



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

ADALÚCIA CORREIA DE OLIVEIRA

EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO GEL CONTENDO
LIPOSSOMAS COM CARVACROL SOBRE A
NOCICEPÇÃO OROFACIAL EM CAMUNDONGOS

ARACAJU

2013

ADALÚCIA CORREIA DE OLIVEIRA

**EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO GEL
CONTENDO LIPOSSOMAS COM CARVACROL
SOBRE A NOCICEPÇÃO OROFACIAL EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim

ARACAJU

2013

Ficha Catalográfica Elaborada pelo
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Sergipe

O48e Oliveira, Adalúcia Correia de
 Efeito da aplicação tópica do gel contendo
 lipossomas com carvacrol sobre a nocicepção
 orofacial em camundongos / Adalúcia Correia de
 Oliveira; orientador Leonardo Rigoldi Bonjardim. --
 Aracaju, 2013.
 000 f. : il.

 Dissertação (Mestrado - Ciências da Saúde -
 Núcleo de Pós-Graduação em Medicina) -
 Universidade Federal de Sergipe, 2013.

 1. Carvacrol - Medicamentos - Administração. 2.
 Dor orofacial. 3. Lipossomas. 4. Odontologia. 5.
 Farmacologia. I. Bonjardim, Leonardo Rigoldi, orient.
 II. Título.

CDU 615.454.1:635.71

AGRADECIMENTOS

Ao meu **orientador Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim**, pela confiança e pela paciência que teve com todas as intercorrências que ocorreram na minha vida durante esse dois anos e meio dedicados ao mestrado.

Ao **Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior**, por abrir as portas do LAPEC viabilizando a realização dos meus experimentos.

Ao **Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo**, por todas as contribuições dadas para este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo** por sua participação desde a escolha do tema até a finalização deste trabalho com observações e colocações que o engrandeceram.

Agradeço também, de uma forma geral, a todos **amigos** que conheci durante o mestrado, que me ajudaram, cada um de uma forma, a chegar até aqui. Em especial a **Mônica Santos de Melo, Makson Gleydson Brito de Oliveira, Adriana Gibara Guimarães, Jullyana de Souza Siqueira Quintans, Amanda Batista, Priscila Santos, Marília Trindade Santana, Douglas Prado, Renan Guedes, Paula Passos, Natália Barreto, Loren Andrade e Jonnielly Costa**, obrigada pela ajuda fundamental de vocês!

Agradeço, de uma forma geral, a todos os **professores** do curso de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe (**UFS**) por todos os ensinamentos passados durante este curso.

Aos **meus pais, Edênia e Antônio**, pelo amor incondicional e apoio em todas as horas que precisei largar tudo para estudar.

À minha **irmã Ana Cláudia**, agradeço por tudo que você já fez e continua fazendo por mim.

Às minhas cunhadas **Lily, Alana, Sylvana e Yvana** e sobrinhos **Caio, Cecília e Dudinha** por todo o apoio e companhia que deram a minha filha quando precisei me ausentar.

Agradeço ao meu príncipe, melhor amigo e marido, **José Luiz**, por todo companheirismo e paciência durante todos estes anos juntos. Obrigada por te ter todos os dias do meu lado acordando e dormindo lado a lado e me apoiando em todas as escolhas.

Por fim, agradeço a minha princesinha **Júlia** por encher a casa de alegria todos os dias e por ter ido para a casa da vovó em todos os momentos em que precisei me ausentar para a conclusão desse trabalho. Mamãe te ama!

Obrigada a todos!

RESUMO

OLIVEIRA, A.C. **Efeito da aplicação tópica do gel contendo lipossomas com carvacrol sobre a nocicepção orofacial em camundongos**, Núcleo de pós-graduação em Medicina da UFS, Aracaju, 2013, 61 p.

