drug release studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.507, p.323–336, 2017.

FUJITA, I.; OKUMURA, T.; SAKAKIBARA, A.; KITA, Y. Involvement of inflammation in severe post-operative pain demonstrated by pre-surgical and post-surgical treatment with piroxicam and ketorolac. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 64 (5) (2012) 747–755.

FÜREDI, P.; PÁPAY, Z.E.; KOVÁCS, K.; KISS, B.D.; LUDÁNYI, K.; ANTAL, I.; KLEBOVICH, I. Development and characterization of the voriconazole loaded lipid-based nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.132, p.184–189, 2017.

FUSARO, M.G.C.O.; SILVA, A.P.; ARALDI, D.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. P2X3 and P2X2/3 receptors mediate mechanical hyperalgesia induced by bradykinin, but not by pro-inflammatory cytokines, PGE2 or dopamine. **European Journal of Pharmacology**, v.649, p.177–182, 2010.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSEMI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v.440, p.170–178, 2013.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.177–183, 2010.

GONÇALVES, E.S.; SILVA, J.R.; GOMES, C.L.; NERY, M.B.L.; NAVARRO, D.M.A.F.; SANTOS, G.K.N.; SILVA-NETOD, J.C.; COSTA-SILVA, J.H.; ARAÚJO, A.V.; WANDERLEY, A.G. Effects of the oral treatment with *Copaifera multijuga* oil on reproductive performance of male Wistar rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, p.355-362, 2014.

GRIM, T.W.; GHOSH, S.; HSU, K.L.; CRAVATT, B.F.; KINSEY, S.G.; LICHTMAN, A.H. Combined inhibition of FAAH and COX produces enhanced anti-allodynic effects in mouse neuropathic and inflammatory pain models. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.124, p.405–411, 2014.

GRUBER-SCHOFFNEGGER, D.; DRDLA-SCHUTTING, R.; HONIGSPERGER, C.; WUNDERBALDINGER, G.; GASSNER, M.; SANDKUHLER, J. Induction of thermal

hyperalgesia and synaptic long-term potentiation in the spinal cord lamina I by TNF-alpha and IL-1beta is mediated by glial cells, **Journal Of Neuroscience**, v.33, 6540–6551, 2013.

GUPTA, A.; BAH, M. NSAIDs in the treatment of postoperative pain, **Current Pain Headache Reports Journal**, v.20, p.62, 2016.

HATHOUT, R.M.; NASR, M. Transdermal delivery of betahistine hydrochloride using microemulsions: physical characterization, biophysical assessment, confocal imaging and permeation studies, **Colloids Surface B**, v.110, p.254–260, 2013.

HATZOPOULOS, M.H.; EASTOE, J.; DOWDING, P.J.; GRILLO, I. Cylinder to sphere transition in reverse microemulsions: the effect of hydrotropes. **Journal of Colloid Interface Science**, v.392, p.304–310, 2013.

HERNÁNDEZ-PORRAS, B.C.; PLANCARTE-SÁNCHEZ, R.; ALARCÓN-BARRIOS, S.; SÁMANO-GARCÍA, M. Síndrome doloroso regional complejo: revisión. **Cirugía y Cirujanos**, v.85, p.366-374, 2017.

HOU, W.; XU, J. Surfactant-free microemulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.25, p.67–74, 2016.

IBRAHIM, M.A.; ABDELZAHER, W.Y.; ROFAEIL, R.R.; ABDELWAHAB, S. Efficacy and safety of combined low doses of either diclofenac or celecoxib with gabapentin versus their single high dose in treatment of neuropathic pain in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.100, p.267–274, 2018.

JARAMILLO-MORALES, O.A.; ESPINOSA-JUÁREZ, J.V.; GARCÍA-MARTÍNEZ, B.A.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. Ketoprofen and antinociception in hypo-oestrogenic Wistar rats fed on a high sucrose diet. **European Journal of Pharmacology**, v.788, p.168–175, 2016.

JI, D.; ZHANG, M.; XU, T.; WANG, K.; LI, P.; JU, F. Experimental and numerical studies of the jet tube based on venture effect. **Vacuum**, v.111, p.25-31, 2015.

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

JOSE, F.F. O papel dos anti-inflamatórios não hormonais no tratamento da dor musculoesquelética. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.102, n.5, 2014.

KAUR, G.; MEHTA, S.K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.529, p.134–160, 2017.

KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; BENDO VÁ, H.; GAJDOŠ, P.; KOLÁŘOVÁ, H. Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. **Toxicology In Vitro**, v.24, p.2084-2089, 2010.

KHAN, J.; NOBORU, N.; IMAMURA, Y.; ELIAV, E. Effect of Pregabalin and Diclofenac on tactile allodynia, mechanical hyperalgesia and pro inflammatory cytokine levels (IL-6, IL-1 β) induced by chronic constriction injury of the infraorbital nerve in rats. **Cytokine**, v.104, p.124–129, 2018.

KHAYYAT, S.A.; ROSELIN, L.S. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2018.

KIM, M.J.; PARK, Y.H.; YANG, K.Y.; JU, J.S.; BAE, Y.C.; HAN, S.K.; AHN, D.K. Participation of central GABAA receptors in the trigeminal processing of mechanical allodynia in rats. **Korean Journal Physiology & Pharmacology**, v.21, p.65–74, 2017.

KUPPER, S.; KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I.; SZUMAŁA, P. Collagen and hyaluronic acid hydrogel in water-in-oil microemulsion delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, 2017.

LAFFLEUR, F.; HINTZEN, F.; SHAHNAZ, G.; RAHMAT, D.; LEITHNER, K.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Development and in vitro evaluation of slippery nanoparticles for enhanced diffusion through native mucus, **Nanomedicine**, v.9, p.387-396, 2014.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, p.89-121, 2000.

LARM, M.G.; HARDING, R.; JOHNSTON, M.; ABRAM, A.Z.; VIYAYAKUMAR, P.; SUN, P. Microemulsion e sub-micron emulsion process e compositions. US20150258023 (2015).

LARM, M.G.; HARDING, R. Microemulsion process and composition. US20060057168 (2006).

LI, X.Q.; YE, Z.M.; WANG, J.B.; FAND, C.R.; PANE, A.W.; LIF, C.; ZHANG, R.B. Filmes bucais mucoadesivos de tramadol para o controle eficaz da dor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2017;67(3):231---237.

LI, Y.; SONG, J.; TIAN, N.; CAI, J.; HUANG, M.; XING, Q.; WANG, Y.; WU, C.; HU, H. Improving oral bioavailability of metformin hydrochloride using water-in-oil microemulsions and analysis of phase behavior after dilution, **International Journal of Pharmaceutics**, v.473, p.316–325, 2014.

LICHTENBERGER, L.M. Compositions comprising lecithin oils and NSAIDs for protecting the gastrointestinal tract and providing enhanced therapeutic activity. US20150011507 (2015).

LICHTENBERGER, L.M.; SHIQIANG, T. Oil-based nsaid compositions and methods for making and using same. US20100173876 (2010).

LIDICH, N.; ASERIN, A.; GARTI, N. Structural characteristics of oil-poor dilutable fish oil omega-3 microemulsions for ophthalmic applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.463, p.83–92. 2016.

LIMA, T.C.; BAGORDAKIS, E.; FALCI, S.G.M.; SANTOS, C.R.R.; PINHEIRO, M.L.P. Pre-Emptive effect of dexamethasone and diclofenac sodium associated with

codeine on pain, swelling, and trismus after third molar surgery: a split-mouth, randomized, triple-blind, controlled clinical trial. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.76, p.60-66, 2018.

LIN, Y.H.; TSAI, M.J.; FANG, Y.P.; FU, Y.S.; HUANG, Y.B.; WU, P.C. Microemulsion formulation design and evaluation for hydrophobic compound: catechin topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.161, p.121–128, 2018.

LISHENG, W.; HONGYING, S.; WENQIANG, B.; DING, W.; GENGBIN, L. *Tripterygium wilfordii-caulis sinomenii* microemulsion gel and preparation method thereof. CN104306447 (2015).

LIU, C.H.; CHANG, F.Y.; HUNG, D.K. Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: Effects of terpenes and cosurfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.82, p.63-70, 2011.

LIU, L.; KOMATSU, T.; ZOR, F.; GORANTLA, V.; JANJIC, J. (128): Sustained analgesic and anti-inflammatory efficacy of single dose COX-2 inhibiting nonmedicine in a murine inflammatory pain model. **The Journal of Pain**, v.19, p. s9, 2018.

LIUZZI, R.; CARCIATI, A.; GUIDO, S.; CASERTA, S. Transport efficiency in transdermal drug delivery: what is the role of fluid microstructure? **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 139 (2016) 294–30.

LOPES, L.B.; VANDEWALL, H.; LI, H.T.; VENUGOPAL, V.; LI, H.K.; NAYDIN, S.; HOSMER, J.; LEVENDUSKY, M.; ZHENG, H.; BENTLEY, M.V.L.B.; LEVIN, R.; HASS, M.A. Topical delivery of lycopene using microemulsions: enhanced skin penetration and tissue antioxidant activity, **Journal Pharmaceutical Science**, v.99, p.1346–1357, 2010.

LU, D.R.; SHAWER, M. Artificial lipoprotein carrier system for bioactive materials. US20040234588 (2004).

MA, Q.; DAVIDSON, P.M.; ZHONG, Q. Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. **International Journal of Food Microbiology**. v.226, p.20-25, 2016.

MA, W.; ST-JACQUES, B.; DUARTE, P.C. Targeting pain mediators induced by injured nerve-derived COX2 and PGE2 to treat neuropathic pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.16, p.527–540, 2012.

MACIEL, M.A.M.; MEDEIROS, M.L.; ARAÚJO-FILHO, I.; RÊGO, A.C.M.; PEREIRA, J.D.S.; BARACHO, B.B.D.; LIMA, M.C.F.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; MEDEIROS, M.I.T. Formulados a base de óleo de copaíba biodisponibilizados para uso oral e tópico associado com aplicações terapêuticas na analgesia, inflamação e cicatrização. BR 10 2017 014800 9 (2017).

MAESTRELLI, F.; BRAGAGNI, M.; MURA, P. Advanced formulations for improving therapies with anti-inflammatory or anaesthetic drugs: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.32, p.192-205, 2016.

MAGDASSI, S.; NETIVI, H.; GOSHEN, K. Organic nanoparticles obtained from microemulsions by solvent evaporation. US20110021592 (2011).

MIRANDA, H.F.; SIERRALTA, F.; ARANDA, N.; NORIEGA, V.; PRIETO, J.C. Pharmacological profile of dexketoprofen in orofacial pain. **Pharmacological Reports**, v.68, p.1111–1114, 2016.

MITSOU, E.; TAVANTZIS, G.; SOTIROUDIS, G.; LADIKOS, D.; XENAKIS, A.; PAPADIMITRIOU, V. Food grade water-in-oil microemulsions as replacement of oil phase to help process and stabilization of whipped cream. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.510, p.69-76, 2016.

MYERS, J.; WIELAGE, R.C.; HAN, B.; PRICE, K.; GAHN, J.; PAGET, M.A.; HAPPICH, M. The efficacy of duloxetine, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and opioids in osteoarthritis: a systematic literature review and meta-analysis. **BMC Musculoskeletal Disord**, v.15, p.76, 2014.

MOGHIMIPOUR, E., SALIMI, A., EFTEKHARI, S., Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.3, n.1, 63-71, 2013.

MORAN-VALERO, M.I.; RUIZ-HENESTROSA, V.M.P.; PILOSOFF, AM.R. Synergistic performance of lecithin and glycerol monostearate in oil/water emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.151, p.68–75, 2017.

MULLA, J.A.S.; MABROUK, M.; CHOONARA, Y.E.; KUMAR, P.; CHEJARA, D.R.; TOIT, L.C.; PILLAY, V. Development of respirable rifampicin-loaded nano-lipomer composites by microemulsion-spray drying for pulmonary delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.41, p.13-19, 2017.

NIESTERS, M.; DAHAN, A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for NMDA receptor antagonists in the treatment of chronic neuropathic pain, **Expert Opinion. Drug Metabolism & Toxicology**, v.8, p.1409–1417, 2012.

NISSIM, G.; ASERIN, A.; KOGAN, A. Microemulsion comprising carbamazepine having solubility. WO/2006/061827 (2006).

OLSON, A.; DIEBEL, L.N.; LIBERATI, D.M. Exogenous phosphatidylcholine supplementation improves intestinal barrier defense against *Clostridium difficile* toxin. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v.77, p.570-575, 2014.

PADULA, C.; TELÒ, I.; IANNI, A.; PESCHINA, S.; NICOLI, S.; SANTI P. Microemulsion containing triamcinolone acetonide for buccal administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.115, p.233–239, 2018.

PICCINELLI, A.C.; MORATO, P.N.; BARBOSA, M.S.; CRODA, J.; SAMPSON, J.; KONG, X.; KONKIEWITZ, E.C.; ZIFF, E.B.; AMAYA-FARFAN, J.; KASSUYA, C.A.L. Limonene reduces hyperalgesia induced by gp120 and cytokines by modulation of IL-1 β and protein expression in spinal cord of mice. **Life Sciences**, v.174, p.28–34, 2017.

PINEROS, I.; SLOWING, K.; SERRANO, D.R.; PABLO, E.; BALLESTEROS, M.P. Analgesic and anti-inflammatory controlled-released injectable microemulsion: Pseudo-ternary phase diagrams, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, p.220–227, 2017.

PYO, W.Y.; MIN, C.S. Transdermal patch for nonsteroidal antiinflammatory drug(s). GB2362825 (2002).

PREMARATHNE, E.P.N.; KARUNARATNE, D.N.; PERERA, A.D.L.C. Controlled release of diclofenac sodium in glycolipid incorporated micro emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.511, p.890–898, 2016.

RABELO, T.K.; GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, M.A.; GASPAROTTO, J.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; MOREIRA, J.C.F.; GELAIN, D.P. Shikimic acid inhibits LPS-induced cellular pro-inflammatory cytokines and attenuates mechanical hyperalgesia in mice. **International Immunopharmacology**, v.39, p.97–105, 2016.

RADWANI, H.; ROCA-LAPIROT, O.; ABY, F.; LOPEZ-GONZALEZ, M.J.; BENAZZOUZ, R.; ERRAMI, M.; FAVEREAUX, A.; LANDRY, M.; FOSSAT, P. [EXPRESS] Group I metabotropic glutamate receptor plasticity after peripheral inflammation alters nociceptive transmission in the dorsal of the spinal cord in adult rats. **Molecular Pain**, v.13, 2017.

RAMÍREZ, F.B.; NÚÑEZ, C.G.; MAS, M.T.; JIMÉNEZ, N.R.; CABALLERO, F.L.P. Criterios para la erradicación de *Helicobacter pylori*. **FMC**, v.25, p.43-53, 2018.

RAMOS-RANGEL, G.E.; FERRER-ZACCARO, L.E.; MOJICA-MANRIQUE, V.L.; ROTTA, M.G.L. Management of post-cesarean delivery analgesia: Pharmacologic strategies. **Colombian Journal of Anesthesiology**, v.45, p.327–334, 2017.

REN, X.; SVIRSKIS, D.; ALANY, R.G.; SHOSHTARI, S.Z.; WU, Z. In-situ phase transition from microemulsion to liquid crystal with the potential of prolonged

parenteral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.431, p.130-137, 2012.

RIEHM, D.A.; ROKKE, D.J.; PAUL, P.G.; LEE, H.S.; VIZANKO, B.S.; MCCORMICK, A.V. Dispersion of oil into water using lecithin-Tween 80 blends: The role of spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.487, p.52–59, 2017.

RIVERA-RANGELA, R.D.; GONZÁLEZ-MUÑOZA, M.P.; AVILA-RODRIGUEZA, M.; RAZO-LAZCANOA, T.A.; SOLANS, C. Green synthesis of silver nanoparticles in oil-in-water microemulsion and nano-emulsion using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent. **Colloids and Surfaces A**, v.536, p.60–67, 2018.

ROCA-VINARDELL, A.; BERROCOSO, E.; LLORCA-TORRALBA, M.; GARCÍA-PARTIDA, J.A.; GIBERT-RAHOLA, J.; MICO, J.A. Involvement of 5-HT1A/1B receptors in the antinociceptive effect of paracetamol in the rat formalin test. **Neurobiology of Pain**, v.3, p.15–21, 2018.

RODRIGUEZ-ALLER, M.; GUILLARME, D.; VEUTHEY, J.L.; GURNY, R. Strategies for formulating and delivering poorly water-soluble drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 30 (2015) 342e351.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D.V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.96, p.1445–1452, 2017.

SALABAT, A.; NABIYOUNI, G.; FAR, M. R. Effect of platinum precursor on the nanoparticle size synthesized in microemulsion system. **Journal of Experimental Nanoscience**, v.6, p.305–310, 2011.

SALABAT, A.; SOLEIMANI, S. Ultrasonic irradiation and solvent effects on destabilization of the colloidal suspensions of platinum nanoparticles. **Particuology**, v.17, p.145–148, 2014.

SALAMONE, J.C.; CHEN, X.; SALAMONE, A.B.; REILLY, K.E. Delivery of biologically-active agents using volatile, hydrophobic solvents. US20140127320 (2014).

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E.; ESPINA, M.; DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E.B.; GARCÍA, M.L. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part II - Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.110, p.58–69, 2017.

SANGGU, K. Sugar-based surfactant microemulsions containing essential oils for cosmetic and pharmaceutical use. US20130237613 (2013)

SANTOS, A.O.; COSTA, M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; VEIGA-JÚNIOR, V.F.; LIMA, M.M.S.; NAKAMURA, C.V. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v.129, p.145–151, 2011.

SANTOS, H. M.; OLIVEIRA, D. F.; CARVALHO, D. A.; PINTO, J. M. A.; CAMPOS, V. A. C.; MOURAO, A. R. B.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v.64, p.231–238, 2010.

SARAIVA, M.E.; ULISSES, A.V.R.A.; RIBEIRO, D.A.; OLIVEIRA, L.G.S.; MACÊDO, D.G.; SOUSA, F.F.S.; MENEZES, I.R.A.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SOUZA, M.M.A. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.171, p.141–153, 2015.

SCHWARZ, J.C.; KLANG, V.; HOPPEL, M.; MAHRHAUSER, D.; VALENTA, C. Natural microemulsions: Formulation design and skin interaction, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.81, p.557–562, 2012.

SEOK, S.H.; LEE, S.A.; PARK, E.S. Formulation of a microemulsion-based hydrogel containing celecoxib. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v.43, p.409-414, 2018.

SERINKEN, M.; EKEN, C.; TUNAY, K.; GOLCUK, Y. Ketoprofen gel improves low back pain in addition to IV dexketoprofen: a randomized placebo-controlled trial. **American Journal of Emergency Medicine**, v.34, p.1458–1461, 2016.

SHARMA, G.; DHANKAR, G.; THAKUR, K.; RAZA, K.; KATARE, O.P. Benzyl benzoate-loaded microemulsion for topical applications: enhanced dermatokinetic profile and better delivery promises, **AAPS PharmSciTech**, v.17, p.1221–1231, 2016.

SHARIFI-RAD, J.; SUREDA, A.; TENORE, G.C.; DAGLIA, M.; SHARIFI-RAD, M.; VALUSSI, M.; TUNDIS, R.; SHARIFI-RAD, M.; LOIZZO, M.R.; ADEMILUYI, A.O.; SHARIFI-RAD, R.; AYATOLLAHI, S.A.; IRITI, M. Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v.22, p. 1-55, 2017.

SINDHU, P.; KUMARA, S.; IQBAL, B.; ALI, J.; BABOOTA, S. Duloxetine loaded-microemulsion system to improve behavioral activities by upregulating serotonin and norepinephrine in brain for the treatment of depression. **Journal of Psychiatric Research**, v.99, p.83–95, 2018.

SINTOV, A.C. Transdermal delivery of curcumin via microemulsion, **International Journal Pharmaceutics**, v.481, p.97–103, 2015.

SOLEIMANI, S.; SALABAT, A.; TABOR, R. F. Effect of surfactant type on platinum nanoparticles size of the synthesized Pt/-Al₂O₃ catalyst by microemulsion method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.426, p.287–292, 2014.

ST-JACQUES, B.; MA, W. Peripheral prostaglandin E₂ prolongs the sensitization of nociceptive dorsal root ganglion neurons possibly by facilitating the synthesis and anterograde axonal trafficking of EP4 receptors. **Experimental Neurology**, v.261, p.354–366, 2014.

SUN, C.; ZHANG, J.; CHEN, L.; LIU, T.; XU, G.; LI, C.; YUAN, W.; XU, H.; SU, Z. IL-17 contributed to the neuropathic pain following peripheral nerve injury by promoting astrocyte proliferation and secretion of proinflammatory cytokines, **Molecular Medicine Reports**, v.15, p.89–96, 2017.

TEIXEIRA, M.Z. New homeopathic medicines: use of modern drugs according to the principle of similitude. **Homeopathy**, v.100, p.244-252. 2011.

THIBAUT, K.; LIN, W.K.; RANCILLAC, A.; FAN, M.; SNOLLAERTS, T.; SORDOILLET, V.; HAMON, M.; SMITH, G.M.; LENKEI, Z.; PEZET, S. BDNF-dependent plasticity induced by peripheral inflammation in the primary sensory and the cingulate cortex triggers cold allodynia and reveals a major role for endogenous BDNF as a tuner of the affective aspect of pain. **Journal of Neuroscience**, v.34, p.14739–14751, 2014.

