

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE EMULGEIS DE LIMONENO VISANDO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS

Gabriel de Souza Mussato (PIBIC/CNPq), Jéssica Bassi da Silva (Coorientadora) e Vagner Roberto Batistela (Orientador). E-mail: vrbatistela@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Maringá, PR.

**Ciências da Saúde: Farmácia/Farmacotécnica.**

**Palavras-chave:** inflamação; emulgel; limoneno.

### RESUMO

O monoterpeno *d*-limoneno (LIM) possui eficácia anti-inflamatória, conforme estudos recentes. No entanto, seu uso em formulações tópicas ainda é limitado. Assim, estudou-se um conjunto de emulgeis de uso tópico contendo LIM para a escolha daquele com as melhores propriedades físico-químicas, bem como sua avaliação em modelo animal. Inicialmente, preparou-se formulações contendo diferentes composições de Pluronic® F-127, Carbopol® C940, água deionizada e LIM. Escolheu-se o emulgel mais estável em estudos de variação de temperatura e agitação, sendo denominado de EMG-LIM. Este foi caracterizado texturalmente, nas temperaturas de 5, 25 e 34 °C e reologicamente, por reologia contínua e oscilatória a 5 e 34 °C. Após, realizou-se ensaios de irritabilidade e de efeito anti-inflamatório tópico em orelha em camundongos macho *Swiss*, que receberam aplicações de veículo, LIM, óleo de cróton (OC), dexametasona (DEX) e EMG-LIM. Também, foi analisada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A caracterização do EMG-LIM resultou que a formulação tem comportamento pseudoplástico e termorresponsiva. Pelas análises *in vivo* e enzimáticas, o EMG-LIM apresentou atividade anti-edematogênica, sem promover irritabilidade tópica, além de reduzir atividade de MPO, indicando redução da migração de neutrófilos nos tecidos previamente inflamados. Com esses resultados, o EMG-LIM demonstra-se promissor para o tratamento de lesões cutâneas relacionadas a processos inflamatórios.

### INTRODUÇÃO

Dentre os monoterpenos mais estudados encontra-se o *d*-limoneno (LIM) devido a sua ampla gama de aplicações com potencial terapêutico, incluindo efeitos antioxidantes e potenciais anti-carcinogênicos e, também, anti-inflamatórios (Tafti et al., 2025). Para uso tópico, o terpeno pode ser incorporado na forma de emulgeis, sistemas de formulação que combinam aspectos tanto de emulsões quanto geis (Mali et al., 2025). Essa forma farmacêutica possui, dentre outros fatores, fácil espalhabilidade, tornando-o mais aceitável para o paciente, além de poder carrear tanto ativos lipofílicos quanto hidrofílicos (Mali et al., 2025). Emulgeis do copolímero

Pluronic® F-127 proporcionam à formação de micelas que aprimoram as formulações por aprisionar o princípio ativo em seu interior, além de otimizar a penetração de fármacos no tecido alvo (Huang et al., 2024). Por isso, objetivou-se o desenvolvimento de um emulgel estável de Pluronic® F-127 contendo LIM, caracterizá-lo quanto à textura e reologia e avaliar sua atividade anti-inflamatória por meio de ensaios *in vivo* em camundongos *Swiss* e métodos enzimáticos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para o preparo dos emulgeis utilizou-se o terpeno *d*-limoneno (Quinari, LIM7A2C, pureza: 96,9%, densidade a 20 °C = 0.841), o surfactante Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich, P2443, F-127), o agente espessante Carbopol® C940, Trietanolamina (TEA) para controle de pH e água deionizada. Para os ensaios *in vivo* utilizou-se como droga de referência a dexametasona (DEX) e o óleo de cróton (OC, Sigma-Aldrich, C6719) como agente flogístico. Analisou-se emulgeis contendo diferentes concentrações de Carbopol® C940, bem como particularidades no modo de incorporação dos componentes. Inicialmente, avaliou-se possíveis separações visuais de fase após 24 h do preparo de cada emulgel. Em seguida, verificou-se a estabilidade dos emulgeis com base no recomendado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004), com algumas adaptações. O estudo foi realizado com teste de estabilidade preliminar em centrífuga (3000 rpm, 30 min.), à 5 e 23 °C, e com teste de ciclo gelo-degelo de 12 dias, em que as formulações, a cada 24 h, eram submetidas a duas temperaturas diferentes (23 e -18 °C). A formulação mais estável denominada de EMG-LIM teve parâmetros de textura caracterizados com o texturômetro TA-XTplus da Stable Micro Systems®, a 5, 25 e 34 °C. As propriedades de dureza, compressibilidade, coesividade, adesividade e elasticidade foram analisadas com o auxílio do software Expoent versão 6.2 (Stable Micro Systems®). O comportamento reológico foi estudado por meio do reômetro MARS II (Thermo-Haake, Thermo Fisher Scientific®) em reologia contínua e oscilatória nas temperaturas de 5 e 34 °C. O software RheoWin 4.10 (Haake®) foi utilizado a fim de determinar propriedades reológicas dinâmicas, módulo elástico ( $G'$ ) e módulo viscoso ( $G''$ ). Em ensaios *in vivo*, foram necessários camundongos machos *Swiss* (CEUA nº 6449120923), que foram mantidos sob regime *ad libitum*, em condições de umidade (40–60%) e temperatura (22 °C  $\pm$  2 °C) controladas, com ciclo de claro/escuro de 12h/12h. Estes foram divididos em grupos (n= 3-7) recebendo aplicações diferentes, sendo "veículo" (acetona/água), "OC" (óleo de cróton, 10 mg/mL), "LIM" (terpeno puro, para irritabilidade, a 0,1 e 1,0 mg/orelha), "DEX" (dexametasona, 5 mg/mL) e "EMG-LIM" (o emulgel mais estável), em duas doses de 10 e 20 mg/orelha. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e, então, discos de orelha de 6,0 mm de diâmetro foram seccionados para aferição de massa em balança analítica. Para edema, o agente inflamatório (OC) foi aplicado nas orelhas dos camundongos previamente ao tratamento proposto para cada grupo. Por fim,