A dor orofacial, embora seja um problema que prejudica a qualidade de vida de milhões de pessoas, ainda é pouco compreendida e, conseqüentemente, seu tratamento é de difícil prognóstico. Este tratamento normalmente envolve farmacoterapia sistêmica que, na maioria das vezes, vem acompanhada de diversos efeitos colaterais. Desta forma, o presente estudo visou avaliar farmacologicamente o efeito da aplicação tópica de um gel contendo lipossomas com carvacrol sobre a nocicepção orofacial induzida em camundongos. Primeiramente, foi realizado o teste de nocicepção orofacial induzido pela administração de formalina 2% em lábio superior de camundongos e em seguida este tecido foi removido para a mensuração da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). No teste acima descrito, a aplicação do gel de carbopol (grupo controle), ou gel contendo lipossomas com carvacrol (1% e 5%) foram realizados 1 h antes da indução da nocicepção orofacial; a droga referência (diclofenaco dietilamônio na forma farmacêutica de gel) foi aplicada 2 h antes da indução da nocicepção. Foi observado que, na concentração de 1%, o gel contendo lipossomas com carvacrol reduziu o comportamento nociceptivo de coçar a região orofacial ($34,4 \pm 4,6$ s, $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($74,1 \pm 4,6$ s, $p < 0,05$) sendo equivalente à redução observada no grupo em que foi utilizada a droga de referência (diclofenaco dietilamônio gel - $34,0 \pm 7,3$ s, $p < 0,05$). O gel de carvacrol a 1% também foi capaz de reduzir a atividade da enzima MPO ($0,7 \pm 0,1$ UMPO / mg de tecido, $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($2,0 \pm 0,3$ UMPO / mg de tecido, $p < 0,05$) e se comportou de forma semelhante ao grupo do diclofenaco dietilamonio gel ($0,5 \pm 0,2$ UMPO / mg de tecido, $p < 0,05$). Dessa forma, conclui-se que o gel contendo lipossomas com carvacrol na concentração de 1% foi eficaz no controle da nocicepção induzida por formalina e teve importante efeito sobre a migração celular, sugerindo que em baixas concentrações o gel contendo lipossomas com carvacrol tem um efeito tópico na terapia de processos dolorosos associados à região orofacial. No entanto, não foram observados tais fenômenos na concentração de 5%.

Descritores: nocicepção orofacial; lipossomas; tratamento farmacológico; via de administração tópica; carvacrol.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A.C. **Effect of topical application of the gel containing liposomes carvacrol on nociception in mice orofacial**, Núcleo de pós-graduação em Medicina da UFS, Aracaju, 2013, 61p.

Orofacial pain, although it is a problem that affects the quality of life of millions of people, is still poorly understood and, consequently, its treatment are difficult to predict. This treatment usually involves systemic pharmacotherapy, in most cases, it is accompanied by various side effects. Thus, the present study aimed to evaluate the pharmacological effect of topical application of a gel containing carvacrol on liposomes induced orofacial nociception in mice. First, we performed the test orofacial nociception induced by administration of 2% formalin into the upper lip of mice and then this tissue was removed for measuring the activity of myeloperoxidase (MPO). In the test described above, applying the carbopol gel (control group) or gel with liposomes containing carvacrol (1% and 5%) were performed 1 h before the induction of nociceptive orofacial; reference drug (diclofenac diethylammonium in gel form) was administered 2 hours before the induction of nociception. It was observed that at a concentration of 1%, the gel containing liposomes with carvacrol reduced the nociceptive behavior of scratching the orofacial region (34.4 ± 4.6 s, $p < 0.05$) compared to the control group (74.1 ± 4.6 s, $p < 0.05$) is equivalent to the reduction observed in the group that was used reference drug (diclofenac diethylammonium gel - 34.0 ± 7.3 s, $p < 0.05$). The gel 1% carvacrol was also able to reduce the activity of the enzyme MPO (0.7 ± 0.1 UMPO / mg tissue, $p < 0.05$) compared to the control group (2.0 ± 0.3 UMPO / mg tissue, $p < 0.05$) and behaved similarly to diclofenac diethylammonium group gel (0.5 ± 0.2 UMPO / mg tissue, $p < 0.05$). Thus, it is concluded that the carvacrol gel containing liposomes at a concentration of 1% was effective in the control of nociception induced by formalin and had an important effect on cell migration at low concentrations suggesting that the gel containing liposomes has an effect carvacrol topic in the therapy of painful processes associated with orofacial region. However, such phenomena were not observed at 5% concentration.

Keywords: orofacial pain, liposomes, pharmacological treatment, via topical administration, carvacrol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do carvacrol.....	30
Figura 2. Distribuição do tamanho de partícula dos lipossomas contendo carvacrol determinados utilizando aparelho Zetasizer® (Nano-ZS90, Malvern Instruments, United Kingdom), na temperatura de 25°C.....	40
Figura 3. Curvas TG/DTG das amostras dos géis obtidas na razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min ⁻¹)	41
Figura 4. Curvas DSC da amostras dos géis de carbopol inerte e dos géis contendo lipossomas de carvacrol na concentração de 1 e 5%, obtidas na razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ e em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min ⁻¹).....	42
Figura 5. Efeito antinociceptivo da aplicação tópica do gel de lipossomas contendo carvacrol (GLC 1% e 5%) na 1ª fase (A) e 2ª fase (B) do teste da nocicepção orofacial induzida por formalina 2%.....	43
Figura 6. Efeito da aplicação tópica do gel de lipossomas contendo carvacrol (GLC 1% e 5%) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no lábios dos animais submetidos ao teste da nocicepção orofacial induzida por formalina 2%.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