TIANIMOGHADAMA, S.; SALABAT, A. A microemulsion method for preparation of thiol-functionalized gold nanoparticles. **Particuology**, v.37, p.33–36, 2018.

TODOSIJEVI, M.N.; SAVI, M.M.; BATINI, B.B.; MARKOVI, B.D.; GAŠPERLIND, M.; RANPELOVI, D.V.; LUKI, M.Z.; SAVI, S.D. Biocompatible microemulsions of a model NSAID for skin delivery: A decisive role of surfactants in skin penetration/irritation profiles and pharmacokinetic performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v.496, p.931–941, 2015.

TRIVEDI, H., THAKUR, R., RAY, S., PATEL, K. Design and evaluation of Piroxicam microemulsion. **International Journal For Pharmaceutical Research Scholars**, v.1, p.166–177, 2012.

VARDEH, D.; WANG, D.; COSTIGAN, M.; LAZARUS, M.; SAPER, C.B.; WOOLF, C.J.; FITZGERALD, G.A.; SAMAD, T.A. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. **The Journal of Clinical Investigation**. v.119, p.287–294, 2009.

VELASCO-ZAMORA, J.A.; GÓMEZ-REYES, E.; USCANGA, L. Are the clinical guideline recommendations on gastroprotection being followed? A review in patients taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Revista de Gastroenterología de México**. v.81, p.121-125, 2016.

VOLPE, V.; NASCIMENTO, D.S.; INSAUSTI, M.; GRÜNHUT, M. Octyl p-methoxycinnamate loaded microemulsion based on *Ocimum basilicum* essential oil. Characterization and analytical studies for potential cosmetic applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.546, p.285–292, 2018.

XU, J.; LIU, X.; PANG, M. Numerical and experimental studies on transport properties of powder ejector based on double venturi effect. **Vacuum**, v.134, p.92-98, 2016.

WANG, A.; CHEN, L.; XU, F.; YAN, Z. Phase behavior of epoxidized soybean oil-based ionic liquid microemulsions: Effects of ionic liquids, surfactants, and co-surfactants. **Colloids and Surfaces a Physicochemical and Engineering Aspects**, v.481, p.500–505, 2015.

WANG, S.; SHI, Y.; TU, Z.; ZHANG, L.; WANG, H.; TIAN, M.; ZHANG, N. Influence of soy lecithin concentration on the physical properties of whey protein isolate-stabilized emulsion and microcapsule formation. **Journal of Food Engineering**, v.207, p.73-80, 2017.

WANG, X.; XUE, M.; GU, J.; FANG, X.; SHA, X. Transdermal microemulsion drug delivery system for impairing male reproductive toxicity and enhancing efficacy of *Tripterygium Wilfordii* Hook. **Fitoterapia**, v.83, p.690–698, 2012.

WANG, X.; ZU, Y.; HUANG, L.; YU, J.; ZHAO, H.; WEN, C.; CHEN, Z.; XU, Z. Treatment of rheumatoid arthritis with combination of methotrexate and *Tripterygium wilfordii*: a meta-analysis. **Life Sciences**, v.171, p.45–50, 2017.

WANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, A.; LI, X.; WANG, G.; ZHAO, L. Synthesis of ZnO nanoparticles from microemulsions in a flow type microreactor. **Chemical Engineering Journal**, 235, p.191–197, 2014.

WARNER, K.S.; ZHANG, J. Gelled emulsion and microemulsion formulations for dermal drug delivery. US20050266085 (2005).

YEHIA, R.; HATHOUT, R.M.; ATTIA, D.A.; ELMAZAR, M.M.; MORTADA, N.D. Antitumor efficacy of an integrated methyl dihydrojasmonate transdermal microemulsion system for breast cancer cells: in vitro and in vivo studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.155, p.512-521, 2017.

ZAKERI, A.; YAZDI, F.G. Toll-like receptor-mediated involvement of innate immune cells in asthma disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1861, p.3270–3277, 2017.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B.B. Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v.536, p.345–352, 2018.

ZHANG, X.; YANG, Y.; YAO, J.; SHAO, Z.; CHEN, X. Strong collagen hydrogels by oxidized dextran modification. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.2, p.1318–1324, 2014.

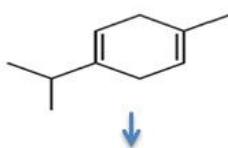
ZHANG, H.; LI, F.; LI, W.W.; STARY, C.; CLARK, J.D.; XU, S.; XIONG, X. The inflammasome as a target for pain therapy. **British Journal of Anaesthesia**, v.117, p.693–707, 2016.

ZHANG, Y.T.; LI, Z.; ZHANG, K.; ZHANG, H.Y.; HE, Z.H.; XIA, Q.; ZHAO, J.H.; FENG, N.P. Co-delivery of evodiamine and rutaecarpine in a microemulsion-based hyaluronic acid hydrogel for enhanced analgesic effects on mouse pain models. **International Journal of Pharmaceutics**, v.528, p.100-106, 2017.

ZHANG, W.; LI, F.; GAO, W. Tripterygium wilfordii Inhibiting Angiogenesis for Rheumatoid Arthritis Treatment. **Journal of the National Medical Association**, v.109, p.142-148, 2017.

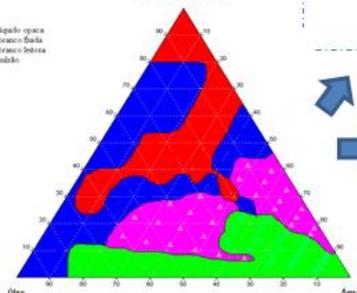
Capítulo 2

Desenvolvimento das Formulações

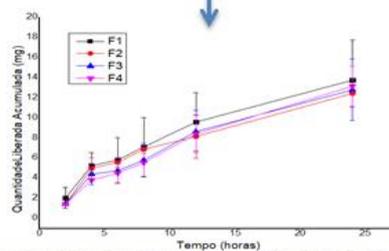
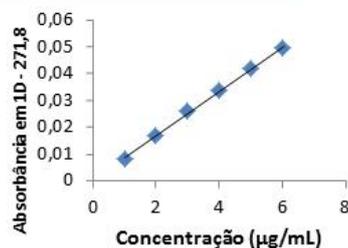


Ternário Co-ternário

- Emulsão líquida opaca
- Emulsão branca-floada
- Emulsão branca-limpa
- Micro-emulsão



Caracterização



Estabilidade



DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DE MICROEMULSÕES CONTENDO γ -TERPINENO

RESUMO

Microemulsões (MEs) são sistemas opticamente transparentes e termodinamicamente estáveis compostos por dois líquidos imiscíveis e estabilizados por tensoativos. Podem ser utilizadas como carreadores de fármacos e substâncias com atividade farmacológica comprovada. Diante disso, esse estudo tem como objetivo investigar a formação, estabilidade e caracterização de sistemas microemulsionados contendo γ -terpineno como princípio ativo, a partir da construção de diagrama de fases. Foram preparados sistemas microemulsionados contendo labrasol®, pluro®l, miristato de isopopila, γ -terpineno e água. As formulações foram desenvolvidas com base em um diagrama de fases pseudoternário (DFPT), que mostrou a formação de 15 MEs, além de regiões de emulsões branco-leitosas, branco-fluidas e líquido-opacas. Das MEs formadas, quatro foram escolhidas para caracterização quanto ao teor, tamanho da gotícula, potencial zeta, índices de polidispersão e de refração, valores de pH, condutividade e viscosidade, ao tempo inicial (T0) e final (T12) do ciclo gelo-degelo e para os testes de estabilidade termodinâmica, por apresentarem proporções crescentes de tensoativos e decrescentes de óleo. Também foram realizados testes de centrifugação e de estresse térmico, bem como, estudos de cinética de liberação *in vitro*, utilizando células de difusão de Franz e membranas de acetato de celulose. O estudo de liberação cinética revelou que as formulações F1, F2, F3 e F4 liberaram o γ -terpineno com uma porcentagem cumulativa de 41,1%, 37,1%, 38,2% e 39,3%, respectivamente, em 24 h, revelando um perfil de liberação controlada. O fluxo de liberação cinética de γ -terpineno melhor se adequou ao modelo Higuchi. Sob condições de estresse por centrifugação não houve separação de fases nas formulações, entretanto as MEs F3 e F4 exibiram aspecto turvo após o estresse térmico. Quando submetidas ao ciclo gelo-degelo, as MEs não apresentaram mudança substancial nos parâmetros analisados, com pH, índice de refração e teor variando entre $5,38 \pm 0,01$ a $6,91 \pm 0,01$, 1,42 a 1,43 e $8,19 \pm 2,27$ a $8,84 \pm 1,21$, respectivamente. As MEs selecionadas para análise foram classificadas como sistemas isotrópicos de óleo em água, com gotículas na faixa nanométrica ($124,4 \pm 243,7$ nm), índice de polidispersão entre 0,235 e 0,315 e potencial zeta variando entre -28,1 e -55,1. De forma geral, a condutividade elétrica das MEs permaneceu relativamente alta, acima de $9,56 \pm 0,01$ $\mu\text{S}/\text{cm}$, o que é comumente descrito para MEs do tipo óleo em água. Todos os resultados sugerem que o sistema microemulsionado produzido a partir DFPT apresentado nesse estudo é um agente promissor para a entrega controlada de γ -terpineno, de forma que quantidades menores de tensoativos produziram formulações com maior estabilidade termodinâmica.

Palavras-chave: Diagrama de fases pseudo-ternário; estabilidade termodinâmica; liberação controlada; monoterpeneo.

ABSTRACT

Microemulsions (MEs) are optically transparent and thermodynamically stable systems composed of two immiscible liquids and stabilized by surfactants. They can be used as

carriers of drugs and substances with proven pharmacological activity. Therefore, this study aims to investigate the formation, stability and characterization of microemulsion systems containing γ -terpinene as active principle, from the construction of phase diagram. Microemulsified systems containing labrasol, plurol, isopropyl myristate, γ -terpinene and water were prepared. The formulations were developed based on a pseudorange phase diagram (DFPT). DFPT showed the formation of 15 microemulsions (MEs), in addition to regions of white-milky, white-fluid and liquid-opaque emulsions. From the MEs formed, four were chosen to characterize the content, droplet size, zeta potential, polydispersity and refractive indexes, pH, conductivity and viscosity values at the initial (T0) and final (T12) time of the ice- and for the tests of thermodynamic stability, because they have increasing proportions of surfactants and oil decreases. Centrifugation and thermal stress tests were also performed, as well as in vitro release kinetics studies using Franz diffusion cells and cellulose acetate membranes. The kinetic release study revealed that the formulations F1, F2, F3 and F4 released γ -terpinene with a cumulative percentage of 41.1%, 37.1%, 38.2% and 39.3%, respectively, in 24 h, identifying a controlled release profile. The kinetic release flux of γ -terpinene was better suited to the Higuchi model. Under stress conditions by centrifugation there was no separation of phases in the formulations, however the MEs F3 and F4 showed a cloudy appearance after the thermal stress. When submitted to the ice-defrost cycle, MEs did not present a substantial change in the analyzed parameters, with pH, refractive index and content ranging from 5.38 ± 0.01 to 6.91 ± 0.01 , 1.42 to 1.43 and 8.19 ± 2.27 to 8.84 ± 1.21 , respectively. The MEs selected for analysis were classified as oil-in-water isotropic systems with droplets in the nanometer range (124.4 ± 243.7 nm), polydispersion index between 0.235 and 0.315 and zeta potential ranging from -28.1 to -55 mV. Overall, the electrical conductivity of MEs remained relatively high, above 9.56 ± 0.01 $\mu\text{S} / \text{cm}$, which is commonly described for oil-in-water MEs. All results suggest that the microemulsion system produced from DFPT presented in this study is a promising agent for the controlled delivery of γ -terpinene, so that smaller amounts of surfactants produced formulations with greater thermodynamic stability.

Keywords: Pseudo-ternary phase diagram; thermodynamic stability; controlled release; monoterpenes.

1. INTRODUÇÃO

Muitos sistemas de liberação controlada de fármacos foram desenvolvidos com vistas a melhorar a biodisponibilidade e ação dessas substâncias (YE; CHI, 2018; SEOK; LEE; PARK, 2018; XING et al., 2016). A baixa solubilidade aquosa de elementos farmacêuticos ativos representa um desafio no processo de desenvolvimento de novos fármacos, estimulando pesquisas com abordagens alternativas de incorporação de substâncias lipofílicas em nano e microsistemas (WANG et al., 2016; KAUR; MEHTA et al., 2017; GÖKE et al., 2018; KANDASAMY et al., 2018).

Sistemas microemulsionados são caracterizados por serem misturas de óleo e água estabilizadas por tensoativos, opticamente transparentes e termodinamicamente

estáveis (CALLENDER et al., 2017). Para análise adequada da formação e estabilidade de sistemas microemulsionados utilizam-se técnicas como a construção de diagramas de fases, a partir do qual se pode identificar a extensão da região de ME e sua relação com as outras fases (DAMASCENO et al., 2011).

Geralmente construídos em duas dimensões, a partir de dados obtidos por titulação, os diagramas de fases ternários e pseudoternários podem ser usados para estudar um amplo número de amostras de diferentes composições, indicando as proporções nas quais os componentes devem ser misturados (LAWRENCE et al., 2000; NOURAEI; ACOSTA, 2017; MA et al., 2015). Os resultados dessas composições são expressos em um triângulo equilátero no qual cada lado é representado por um dos componentes da mistura, de forma que os vértices do diagrama de fases (A, B, C) representam os componentes puros. Quando se trata de um diagrama de fases específico para construção de MEs, utiliza-se a denominação pseudoternário, pois o ponto “A”, que representa normalmente apenas o tensoativo, passa a representar a mistura tensoativo/co-tensoativo (DAMASCENO et al, 2011).

A capacidade de solubilização de sistemas microemulsionados é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos constituintes empregados e pelo tipo de microestrutura formada (DJEKIC; PRIMORAC; JOCKOVIC, 2011). Kaur e Mehta (2017) enfatizam a importância de estudos de pré-formulação como pré-requisitos para o desenvolvimento de uma formulação bem sucedida, incluindo a caracterização físico-química de carreadores de fármacos como plataforma para uma ampla gama de produtos naturais, como meio de alcançar melhores perfis terapêuticos, independentemente da via de administração.

As MEs são amplamente utilizadas como carreadores de óleos essenciais e seus constituintes por garantirem maior estabilidade física das substâncias ativas, diminuir sua volatilidade e aumentar sua bioatividade (LINS et al., 2016; MOGHIMI et al., 2016; RODRÍGUEZ et al., 2016). Terpenos com repetidas unidades de isopreno também são empregados em MEs como intensificadores de penetração devido a suas baixas toxicidades em comparação com os intensificadores de penetração sintéticos (LIU; CHANG; HUNG, 2011).

Compostos terpênicos presentes em óleos essenciais são frequentemente relatados com atividades anti-inflamatória (MAHBOUBI et al., 2018), antifúngica

(KSOURI et al., 2017), tripanocida (BALDISSERA et al., 2016), bactericida (MILADI et al., 2017) e antinociceptiva (PARK et al., 2015).

O γ -terpineno é um monoterpene cíclico, derivado de unidades de isopreno, tendo como precursor direto o pirofosfato genail acíclico (ZHANG et al., 2017), encontrado em óleos essenciais de *Timo caespititius* (MENDES et al., 2014; LIMA et al., 2013) e *Origanum* spp. (CROCOLL et al., 2010; KHAN et al., 2018), com atividade larvívica (SANTOS et al., 2011), antimicrobiana, antioxidante (ZHELJAZKOV et al., 2017) e antinociceptiva (PASSOS et al., 2015).

Apesar de amplos estudos sobre o desenvolvimento de MEs como carreadores de fármacos e substâncias com atividade farmacológica comprovada, existe a necessidade de informações sobre a incorporação de um monoterpene nesse tipo de sistema visando a aplicação biotecnológica desse produto. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar a formação, estabilidade e caracterização de sistemas microemulsionados contendo γ -terpineno como princípio ativo, a partir da construção de diagrama de fases.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os componentes da microemulsão foram: γ -terpineno (1-isopropyl-4-methyl-1,4-cyclohexadiene, Sigma-Aldrich®, fórmula estrutural C_6H_{16} , peso molecular 136,23 e índice de refração 1,47); PEG-8 glicérido capílico (Labrasol®, EHL = 12,0) e poligliceril-6 dioleato (Plurol Oleique®, Brasquim®, EHL = 4,0); miristato de isopropila (Synth®, EHL = 10) e água destilada.

2.2 Construção do diagrama de fases e preparação das MEs

Para a construção do DFPT, utilizou-se a metodologia de titulação aquosa, que consiste em adição gradual de água a cada razão de peso dos demais componentes do sistema seguida pela mistura destes com agitação branda. Desta forma, selecionou-se previamente o tensoativo e co-tensoativo para serem utilizados, definindo-se por Labrasol® e Plurol®, respectivamente, na proporção 2:1. Essa combinação foi mantida sob agitação magnética por cinco minutos. A essa mistura foi adicionada a fase oleosa

(mistura homogênea de miristato de isopropila e γ -terpineno) obedecendo as seguintes proporções (tensoativo/óleo): 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1; sendo também mantida a agitação magnética por mais cinco minutos. Posteriormente, foi adicionada a água destilada através de titulação de volumes pré-definidos, sendo que a cada titulação da fase aquosa a mistura era submetida à agitação magnética por dois minutos. Após diminuição das bolhas, o sistema era analisado visualmente e classificado em: Separação de Fases (SF); Emulsão Líquido Opaca (ELO); Emulsão Branco Leitosa (EBL); Emulsão Branco Flúida (EBF); e Microemulsão (ME). Durante as titulações, com o objetivo de evitar a coalescência das gotículas, a velocidade de homogeneização e o tempo de observação da formulação foram padronizados. O ensaio foi realizado em duplicata. Os resultados da classificação dos sistemas foram transferidos para o programa Triplot® onde se obteve o modelo gráfico do diagrama (KE et al., 2005; DJORDJEVIC et al., 2004; FORMARIZ et al., 2007; FORMARIZ et al., 2006; SINTOV; SHAPIRO, 2004).

2.3 Caracterização das microemulsões

Das formulações desenvolvidas, quatro (F1, F2, F3 e F4) foram submetidas à caracterização organoléptica e determinação de pH, condutividade, tamanho da gotícula, índice de refração, teor e viscosidade, antes e depois dos testes de estabilidade termodinâmica. Foram preparadas formulações veículo (sem γ -terpineno, denominadas V2, V3 e V4) para comparar a estabilidade física e adequação do sistema à incorporação do monoterpeno. Após isso, duas formulações (F1 e F2) foram escolhidas para avaliação em microscópio eletrônico. Todas as amostras foram mantidas em recipientes de vidro transparente bem fechados à temperatura ambiente e testadas 48 h após a preparação. Também foi realizado um teste de cinética de liberação para comparação das formulações escolhidas através do DFPT. Para determinação analítica do teor de γ -terpineno nas MEs foi seguido o método analítico validado por OLIVEIRA (2016).

2.3.1 Características organolépticas

A avaliação das características organolépticas foi realizada observando-se características primárias como coloração, homogeneidade (sem separação de fases) e transparência.

2.3.2 Determinação de pH

O pH das amostras foi medido utilizando-se o Potenciômetro *Bel Engineering* modelo W3B, com eletrodo e sensor de temperatura previamente calibrados em solução tampão 4,0 e 7,0, à temperatura de $25 \pm 2,0$ °C. O eletrodo foi introduzido diretamente na formulação, sendo a análise realizada em triplicata (BRASIL, 2010).

2.3.3 Índice de refração

Usado para avaliar a transparência das amostras, o índice de refração, foi determinado de acordo com a Farmacopeia Brasileira, quinta edição, em refratômetro rotativo digital previamente calibrado, em triplicata, a temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) (BRASIL, 2010).

2.3.4 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica das formulações foi realizada utilizando-se o condutivímetro MARTE®, previamente calibrado, à temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C. O eletrodo foi introduzido nas amostras (ZHANG et al., 2013; SEOK et al., 2018). Todas as medidas foram feitas em triplicatas para garantir a repetibilidade e precisão dos resultados.

2.3.5 Tamanho de gotícula

A aferição do tamanho das gotículas se deu através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, também denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS), cuja técnica fornece o raio hidrodinâmico das partículas. Durante a análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS – Dynamic Light Scattering), gotículas da amostra são iluminadas por um feixe de luz laser, ocorrendo o espalhamento deste, detectado em um ângulo determinado. Esse espalhamento varia em uma taxa dependente da velocidade de difusão da partícula, a qual, por sua vez, é governada pelo seu tamanho (ROSSETI, 2006), fornecendo informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas e permitindo o cálculo do tamanho destas através de relações empíricas adequadas.

O teste foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí. Antes das análises, as amostras foram diluídas com água Milli-Q ultrapura. As medidas de tamanho foram realizadas em um ângulo fixo de 90°. O correlacionador foi operado em modo paralelo e o método cumulativo de análise foi utilizado para calcular o tamanho médio das gotículas de acordo com a intensidade de luz dispersa (diâmetro médio Z). As medições foram realizadas a $25 \pm 0,2$ °C. A medição do tamanho da gotícula e índice de polidispersão das MEs foi realizada com diluição (1:10000) das formulações com água MiliQ (DONG et al., 2016; SEOK et al., 2018). A viscosidade dos sistemas pode levar a um erro de determinação experimental durante a análise de tamanho de gotícula. Assim, para melhor quantificação do espalhamento de luz dinâmica, emprega-se um processo de diluição para determinar o tamanho do monodisperso (SILVA et al., 2009a). Para facilitar a análise, Formariz et al. (2006) recomendam diluir as amostras caso o sistema esteja em elevadas concentrações, pois a interpolação torna-se dificultada em razão das interações intergotículas.