após 6 h, as secções auriculares de edema foram pesadas e, posteriormente mantidas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) adaptando a técnica proposta por Bradley et al. (1982). Todos os resultados *in vivo* foram analisados por testes de Grubbs (para remoção de outliers, a 95% de confiança), seguido de ANOVA e pós teste-Tukey, com o software JASP. Os resultados foram expressos em termos de média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em análise de textura, a formulação EMG-LIM apresentou aumento de dureza e compressibilidade conforme o aumento de temperatura, indicando termorresponsividade regida pelo Pluronic® F-127. Os fatores de coesividade e adesividade aumentaram significativamente quando relacionados às duas maiores temperaturas, indicando um amplo benefício para uma formulação tópica (Fernandes et al., 2022). Quando se compara a adição do terpeno ao excipiente, nota-se que a presença de LIM alterou os valores de compressibilidade, dureza, adesividade e coesividade ( $p < 0.05$ ). Os parâmetros de elasticidade não foram alterados significativamente em nenhum dos casos ( $p > 0.05$ ). As propriedades reológicas demonstraram termorresponsividade do EMG-LIM, devido ao aumento de sua viscosidade (em testes de reologia oscilatória), sob a mesma tensão de cisalhamento (1 Pa). Em reologia contínua, observou-se um comportamento pseudoplástico. Além disso, a formulação apresentou comportamento viscoelástico. Nos ensaios *in vivo*, não foram verificadas evidências de que o EMG-LIM (20 mg/orelha) apresenta ação irritativa, em comparação aos grupos controles. Para estudos em edema de orelha, a maior dose da formulação (20 mg/orelha) proporcionou resultados estatisticamente equivalentes ao grupo DEX ( $p < 0.05$ ), sugerindo que o EMG-LIM possui resultado anti-edematogênico semelhante ao promovido pelo fármaco de referência, nas condições avaliadas. O EMG-LIM (10 mg/orelha) também apresenta tal efeito, porém reduzindo o edema menos intensamente. Em concomitância, o LIM apresentou efeitos anti-inflamatórios, porém bem menos expressivos quando comparado às duas doses testadas do EMG-LIM. Deste modo, percebeu-se que as formulações termoresponsivas micelares de Pluronic® F-127 aumentam a biodisponibilidade do fármaco para aplicação tópica, permitindo o potencial terapêutico. A atividade de MPO demonstrou que os grupos EMG-LIM, em ambas as doses, não diferenciaram do grupo veículo, sugerindo a redução da inflamação em nível celular por estar relacionado à imigração de neutrófilos ao tecido doente (Bradley et al., 1982).

## CONCLUSÕES

O EMG-LIM apresenta estabilidade e possui características texturais e reológicas importantes para aplicação tópica. Os ensaios *in vivo* e enzimáticos demonstraram que o EMG-LIM não é irritativo e exerce efeitos anti-inflamatórios tópico. Deste modo, a formulação apresentou resultados promissores, sugerindo potencial para

novos estudos visando o desenvolvimento de medicamentos tópicos para inflamação.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FAAPR), à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao COMCAP-UEM (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da UEM).

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf/view>. Acesso em: 28 ago.2025.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.

FERNANDES, A. *et al.* The influence of different bioadhesive polymers on physicochemical properties of thermoresponsive emulgels containing Amazonian andiroba oil. **Journal of Molecular Liquids**, v. 365, nov. 2022, 120102.

HUANG, L. *et al.* Novel nano-drug delivery system for natural products and their application. **Pharmacological Research**, v. 201, mar. 2024, 107100.

MALI, A. J. *et al.* Development of novel emulgel comprising quercetin-loaded transferosomes and thuja oil for enhanced anti-inflammatory efficacy. **Next Nanotechnology**, v. 8, jan. 2025, 100246.

TAFT, R. D. *et al.* Investigation of the healing effects of D-limonene on ovarian ischemia and reperfusion injury. **Tissue and Cell**, v. 95, ago. 2025, 102912.