GC – Gel de Carbopol
GLC 1% - Gel contendo lipossomas com carvacrol a 1%
GLC 5% - Gel contendo lipossomas com carvacrol a 5%
GDD – Gel de diclofenaco dietilamônio
DSC – Calorímetro exploratório diferencial (*Differential scanning calorimetry*)
MPO – Mieloperoxidase
UMPO – Unidade de mieloperoxidase
IASP – *International Association for the Study of Pain*
SNP – Sistema Nervoso Periférico
SNC – Sistema Nervoso Central
5-HT – serotonina
VCAM1 - molécula de adesão vascular da célula 1
NF- κ B – fator de transcrição nuclear kappa B
COX – Ciclooxigenase
COX-2 – Ciclooxigenase-2
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
IL – Interleucina
IFN- γ – interferon gama
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
PGE₂ - prostaglandina E₂
TNFR1 - receptor do fator de necrose tumoral 1
TNFR2 – receptor do fator de necrose tumoral 2
TXA₂ – tromboxano A₂
PGI₂ – prostaglandina I₂
PGF_{2 α} – prostaglandina F_{2 α}
PGJ₂ – prostaglandina J₂
PGD₂ – prostaglandina D₂
5-LOX – lipoxigenase 5
LTB₄ – receptor de leucotrieno B₄
LTC₄ – receptor de leucotrieno C₄
LTD₄ – receptor de leucotrieno D₄

LTE₄ – receptor de leucotrieno E₄
H₁ – receptor de histamina 1
H₂ – receptor de histamina 2
H₃ – receptor de histamina 3
H₄ – receptor de histamina 4
ETA – receptor de endotelina A
ETB – receptor de endotelina B
ET1 – receptor de endotelina isoforma 1
ET2 – receptor de endotelina isoforma 2
ET3 – receptor de endotelina isoforma 3
AA – ácido araquidônico
PLA₂ – fosfolipase A₂
ATM – Articulação temporomandibular
DTM – Disfunção temporomandibular
AINES – Anti-inflamatórios não-esteroidais
AIES – Anti-inflamatórios esteroidais
LPS – Lipopolissacarídeo
i.p. – intra-peritoneal
CFA – Adjuvante completo de Freund
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Dor e inflamação.....	16
2.1.1 Dor.....	16
2.1.2 Inflamação.....	19
2.2 Dor orofacial.....	24
2.3 Tratamento da dor orofacial.....	25
2.3.1 Tratamento Tópico da dor orofacial.....	26
2.3.2 O uso de produtos naturais no tratamento da dor orofacial.....	28
2.3.3 Incorporação de fármacos em lipossomas.....	33
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Preparação dos lipossomas contendo carvacrol.....	36
4.2 Caracterização físico-química dos lipossomas.....	36
4.3 Preparação do gel.....	36
4.4 Caracterização físico-química dos géis.....	37
4.5 Ensaios <i>in vivo</i>	37
4.5.1 Animais.....	37

4.5.2 Material.....	38
4.5.3 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	38
4.5.3.1 Teste de nocicepção orofacial induzida por formalina.....	38
4.5.3.2 Ensaio <i>in vitro</i> – Atividade da enzima mieloperoxidase.....	39
4.6 Eutanásia e descarte de carcaças.....	39
4.7 Análise Estatística.....	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Caracterização físico-química do gel contendo lipossomas com carvacrol.....	40
5.2 Atividade antinociceptiva do gel contendo lipossomas com carvacrol.....	42
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÃO.....	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A dor orofacial é um problema que prejudica a qualidade de vida das pessoas, mas os mecanismos fisiológicos dessa condição ainda são pouco compreendidos, justificando a necessidade de estudos direcionados para essa área (BARROS *et al.* 2009).

O tratamento da dor orofacial normalmente envolve farmacoterapia que, na maioria das vezes, é utilizada por via sistêmica (DIONNE 1997). No entanto, a utilização de medicamentos sistêmicos pode acarretar uma série de efeitos adversos, especialmente se seu uso for prolongado (SCHNITZER *et al.* 2004; SOLOMON *et al.* 2005; NUSSMEIER *et al.* 2005).