2.3.6 Viscosidade

Para a determinação da viscosidade das diferentes amostras utilizou-se o viscosímetro rotativo digital QUIMIS®, à temperatura ambiente de $25 \pm 2,0$ °C. O equipamento possui cilindros de diferentes diâmetros (*splindles*), selecionados de acordo com a viscosidade da amostra. Para esse estudo, utilizou-se o *splindle* número 3; nas velocidades 50, 60 e 100 rpm. Todas as medições foram feitas em triplicata. As medidas de viscosidade foram realizadas para ambas as curvas crescente e decrescente.

2.3.7 Microscopia de luz polarizada

Para avaliar a isotropia dos sistemas, as MEs foram analisadas em microscópio de luz polarizada (Optical Olympus BX-51) equipado com câmera digital LC-Color Evolution (PL-A662) (CARVALHO et al., 2018).

2.4 Estabilidade Preliminar

Para garantir a estabilidade física das MEs, um teste de estabilidade preliminar foi realizado de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2004). A estabilidade preliminar é um estudo de triagem para orientar a escolha da formulação, empregando-se condições extremas de temperatura com objetivo de acelerar possíveis reações. Para isso, amostras de quatro formulações desenvolvidas foram submetidas a ciclos gelo-degelo e ensaios de centrifugação e estresse térmico, todos realizados em triplicata. Amostras de aproximadamente 5 mL das MEs veículo e MEs contendo γ -terpineno foram submetidas a seis ciclos gelo-degelo (12 dias) nas seguintes condições experimentais: alternância de 24h a $45\pm 5^\circ\text{C}$ e 24h a $-5\pm 2^\circ\text{C}$. No teste de centrifugação, amostras de 1,5 mL das formulações foram acondicionadas em ependorff, em triplicata, à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), com velocidade de rotação de 3.000 rpm. No ensaio de estresse térmico, 1,5 mL das formulações foi submetido a aquecimento em banho-maria nas seguintes faixas 40, 50, 60, 70 e 80°C , mantendo-se por 30 minutos em cada temperatura. Após o tempo de 30 minutos, as amostras foram observadas visualmente para detecção de qualquer alteração física, como precipitação, turvação, separação de fases e formação de creme (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005; ISAAC et al., 2008).

2.5 Escolha da fase receptora (condição “sink”) e Cinética de liberação *in vitro*

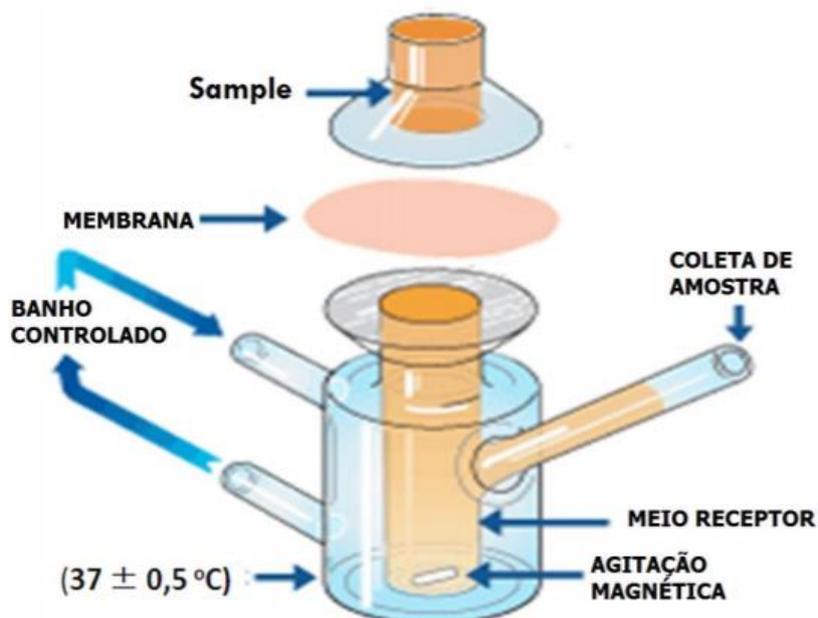
Para escolha da fase receptora, utilizou-se os meios: a) Tampão fosfato pH 7,4 e Polaxamer (8:2); b) Tampão fosfato pH 7,4 e Polaxamer (9:1); c) Tampão fosfato pH 7,4 e LSS (9:1); d) Tampão fosfato pH 7,4 e LSS (9,5:0,5); e) Tampão fosfato pH 7,4.

As soluções foram preparadas em temperatura ambiente e acondicionadas em tubo falcon, em triplicata. Cada tubo foi agitado a 100 rpm durante 72 h em banho-maria a $37\pm 2^\circ\text{C}$ e, em seguida, a mistura resultante foi centrifugada durante 30 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado através de papel filtro e transferido para balão volumétrico. Posteriormente analisou-se o teor por espectrofotometria derivativa no comprimento de onda entre 200 nm a 340 nm. (BOERIS et al., 2000; ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011, adaptado).

A partir deste ensaio de estabilidade foi escolhida a solução receptora a ser utilizada no teste de cinética de liberação *in vitro*, realizado por meio de células de difusão tipo Franz com área difusional de $1,5\text{ cm}^2$ (**Figura 1**), volume de

aproximadamente 12 mL, com membranas artificiais de acetato de celulose, de 0,45 μm . As membranas foram imersas na solução do meio receptor e permaneceram por 1 hora. Em seguida, foram cuidadosamente colocadas entre os compartimentos receptor e doador da célula de Franz. O compartimento receptor da célula foi preenchido com a solução receptora escolhida, em um sistema composto de seis células individuais ligadas a um banho termostatizado a $37 \pm 0,5$ °C, sob agitação constante de 100 rpm em agitador magnético, por um período de 24 horas (ROSA; VILHENA, 2012). No compartimento doador, 400 mg da formulação foi aplicado diretamente sobre a membrana artificial de cada célula. Alíquotas de 3 mL da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos: 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas. O volume coletado foi repostado com a solução receptora, na mesma temperatura do banho termostatizado ($37 \pm 0,5$ °C), após cada coleta de amostra, para manter as condições do teste (CARVALHO, 2012). A quantidade de γ -terpineno liberado nas amostras coletadas foi quantificada por espectrofotômetro UV-Vis através do método analítico de espectroscopia previamente validado (OLIVEIRA, 2016). Para o branco utilizou-se a solução receptora da cinética.

Figura 1. Estrutura de célula de difusão de Franz



Fonte: Adaptado de Silva (2009b).

2.5.1 Parâmetros da varredura espectrofotométrica

As varreduras foram realizadas no Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, acoplado a um computador e operado pelo software UV-Probe 2.42. Para a realização

das varreduras espectrofotométricas utilizou-se os parâmetros de intervalo de comprimento de onda entre 200 a 340 nm, velocidade rápida de leitura e resolução de 0,2 nm. O teor de γ -terpineno foi calculado utilizando o software do espectrofotômetro (UV-Probe 2.42), seguindo os parâmetros otimizados com derivada de segunda ordem e comprimento de onda -292,5 como parâmetro de quantificação do γ -terpineno, de acordo com o método analítico previamente validado por OLIVEIRA (2016), realizado conforme normas estabelecidas pela RE 899 de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

2.5.2 Modelo cinético de liberação

O modelo cinético de liberação foi determinado pela compilação dos resultados em parcelas XY de acordo com três modelos diferentes, ordem zero ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus tempo), Higuchi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus raiz quadrada do tempo) e primeira ordem (log de $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus tempo). Uma análise de regressão linear foi realizada e o modelo matemático com o maior coeficiente de correlação linear (r) foi selecionado para melhor expressar o perfil de liberação. A taxa de fluxo de γ -terpineno através de membranas sintéticas (J) foi calculada por meio de regressão linear do gráfico de estado estacionário (porção linear do declive) (BORGES et al., 2013). O tempo de latência correspondeu ao intercepto obtido quando a linha de estado estacionário foi extrapolada para o eixo do tempo. O coeficiente de liberação foi calculado dividindo a taxa de liberação (J) pela concentração inicial do fármaco no veículo de acordo com a equação:

$$K_r = J_{ss} / C_0$$

onde K_r é o coeficiente de liberação, J_{ss} é o fluxo no estado estacionário e C_0 é a concentração inicial da substância na formulação (ROTTKE et al., 2014).

2.6 Análise estatística

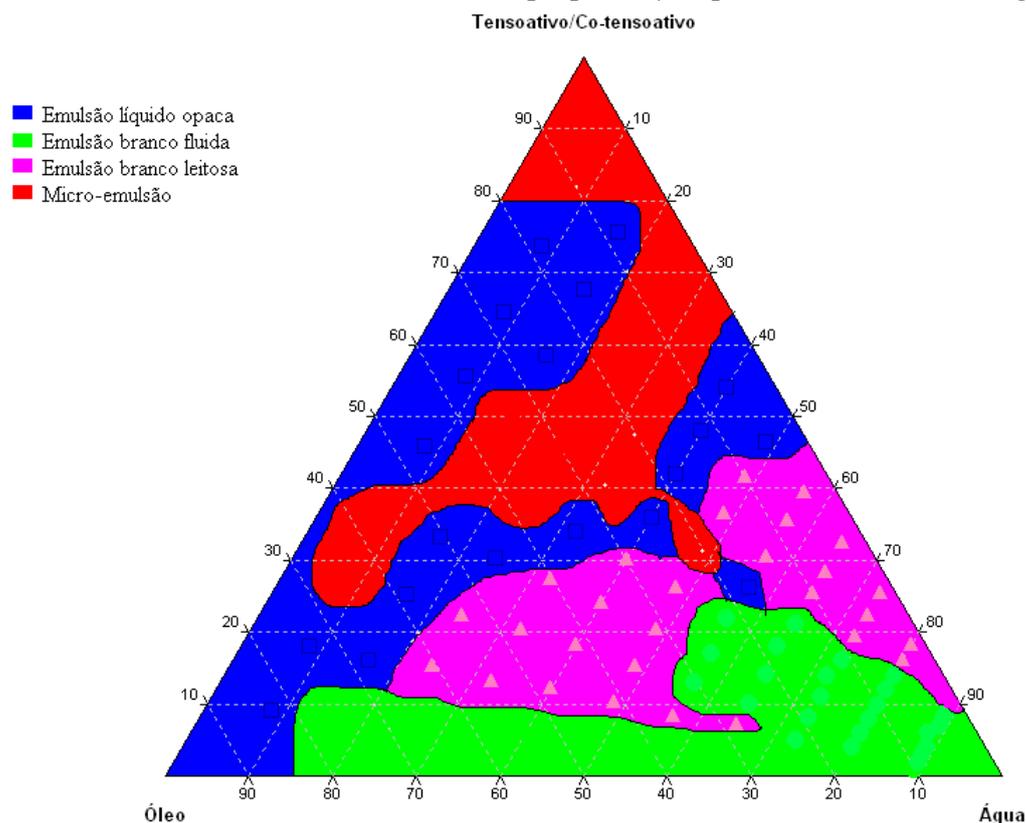
Cada ensaio experimental foi realizado em triplicata e os resultados foram apresentados como média \pm SD (desvio padrão). Para representação gráfica dos resultados da viscosidade, utilizou-se o programa estatístico Grafic Pad Prisma 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Construção do DFPT

Com a construção do diagrama de fases, foram obtidas 15 MEs (ME1 a ME15) em uma determinada região do DFPT, com concentrações diferentes de γ -terpineno (Figura 2).

Figura 2. Diagrama de fases pseudo-ternário para o sistema contendo Labrasol + Plurol (Tensoativo/Co-tensoativo), miristato de isopropila + γ -terpineno (fase oleosa) e água



A construção de diagramas de fase pseudo-ternários é uma das maneiras mais adequadas para estudar todos os tipos de formulações que podem ser obtidas a partir da mistura de tensoativos, óleo e água, combinando todas as possibilidades de maneira sistemática (HADZIR et al., 2013). A partir da construção do DFPT foram formadas MEs espontaneamente à temperatura ambiente quando seus componentes foram postos em contato e sem a necessidade de alta energia.

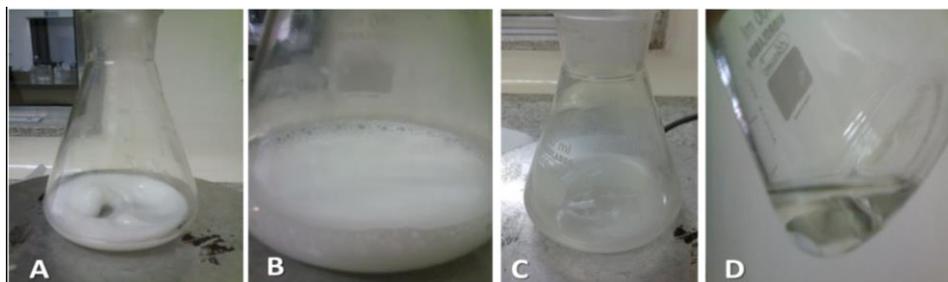
Durante o processo de produção das MEs, a energia usada e as proporções dos componentes (óleo, água, tensoativo, co-tensoativo) foram adequadas para reduzir a tensão superficial do sistema e suficientes para produzir um efeito homogêneo e

translúcido conforme as características de Winsor IV (DAMASCENO et al., 2011). A maioria dos sistemas de ME se formam espontaneamente sem a entrada de energia, pois os seus componentes estão em um estado energético superior ao do produto final. Assim, é necessária energia apenas para a dissociação da microemulsão nos componentes originais (CALLENDER et al., 2017).

O DFPT mostra que maior formação de uma região de ME pode ser observada em concentrações muito baixas de água e óleo, com altas concentrações de tensoativos. Nota-se que a quantidade de tensoativos utilizada foi capaz de diminuir a tensão superficial entre a fase aquosa e a fase oleosa. Esses resultados corroboram com Damasceno et al. (2011), que afirmam que, de forma geral, a região do diagrama que apresenta maior formação de ME se configura pela maior quantidade de tensoativo, que diminui a tensão interfacial do sistema.

Além das regiões de ME, o DFPT mostra a formação de emulsões líquido-opaca, branco-fluida e branco-leitosa (**Figura 3**). Emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica (BAGWE et al., 2001). Não foi observado sistema com separação de fases durante a construção do DFPT, o que sugere que a quantidade de tensoativos utilizada foi suficiente para emulsionar as fases aquosa e oleosa, tanto em emulsões como e MEs. Abaixo da quantidade ótima de tensoativo, não há a formação de ME, pois havia sítios hidrofóbicos insuficientemente disponíveis para as interações acontecerem, o que resultou na formação apenas de emulsões nas proporções 2:8 e 1:9 no DFPT.

Figura 3. Sistemas obtidos a partir do DFPT de acordo com a classificação utilizada. A: emulsão branco-leitosa; B: emulsão branco-fluida; C: emulsão líquido opaca; e D: microemulsão.



O γ -terpineno foi incorporado ao sistema durante a formação das MEs. Isso pode ter facilitado a alocação da substância no núcleo de óleo da ME óleo em água, com a

região hidrofílica da molécula na interface óleo-água. A composição específica das formulações, com incorporação do γ -terpineno durante a formação do sistema microemulsionado, permitiu uma grande variedade de MEs com propriedades diferentes e adequadas para a entrega transdérmica da substância γ -terpineno. Esses resultados corroboram com o descrito por SILVA et al. (2009), observando-se uma larga região de ME para as proporções de tensoativo e co-tensoativo utilizadas.

Damasceno et al. (2011) afirmam que a incorporação do fármaco ou princípio ativo durante a formação do sistema microemulsionado pode aumentar a eficiência de encapsulação. Ressalta-se que a incorporação do fármaco na ME após a formação do sistema pode alterar sua microestrutura e até influenciar a estabilidade do sistema (MOURI et al., 2016).

As MEs com proporção de tensoativos/óleo 5:5, 6:4, 7:3 e 8:2, todas com 24% de água foram escolhidas para caracterização com o objetivo de avaliar a influência dessas proporções nas características físico-químicas das MEs. A composição dessas MEs é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das formulações de sistemas de ME formados a partir do diagrama de fases pseudo-ternário

Formulação	Proporção tensoativos:óleos	Labrasol (%)	Plurol oleico (%)	Miristato de isopropila (%)	γ -terpineno (%)	Água %
F1	5:5	25,34	12,66	29,64	8,36	24
F2	6:4	30,40	15,20	22,04	8,36	24
F3	7:3	35,47	17,75	14,44	8,36	24
F4	8:2	40,54	20,26	6,84	8,36	24

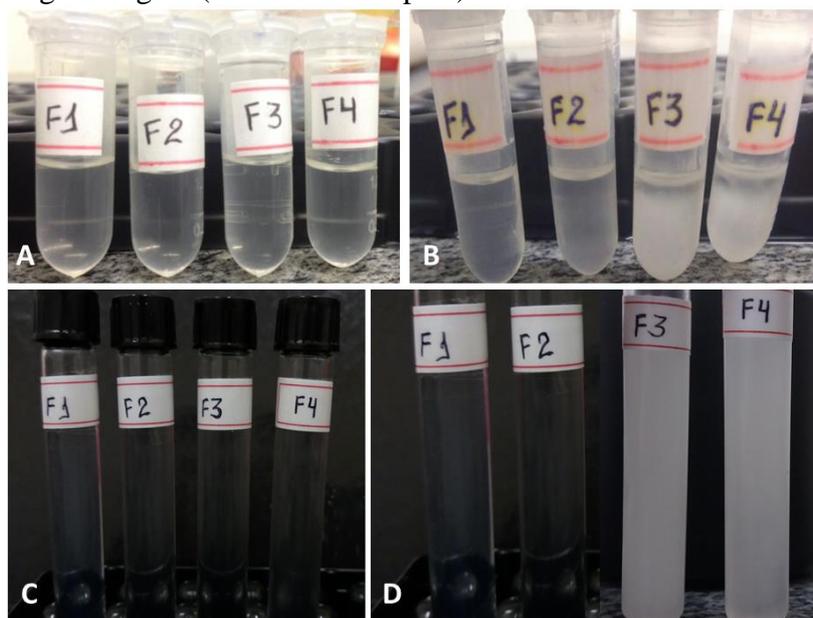
Foram produzidas também MEs veículo, sem a incorporação do γ -terpineno, para comparação das características macroscópicas e físico-químicas. Considerando as mesmas proporções de constituintes das MEs escolhidas para caracterização, apenas três veículos puderam ser produzidos. O veículo da ME na proporção tensoativos/óleo 5:5 não forma sistema microemulsionado, sendo caracterizado macroscopicamente como uma emulsão branco leitosa.

3.2 Testes de estabilidade

Para avaliação da estabilidade física, as formulações passaram pelo teste de centrifugação, estresse térmico e ciclo gelo-degelo. Ao realizar o teste de centrifugação, a desestabilização dos sistemas microemulsionados pode ser acelerada, estimulando seu período de envelhecimento (NG et al., 2011). Além disso, com esse teste é possível prever o prazo de validade em condições normais de armazenagem observando a coalescência da fase dispersa da ME (HADZIR et al., 2013). Ao final do teste de centrifugação as formulações mantiveram-se homogêneas, não apresentando separação de fases.

Das quatro formulações testadas, as MEs F3 e F4 apresentaram aspecto turvo após o teste de estresse térmico e ciclo gelo-degelo (**Figura 4**). A turvação constatada visualmente foi revertida nas formulações submetidas ao estresse térmico logo após o arrefecimento da temperatura.

Figura 4. Aspecto visual das micromeulsões após o estresse térmico (A-antes e B-depois) e ciclo gelo-degelo (C-antes e D-depois)



Segundo Callender et al. (2017), as MEs são sensíveis às variações de temperatura e salinidade e podem sofrer mudanças de fase quando expostas a temperaturas mais altas ou mais baixas do que o normal ou diferentes concentrações de salinidade. Isso poderia levar à 'quebra' do sistema e a uma eventual separação de fases.

Além disso, tensoativos não-iônicos apresentam interações suaves entre os grupos de cabeças hidrofílicas. Esta é a principal razão pela qual as formulações que

contem esses tensoativos podem apresentar alterações em sua microestrutura em função de uma mudança na temperatura (KAUR; MEHTA, 2017).

De acordo com Yu et al. (2004), MEs podem apresentar aspecto turvo ou leitoso em determinado ponto de nuvem do tensoativo, para o qual, em função do aumento da temperatura, a turvação do agente tensoativo começa como resultado de uma alteração física e desidratação suficiente da porção hidrofílica das micelas.

Quando as formulações F3 e F4 foram deixadas a arrefecer até à temperatura ambiente, o aspecto turvo se tornou transparente. Mohajeri e Noudeh (2012) esclarecem que em altas temperaturas, algumas mudanças reversíveis podem ocorrer na interface entre as fases interna e externa, o que pode levar à agregação temporária e aumento no tamanho da gotícula.

Portanto, sistemas microemulsionados que são estabilizados com tensoativos não-iônicos mostram transições estruturais em uma temperatura particular que pode ser denominada Temperatura de Inversão de Fases do inglês *Phase Inversion Temperature* (PIT), caracterizada como uma propriedade peculiar do tensoativo (KAUR; MEHTA, 2017). Entretanto, o PIT do sistema microemulsionado pode ser ajustado pela adição de um eletrólito ou pela inclusão de alguns outros compostos no sistema.

3.3 Propriedades físico-químicas das formulações

A análise das propriedades físico-químicas, incluindo estabilidade termodinâmica, condutividade elétrica, pH e viscosidade de sistemas microemulsionados, são de grande importância para a caracterização das micelas presentes em MEs (PAUL; PANDA, 2013; MA et al., 2015). Entretanto, apesar de existirem técnicas bem estabelecidas para caracterização das MEs, e de possíveis generalizações com relação à formação de MEs, esses sistemas possuem natureza complexa e dinâmica (CALLENDER et al., 2017).

3.3.1 pH, Condutividade, Índice de refração e Teor

A Tabela 2 mostra os resultados de pH, condutividade, índice de refração e teor das formulações F1, F2, F3 e F4, nos tempos 0 (início do ciclo gelo-degelo) e 12 (final do ciclo gelo-degelo).

Tabela 2. Características físico-químicas das microemulsões contendo γ -terpineno nos tempos T0 e T12 frente ao ensaio de estabilidade preliminar

	pH		Condutividade (μ S/cm)		IR		Teor (mg/mL)	
	T0	T12	T0	T12	T0	T12	T0	T12
F1	6,78 \pm 0,01	5,38 \pm 0,01 ^a	72,37 \pm 0,23	72,46 \pm 0,15	1,42	1,42	8,19 \pm 0,19	8,32 \pm 0,19
F2	6,82 \pm 0,01	5,53 \pm 0,01	25,80 \pm 0,26	26,26 \pm 0,20	1,42	1,42	8,37 \pm 0,13	8,79 \pm 0,18
F3	6,88 \pm 0,04	5,70 \pm 0,01	9,71 \pm 0,10	9,56 \pm 0,01	1,42	1,43	8,67 \pm 0,12	8,84 \pm 0,10
F4	6,91 \pm 0,01	5,76 \pm 0,01	12,20 \pm 0,29	12,37 \pm 0,17	1,43	1,44	9,15 \pm 0,15	7,98 \pm 0,14 ^a
V2	6,91 \pm 0,02	5,72 \pm 0,01	48,59 \pm 0,07 ^b	54,04 \pm 0,14 ^{a,c}	1,42	1,43	-	-
V3	6,88 \pm 0,01	5,79 \pm 0,01	47,77 \pm 0,02 ^b	49,24 \pm 0,22 ^{a,c}	1,42	1,43	-	-
V4	7,94 \pm 0,72	5,81 \pm 0,03 ^a	37,05 \pm 0,15 ^b	38,68 \pm 0,28 ^{a,c}	1,42	1,43	-	-

pH: potencial hidrogeniônico; IR: índice de refração. Os números representam a média e o desvio padrão da média. A análise estatística foi determinada pelo teste de Tukey (^a = p<0,05 comparados os tempos 0 e 12 da mesma formulação; ^b = p<0,05 veículo comparado com a formulação contendo γ -terpineno no tempo 0; ^c = p<0,05 veículo comparado com a formulação contendo γ -terpineno no tempo 12).

Apesar da diferença significativa apresentada no pH das MEs F1 e V4, quando comparados os valores nos tempos 0 e 12 do ciclo gelo-degelo, o valor do pH das formulações se manteve na faixa de 5,38 a 6,91, valor condizente com o limite biológico tolerável para administrações por via transdérmicas (DEHGHANI et al., 2017).

Após o ciclo gelo-degelo todas as MEs veículos sofreram alteração significativa na condutividade elétrica, o que não aconteceu em MEs contendo o γ -terpineno, evidenciando que o monoterpene auxilia na estabilidade física das formulações. O tipo de ME pode ser confirmado pela condutividade elétrica apresentada pela formulação. A condutividade elétrica das MEs contendo γ -terpineno esteve na faixa de 9,71 \pm 0,10 a 72,37 \pm 0,23 μ S/cm, indicando a estrutura óleo-em-água de todas as MEs preparadas. A água é um bom condutor de íons, de forma que, quanto maior o teor de água, maior o valor de condutividade (RAMLI et al., 2009). Entre os diferentes tipos de microemulsão, sistemas do tipo óleo em água são mais utilizados para entrega de moléculas de fármaco insolúveis em água (ATASHAFROOZ et al., 2014; DIZAJ, 2013).

É sabido que o valor exato da condutividade pode ser influenciado pela natureza do óleo e/ou do tensoativo usado na formulação. Em geral, MEs inversas ou do tipo água em óleo tem valores de condutividade elétrica muito baixos, chegando à zero (MEHTA; KAUR, 2011). Já MEs óleo-em-água podem ter valores de condutividade elétrica maiores (TAO et al., 2018). Conforme observado nesse estudo, os valores de condutividade elétrica das MEs diminuíram com a maior adição de tensoativos, de

forma que o aumento da condutividade elétrica pode ser considerado inversamente proporcional à concentração do tensoativo (MOURI et al., 2016). Percebe-se que a presença de γ -terpineno altera significativamente a condutividade das MEs.

O índice de refração (IR) de todas as microemulsões, tanto livres de γ -terpineno quanto com a inclusão deste, se apresentou em torno de 1,42, não sendo evidenciando desvio ou vibração da luz polarizada, de forma que as MEs se apresentaram com as mesmas propriedades ópticas em todas as direções (SILVA et al., 2009a).

O índice de refração é um parâmetro utilizado como indicador da perda de estabilidade de MEs em diferentes temperaturas podendo indicar também a localização e estabilidade do fármaco no sistema. Revelando boa estabilidade físico-química, os resultados do índice de refração mostram que as diferenças entre as MEs no T0 e no T12 não foram significativas (**Tabela 2**). Entretanto, quando avaliado o teor de γ -terpineno nas formulações, a F4 apresentou redução significativa frente ao ciclo gelo-degelo, revelando instabilidade.

3.3.2 Tamanho da Gotícula, PDI e Potencial Zeta

Após o ciclo gelo-degelo, os sistemas microemulsionados apresentaram aumento do tamanho da gotícula e pequenas alterações de PDI e potencial zeta. As maiores alterações se mostraram nas MEs veículo, evidenciando que o γ -terpineno auxilia na estabilidade do sistema (**Tabela 3**).

Tabela 3. Tamanho da gotícula, PDI e Potencial Zeta das microemulsões contendo γ -terpineno nos tempos T0 e T12 frente ao ensaio de estabilidade preliminar

	Tamanho da Gotícula (nm)		PDI		Potencial Zeta (mV)	
	T0	T12	T0	T12	T0	T12
F1	143,4	239,7	0,238	0,273	-42,2	-55,1
F2	124,4	218,7	0,302	0,315	-41,7	-49,5
F3	229,9	239,2	0,334	0,312	-28,1	-43,1
F4	243,7	237,5	0,235	0,246	-36,0	-44,6
V2	158,8	162,3	0,352	0,252	-36,7	-45,7
V3	148,7	181,5	0,273	0,181	-35,8	-41,0
V4	269,4	306,6	0,270	0,466	-46,8	-44,6

PDI: índice de polidispersão.

Todas as MEs exibiram um tamanho de gotícula na faixa nanométrica. Observa-se um comportamento monomodal das MEs, distribuição homogênea das gotículas e baixo PDI. Nota-se também ligeira variação no tamanho das gotículas de ME com γ -

terpineno em relação ao veículo, sugerindo que o γ -terpineno esteja localizado no núcleo de óleo das formulações com a região hidrofílica da molécula na região da interface, aumentando o diâmetro das estruturas. Contudo, o ciclo gelo-degelo não causou grande aumento no tamanho das gotículas nas formulações contendo γ -terpineno e seu PDI, evidenciando a homogeneidade do sistema e, conseqüentemente, confirmando sua estabilidade físico-química.

O pequeno tamanho da gotícula configura as formulações testadas como sistemas microemulsionados e com grande estabilidade termodinâmica. O tamanho da gotícula de ME é tipicamente entre 10-300nm, aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões, que é em torno de 1-10 μ m (DAMASCENO et al., 2011). Por essa razão, MEs são relativamente translúcidas, o que pode ser justificado pelo fato de que o diâmetro médio das gotículas é menor do que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente. Dessa forma, essas gotículas não espalham luz e o sistema mostra-se opticamente transparente (LANGEVIN, 1988). As MEs do tipo óleo em água podem apresentar uma aparência transparente azulada por consistirem de gotículas de óleo rodeadas por um filme de tensoativos (FLETCHER; MORRIS, 1995). O pequeno tamanho de gotícula também sugere a adequada interação entre as porções hidrofóbicas dos tensoativos e a cauda hidrofóbica do óleo.

De acordo com Silva et al. (2009a) o baixo diâmetro das gotículas de ME, menores que 200 nm, permite uso desse sistema por aplicação transdérmica, podendo ser usado como sistemas de liberação prolongada. Todas as formulações analisadas apresentam características favoráveis para esse tipo de administração. Entretanto, as formulações F1 e F2 se mostram como as mais adequadas para estudos *in vivo*, como via transdérmica de entrega sistêmica de γ -terpineno, uma vez que dentre os sistemas caracterizados, estas apresentam menor quantidade de tensoativos.

Tendo em vista que uma quantidade elevada de tensoativo pode causar irritação na pele, especialmente para a aplicação transdérmica, estabilizadores de sistemas microemulsionados podem ser utilizados para sua modificação, visando a diminuição da porcentagem de tensoativos utilizados devido ao seu excelente comportamento de umidificação nas interfaces, além de proporcionar uma sensação não oleosa quando a ME é aplicada na superfície da pele (SHAKEEL; RAMADAN, 2010; SUNINTABOON et al., 2013; HADZIR et al., 2013).

Nota-se que para todas as amostras, o índice de polidispersividade (PDI), como medida de homogeneidade de partículas, foi menor que 0,5. Valores de PDI próximos a zero indicaram maior uniformidade na distribuição do tamanho das gotículas e homogeneidade. Assim, todas as MEs preparadas eram homogêneas com uma estreita distribuição de tamanho.

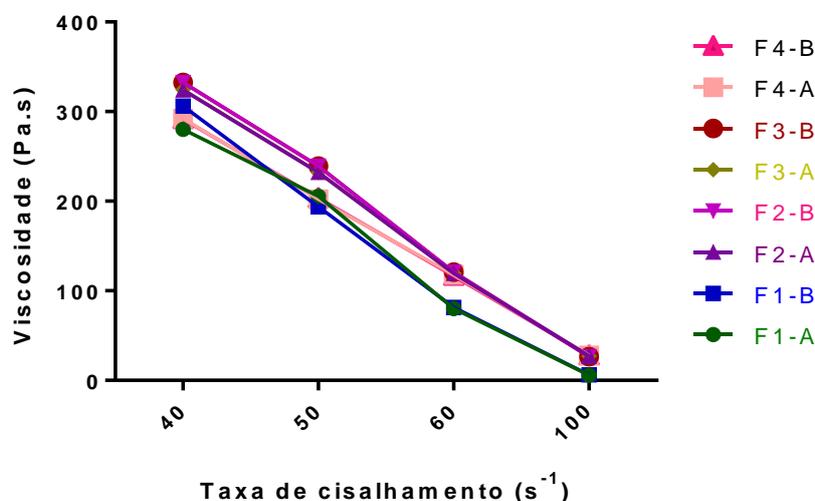
O potencial zeta é considerado um indicador de estabilidade de MEs e reflete a carga superficial de gotículas do sistema. Como tal, fornece informações sobre as interações carga-carga que podem ocorrer entre as gotas em um sistema microemulsionado, ou seja, repulsão ou atração eletrostática. Considerando que a repulsão eletrostática atrasa a coalescência e a floculação e, em consequência, a separação de fases, valores potencial zeta das gotículas em função do tempo são indicativos de estabilidade do sistema (SEPEUR, 2008). Potencial zeta com valor maior ou igual ao módulo de 30 mV indica que a força repulsiva entre as superfícies é maior que a força atrativa de van der Waals, evitando assim uma possível floculação (BENITA; LEY, 1993).

Mesmo com uma pequena variação após o ciclo gelo-degelo, o potencial zeta das microemulsões foi negativo, na faixa de -28,1 a -46,8 mV, no tempo inicial e -41,0 a -55,1 mV, ao final do teste. O valor negativo do potencial zeta pode estar relacionado à presença de grupos funcionais que contém o átomo de oxigênio com alta eletronegatividade nos tensoativos. Além disso, um valor elevado e negativo do potencial zeta é importante para a estabilidade físico-química do sistema microemulsionado, pois as forças repulsivas entre as partículas evitam a floculação.

3.3.3 Viscosidade

Os valores de viscosidade das MEs em função do aumento da velocidade de rotação em rpm, antes e depois do teste de estabilidade preliminar, são apresentados na Figura 5. Observa-se que as formulações apresentaram-se como fluidos não-newtonianos, nos quais a viscosidade não se mantém constante frente à diferentes taxas de cisalhamento. Nos fluidos newtonianos a tensão é diretamente proporcional à taxa de deformação (LU; WANG; DUAN, 2016). Pode-se observar também que os valores de viscosidade não foram modificados frente ao ciclo gelo-degelo.

Figura 5. Viscosidade média das formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno nos tempos T0 (F1A, F2A, F3A e F4A) e T12 (F1B, F2B, F3B e F4B) frente ao ensaio de estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo)



Cada ponto representa a média \pm desvio padrão da média da viscosidade das formulações frente ao ciclo gelo-degelo (T0 e T12). ANOVA duas vias, Teste de Tukey.

As medições de viscosidade também podem indicar a estabilidade de um sistema microemulsionado. A viscosidade da fase contínua é inversamente proporcional à constante de difusão (ROSEN; KUNJAPPU, 2012). À medida que a viscosidade aumenta, a constante de difusão diminui, resultando em uma diminuição geral na frequência de colisões entre as gotículas do sistema, o que pode resultar posteriormente na separação de fases. Assim, o aumento da viscosidade limita essas colisões e aumenta a estabilidade. Além disso, é sabido que à medida que a concentração de tensoativo aumenta na formulação, várias formas micelares são formadas, resultando em aumento da viscosidade geral (KAMRANFAR; JAMIALAHMADI, 2014).

3.3.4 Microscopia de luz polarizada

A caracterização dos MEs pode ser feita através de microscopia de luz polarizada, que identifica sistemas anisotrópicos e isotrópicos. Nessa análise verifica-se que as formulações mostram-se como sistemas isotrópicos, podendo ser visualizado um campo homogêneo característico de ME (**Figura 6**).

Figura 6. Fotomicrografias de formulações contendo γ -terpineno e formulação veículo



A- F1; B- F2; C- veículo. Aumento de 400x.

Sob um plano de luz polarizada, a amostra é isotrópica quando não é capaz de desviar o plano da luz incidente (CHIVAS et al., 2009). Os sistemas em estudo foram visualizados como campo escuro, não desviando a propagação da luz, ou seja, apresentando as mesmas propriedades ópticas em todas as direções.

3.4 Escolha da fase receptora

Um aspecto importante dos estudos de liberação cinética e permeação cutânea *in vitro* é a escolha do fluido receptor. O γ -terpineno é praticamente insolúvel em água, inviabilizando o uso de tampão fosfato como meio receptor (BRASIL, 2010). A solução receptora da cinética de liberação *in vitro* foi escolhida a partir de um ensaio de solubilidade, no qual foi possível identificar o meio solúvel para o γ -terpineno e que mimetize as condições “*sink*” (Tabela 4).

Tabela 4: Escolha da fase receptora para a cinética de liberação *in vitro* através da quantificação de γ -terpineno em meios de solubilização

	Meio de solubilização	Teor (mg/mL)	DP
1	Tampão fosfato pH 7,4 e Polaxamer 8:2 (v/v)	0	-
2	Tampão fosfato pH 7,4 e Polaxamer 9:1 (v/v)	0	-
3	Tampão fosfato pH 7,4 e LSS 9:1 (v/v)	9,657	4,335
4	Tampão fosfato pH 7,4 e LSS 9,5:0,5 (v/v)	6,380	1,815
5	Tampão fosfato pH 7,4	0	-

LSS: lauril sulfato de sódio; v/v: volume/volume; DP: desvio padrão.

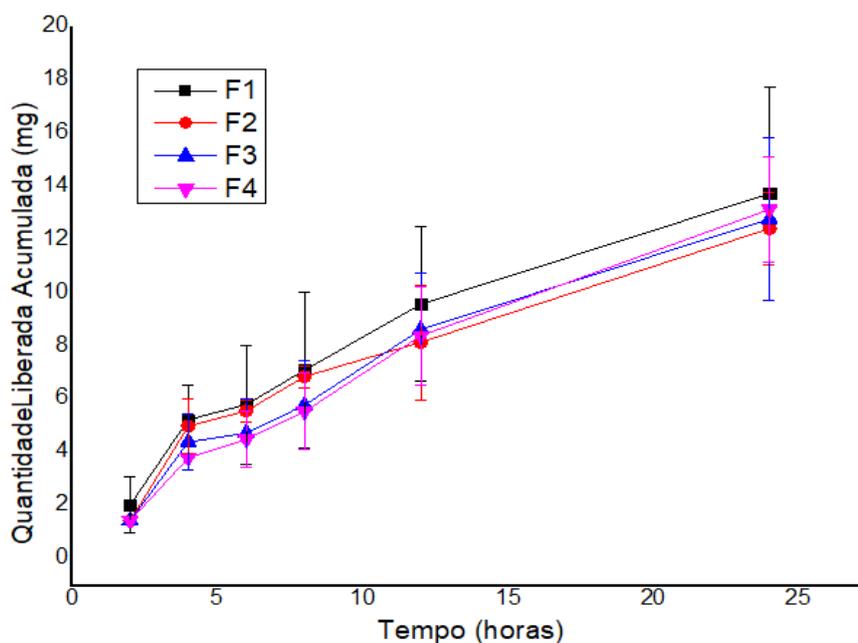
Como já era esperado, não houve o aparecimento do pico característico de γ -terpineno nas curvas espectrofotométricas em primeira e segunda derivadas da solução Tampão fosfato pH 7,4, evidenciando a não solubilização do γ -terpineno nesse meio que foi, portanto, descartado como fase receptora para a cinética de liberação *in vitro*. O mesmo resultado foi obtido com a análise espectrofotométrica das soluções com tampão fosfato pH 7,4 adicionado a 5% ou 10% de Polaxamer.

Apenas as soluções de tampão fosfato pH 7,4 com LSS se mostraram solúveis ao γ -terpineno. Embora a solução 3 tenha apresentado maior solubilidade ao monoterpeno, foi escolhida a solução 4 como fase receptora para o teste de liberação já que constatou-se que a quantidade dobrada de LSS na solução não reflete em aumento significativo do teor de γ -terpineno nesta. Dessa forma, a solução 4 atende às condições “sink” do meio, e ainda proporciona solubilização adequada ao γ -terpineno, ou seja, a substância foi detectada em quantidade 10 vezes menor que o coeficiente de solubilidade do fármaco no meio (PRAÇA, 2010).

3.5 Cinética de liberação das formulações contendo γ -terpineno

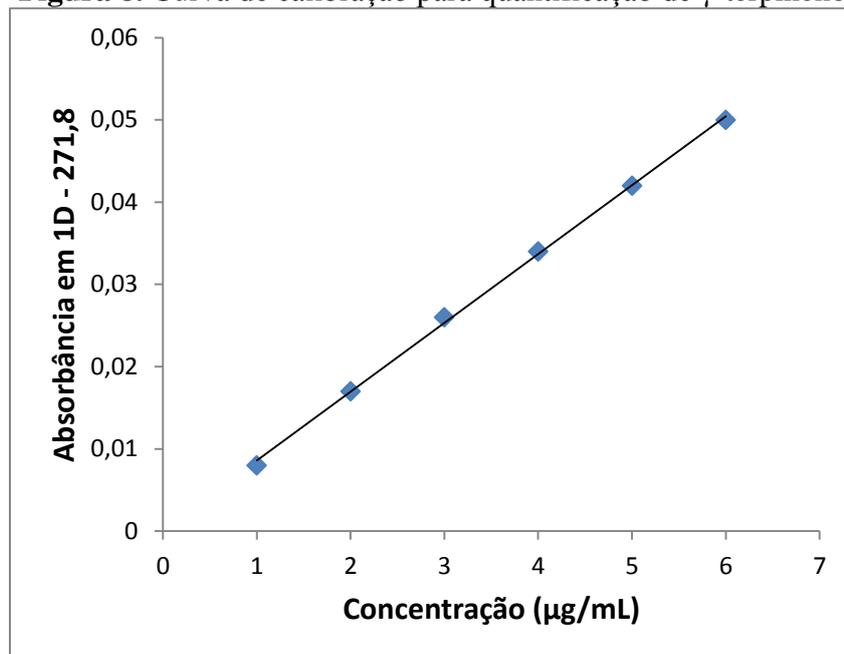
A cinética de liberação *in vitro* das formulações escolhidas está representada na Figura 7. As formulações F1, F2, F3 e F4 liberaram o γ -terpineno com uma porcentagem cumulativa de liberação de $41,1 \pm 4,03$, $37,1 \pm 1,36$, $38,2 \pm 3,05$ e $39,3 \pm 1,97$, respectivamente, em 24 h. Observando a taxa de liberação do γ -terpineno no tempo em estudo, pode ser identificado um perfil de liberação controlada, com rápida difusão no meio receptor durante as primeiras 4h.

Figura 7. Perfil de liberação *in vitro* de formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno



A curva de calibração construída para a quantificação do γ -terpineno apresenta a equação linear da reta $y = 0,0084x + 0,0002$, com $r^2 = 0,9991$ (**Figura 8**).