Um número considerável de fármacos analgésicos estão disponíveis para o tratamento da dor porém, a procura de novos compostos como alternativas terapêuticas continua, pois os analgésicos disponíveis apresentam uma gama de efeitos colaterais (ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001). Substâncias ativas encontradas em produtos naturais estão sendo cada vez mais utilizadas na busca de fármacos mais seletivos e potentes por causa de seu custo relativamente baixo e fácil disponibilidade em vários países (GONÇALVES *et al.* 2008; QUINTANS-JÚNIOR *et al.* 2008). Dentre estas substâncias podemos citar o carvacrol que é um fenol monoterpênico predominante em muitos óleos essenciais da família Labiatae incluindo as espécies *Origanum*, *Satureia*, *Timbra*, *Thymus* e *Corydothymus*. Estudos anteriores demonstraram que o carvacrol promove inibição da ciclooxigenase (WAGNER; WIERER; BAUER, 1986). Carvacrol também é responsável por atividades antimicrobiana, antitumoral, antimutagênica, antigenotóxica, analgésica, anti-espasmódico, anti-inflamatório, angiogênico, antiparasitário, anti-plaquetário, inibição de acetilcolinesterase, antielastase, inseticida e atividades hepatoprotetora (DIDRY *et al.* 1994; RICE; COATS, 1994; THOMPSON *et al.* 1996; ULTEE *et al.* 1998; BASER, 2008).

Para o nosso conhecimento, a eficácia analgésica do carvacrol, embora já tenha sido explorada sistemicamente, ainda não foi determinada topicamente. Dessa forma, o desenvolvimento de um agente tópico para o controle da dor orofacial,

torna-se uma alternativa de grande valia, especialmente porque, são escassos na literatura científica trabalhos sobre a aplicação de agentes tópicos na terapia da dor e inflamação orofacial utilizando sistemas de liberação controlada de fármacos. A incorporação de óleos essenciais e seus componentes em lipossomas além de facilitar a penetração cutânea promove a necessária proteção do fármaco frente à oxidação (IMBERT *et al.* 1994; CITERNESI; SCIACCHITANO, 1995; LIOLIOS, 2009).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito tópico do gel contendo lipossomas com carvacrol sobre a nocicepção orofacial em camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dor e inflamação

2.1.1 Dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como sendo uma experiência sensorial e emocional associada a dano tecidual real ou potencial que pode ser classificada em aguda e crônica (ZIMMERMANN, 1983; MOSSEY, 2011). A dor aguda é definida como uma dor de curta duração e auto-limitada, que pode se tornar persistente e de difícil tratamento se o processo da doença subjacente ou lesão não for solucionado. A dor é considerada crônica quando persiste por mais de três meses (DUBOIS; GALLAGHER; LIPPE, 2009).

A variação da dor em diferentes faixas etárias na população pode ser reflexo das diferenças entre as populações e de divergências na definição e classificação de dor presente nos estudos epidemiológicos (BEKKERING *et al.* 2011; HARKER *et al.* 2012). Sabe-se, entretanto, que a dor geralmente é mais comum em grupos etários com idade mais avançada, grupos com menor renda e entre as mulheres (OHAYON, 2004; DEMYTTENAERE *et al.* 2006). Com relação à dor orofacial, estima-se que mais de 22% dos americanos, ingleses e alemães com mais de 18 anos apresentam esse tipo de dor (HARGREAVES, 2011).

Considerando os eventos fisiológicos relacionados à dor, três tipos principais de fibras sensoriais no Sistema Nervoso Periférico (SNP) estão envolvidos na nocicepção, as fibras A β , A δ e C, as quais possuem propriedades diferentes, permitindo transmitir tipos diferentes de informação sensorial. Na sequência dos eventos que originam o fenômeno sensitivo doloroso, o primeiro passo é a transformação dos estímulos ambientais, físicos ou químicos intensos em potencial de ação, que são transferidos da fibra nervosa do SNP para o Sistema Nervoso Central (SNC) (ALVES NETO, 2010).

As fibras A β são grandes em diâmetro e altamente mielinizadas, permitindo-lhes, assim, conduzir rapidamente potenciais de ação, sendo responsáveis por transmitir a informação tátil. As fibras A δ são menores em diâmetro e finamente mielinizadas, o que as torna mais lentas que a fibra A β , respondendo tanto a

estímulos térmicos quanto a mecânicos. Já as Fibras C são amielinizadas, de condução lenta, sendo responsáveis por detectar estímulos dolorosos. Conjuntamente, as fibras A δ e C são denominadas de nociceptores, respondendo a estímulos nocivos, sejam eles mecânicos, térmicos ou químicos (RAJA; MEYER; CAMPBELL, 1988; HUCHO; LEVINE, 2007; BASBAUM *et al.* 2009). No corno dorsal da medula espinhal, as fibras A δ e as C fazem conexões principalmente com as lâminas I e II, com um número menor de conexões com as lâminas profundas, enquanto que as fibras A β inervam predominantemente as lâminas III e IV, fazendo conexões com lâmina V (TODD, 2002).