Figura 8. Curva de calibração para quantificação de γ -terpineno



Conforme mostra a Tabela 5, o modelo cinético de liberação *in vitro* das formulações microemulsionadas de γ -terpineno melhor se ajustou ao modelo matemático de Higuchi, no qual foi alcançado maior valor de coeficiente de regressão linear.

Tabela 5. Valores da taxa de fluxo (J_{ss}) e do coeficiente de regressão (r^2) para a análise dos dados de liberação utilizando as equações cinéticas de ordem zero, primeira ordem e Higuchi

	J_{ss}				r^2			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
Ordem zero	0,399	0,350	0,416	0,457	0,970	0,956	0,976	0,988
Primeira ordem	9,221	7,966	9,891	10,956	0,971	0,965	0,960	0,956
Higuchi	2,093	1,834	2,237	2,485	0,986	0,968	0,983	0,990

Modelos matemáticos de permeabilidade da pele são importantes para a previsão da entrega de drogas transdérmicas (MITRAGOTRI et al., 2011). Baseado em uma abordagem pseudo-estacionária, uma proporcionalidade direta entre a quantidade cumulativa de droga liberada e a raiz quadrada do tempo pode ser demonstrada através do modelo matemático de Higuchi (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014). Assim, o modelo Higuchi permite a quantificação da liberação da substância a partir de um sistema microemulsionado de entrega de drogas.

Em contraste com vários outros modelos de liberação cinética, a constante de proporcionalidade na equação clássica de Higuchi permite facilitar a otimização do dispositivo e compreender melhor os mecanismos subjacentes à liberação do fármaco analisado, com um significado específico, fisicamente realista (SIEPMANNA; PEPPAS, 2011).

4. CONCLUSÃO

A partir da construção do DFPT foi possível identificar uma região de MEs contendo γ -terpineno como princípio ativo da formulação. A região do diagrama que apresenta maior formação de ME se configura por apresentar maiores quantidades de tensoativo, que diminui a tensão interfacial do sistema. Dentre as MEs obtidas a partir do diagrama de fases, quatro foram escolhidas para caracterização, das quais F1 e F2 mostraram-se sistemas opticamente translúcidos, homogêneos e termodinamicamente estáveis. Foi possível inferir que o γ -terpineno contido nas MEs se incorporou efetivamente no núcleo de óleo das MEs, com a região hidrofílica da molécula localizada na interface óleo-água, uma vez que o diâmetro das estruturas aumentou quando comparado ao veículo. A síntese de MEs pode se tornar uma nova alternativa biotecnológica na liberação transdérmica de γ -terpineno para fins farmacêuticos. Essas formulações garantem melhoria da estabilidade termodinâmica da substância e promove um aprimoramento da sua solubilidade em meio aquoso. Adicionalmente, as MEs em análise apresentam tamanho adequado de gotícula para sistemas transdérmicos de liberação controlada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATASHAFROOZ, Z.; DIZAJ, S.M.; SADAGHIANI, A.S. *Cucurbita pepo* oil as a drug microemulsion formulation: study of phase diagram. **International Journal of Nanomedicine** v.1, 298–301, 2014.

BAGWE, R.P.; KANICKY, J.R.; PALLA, B.J.; PATANJALI, P.K.; SHAH, D.O. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.18, n.1, p.77-140, 2001.

BALDISSERA, M.D.; GRANDO, T.H.; SOUZA, C.F.; GRESSLER, L.T.; STEFANI, L.M.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. *In vitro* and in vivo action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v.162, p.43-48, 2016.

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.

BORGES, V.R.A.; SIMON, A.; SENA, A.R.C.; CABRAL, L.M.; SOUSA, V.P. Nanoemulsion containing dapsone for topical administration: a study of in vitro release and epidermal permeation. **International Journal Nanomedicine**, v.8, p.535–544, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 1ed. 52p. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005 – **Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**. Brasília, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

CALLENDER, S.P.; MATHEWS, J.A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S.D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.526, p.425–442, 2017.

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.

CARVALHO, A. L. M.; SILVA, J. A.; LIRA, A. A. M.; ALMEIDA, E. D. P.; NUNES, R. S.; SARMENTO, V. H. V.; VERAS, L. M. C.; LEITE, J. R. A.; LEAL, L. B.; SANTANA, D. P. Third-generation transdermal delivery systems containing zidovudine: effect of the combination of different chemical enhancers and a microemulsion system. **AAPS PharmSciTech**, 2018.

CROCOLL, C.; ASBACH, J.; NOVAK, J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. Terpene synthases of orégano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. **Plant Molecular Biology**, v.73, p.587-603, 2010.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador paramoléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.9-18, 2011.

DEGHANI, F.; FARHADIAN, N.; GOLMOHAMMADZADEH, S.; BIRIAEE, A.; EBRAHIMI, M.; KARIMI, M. Preparation, characterization and in-vivo evaluation of microemulsions containing tamoxifen citrate anti-cancer drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, p.479–489, 2017.

DIZAJ, S.M.. Preparation and study of vitamin A palmitate microemulsion drug delivery system and investigation of co-surfactant effect. **Journal of Nanostructured Chemistry**, v.3, n.1, p.1–6, 2013.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M.; JOCKOVIC, J. Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic microemulsions. **Journal of Molecular Liquids**, v.160, p.81–87, 2011.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v.271, p.11-19, 2004.

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.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.V.; SANTILLI, C.V.; EGITO, E.S.T. & OLIVEIRA, A.G. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids Surfaces B**, v.60, p.28-35, 2007.

FORMARIZ, T.R.; SARMENTO, V.H.V.; SILVA-JUNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V.; OLIVEIRA, A.G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids Surfaces B**, v.51, p.54-61, 2006.

FLETCHER, P.D.I.; MORRIS, J.S. Turbidity of oil-in-water microemulsion droplets stabilized by nonionic surfactants. **Colloids and Surfaces A**. v.98, p.147, 1995.

GÖKE, K.; LORENZ, T.; REPANAS, A.; SCHNEIDER, F.; STEINER, D.; BAUMANN, K.; BUNJES, H.; DIETZEL, A.; FINKE, J. H.; GLASMACHER, B.; KWADE, A. Novel strategies for the formulation and processing of poorly watersoluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.126, p.40–56, 2018.

HADZIR, N.M; BASRI, M.; RAHMAN, M.B.A.; SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; BASRI, H. Phase Behaviour and Formation of Fatty Acid Esters Nanoemulsions Containing Piroxicam. **AAPS PharmSciTech**, Vol. 14, No. 1, p.456-63, 2013.

ISAAC, V. L. B.; Cefali, L. C.; Chiari, B. G.; Oliveira, C. C. L. G.; Salgado, H. R. N.; Corrêa, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**. São Paulo, v. 29, n.1, p.81-96, 2008.

KANDASAMY, S.; MONIRUZZAMAN, M.; SIVAPRAGASAM, M.; SHAMSUDDIN, M.R.; MUTALI, M.I.A. Formulation and characterization of acetate based ionic liquid in oil microemulsion as a carrier for acyclovir and methotrexate. **Separation and Purification Technology**, v.196, p.149-156, 2018.

KAUR, G.; MEHTA, S.K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.529, p.134–160, 2017.

KAMRANFAR, P.; JAMIALAHMADI M. Effect of surfactant micelle shape transition on the microemulsion viscosity and its application in enhanced oil recovery processes. **Journal of Molecular Liquids**, v.198, p. 286-291, 2014.

KE, W.T.; LIN, S.Y.; HO, H.O. & SHEU, M.T. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. **Journal of Controlled Release**, v.102, p.489-507, 2005.

KHAN, M.; KHAN, S.T.; KHAN, N.A.; MAHMOOD, A., AL-KEDHAIRY, A.A.; ALKHATHLAN, H.Z. The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, 2018.

KSOURI, S.; DJEBIR, S.; BENTORKI, A.A.; GOURI, A.; HADEF, Y.; BENAKHLA, A. Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal de Mycologie Médicale**, v.27, p.245—249, 2017.

LANGEVIN, D. Microemulsions. **Accounts of Chemical Research**, v.21(7), p.255-601, 1988.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, p.89-121, 2000.

LIMA, A.S.; SCHIMMEL, J.; LUKAS, B.; NOVAK, J.; BARROSO, J.G.; FIGUEIREDO, A.C.; PEDRO, L.G.; DEGENHARDT, J.; TRINDADE, H. Genomic characterization, molecular cloning and expression analysis of two terpene synthases from *Thymus caespititius* (Lamiaceae). **Planta**, v.238, p.191-204, 2013.

LINS, R.F.; LUSTRI, W.R.; MINHARRO, S.; ALONSO, A.; NETO, D.S. On the formation, physicochemical properties and antibacterial activity of colloidal systems containing tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.497, p.271–279, 2016.

LIU, C.H.; CHANG, F.Y.; HUNG, D.K. Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: effects of terpenes and cosurfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.82, p.63–70, 2011.

LU, G.; WANG, X.D.; DUAN, Y.Y. A critical review of dynamic wetting by complex fluids: from newtonian fluids to non-newtonian fluids and nanofluids. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.236, p.43–62, 2016.

MA, Y.; YUAN, X.Z.; PENG, X.; WANG, H.; HUANG, W.; BAO, S.; LIU, H.; XIAO, Z.; ZENG, G. The pseudo-ternary phase diagrams and properties of anionic–nonionic mixed surfactant reverse micellar systems. **Journal of Molecular Liquids**, v.203, p.181–186, 2015.

MAHBOUBI, M.; HEIDARYTABAR, R.; MAHDIZADEH, E.; HOSSEINI, H. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus* species and *Zataria multiflora* essential oils. **Agriculture and Natural Resources**, v.51, p.395-401, 2017.

MENDES, M.D.; BARROSO, J.G.; OLIVEIRA, M.M.; TRINDADE, H. Identification and characterization of a second isogene encoding γ -terpinene synthase in *Thymus caespititius*. **Journal of Plant Physiology**, v.171, p.1017–1027, 2014.

MILADI, H.; ZMANTAR, T.; KOUIDHI, B.; QURASHI, Y.M.A.A.; BAKHROUF, A.; CHAABOUNI, Y.; MAHDOUANI, K.; CHAIEB, K. Synergistic effect of eugenol,

carvacrol, thymol, p-cymene and gamma-terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v.112, 156-163, 2017.

MITRAGOTRI, S.; ANISSIMOV, Y.G.; BUNGE, A.L.; FRASCH, H.F.; GUYE, R.H.; HADGRAFT, J.; KASTING, G.B.; LANE, M.E.; ROBERTS, M.S. Modelos matemáticos de permeabilidade da pele: uma visão geral. **International Journal of Pharmaceutical**, v.418, p.115 – 129, 2011.

MOGHIMI, R.; GHADERI, L.; RAFATI, H.; ALIAHMADI, A.; MCCLEMENTS, D.J. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against E. coli. **Food Chemistry**, v.194, p.410–415, 2016.

MOHAJERI, E.; NOUDEH, G.D. Effect of temperature on the critical micelle concentration and micellization thermodynamic of nonionic surfactants: polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters. **E-Journal of Chemistry**, v.9, n.4, 2012.

MOURI, A.; LEGRAND, P.; EL-GHZAOU, A.; DORANDEU, C.; MAUREL, J.C.; DEVOISSELLE, J.M. Formulation, physicochemical characterization and stability study of lithium-loaded microemulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.502, p.117–124, 2016.

NG, S.H.; BASRI, M.; RAHMAN, M.B.A.; RAHMAN, R.N.Z.A.; SALLEH, A.B.; ISMAIL, Z. Phase behavior and formulation of palm oil esters o/w nanoemulsions stabilized by hydrocolloid gums for cosmeceuticals application. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.32, p.1428-33, 2011.

NOURAEI, M.; ACOSTA, E. J. Predicting solubilisation features of ternary phase diagrams of fully dilutable lecithin linker microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.495, p.178–190, 2017.

OLIVEIRA, L.S.A. Validação de método analítico para quantificação de gama terpineno em microemulsão por espectrofotometria derivativa. Trabalho de Conclusão de Curso. (48f.) Graduação em Farmácia. Centro de Ciências da Saúde. **Universidade Federal do Piauí**, 2016.

PARK, Y.; JUNG, S.M.; YOO, S.A.; KIM, W.U.; CHO, C.S.; PARK, B.J.; WOO, J.M.; YOON, C.H. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* in mice. **International Immunopharmacology**, v.29, p.320–325, 2015.

PASSOS, F.F.B.; LOPES, E.M.; ARAÚJO, J.M.; SOUSA, D.P.; VERAS, L.M.C.; LEITE, J.R.S.A.; ALMEIDA, F.R.C. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, Article ID 829414, 9 pages, 2015.

PAUL, S.; PANDA, A.K. Physico-chemical studies on ionic liquid microemulsion: phase manifestation, formation dynamics, size, viscosity, percolation of electrical conductance and spectroscopic investigations on 1-butyl-3-methylimidazolium methanesulfonate + water/Tween 20 + n-pentanol/n-heptane pseudo-ternary system, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering**, v.419, p.113–124, 2013.

PEPPAS, N.A.; NARASIMHAND, B. Mathematical models in drug delivery: how modeling has shaped the way we design new drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v.190, p.75-81, 2014.

PRAÇA, F.S.G. Liberação e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais. **Universidade de São Paulo**, Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto. Tese de doutorado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2010.

RAMLI, S.; ROSS, B.P.; GENTLE, I.R.. Formulation and physical characterization of microemulsions containing isotretinoin. **International Conference on Biomedical and Pharmaceutical Engineering**, 2009.

RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M.J.; RUIZ, M.A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: from alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v.83, p.41–59, 2016.

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.

ROSANI, L. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água com óleos vegetais. **Dissertação**. Universidade Federal do de Saó Carlos. São Paulo, 2011.

ROSEN, M.J.; KUNJAPPU, J.T. Surfactants and Interfacial Phenomena, **4ª Edição**, ISBN: 978-0-470-54194-4, Mar 616 p. 2012.

ROTTKE, M.; LUNTER, D.J.; DANIELS, R. In vitro studies on release and skin permeation of nonivamide from novel oil-in-oil-emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.86, p.260–266, 2014.

SANTOS, S.R.L.; MELO, M.A.; CARDOSO, A.V.; SANTOS, R.L.C.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v.84, p.150–153, 2011.

SEPEUR, S. Nanotechnology: Basics and Applications. **Vincentz Network**, Germany, p. 59, 2008.

SEOK, S.H.; LEE, S.A.; PARK, E.S. Formulation of a microemulsion-based hydrogel containing celecoxib. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.43, p.409–414, 2018.

SIEPMANNA, J.; PEPPAS, N.A.; Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**. v.418, p.6-12, 2011.

SINTOV, A.C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal of Controlled Release**, v.95, p.173-183, 2004.

SILVA, J. A.; DAMASCENO, B.P.G.L.; BORBA, V.F.C.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P.S. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de

obtenção de nanoemulsões transdérmicas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.3, p.245-249, 2009.

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, 2009b.

SHAKEEL. F.; RAMADAN, W. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v.75, p.356-62, 2010.

SILVA, J.A.; BEDOR, D.C.G.; DAMASCENO, B.P.G.L.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, n.1, p.1-8, 2009.

SUNINTABOON, P.; PUMDUANG, K.; VONGSETSKUL, T.; PITTAYANURAK, P.; ANANTACHOKE, N.; TUCHINDA, P.; DURAND, A. One-step preparation of chitosan/sodium dodecyl sulfate-stabilized oil-in-water emulsion of *Zingiber cassumunar* Roxb. oil extract. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.414, p.151-159, 2012.

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.

YE, C.; CHI, H. A review of recent progress in drug and protein encapsulation: approaches, applications and challenges. **Materials Science & Engineering C**, v.83, p.233–246, 2018.

YU, H.X.; WAN, B.K.W.; CHAN, L.N.; LAM, M.H.; LAM, P.K.S.; WANG, L.S. Cloudpoint extraction of nodularin-R from natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v.509, p.63–70, 2004.

XING, Q.; SONG, J.; YOU, X.; XU, D.; WANG, K.; SONG, J.; GUO, K.; LI, P.; WU, C.; HU, H. Microemulsions containing long-chain oil ethyl oleate improve the oral bioavailability of piroxicam by increasing drug solubility and lymphatic transportation simultaneously. **International Journal of Pharmaceutics**, v.511, p.709–718, 2016.

WANG, X.; CHEN, H.; LUO, Z.; FU, X. Preparation of starch nanoparticles in water in oil microemulsion system and their drug delivery properties. **Carbohydrate Polymers**, v.138, p.192–200, 2016.

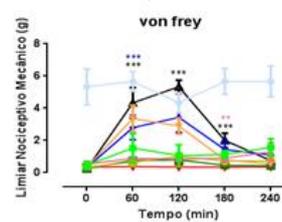
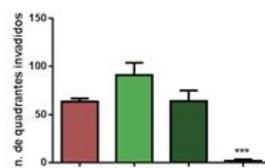
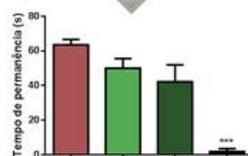
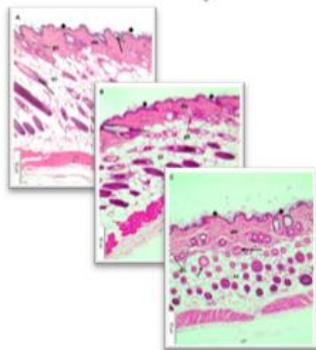
ZHANG, L.; XIAO, W.H.; WANG, Y.; YAO, M.D.; JIANG, G.Z.; ZENG, B.X.; ZHANG, R.S.; YUAN, Y.J. Chassis and key enzymes engineering for monoterpenes production. **Biotechnology Advances**, v.35, p.1022–1031, 2017.

ZHANG, H.; TAXIPALATI, M.; QUE, F.; FENG, F. Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques. **Food Chemistry**, v.141, p.3050–3055, 2013.

ZHELJAZKOV, V.D.; SEMERDJIEVA, I.B.; DINCHEVA, I.; KACANIOVA, M.; ASTATKIE, T.; RADOUKOVA, T.; SCHLEGEL, V. Antimicrobial and antioxidant activity of *Juniper galbuli* essential oil constituents eluted at different times. **Industrial Crops & Products**, v.109, p.529–537, 2017.

Capítulo 3

Avaliação Antinociceptiva



ATIVIDADE ANTONOCICEPTIVA DE MICROEMULSÕES TRANSDÉRMICAS DE γ -TERPINENO EM MODELO DE CONSTRIÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO

RESUMO

A dor neuropática é provocada por um dano no sistema nervoso central ou periférico, caracterizada pela hiperalgesia, dor espontânea e alodinia. O tratamento é realizado com anticonvulsivantes, antidepressivos tricíclicos, analgésicos opióides, anestésicos locais, entre outros. Entretanto, esses tratamentos são limitados pela baixa segurança terapêutica. Diante da necessidade de encontrar uma terapia que possa reduzir efetivamente a dor neuropática, sem apresentar efeitos adversos, surgem pesquisas com monoterpenos. Dentre eles, o γ -terpineno apresenta ação antinociceptiva na dor aguda, entretanto sua baixa solubilidade e biodisponibilidade limitam seu uso. Vias alternativas de administração e o uso de formulações farmacêuticas contribuem para minimizar esses problemas. Desse modo, o presente estudo busca investigar a ação antinociceptiva do γ -terpineno incorporado em um sistema de microemulsão, administrado por via transdérmica, em modelo de dor neuropática, induzido por constrição parcial do nervo ciático. Foi observado um aumento significativo no limiar de retirada da pata na dose de 200 mg/kg das formulações F1 e F2, aos 60 e 120 min após a administração, evidenciando a ação antinociceptiva da formulação. Na avaliação da sensibilidade térmica a F2 também mostrou ação antinociceptiva aos 60 min. Em animais submetidos ao tratamento sub-agudo, em protocolo de co-tratamento, ambas as formulações resultaram em aumento do limiar de retirada da pata a partir do 6º dia de tratamento, com exceção do 8º dia, nas doses de 200 mg/kg (F1 e F2) e 400 mg/kg (F2). Já no pós-tratamento, os animais tratados com as formulações F1 (100 e 200 mg/kg) a partir do 5º dia de tratamento, F1 (400 mg/kg) e F2 (100 mg/kg) a partir do 7º dia de tratamento e F2 (200 mg/kg) no último dia de tratamento, apresentaram redução do limiar nociceptivo mecânico. No que se refere à sensibilidade térmica ao frio, percebe-se aumento do escore em animais tratados com F2 (200 mg/kg) a partir do 7º dia de tratamento e F2 (400 mg/kg) no último dia de tratamento. As formulações transdérmicas na dose de 2000 mg/kg não demonstraram nenhum sinal de toxicidade clínica-comportamental durante os 14 dias de avaliação. A análise histológica da pele de camundongos tratados com as formulações contendo γ -terpineno sugere permeação folicular do sistema microemulsionado. No teste do campo aberto e rota rod as formulações transdérmicas na maior dose (400 mg/kg) não foram capazes de alterar a mobilidade dos animais e a atividade locomotora. Esse estudo permite concluir que formulações microemulsionadas de γ -terpineno apresentam atividade antinociceptiva, sugerindo efeito terapêutico com administrações agudas e crônicas.

Palavras-chave: γ -terpineno. Monoterpeno. Dor neuropática. Dor crônica.