Os fatores endógenos capazes de ativar os nervos sensitivos são produzidos em resposta ao dano tecidual ou ao stress fisiológico, incluindo o estresse oxidativo. Tais fatores podem atuar isoladamente, ou em combinação, na sensibilização dos nociceptores diminuindo o limiar nociceptivo. Assim, a quimionocicepção representa uma interface importante entre a dor aguda e persistente, especialmente no contexto da lesão do tecido periférico e, conseqüente, instalação de um processo inflamatório, o qual produz uma série de mediadores que ativam diretamente os canais de Ca⁺² e despolarizam os neurônios, desencadeando assim potenciais de ação (PEIER *et al.* 2002; BANDELL *et al.* 2004; BASBAUM *et al.* 2009).

Uma vez que o estímulo nocivo tenha chegado aos neurônios de projeção, concentrados na lâmina I e espalhados nas lâminas II, III e IV, estes cruzam a linha média e seguem na substância branca contralateral, através dos tratos espinotalâmico e espinorreticular, para realizar aferências no tronco cerebral e em vários núcleos talâmicos (SPIKE *et al.* 2003). Vias de projeção do corno dorsal da medula fazem aferência com a medula rostroventral, com a substância cinzenta periaquedutal, com o núcleo ventromedial do tálamo, e, finalmente, com os lóbulos frontais dorsolaterais. Outra via de projeção ascendente ocorre da medula espinhal para o núcleo parabraquial, e, subsequentemente, para o hipotálamo e para amígdala. Outra via envolve projeções do núcleo parabraquial para o núcleo central da amígdala e para o prosencéfalo basal (BESTER *et al.* 2000; BOURGEAIS; GAURIAU; BERNARD, 2001; DESBOIS; VILLANUEVA, 2001; RAINVILLE, 2002).

Uma série de neurotransmissores, neuromoduladores e receptores estão envolvidos na modulação da dor, sendo a serotonina, a noradrenalina e os opiáceos

os principais mediadores envolvidos na ativação da via descendente (CROFFORD; CASEY, 1999; MARKS *et al.* 2009). A inibição da dor por vias descendentes ocorre principalmente através de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos originados no mesencéfalo e na substância cinzenta medular. Os neurônios serotoninérgicos estão principalmente no núcleo magno da rafe, exercendo, através de uma série de receptores 5-HT, um papel importante na modulação da dor, entretanto seus mecanismos de ação precisos ainda não estão claros. Já a noradrenalina, através de seu receptor α_2 , possui um papel importante na antinocicepção (BAJIC; PROUDFIT, 1999; CROFFORD; CASEY, 1999; RAHMAN *et al.* 2009; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

A dor é uma experiência complexa e multidimensional, compreendendo dimensões sensitivo-discriminativa, cognitiva, emocional e motivacional. Tais dimensões apresentam expressão particular na região orofacial, uma vez que esta região é formada por uma complexa variedade de tecidos, dentre eles a pele, dentes, língua, músculos da mastigação, a articulação temporomandibular e glândulas salivares, apresentando significados biológico, emocional e psicológico especial para cada indivíduo (TAKEMURA *et al.* 2006).

Os tecidos orofaciais são inervados principalmente pelos três ramos (maxilar, oftálmico e mandibular) do nervo trigeminal. Assim como em outros tecidos do corpo, as fibras A δ e C transmitem sinais nociceptivos da região orofacial para o SNC. Os principais corpos celulares das fibras aferentes primárias estão localizados no gânglio trigeminal. Cada um destes neurônios presentes no gânglio trigeminal possui um axônio que se projeta para os tecidos periféricos e outro que se projeta centralmente através do tronco cerebral ipsilateral, onde realiza sinapses com os neurônios de segunda ordem, especialmente no complexo nuclear trigeminal espinhal, o qual inclui o núcleo trigeminal sensorial e o núcleo trigeminal do trato espinhal, sendo este dividido em três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (SESSLE, 2000; SESSLE, 2005).

Os neurônios do complexo trigeminal projetam-se para diversas áreas do SNC. Alguns neurônios projetam-se para a formação reticular ou para os núcleos do nervo craniano motor, e, assim, fornece sinais necessários para as respostas autonômicas e musculares reflexas. Além disso, muitos neurônios ascendem

diretamente para o tálamo através de vias que envolvem outras estruturas do tronco cerebral, tais como o núcleo parabraquial e a formação reticular (DUBNER; REN, 2004; SESSLE, 2005).

Para entender, de forma mais precisa, os mecanismos de ação da dor orofacial, bem como as formas de tratamento mais viáveis, foram desenvolvidos os testes de nocicepção orofacial. A nocicepção, no modelo de nocicepção orofacial induzida por formalina, é resultante da ação inflamatória oriunda da ligação da formalina com as proteínas teciduais, levando a estimulação direta dos nociceptores, na primeira fase, e a um processo inflamatório, com consequente sensibilização central, na segunda fase, de forma análoga ao observado em todos os testes que utilizam a formalina como algógeno. Entretanto, quando injetada na região orofacial, a formalina excita os neurônios nociceptivos convergentes do núcleo trigeminal espinhal, o que torna o teste de nocicepção orofacial induzida por formalina mais específico na análise do componente central da nocicepção quando comparado, por exemplo, ao teste da injeção intra-plantar (CLAVELOU *et al.* 1989; ANDERSON; VAKOULA; VEINOTE, 2003; RABOISSON; DALLEL, 2004; LUCCARINI *et al.* 2006).

2.1.2 Inflamação

A inflamação é um processo que ocorre após uma infecção ou injúria tissular, que é intercedido por uma diversidade de células e mediadores. O processo inflamatório é dividido em agudo e crônico por um critério temporal e por algumas diferenças nos mediadores inflamatórios presentes em cada condição. A inflamação aguda é subdividida em três fases: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração leucocitária, sendo cada uma dessas fases imprescindíveis para o surgimento da subsequente (SCOTT; LAM; FERRELL, 1994). Desta forma, a resposta inflamatória pode ser benéfica, atenuando uma infecção, em defesa do hospedeiro em relação ao organismo invasor e prolonga-se até o retorno da homeostase. No entanto, esse evento pode cronificar-se, por não destruição do patógeno ou por falta da homeostasia, levando a lesão de algumas estruturas, em virtude da leucocitose, fibroplasia, da produção excessiva de citocinas e de outros mediadores desse processo. As manifestações moleculares geram uma

sintomatologia característica, conhecida pelos cinco sinais cardinais da inflamação: eritema, calor, rubor, dor e a perda da função (MEDZHITOV, 2008).

A vasodilatação em arteríolas e vênulas promoverá acúmulo de células naquela região, além de interromper o fluxo laminar no lúmen do vaso, gerando o rubor e calor na região (NORTHOVER; NORTHOVER, 1969). Consequentemente, os mediadores que são liberados pelos leucócitos, como histamina, aumentam a permeabilidade dos vasos, levando a extravasamento de plasma e formação do edema, caracterizando a segunda fase (BIGNOLD; LYKKE, 1975). Após todas essas condições serem estabelecidas, há expressão de moléculas de adesão para iniciar a terceira fase da inflamação aguda, com intensa migração leucocitária, que libera citocinas, causando um quadro de dor inflamatória (LEY, 2003; CUNHA *et al.*, 2008). A ação dos leucócitos na fase inicial da inflamação é primordial para a resolução desse processo (BUCKLEY *et al.*, 2001).

Para o processo de migração leucocitária é necessário que ocorra redução da velocidade do fluxo sanguíneo, com marginação dos leucócitos, para posterior adesão na parede do endotélio, processo que é mediado por substâncias que promovem vasodilatação, inicialmente, e por L-selectina, posteriormente (SMITH *et al.*, 1991; SPERTINI *et al.*, 1991). Após a adesão, ocorre a migração do leucócito, por transmigração ou por diapedese, processos dependentes de integrinas (ICAM-1 e VCAM-1) e do gradiente quimiotático, respectivamente (LUSCINSKAS *et al.*, 1991; SPERTINI *et al.*, 1991).

Os neutrófilos ou células polimorfonucleares são as primeiras células a migrarem após uma lesão, sendo maioria na região afetada durante as primeiras 24 horas (SPRINGER, 1994; KAPLANSKI *et al.*, 2003). Estas células, ao chegarem ao sítio inflamatório fagocitam os microrganismos, funcionando como a primeira linha de defesa no combate a invasores, para tanto se faz necessária a ação da enzima mieloperoxidase, presente nos grânulos azurófilos destas células, sendo liberada por vesículas secretoras (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Além disso, os neutrófilos são essenciais na fisiopatogênese da dor inflamatória, uma vez que se inibindo a quimiotaxia destas células, atenua-se a hipernocicepção (CUNHA *et al.*, 2008). O processo de quimiotaxia é mediado por diversos fatores quimiotáticos, além da função de moléculas de adesão que aumentam a adesão dos leucócitos ao

endotélio, mecanismos indispensáveis para a migração leucocitária e defesa do organismo (LEY, 2003).