ABSTRACT

Neuropathic pain is caused by damage to the central or peripheral nervous system, characterized by hyperalgesia, spontaneous pain and allodynia. The treatment is performed with anticonvulsants, tricyclic antidepressants, opioid analgesics, local anesthetics, among others. However, such treatments are limited by poor therapeutic

safety. In view of the need to find a therapy that can effectively reduce neuropathic pain, but without adverse effects, research with monoterpenes appears. γ -terpinene has antinociceptive action in acute pain, however its low solubility and bioavailability limits its use. Parenteral administration and the use of pharmaceutical formulations contribute to minimize such problems. Thus, the present study investigates the antinociceptive action of γ -terpinene administered transdermally in a microemulsion system in the neuropathic pain model induced by partial constriction of the sciatic nerve. The results presented show a significant increase in the paw withdrawal threshold at the dose of 200 mg / kg formulations F1 and F2, at 60 and 120 min after administration, evidencing the antinociceptive action of the formulation. In the evaluation of thermal sensitivity F2 also showed antinociceptive action at 60 min. In animals submitted to sub-acute treatment in a co-treatment protocol, both formulations resulted in an increase in the paw withdrawal threshold from the 6th day of treatment, except for the 8th day, at doses of 200 mg / kg (F1 and F2) and 400 mg / kg (F2). In the post-treatment period, animals treated with F1 formulations (100 and 200 mg / kg) from the 5th day of treatment, F1 (400 mg / kg) and F2 (100 mg / kg) from the 7th day of treatment treatment and F2 (200 mg / kg) on the last day of treatment, presented mechanical nociceptive threshold reduction. Regarding the thermal sensitivity to cold, an increase in the F2-treated animals (200 mg / kg) from the 7th day of treatment and F2 (400 mg / kg) was observed on the last day of treatment. Transdermal formulations at the dose of 2000 mg / kg showed no sign of clinical behavioral toxicity during the 14 days of evaluation. Histological analysis of the skin of mice treated with γ -terpinene containing formulations suggests follicular permeation of the microemulsion system. In the open field and rotated rod test the transdermal formulations at the highest dose (400 mg / kg) were not able to alter the mobility of the animals and the locomotor activity. In summary, the results of this study allow us to conclude that microemulsion formulations of γ -terpinene, presented antinociceptive activity, suggesting therapeutic effect with acute and chronic administrations.

Key-words: γ -terpinene. Monoterpene. Neuropathic pain. Chronic pain.

1. INTRODUÇÃO

Danos no sistema nervoso central e periférico podem provocar a dor neuropática em decorrência de processos que acontecem de forma simultânea, incluindo interações neuroimunes, fatores estimulantes, processos excitatórios exacerbados e processos inibitórios atenuados. Isso leva à sensibilização central e ao processamento anormal de maneira que as informações térmica ou tátil, ambas de natureza inócua passam a ser percebidas como dor (ALLES; SMITH, 2018).

A dor neuropática é caracterizada por um estado de hiperexcitabilidade clinicamente traduzida por uma resposta amplificada a estímulos de intensidade moderada (fenômeno da hiperalgesia) ou por uma sensação aversiva provocada pela ativação de mecanorreceptores de baixo limiar em resposta a estímulos não nociceptivos, que define o fenômeno da alodinia. É resultante do aumento da

sensibilidade dos receptores periféricos, bem com, do fluxo aferente em direção ao sistema nervoso central (BROWN et al., 2015).

Apesar da expansão das opções medicamentosas nos últimos anos, a terapêutica da dor neuropática, que inclui drogas anticonvulsivantes e antidepressivos tricíclicos, analgésicos opióides, anestésicos locais, dentre outros, é limitada pela baixa segurança terapêutica (DOSENOVIC et al., 2017; NISHIKAWA; NOMOTO, 2017).

A necessidade urgente de encontrar uma terapia que possa reduzir efetivamente a dor neuropática com mínimos efeitos colaterais estimula o desenvolvimento de novas pesquisas sobre medicamentos de fontes naturais. Essa matéria prima tem destaque por suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, neuroprotetoras e inibidores de influxo de cálcio (FOROUZANFAR; HOSSEINZADEH, 2018).

As plantas medicinais aromáticas possuem óleos essenciais, que são misturas complexas de metabólitos voláteis, muito utilizados na indústria farmacêutica. Os terpenóides são os constituintes mais abundantes dos óleos essenciais, podendo ser classificados como hemiterpenos, monoterpenos, ou sesquiterpenos e seus derivados (BAKKALI, et. al. 2008).

O γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexa-1,4-dieno) é um monoterpeno presente no óleo essencial de diversas espécies de plantas com propriedades farmacológicas. É encontrado no óleo de *Protium icariba* (DC.) Marchand, *Citrus deliciosa* Tenore e *Origanum onites* L., entre outras (SIANI et al., 2004; PEDRUZZI et al., 2004; ECONOMOU et al., 2011). Esse monoterpeno apresenta ação antinociceptiva em modelos de dor aguda (PASSOS et al., 2015).

Os terpenos são caracterizados pela baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade, mas devido à sua importância como recursos para as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, há um grande esforço na melhoria de seu uso clínico (PAPADA et al., 2018).

Uma das alternativas empregadas no tratamento da dor se constitui na administração transdérmica de fármacos que oferece vantagens sobre outras vias, melhorando a absorção controlada e garantindo concentrações plasmáticas mais uniformes. A biodisponibilidade é melhorada evitando o metabolismo hepático de primeira passagem e a desativação enzimática e associada ao pH. A entrega da droga é através de uma aplicação simples e indolor, o que melhora a adesão do paciente pela simplicidade de administração (BAJAJ; WHITEMAN; BRANDNER, 2011).

Diante disso, o uso do γ -terpineno por via transdérmica seria uma alternativa biotecnológica promissora para o tratamento da dor neuropática, uma vez que o monoterpene incorporado na gotícula de microemulsões (MEs) ficaria protegido de possíveis degradações (KAUR; MEHTA, 2017).

Sistemas microemulsionados têm melhorado a biodisponibilidade de compostos insolúveis em água transportados no seu núcleo de óleo ou na interface água-óleo (GUIMARÃES et al, 2014). Para facilitar sua penetração na pele, a incorporação de γ -terpineno em um sistema de liberação de fármacos pode fornecer um aumento da biodisponibilidade, redução dos efeitos colaterais e, conseqüentemente, maior frequência de administração pela maior adesão do paciente.

Desse modo, a presente pesquisa busca investigar a ação antinociceptiva do γ -terpineno administrado por via transdérmica em um sistema de microemulsão no modelo de dor neuropática induzida por constrição parcial do nervo ciático.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do γ -terpineno livre e formulações microemulsionadas

O γ -terpineno foi obtido da Sigma Aldrich com grau de pureza $\geq 97\%$ (Sigma, EUA). As formulações micromulsionadas contendo 8% de γ -terpineno, foram preparadas conforme exposto no capítulo II, na Farmácia Escola da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob supervisão do Professor Dr. André Luis Menezes Carvalho. As proporções de tensoativos/óleo das formulações testadas F1 e F2 foram, respectivamente, 5:5 e 6:4.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos, fêmeas, da linhagem Swiss, pesando 20-35 g, sendo seis animais por grupo experimental, a fim de permitir a análise estatística dos resultados, em concordância com a literatura sobre o tema.

Os animais foram obtidos do Biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí e os experimentos foram conduzidos no mesmo Núcleo, onde foram mantidos à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum* e colocados em jejum de 12h antes dos experimentos.

Para a realização do protocolo cirúrgico, os animais foram anestesiados por uma associação de cloridrato de xilazina (2,0 mg/kg) e cloridrato de cetamina (15 mg/kg) intramuscular, sendo refeita a anestesia caso o animal apresentasse sinais de recuperação. Os procedimentos referentes à eutanásia foram realizados por overdose de anestésico geral (tiopental sódico, 100 mg/kg, por via intraperitoneal), em conformidade com o Parágrafo 1º. do Art. 14 da Resolução N° 1000, de 11 de maio de 2012 do CFMV. Tais procedimentos estiveram sob a responsabilidade técnica da médica veterinária da equipe, Adeline de Andrade Carvalho, CRMV-PI N° 866.

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais como modelo experimental foram realizados segundo as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí para apreciação e aprovado sob n°. 148/2016.

2.3 Administração transdérmica

No momento em que o animal foi submetido à cirurgia de constrição parcial do nervo ciático, foi realizada a tricotomia da área dorsal do tronco de todos os animais, para expor o local de administração. O dorso foi escolhido pela dificuldade de autolimpeza do animal nessa região contribuindo para que a microemulsão fosse inteiramente absorvida. A dose administrada foi obtida com base no peso dos animais e o volume (1 mL da formulação para cada 100 mg de monoterpeno) foi uniformemente colocado sobre a pele limpa e mensurado com a ajuda de uma micropipeta graduada (Peguepet[®] 20-200 µL).

2.4 Avaliação da toxicidade aguda da formulação transdérmica

A fim de avaliar a segurança das microemulsões transdérmicas de γ -terpineno, um estudo agudo de toxicidade dérmica foi realizado de acordo com os protocolos descritos na Diretriz N° 402 da OCDE (OCDE, 1987) e conforme Bras et al. (2011, modificado). No dia anterior ao teste, foi cuidadosamente realizada tricotomia da área dorsal do tronco de todos os animais. Quinze camundongos, fêmeas, foram distribuídos em três grupos de tratamento: veículo (V), formulação 1 (F1) e formulação 2 (F2). Cada formulação foi aplicada uniformemente sobre a pele limpa do animal na dose de 2000 mg/kg de peso corporal. A área de superfície exposta era de aproximadamente 10% da

área total da superfície corporal. Após os tratamentos, aos 30, 60, 120, 180 e 240 min, os parâmetros comportamentais e funcionais, bem como a atividade motora foram avaliados em todos os animais que foram alojados em gaiolas individuais e mantiveram-se por 14 dias (OECD, 2001).

Os parâmetros analisados foram atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, contorção, reflexo ao endireitamento, tônus muscular, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimejamento, ptose palpebral, micção, evacuações, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte. A intensidade, duração e a progressão dos mesmos foram anotados, tabulando-as numa escala de 0 a 4 (ausente = 0, raro = 1, pouco = 2, moderado = 3, intenso = 4), para posterior análise (OECD, 2001). Durante esse período, os mesmos parâmetros foram avaliados para determinar reversibilidade, persistência ou atraso na ocorrência de efeitos tóxicos.

Finalmente, todos os animais foram submetidos à eutanásia e realizaram-se observações de necropsia e exames histopatológicos com mensuração do peso relativo dos órgãos internos e dosagem de parâmetros bioquímicos (alanina aminotransferase; aspartato aminotransferase; uréia; creatinina). Para isso, o sangue foi retirado do plexo orbital de cada animal e acondicionado em tubo sem anticoagulante, para obtenção do soro. Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos e, em seguida, realizada as dosagens. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 400, com kits comerciais da LABTEST®.

A pele exposta a aplicação das formulações foi retirada e fixada em formalina tamponada – PBS 10% até a sua análise. Os tecidos foram processados utilizando-se técnica histológica padrão de laboratório. Resumidamente, usando um micrótomo, seções de 4 µm foram cortadas e coradas com hematoxilina e Eosina (H&E).

Alterações na arquitetura do tecido epitelial (derme, epiderme e região subcutânea) foram avaliados ao microscópio óptico, procedida por um patologista que não teve acesso ao protocolo de tratamento, com emprego de uma escala semi-quantitativa de 0 (normal ou sem alterações apreciáveis), 1 (alterações leves), 2 (alterações moderadas) e 3 (alterações severas) (BEEHLER et al., 2003).

2.5 Avaliação antinociceptiva de formulações transdérmicas de γ -terpineno

2.5.1 Indução da neuropatia por compressão parcial do nervo ciático

Camundongos *Swiss* fêmeas (n=6), sob anestesia profunda foram submetidos à compressão do nervo ciático, o qual foi exposto através 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 (3-0 Shalon®) foi amarrado ao nervo ciático, de forma a circundar levemente todo o diâmetro do nervo. Todas as ligaduras foram realizadas pelo mesmo pesquisador, a fim de garantir a homogeneidade no procedimento. Após a ligadura, a pele foi suturada e o animal tratado com solução tópica de clorexidina (2%) e colocado em gaiola metabólica com assepsia prévia. Em um grupo (Sham) o procedimento foi apenas simulado (SELTZER et al., 1990).

2.5.2 Testes comportamentais de nociceção

Os animais foram submetidos à avaliação do limiar nociceptivo mecânico pelos filamentos de von Frey e ao teste de sensibilidade térmica ao frio (10 °C, teste da acetona), para mensurar a alodinia mecânica e térmica, respectivamente.

Na avaliação do limiar nociceptivo mecânico, os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno sob uma plataforma fenestrada de arame elevada para permitir o acesso à superfície plantar das patas traseiras, as quais foram tocadas com três repetições, por diferentes filamentos partindo da menor para a maior massa, em gramas (0,16 – 15 g). Antes dos testes comportamentais, os animais foram aclimatados no compartimento por pelo menos 30 min. Todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação prévia (basal) e novamente reavaliados em diferentes tempos após a cirurgia (CHAPLAN et al., 1994).

Para avaliação da sensibilidade térmica ao frio (10°C), uma alíquota de 0,05 mL de acetona foi lançada sob a superfície ventral da pata do animal através do piso fenestrado. Se a pata do animal estivesse corretamente molhada pela acetona, iniciava-se um período de observação inicial de 20s, no qual o animal poderia ou não apresentar comportamentos relacionados à dor. Os comportamentos foram avaliados em uma escala de 4 pontos assim apresentada:

- Escore “0” para a ausência de qualquer comportamento doloroso;
- Escore “1” para uma retirada rápida da pata e/ou com tremor ou batimento desta no chão (o tremor característico, ou *flicking*, era importante para determinar se a retirada da pata se deu por dor ou por espanto do animal);

- Escore “2” para uma retirada com sustentação prolongada da pata com ou sem repetido *flicking* desta, e;
- Escore “3” para a situação onde o animal lambe a face ventral da pata após *flicking* repetido da pata (FLATTERS; BENNET, 2004).

Todas as avaliações foram realizadas às cegas e sempre pelo mesmo pesquisador.

2.5.3 Esquema de tratamento e protocolo de avaliação aguda

Inicialmente, antes da avaliação do efeito das formulações, o teste com os filamentos de von Frey foi realizado no dia 0 (avaliação basal), no 4º e 8º dia após o procedimento cirúrgico para avaliar a instalação da neuropatia. Após a confirmação da condição neuropática os animais foram tratados com a ME de γ -terpineno (doses de 100, 200 e 400 mg/kg, via transdérmica), morfina (5 mg/kg, via intraperitoneal) e veículo (via transdérmica).

Para avaliar o efeito agudo após os tratamentos, o teste de limiar nociceptivo mecânico e sensibilidade térmica foram realizados nos tempos de 0, 60, 120, 180 e 240 minutos na pata operada.

2.5.4 Esquema de tratamento e protocolos de avaliação sub-aguda

Dois protocolos distintos foram realizados: co-tratamento e pós-tratamento. No esquema de co-tratamento, os animais foram tratados diariamente, a partir do 1º dia após o procedimento cirúrgico com a ME de γ -terpineno (doses de 100, 200 e 400 mg/kg, via transdérmica), pregabalina (10 mg/kg, via oral), ME veículo (via transdérmico). As avaliações do limiar nociceptivo mecânico e sensibilidade térmica foram realizados antes do procedimento cirúrgico e no 2º, 4º, 6, 8º, 10º, 12º e 14º dias após o procedimento cirúrgico, na pata operada.

No esquema de pós-tratamento, os animais foram tratados diariamente a partir do 8º dia após o procedimento cirúrgico com a ME de γ -terpineno (doses de 100, 200 e 400 mg/kg, via transdérmica), pregabalina (10 mg/kg, via oral), ME veículo (via transdérmico). As avaliações do limiar nociceptivo mecânico e sensibilidade térmica foram realizados antes do procedimento cirúrgico e no 2º, 4º, 6, 8º, 10º, 12º, 14º e 16º dias após o procedimento cirúrgico, na pata operada.

2.6 Investigação de atividade antioxidante de formulações transdérmicas de γ -terpineno

2.6.1 Preparação das amostras

Após o teste sub-agudo de pós-tratamento, foi realizada a coleta de sangue para análise antioxidante. Essas amostras foram centrifugadas e o soro utilizado para a estimativa de malondialdeído e grupos sulfidrílicos não-proteicos (GSH reduzida).

2.6.2 Determinação da GSH

A GSH foi determinada como descrito por Moron, Depierre e Mannervik (1979). Para isso, foi avaliado o homogenato do tecido a 10% em EDTA 0,02M e o ensaio realizado em tampão tris 0,4M, pH=8,9, na presença de DTNB 0,1M a intensidade da cor será medida a 412 nm.

2.6.3 Determinação de MDA

Os níveis de malondialdeído serão determinados no tecido neural pelo método de Slater e Sawyer (1971). Os valores serão expressos em nanomols/mg de proteína.

2.7 Avaliação do efeito das formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre a atividade locomotora e relaxante muscular

2.7.1 Teste do Rota-Rod

Por este método é possível detectar a ocorrência de incoordenação motora relacionada a um possível efeito relaxante muscular da substância em análise, permitindo uma interpretação mais precisa dos testes de nocicepção (LAPA et al., 2003). Os animais foram selecionados 24 h antes do experimento, através de uma triagem em sessões de 1 minuto de duração, foram escolhidos os que permanecerem este tempo no aparelho. Após a triagem os animais foram divididos em grupos (n = 6) e tratados com a formulação transdérmica de γ -terpineno (400 mg/kg, via transdérmica), veículo (via transdérmica) ou diazepam (agonista benzodiazepínico, 4 mg/kg i.p.) como controle positivo. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória podendo o animal ser reconduzido por até três vezes, no tempo máximo de 1 minuto.

2.7.2 Teste do Campo Aberto

Este teste é utilizado para avaliar a capacidade exploratória dos animais (LAPA, 2003). Os camundongos foram divididos em grupos ($n = 6$) e tratados com as formulações transdérmicas de γ -terpineno (400 mg/kg, via transdérmica), veículo (via transdérmica) ou diazepam (agonista benzodiazepínico, 4 mg/kg i.p.). Após 30 e 60 minutos, os animais foram levados individualmente ao campo aberto, que consiste em uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm), confeccionada em acrílico, com piso preto dividido em nove partes iguais, paredes transparentes e iluminada com luz vermelha. O animal foi posto na arena e deixado para explorar o ambiente por um minuto. Após esse período, foi quantificado o número de quadrantes atravessados com as quatro patas pelo animal, o número de *rearings* (ato de levantar as patas - exploração vertical) e o tempo de imobilidade, durante cinco minutos. A arena foi limpa com álcool a 70 % após cada animal ser retirado, sendo então realizada a comparação entre os grupos (BROADHURST, 1957; ARCHER, 1973).

2.8 Análise estatística

Foram utilizados, quando necessário, os testes “*t de Student*”, para as análises entre dois grupos, e análise de variância uma ou duas vias (ANOVA) seguida do Teste de *Tukey* para avaliar a significância das diferenças entre as médias. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando o valor for $p < 0,05$. Em todos estes procedimentos, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação comportamental no teste de toxicidade aguda das formulações

A avaliação dos potenciais efeitos tóxicos foi realizada com as formulações microemulsionadas de γ -terpineno, uma vez que os constituintes da formulação poderiam apresentar efeitos tóxicos. As formulações transdérmicas de γ -terpineno na dose de 2000 mg/kg não demonstraram nenhum sinal de toxicidade clínica-comportamental nas primeiras horas de observação (**Tabela 1**), bem como nos 14 dias seguintes de observação, também não foi observada nenhuma morte.

Tabela 1: Parâmetros clínico-comportamentais da análise da toxicidade aguda de formulações microemulsionadas de γ -terpineno (F1, F2 e veículo, 2000 mg/kg, via transdérmica)

Atividade farmacológica	Tempo (min.)				
	30	60	120	180	240
ESTIMULANTE					
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
DEPRESSOR					
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Perda do reflexo palpebral	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO					
Diarreia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
OUTROS COMPORTAMENTOS					
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	0	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0

Após os 14 dias de observação foram mensurados alguns parâmetros bioquímicos, onde também não foram observadas alterações, significativas, provocadas pela administração das formulações com o monoterpene em relação ao veículo (**Tabela 2**).

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos tratados com formulações microemulsionadas de γ -terpineno (2000 mg/kg, via transdérmica, n = 5)

Parâmetros bioquímicos	Veículo	Formulação 1	Formulação 2
ALT (U/L)	113,00 \pm 1,00	73,00 \pm 1,91	84,40 \pm 16,77
AST (U/L)	137,50 \pm 11,50	95,75 \pm 18,85	132,80* \pm 17,85
Creatinina (mg/dL)	0,30 \pm 0	0,28 \pm 0,02	0,30 \pm 0
Uréia (mg/dL)	63,00 \pm 6,00	46,50 \pm 6,50	46,20 \pm 5,53

ALT- alanina transferase; AST- aspartato aminotransferase; mg/dL: miligrama por decilitro, U/L: Unidades internacionais por litro. Os números representam a média e o erro padrão da média. A análise estatística foi determinada pelo teste de Tukey. (*=p<0,05 comparado com F1).

Esses dados mostram que as formulações transdérmicas de γ -terpineno na dose utilizada, não alteraram parâmetros hepáticos (AST e ALT) ou renais (creatinina e ureia). A Tabela 3 apresenta o peso relativo dos órgãos dos animais, onde γ -terpineno não provocou alterações significativas em relação ao controle.