Se os eventos citados anteriormente persistirem, ocorre a cronificação do processo inflamatório, caracterizado por expressão excessiva de fibroblastos e de tecido conjuntivo. Em virtude disso, a inflamação crônica é caracterizada por fibrose, devido à lesão tecidual persistente (BUCKLEY *et al.*, 2001). Os fibroblastos induzem a expressão de NF- κ B, aumentando a síntese de citocinas inflamatórias, além de ativar a via dos prostanóides por indução da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) (SMITH *et al.*, 1997). O NF- κ B é um fator de transcrição que promove a transcrição gênica de alguns mediadores do processo inflamatório, como: citocinas, quimiocinas e enzimas (iNOS e COX-2) (BALDWIN, 1996; SEBBAN; COURTOIS, 2006). Portanto, NF- κ B modula o processo inflamatório a partir da formação de um complexo ativo regulado por um feedback positivo, com produção de outros mediadores inflamatórios. Entre esses mediadores, as citocinas apresentam um grupo diverso, sendo constituídos por citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-27, IL-33, IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) (HANADA; YOSHIMURA, 2002).

A IL-1 β é uma das principais citocinas que regulam o processo inflamatório, sendo caracterizada como pirógeno endógeno. Sua produção ocorre através de um estímulo bacteriano ou inflamatório, com objetivo de participar na resposta imune do hospedeiro contra os microorganismos (DINARELLO, 1998). Os mecanismos pelos quais esta citocina modula o processo inflamatório são a produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa, aumento da permeabilidade dos vasos, produção de prostaglandinas por indução da enzima COX, indução de moléculas de adesão na parede dos vasos, facilitando o processo migratório de leucócitos para o local da lesão (MOSER *et al.*, 1989; RAMADORI; MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, 1989).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) é também uma das principais citocinas que controlam o processo inflamatório, sendo a primeira a ser liberada após um estímulo inflamatório, levando a aumento da expressão da COX e PGE₂. Seus efeitos são mediados por dois receptores: TNFR1 e TNFR2, sendo que o primeiro está relacionado com apoptose, com a dor neuropática e com a dor

inflamatória, e o segundo com o processo inflamatório (SOMMER; SCHMIDT; GEORGE, 1998; CUNHA *et al.*, 2005). O TNF- α induz a migração de neutrófilos para o local da injúria por mecanismos indiretos, como a indução de liberação de fatores quimiotáticos para neutrófilos por estimulação de macrófagos residentes (FACCIOLI *et al.*, 1990). Além disso, esta citocina induz a migração de neutrófilos por estimulação da via dos leucotrienos. No entanto, é estabelecido que o TNF- α está relacionado na sinalização do óxido nítrico, inibindo indiretamente a expressão de moléculas de adesão (TAVARES-MURTA; CUNHA; FERREIRA, 1998; MORELAND *et al.*, 1999; CANETTI *et al.*, 2001).

O tratamento para condições inflamatórias busca atenuar a liberação dos mediadores inflamatórios que causam a sintomatologia descrita. Consequentemente, foram analisados os mecanismos de ações de algumas drogas com ação anti-inflamatória, como a aspirina. O mecanismo de ação dessa droga e de seus derivados sintéticos está na inibição da produção de prostanóides, como as prostaglandinas, produzida através da via do ácido araquidônico, surgindo os inibidores da enzima cicloxigenase (MONCADA; FERREIRA; VANE, 1973; VANE; BOTTING, 1997).

Mediante os efeitos adversos causados por essas drogas, pela importância fisiológica dos prostanóides, e a descoberta de duas isoformas para essa enzima (GABRIEL; JAAKKIMAINEN; BOMBARDIER, 1991; HLA; NEILSON, 1992), nasceu uma nova classe de drogas, os inibidores seletivos para a cicloxigenase-2, enzima importante na via do ácido araquidônico, que seria a forma induzida, encontrada apenas em condições patológicas. Diante disso, uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de condições inflamatórias estava surgindo, os inibidores seletivos da nova isoforma, que deveriam possuir menores efeitos adversos, pela inibição seletiva da forma induzível (SIMON, 2001). No entanto, foram encontrados alguns efeitos não esperados para essa nova terapêutica, em virtude da forma considerada induzida ser expressa constitutivamente em vasos e rins (MAJIMA *et al.*, 2000).

A via da COX leva a produção de alguns prostanóides, sendo os efeitos mediados por essas enzimas atribuídos a estes produtos. Entre os prostanóides encontram-se o tromboxano A₂ (TXA₂), prostaciclina (PGI₂), relacionados com o tônus vascular e com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e

prostaglandinas (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 e PGJ_2) (REILLY; FITZGERALD, 1993). Os efeitos biológicos atribuídos as prostaglandinas são diversos, já que $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGJ_2 possuem efeitos anti-inflamatórios, PGD_2 promove vasoconstricção e PGE_2 possui efeito vasodilatador e tem participação na fisiopatogênese da febre (KOIZUMI; NEGISHI; ICHIKAWA, 1992; GILROY *et al.*, 1999; HELLIWELL; ADAMS; MITCHELL, 2004).