Tabela 3: Avaliação da massa relativa dos órgãos de camundongos tratados com formulações de γ -terpineno (2000 mg/kg, via transdérmica, n = 5)

Órgãos Internos	Veículo	Formulação 1	Formulação 2
Fígado	466 \pm 0,01	424 \pm 0,04	441 \pm 0,04
Baço	38 \pm 0,01	36 \pm 0,01	38 \pm 0,01
Coração	46 \pm 0,01	46 \pm 0,01	54 \pm 0,01
Rins	96 \pm 0,01	116 \pm 0,01	116 \pm 0,01
Pulmões	62 \pm 0,01	110 \pm 0,05	84 \pm 0,03

Os números representam a média e o erro padrão da média do peso relativo em miligramas para cada 10g de peso corporal do animal.

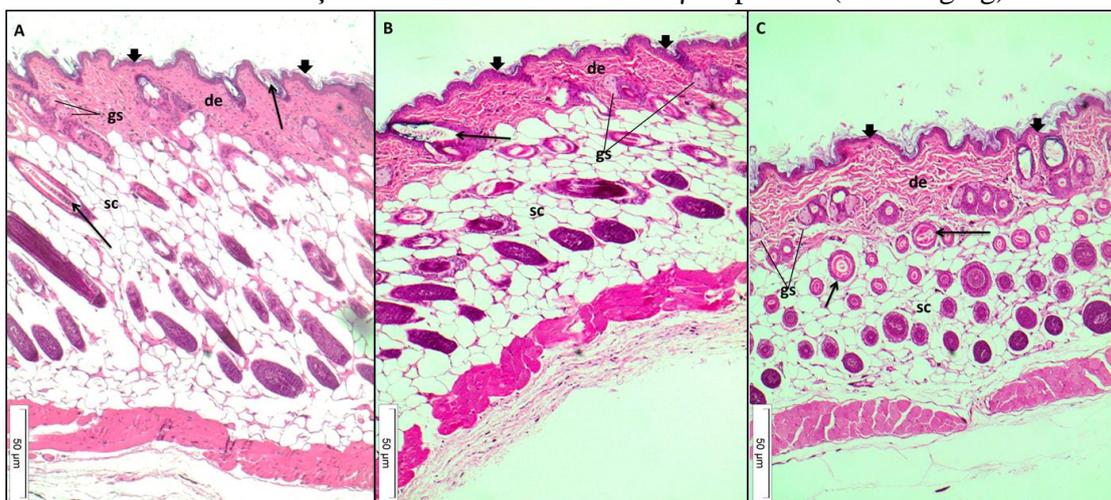
3.2 Avaliação histopatológica das amostras no teste de toxicidade aguda

A aplicação transdérmica de formulações microemulsionadas de γ -terpineno não resultou em toxicidade dérmica ou lesões. A Figura 1 mostra secções histológicas, coradas por hematoxilina e eosina, da pele fina de camundongos expostos à administração transdérmica das formulações F1, F2 e veículo (2000 mg/kg). De forma geral, a exposição transdérmica à formulações microemulsionadas não produziram irritação evidente da pele. A epiderme se manteve com espessura normal, sem aumento do número de camadas epiteliais.

Foi observada, em animais tratados com F2 e com o veículo, hiperplasia moderada das glândulas sebáceas (gs), caracterizada por proeminentemente aumento devido ao aumento do tamanho e do número de células alveolares.

Note-se que há também desestruturação da derme dos animais tratados com veículo, evidenciado que a presença do monoterpene pode auxiliar na proteção dérmica quando a pele é exposta aos demais constituintes da formulação. Além disso, os folículos pilosos (setas finas) de animais tratados com as formulações contendo γ -terpineno são mais evidentes em comparação com os folículos pilosos dos animais expostos ao veículo.

Figura 1. Histopatologia da pele fina de camundongos expostos à administração transdérmica de formulações microemulsionadas de γ -terpineno (2000 mg/kg)

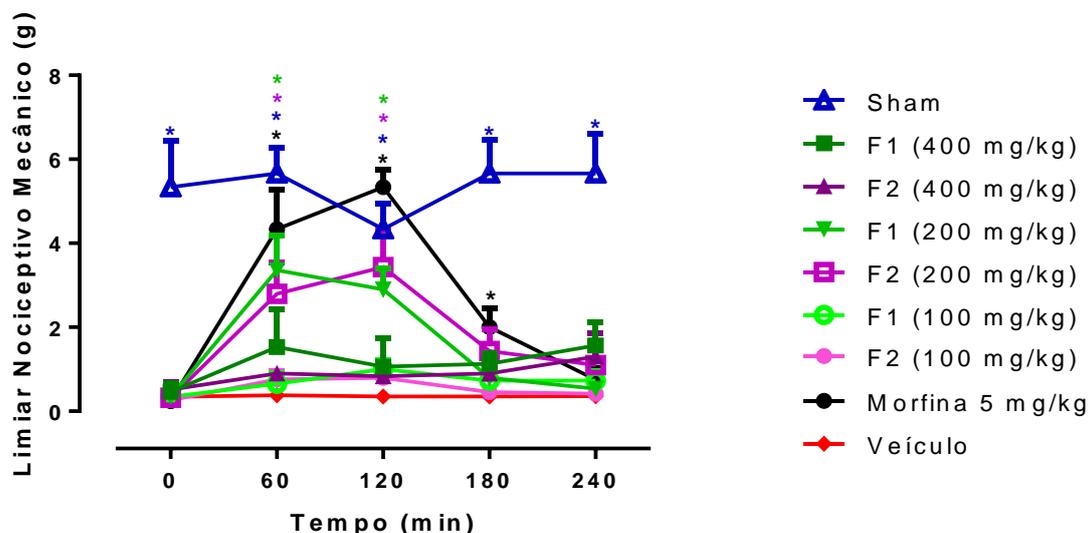


A: Pele exposta à F1; B: pele exposta à F2; C: pele exposta ao veículo. A epiderme (setas largas) é composta por 1 a 3 camadas de células epiteliais; folículos pilosos (setas finas); glândulas sebáceas (gs); derme (de); tecido subcutâneo (sc). Imagens com aumento de 10 \times .

3.3 Atividade antinociceptiva das formulações contendo γ -terpineno

Os dados da Figura 2 mostram o efeito das formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre a instalação da neuropatia por injúria nervosa, a fim de verificar se o monoterpene provoca efeito antinociceptivo em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial de nervo ciático.

Figura 2. Efeito do tratamento agudo com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do nervo ciático

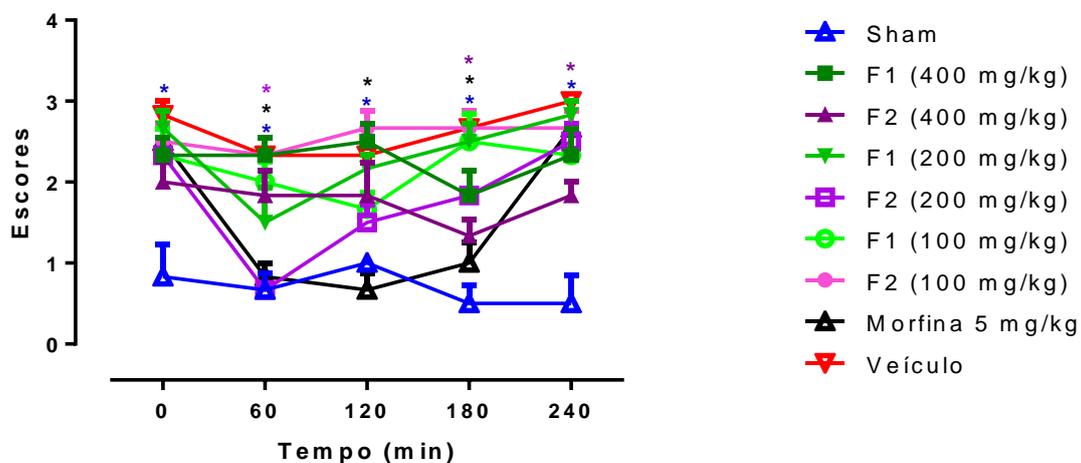


Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do limiar de retirada de pata de camundongos (25-35g, n=6) submetidos ao teste com filamentos de von Frey, tratados com formulações de γ -terpineno (F1 ou F2 100, 200 e 400 mg/kg, via transdérmica), veículo (via transdérmica) ou morfina (5 mg/kg, v.o.) (* $p < 0,05$ comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

Observa-se aumento significativo no limiar de retirada da pata na dose de 200 mg/kg das formulações F1 e F2, aos 60 e 120 min após a administração, evidenciando a ação antinociceptiva da formulação. O grupo de animais tratados com o veículo não apresentou aumento do limiar durante o tempo de avaliação e o grupo Sham permaneceu com o limiar elevado por toda a avaliação.

Além da avaliação por estímulo mecânico foi realizada a investigação da ação antinociceptiva das formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre os escores de sensibilidade térmica através do teste da acetona, como mostra a Figura 3.

Figura 3. Efeito do tratamento agudo com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o escore de sensibilidade térmica ao frio em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático.

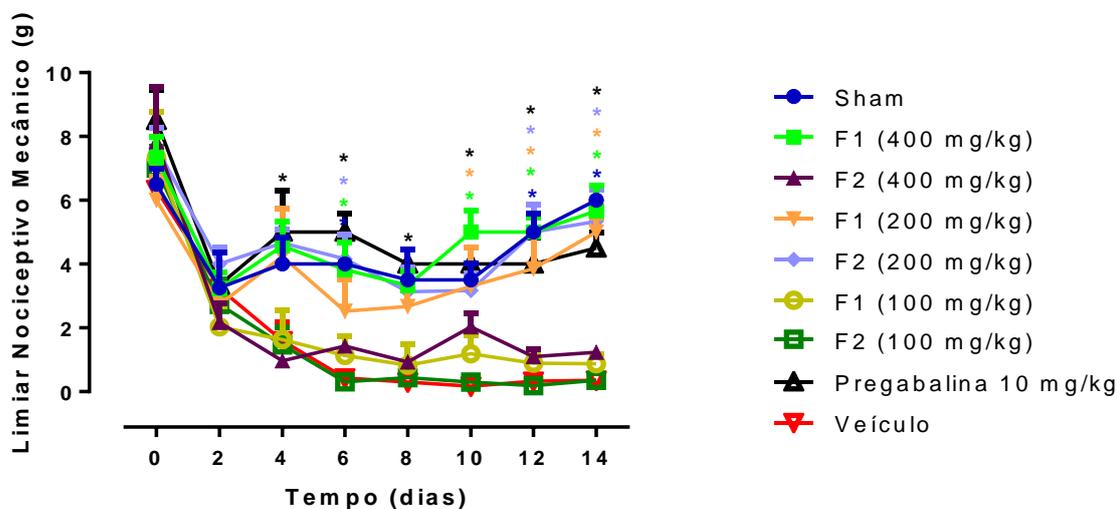


Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do escore de sensibilidade térmica ao frio por acetona nos animais (25-35g, n=6) submetidos ao teste com filamentos de von Frey, tratados com formulações de γ -terpineno (F1 ou F2 100, 200 e 400 mg/kg, via transdérmica), veículo (via transdérmica) ou morfina (5 mg/kg, v.o.) (* $p < 0,05$ comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

Os dados mostram que a formulação transdérmica de γ -terpineno F2 (200 mg/kg) foi efetiva no tempo de 60 min reduzindo significativamente a sensibilidade ao estímulo térmico, enquanto que a dose de 400 mg/kg só foi efetiva à partir de 180 min após o tratamento, e essa ação permaneceu até o final da avaliação.

Em animais submetidos ao tratamento sub-agudo, em protocolo de co-tratamento, ambas as formulações resultaram em aumento do limiar de retirada da pata a partir do 6º dia de avaliação, com excessão do 8º dia (**Figura 4**).

Figura 4. Efeito do tratamento sub-agudo (co-tratamento) com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do nervo ciático

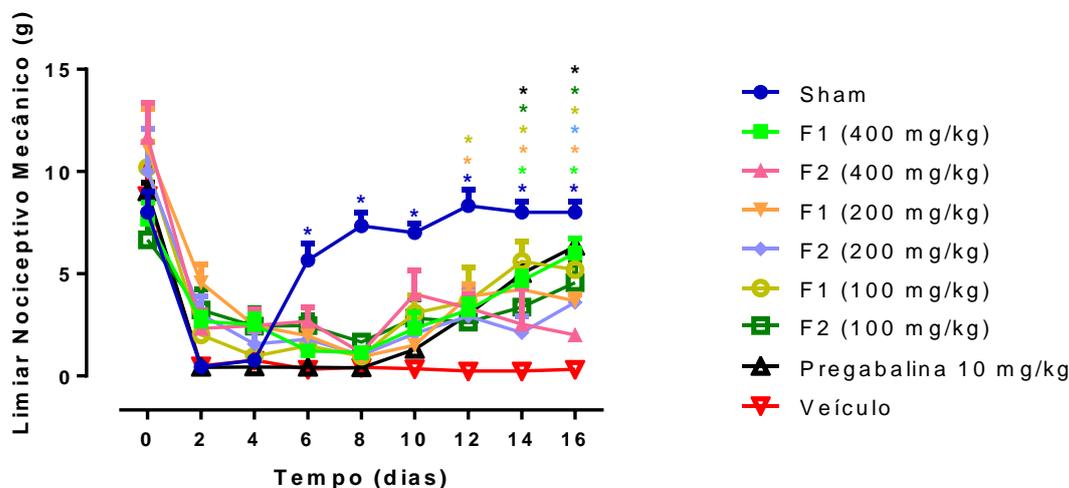


Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do limiar de retirada de pata de camundongos (25-35g, n=6) submetidos ao teste com filamentos de von Frey, tratados com formulações de γ -terpineno (F1 ou F2 100, 200 e 400 mg/kg, via transdérmica), veículo (via transdérmica) ou pregabalina (10 mg/kg, v.o.) (* $p < 0,05$ comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

As doses efetivas foram 200 mg/kg (F1 e F2) e 400 mg/kg (F2). Já na avaliação da sensibilidade ao frio, não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento (dados não apresentados).

A Figura 5 mostra o efeito do pós-tratamento sobre o limiar nociceptivo mecânico, o qual foi reduzido em animais tratados com as formulações F1 (100 e 200 mg/kg) a partir do 5º dia de tratamento, F1 (400 mg/kg) e F2 (100 mg/kg) a partir do 7º dia de tratamento e F2 (200 mg/kg) no último dia de tratamento.

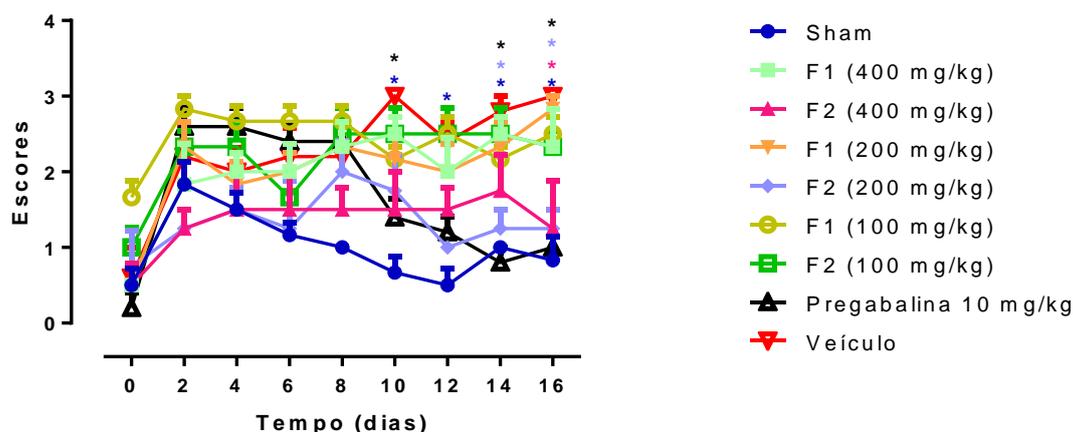
Figura 5. Efeito do tratamento sub-agudo (pós-tratamento) com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o limiar nociceptivo mecânico em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do nervo ciático



Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do limiar de retirada de pata de camundongos (25-35g, n=6) submetidos ao teste com filamentos de von Frey, tratados com formulações de γ -terpineno (F1 ou F2 100, 200 e 400 mg/kg, via transdérmica), veículo (via transdérmica) ou ou pregabalina (10 mg/kg, v.o.) (* $p<0,05$ comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

No que se refere à sensibilidade térmica ao frio, percebe-se aumento do escore em animais tratados com F2 (200 mg/kg) a partir do 7º dia de tratamento e F2 (400 mg/kg) no último dia de tratamento.

Figura 6. Efeito do tratamento sub-agudo (pós-tratamento) com formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre o escore de sensibilidade térmica ao frio em modelo de neuropatia induzida por compressão parcial do ciático

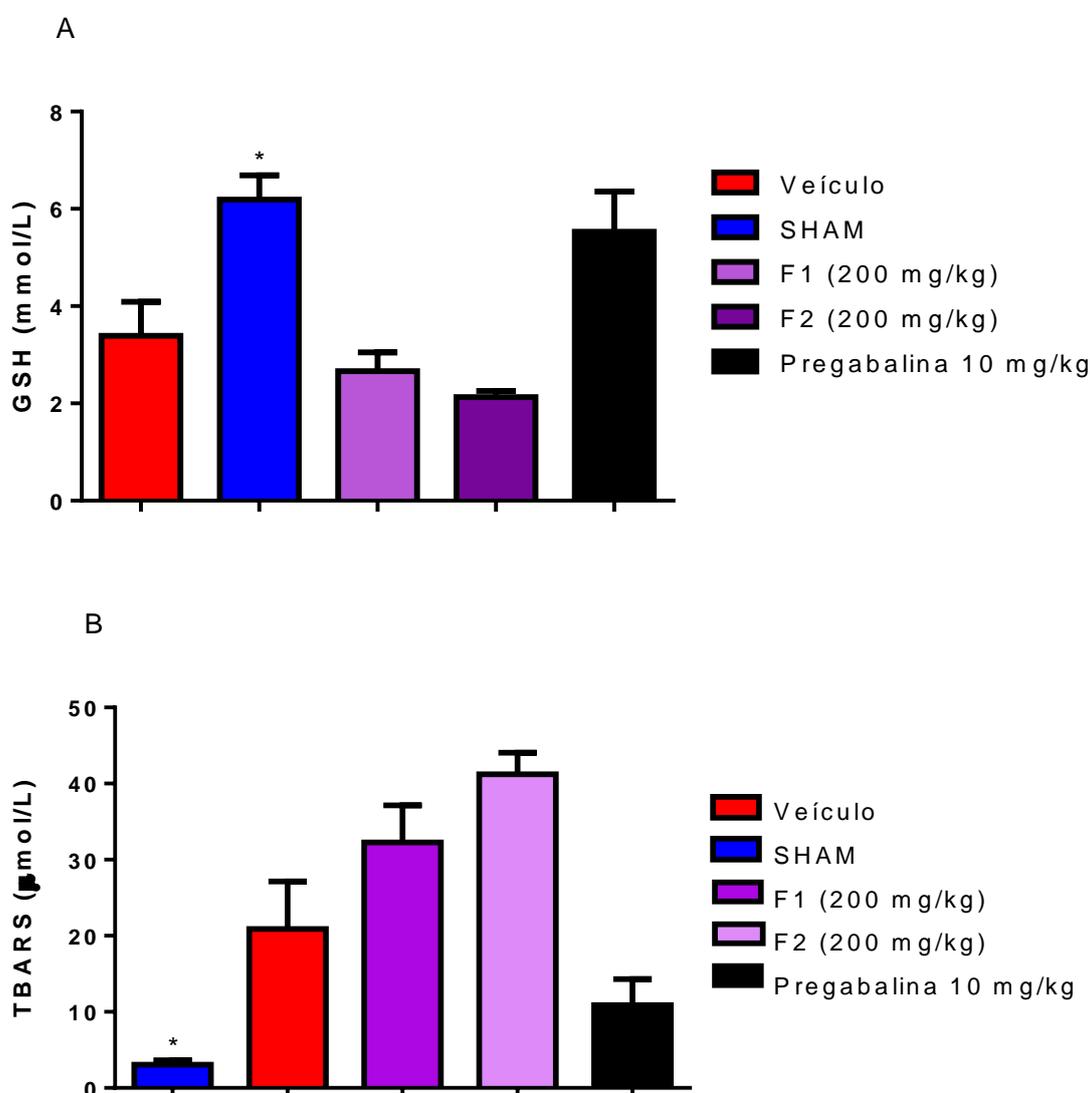


Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do escore de sensibilidade térmica ao frio por acetona nos animais (25-35g, n=6) submetidos ao teste com filamentos de von Frey, tratados com formulações de γ -terpineno (F1 ou F2 100, 200 e 400 mg/kg, via transdérmica), veículo (via transdérmica) ou ou pregabalina (10 mg/kg, v.o.) (* $p<0,05$ comparado com grupo veículo; ANOVA duas vias, Teste de Tukey).

3.4 Avaliação Antioxidante

A avaliação antioxidante foi realizada a partir do protocolo de pós-tratamento com a menor dose efetiva das formulações transdérmicas de γ -terpineno. Como mostra a figura 7, não foi observada diferença significativa quando os dois grupos referentes às formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno, bem como o grupo tratado com Pregabalina, foram comparados ao veículo.

Figura 7. Efeito antioxidante de formulações transdérmicas de γ -terpineno em soro sanguíneo de camundongos com neuropatia induzida por ligadura parcial do nervo ciático

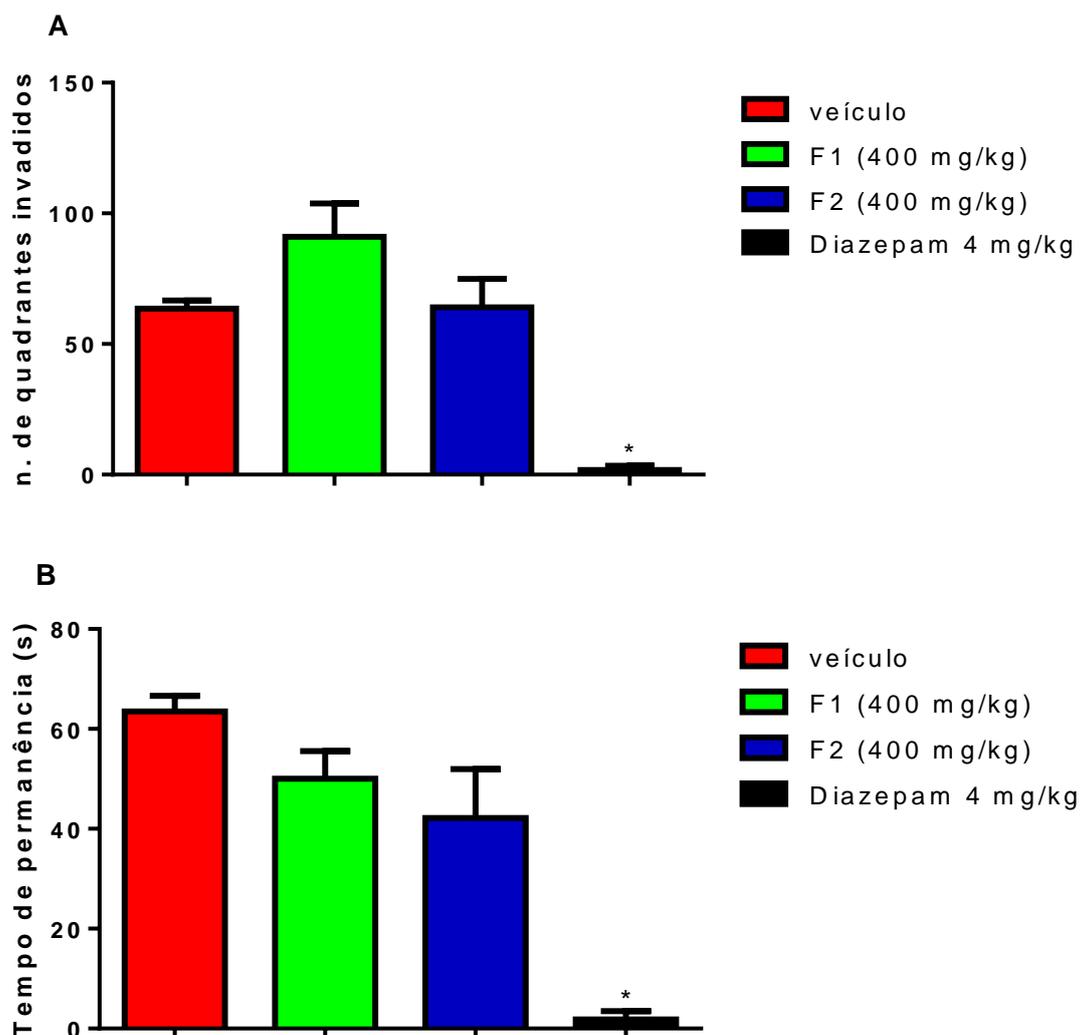


Os grupos de animais (n = 6) receberam as formulações contendo γ -terpineno (F1 e F2 200 mg/kg, transdérmico), veículo ou pregabalina (10mg/kg, v.o.). (A) concentração de glutathiona reduzida (GSH) e (B) concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)). Cada barra representa média \pm EPM (*p<0,05 comparado com o veículo; ANOVA uma via, Teste de Tukey).

3.5 Campo aberto e Rota rod

Para a realização dos testes do campo aberto e rota-rod, apresentados na Figura 8, foi escolhida a maior dose das formulações testadas nos ensaios comportamentais.

Figura 8. Efeito de formulações transdérmicas de γ -terpineno sobre a atividade locomotora e relaxante muscular



Os camundongos (25-35g, n=6) foram tratados com formulações transdérmicas de γ -terpineno (400 mg/kg, via transdérmica), veículo (veículo, via transdérmica) ou diazepam (agonista benzodiazepínico, 4 mg/kg i.p.). Teste do campo aberto com 30 min (A) e 60 min (B) de avaliação. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. do número de quadrantes invadidos. (***) $p < 0,001$ comparado com grupo veículo; ANOVA uma via, Teste de Tukey).

Os dados das figuras mostram que, na dose testada, as formulações transdérmicas de γ -terpineno não foram capazes de alterar a mobilidade dos animais, não apresentando atividade relaxante muscular, nem interferindo na atividade locomotora. Não houve diferença significativa na média de quadrantes invadidos pelos

animais tratados com as formulações (400 mg/kg) em relação ao controle negativo (veículo), de forma semelhante ao resultado do teste do rota-rod, onde as formulações também não alteraram o tempo de permanência dos animais na barra giratória. Em ambos os testes apenas o diazepam (4 mg/kg) alterou, significativamente ($p < 0,001$) os parâmetros observados.

4. DISCUSSÃO

Os sistemas microemulsionados tem se mostrado como alternativas promissoras para entrega sistêmica de fármacos, especialmente devido à sua capacidade de transportar substâncias em suas fases lipofílicas ou hidrofílicas (SILVA et al., 2008). Além disso, o aumento na concentração de soluto e a tendência do veículo para favorecer a divisão no estrato córneo tornam as microemulsões um veículo útil para aumentar a permeabilidade transdérmica das substâncias carregadas (SINTOV, 2015).

O uso de MEs como tratamento farmacológico de neuropatias pode se tornar uma alternativa biotecnológica por apresentarem-se como reservatórios capazes de liberar e direcionar os fármacos para tecidos e células específicas do organismo, proporcionando uma modificação na biodisponibilidade do fármaco e, conseqüentemente, a diminuição da toxicidade deste.

As MEs analisadas nesse estudo são do tipo óleo em água e permitiram uma boa permeação do γ -terpineno no estrato córneo com liberação controlada do monoterpene. Isso corrobora com o descrito por Alam et al. (2017), que recomenda a utilização de MEs do tipo óleo em água para uso por via tópica ou transdérmica.

Os constituintes utilizados na formulação microemulsionada permitem seu uso por via transdérmica. O miristato de isopropila é um tensoativo não iônico, comumente utilizado na administração transdérmica de fármacos como potenciador de penetração (OLIVEIRA et al., 2017; PINEROS et al., 2017). O tamanho em nanoescala das gotículas de microemulsões também torna esse sistema adequado para entrega transdérmica. De acordo com Sintov (2015), um dos fatores mediadores da permeação e retenção da pele é o tamanho da gotícula da microemulsão. As microemulsões analisadas no presente estudo apresentam tamanho entre 150 e 250 nm, o que favorece sua permeação através do estrato córneo.

As microemulsões óleo-em-água e água-em-óleo são bem adequadas para administração de fármacos lipofílicos e hidrofílicos, respectivamente. A simplicidade

dos componentes que compreendem sistemas microemulsionados torna-os adequados para administração de fármacos pela via transdérmica, de forma que os tensoativos e os componentes da fase oleosa estão prontamente disponíveis e são, na maioria das vezes, econômicos para fins de formulação (CALLENDER et al., 2017).

A função protetora da pele se fundamenta na forma estrutural do estrato córneo, que consiste em corneócitos embebidos em uma matriz lipídica (VAN-SMEDEN et al., 2014). A utilização de microemulsão por via transdérmica tem alta capacidade de carga, boa estabilidade termodinâmica, podendo aumentar o gradiente de concentração e a atividade termodinâmica do fármaco devido a sua alta capacidade de solubilização e pode superar a barreira difusional do estrato córneo da pele devido à presença de uma camada de tensoativo em sua composição que favorece a partição do fármaco na pele e aumenta sua permeação (SAHLE; WOHLRAB; NEUBERT, 2014).

O tratamento abrangente da dor é multidimensional, com a farmacoterapia desempenhando um papel fundamental. Uma terapia eficaz para a dor depende da intensidade e do tipo de dor, da idade dos pacientes, das comorbidades e da escolha apropriada do analgésico, sua dose e via de administração. A via transdérmica fornece um longo período de analgesia devido à possibilidade de liberação controlada, além de se tornar mais conveniente, especialmente para pacientes que não podem tomar medicamentos por via oral (LEPPERT et al., 2018). Os sistemas de administração transdérmica aumentam a adesão ao tratamento visto que muitas vezes reduzem os efeitos colaterais por diminuírem a quantidade de fármaco utilizado (PERGOLIZZI JR. et al., 2015).

Nesse estudo foi observada boa efetividade do γ -terpineno no tratamento da dor crônica no modelo de neuropatia por injúria nervosa ao aumentar o limiar nociceptivo mecânico e reduzir a sensibilidade térmica, evidenciando atividade antinociceptiva. Esses resultados comprovam o que foi evidenciado por Passos et al., (2015) que demonstrou atividade antinociceptiva desse monoterpene em diferentes modelos de nociceção química após administração oral em modelos de dor aguda, através da participação do sistema opióide via canais K^+ _{ATP} e sistema colinérgico.

A dor crônica pode estar associada à processos de estresse oxidativo identificados pelo aumento dos níveis de MDA e diminuição dos níveis de CAT, SOD e GSH no soro. Níveis aumentados de MDA indicam aumento da peroxidação lipídica, que pode causar falha dos mecanismos de defesa antioxidante (GSH, SOD e CAT) em eliminar radicais livres excessivos (DEMIR et al., 2018; ZHOU et al., 2015). Assim, os

resultados desse estudo sugerem uma ligação entre a dor neuropática e aumento da produção de radicais livres. Percebe-se que a ação antinociceptiva das formulações transdérmicas de γ -terpineno não interferiu em níveis de MDA e GSH em animais submetidos à constrição crônica do nervo ciático. Assim, novas investigações são necessárias com a finalidade de verificar se doses maiores do monoterpene são capazes de interferir na ação de GSH e TBARS, bem como, investigar a existência de ação antioxidante com outras espécies reativas de oxigênio e seus subprodutos.

Em relação à toxicidade o γ -terpineno, a dose de 2000 mg/kg não provocou alterações comportamentais, bem como não demonstra sinais nocivos ao organismo quando administrado por via oral (PASSOS et al., 2015). De forma semelhante, a administração transdérmica se mostrou bastante segura por não alterar esses parâmetros, e não provocar hipo ou hipertrofia dos órgãos internos, danos hepáticos ou renais.

Da mesma forma, as imagens histológicas apresentadas nesse estudo não demonstram sinais de toxicidade das formulações microemulsionadas em análise. Entretanto, alterações morfológicas na estrutura do folículo piloso observadas em animais tratados com as formulações contendo γ -terpineno sugerem a via folicular como via de penetração nas microemulsões. Esses achados corroboram com Fang et al. (2014) que descrevem as vantagens da permeação folicular incluindo melhor biodisponibilidade da substância carregada através de vias de administração dérmica e transdérmica, maior profundidade de penetração e duração prolongada do armazenamento, o que facilita a liberação controlada do princípio ativo.

De acordo com Abdel-Hafez, Hathout e Sammour (2018) a via folicular parece ser a via de penetração chave para sistemas nanoparticulados de liberação de fármacos. Os mesmos autores evidenciaram a via folicular como rota de permeação de um sistema de nanopartículas carreadoras de curcumina, um metabólito secundário vegetal.

O mecanismo de ação pelo qual o γ -terpineno contribui para a redução da sintomatologia da dor neuropática ainda carece de investigações mais amplas. Todavia essa ação terapêutica pode estar associada a mecanismos semelhantes aos descritos na literatura para dor aguda. Estudos futuros ainda são necessários a fim de elucidar a atuação do monoterpene frente à neuropatia.

5. CONCLUSÃO

Esse estudo permite concluir que formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno apresentam pronunciada atividade antinociceptiva, sugerindo efeito terapêutico com administrações agudas e sub-agudas. Esse efeito não foi acompanhado de redução da atividade locomotora dos animais, nem de toxicidade sistêmica. Assim, caso esta tendência venha a ser concretizada em estudos clínicos, formulações transdérmicas desse monoterpene podem otimizar o tratamento da dor neuropática, além de reduzir limitações existentes em outras vias de administração.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFEZ, S.M.; HATHOUT, R.M.; SAMMOUR, O.A. Tracking the transdermal penetration pathways of optimized curcumin-loaded chitosan nanoparticles via confocal laser scanning microscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, 753–764, 2018.

ALAM, M.A.; AL-JANOobi, F.I.; ALZHRANI, K.A.; AL-AGAMY, M.H.; ABDEL-GALIL, A.A.; AL-MOHIZEA, A.M. In-vitro efficacies of topical microemulsions of clotrimazole and ketoconazole; and in-vivo performance of clotrimazole microemulsion. **Journal of Drug Delivery Science and Technology** v. 39, p. 408e416, 2017.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–35, maio 1973.

BAJAJ, S.; WHITEMAN, A.; BRANDNER, B. Transdermal drug delivery in pain management, **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, v. 11, n. 2, p. 39-43, 2011.

BLOND, S.; MERTENS, P.; DAVID, R.; ROULAUD, M.; RIGOARD, P. From “mechanical” to “neuropathic” back pain concept in FBSS patients. A systematic review based on factors leading to the chronification of pain (part C). **Neurochirurgie**, v.61, S45–S56, 2015.

BRAS, C.; GUMILAR, F.; GANDINI, N.; MINETTI, A.; FERRERO, A. Evaluation of the acute dermal exposure of the ethanolic and hexanic extracts from leaves of *Schinus molle* var. *areira* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 137, p. 1450–1456, 2017.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA 5. ed. v. 1 -- Brasília: ANVISA, 2010.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. **British Journal of Psychology** (London, England: 1953), v. 48, n. 1, p. 1–12, fev. 1957.

CALLENDER, S.P.; MATHEWS, J.A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S.D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, p. 425–442, 2017.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.

DEMIR, C.Y.; KOCAK, O.F.; BOZAN, N.; ERSOZ, M.E.; DEMIR, H. Is There a Role for Oxidative Stress in Temporomandibular Joint Disorders? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 76, p. 515-520, 2018.

FANG, C.L.; ALJUFFALI, I.A.; LI, Y.C.; FANG, J.Y. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. **Therapeutic delivery**, v.5, p.991–1006, 2014.

FLATTERS, S.J.L.; BENNETT G.J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 109, p.150-61, 2004.

GUIMARÃES, G.P; REIS, M.Y.F.A.; SILVA, D.T.C.; MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B.; CONVERTI, A.; PESSOA-JÚNIOR, A.; DAMASCENO, B.P.C.L.; SILVA, J.A. Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 545-550.

KAUR, G.; MEHTA, S.K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics** v. 529, p. 134–160, 2017.

LAPA, J.A.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.93, p. 64-66, 2003.

LEPPERT, W. et al. Transdermal and Topical Drug Administration in the Treatment of Pain. **Molecules**. v. 17;23, n. 3, 2018.

MISERA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for SOD. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

OECD, 1987. Test No. 402: **Acute Dermal Toxicity**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. OECD Publishing.

OLIVEIRA, J.S.L.; LANGE, S.; DOBNER, B.; BREZESINSKI, G. Analytical data of synthesized deuterated isopropyl myristate and data about the influence of IPM/IPMdeut on the thermodynamics and morphology of 2D Stratum Corneum models. **Data in Brief**, v. 12, p. 624–631, 2017.

PAPADA, E. et al. Bioavailability of Terpenes and Postprandial Effect on Human Antioxidant Potential. An Open-Label Study in Healthy Subjects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n.3, 2018.

PASSOS, F.F.B.; LOPES, E.M.; ARAÚJO, J.M.; SOUSA, D.P.; VERAS, L.M.C.; LEITE, J.R.S.A.; ALMEIDA, F.R.C. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, Article ID 829414, 9 pages, 2015.

PERGOLIZZI JUNIOR, et al. The unique role of transdermal buprenorphine in the global chronic pain epidemic, **Acta Anaesthesiologica Taiwanica**, v. 53, n. 2, p. 71-76, 2015.

PINEROS, I.; SLOWING, K.; SERRANO, D.R.; PABLO, E.; BALLESTEROS, M.P. Analgesic and anti-inflammatory controlled-released injectable microemulsion: pseudo-ternary phase diagrams, in vitro, ex vivo and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 101, p. 220–227, 2017.

SAHLE, F.F.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R.H.H. Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsion and formulation associated toxicity studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 86, p. 244–250, 2014.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205–18, nov. 1990.

SINTOV, A.C. Transdermal delivery of curcumin via microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 481, n. 1–2, p. 97-103, 2015.

SLATER T.F., SAWYER B.C. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other alogenoalkanes or peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. **Biochemical Journal**, v. 123, p. 805–814, 1971.

VAN-SMEDEN, J.; JANSSENS, M.; GOORIS, G.S.; BOUWSTRA, J.A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1841, p. 295–313, 2014.

YAN, Y.Y.; LI, C.Y.; ZHOU, L.; AO, L.Y.; FANG, W.R.; LI, Y.M. Research progress of mechanisms and drug therapy for neuropathic pain. **Life Sciences** v. 190, p. 68–77, 2017.

ZHOU, D.; WANG, W.; CHENG, X.; WEI, J.; ZHENG, S. Antioxidant therapy for patients with chronic pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 34, p. 627 - 634, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, é possível fazermos as seguintes considerações:

- A revisão de literatura realizada para esse estudo mostra o monoterpeneo γ -terpineno como uma substância favorável para o tratamento de dor neuropática, bem como para sua inclusão em formulações transdérmicas microemulsionadas.
- O estado da arte referente ao desenvolvimento e uso de microemulsões para o tratamento da dor aponta esse tipo de sistema de liberação de fármacos como uma ferramenta biotecnológica promissora que pode carrear substâncias lipofílicas e hidrofílicas por várias vias de administração, inclusive a via transdérmica.
- A partir da construção de um diagrama de fases pseudo-ternário foram obtidas quinze formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno, das quais duas foram analisadas e bem sucedidas quanto à caracterização físico-química, estabilidade preliminar, cinética de liberação e estabilidade preliminar.
- Microemulsões contendo γ -terpineno, administradas por via transdérmica, promoveram efeito antinociceptivo quando avaliado em modelo de dor neuropática induzida por constrição parcial do nervo ciático, em administrações agudas e sub-agudas, 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.
- Mais estudos ainda são necessários, a fim de compreender os mecanismos de ação dessa molécula promissora no tratamento da dor neuropática, bem como novas tecnologias podem ser incorporadas com o objetivo de aumentar a efetividade γ -terpineno.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Para consolidação da confirmação do efeito farmacológico de formulações microemulsionadas contendo γ -terpineno como princípio ativo para o tratamento de dor neuropática prospecta-se para trabalhos posteriores:

- ✓ Avaliar os mecanismos de ação das microemulsões de γ -terpineno através da quantificação de interleucinas no plasma sanguíneo de animais com neuropatia dolorosa.
- ✓ Identificar os possíveis mecanismos de regeneração tecidual induzida pela ação das microemulsões de γ -terpineno através da expressão de marcadores de reconstrução de bainha de mielina e aqueles relacionados à diferenciação e maturação glial, em células de Schwann.
- ✓ Avaliar o efeito analgésico das formulações microemulsionadas de γ -terpineno em estudos clínicos de dor neuropática induzida por lesão do nervo;

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Patente em processo



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de MARLUCE PEREIRA DAMASCENO LIMA– Doutoranda (nome e qualificação do (a) Requerente), que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 27/02/2018, cujo título denomina-se “**MICROEMULSÕES TRANSDÉRMICAS CONTENDO γ -TERPINENO PARA TRATAMENTO DE DOR NEUROPÁTICA**”, do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 02/03/2018.

Profª. Drª. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

APÊNDICE 2 – Artigo Aceito



Journal
Expert Opinion on Therapeutic Patents >
Volume 28, 2018 - Issue 9

Enter keywords, authors, DOI etc.

3
Views

0
CrossRef citations
to date

0
Altmetric

Review

Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review

Marluce Pereira Damasceno Lima, Everton Moraes Lopes, Laércio da Silva Gomes, Ana Rita de Sousa França, Boris Timah Acha, André Luis Menezes Carvalho & ...show all

Pages 691-702 | Received 16 Jul 2018, Accepted 30 Aug 2018, Accepted author version posted online: 02 Sep 2018, Published online: 14 Sep 2018

[Download citation](#) <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1519025> [Check for updates](#)

[Full Article](#) [Figures & data](#) [References](#) [Citations](#) [Metrics](#) [Reprints & Permissions](#) [Get access](#)

APÊNDICE 3 – Artigo Submetido

02/10/2018

Elsevier Editorial System™

European Journal of
PHARMACEUTICAL SCIENCES

Contact us 
Help ?

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: ferecal@ufpi.edu.br
Switch To: Go
to: [My EES Hub](#)

Version:
EES
2018.9

Author's Decision

Thank you for approving "DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF TRANSDERMIC MICROEMULSIONS CONTAINING γ -TERPINENE". An email has been sent to you confirming that the journal has received this submission. Your Co-Author(s) may also receive this email, depending on the journal policy.



Mendeley

To keep track of how your article is performing
[get your Author stats on Mendeley](#)

[Main Menu](#)

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [About Us](#)

Copyright © 2018 [Elsevier B.V.](#) All rights reserved.
Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.