A outra via de produção de mediadores inflamatórios a partir do ácido araquidônico é ativada pela enzima 5-LOX, a qual produz leucotrienos (LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4). Assim como as prostaglandinas, os leucotrienos possuem diversas funções biológicas, pois LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 são reguladores do processo inflamatório, e LTB_4 possui ação na quimiotaxia de leucócitos para o local do processo inflamatório (BISGAARD, 1984; ASAKO *et al.*, 1992).

A bradicinina, histamina e a endotelina consistem em outras substâncias de grande importância no processo inflamatório. A bradicinina é um nonapeptídeo sintetizado através do cininogênio pela calicreína, sendo inativada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) ou por outras enzimas como as aminopeptidases (STEWART, 2004), possuindo efeito vasodilatador, sendo um mediador inicial importante para o processo inflamatório, uma vez que a migração de leucócitos e o extravasamento de plasma são dependentes da velocidade do fluxo sanguíneo (REGOLI; BARABÉ, 1980; DAMAS *et al.*, 1990). Seus efeitos biológicos ocorrem por ativação dos seus receptores, B1 e B2, os quais promovem a liberação de outros mediadores inflamatórios como citocinas, histamina, PGE_2 e óxido nítrico (TAYLOR; DEFEUDIS; MOREAU, 1989; MARCEAU *et al.*, 1999; COUTURE *et al.*, 2001).

A histamina é uma amina sintetizada através da L-histidina descarboxilase que atua sobre a histidina, promovendo descarboxilação para a formação de histamina (COUTURE *et al.*, 2001). Essa amina é armazenada em mastócitos, principalmente, até a desgranulação deste e posterior liberação por meio de um estímulo, que pode ser um processo inflamatório, como citocinas pró-inflamatórias. Além de participar de eventos inflamatórios, a histamina é expressa constitutivamente nos pulmões (ENDO, 1982). Suas propriedades biológicas são mediadas pelos receptores: H1, H2, H3 e H4.

A endotelina é um peptídeo endógeno, com efeito vasoconstritor, sintetizado a partir das células endoteliais, cérebro e coração, sendo sua ativação realizada por endopeptidases. Os efeitos biológicos produzidos por ela são mediados por dois receptores, ETA e ETB, sendo ambos acoplados a proteína G, nas suas isoformas ET1, ET2 e ET3 (HICKEY *et al.*, 1985; NUNEZ *et al.*, 1990; LEVIN, 1995). Apesar de possuir essa ação em vasos, a endotelina é um mediador da inflamação. Esse fato se deve ao estímulo na liberação de IL-6, IL-8 e TNF- α , além de estar associado com a ativação da via do AA por ativação de PLA2 (ARAMORI; NAKANISHI, 1992; MULLOL *et al.*, 1996; RUETTEN; THIEMERMANN, 1997).

De maneira geral, o combate ao corpo estranho ocorre por estimulação da defesa do organismo com estímulo ao desencadeamento de um processo inflamatório, induzindo maior efeito fagocitário às células de defesa. Um dos principais mecanismos pelos quais o organismo promove um processo inflamatório está relacionado com a quimiotaxia de leucócitos, impedindo o dano tecidual. Outras evidências sugerem o aumento da permeabilidade vascular e produção de citocinas como TNF- α e IL-1 β . (HUGLI, 1986; WANG *et al.*, 1995).

2.2 Dor orofacial

A dor proveniente da região orofacial corresponde a mais de 25% dos casos de queixas de dor (SESSLE, 1987), sendo a síndrome dolorosa da articulação temporomandibular (ATM) a ocorrência mais comum na região orofacial, ficando apenas atrás da “dor de dente” (IRVING, *et al.*, 1999). Em um estudo epidemiológico recente na população brasileira, Gonçalves, *et al.*, em 2010 verificaram a presença de pelo menos um sintoma de disfunção temporomandibular (DTM) em 39,2% dos sujeitos, sendo a dor notada em 25,6% da população estudada.

A dor orofacial constitui um grupo de desordens que, muitas vezes, associa sinais dolorosos e sintomas que podem afetar vários componentes do sistema mastigatório como a ATM, músculos da mastigação, dentes e suas estruturas de suporte. A presença de dor nos músculos mastigatórios e/ou ATM, além de alguns sinais cardinais como a dificuldade de abertura bucal e a presença de estalidos articulares são as principais queixas dos pacientes portadores de dor orofacial (SIQUEIRA; TEIXEIRA, 2001).

Muitos estudos têm demonstrado que a dor decorrente da dor orofacial traz sérias limitações na qualidade de vida dos indivíduos que a possuem (LIST; DWORKIN, 1996; JOHN, *et al.*, 2007; TURP, *et al.*, 2007; BARROS V.DE.M., *et al.*, 2009) e, dessa forma, o seu alívio deve ser o primeiro procedimento a ser realizado no paciente com dor orofacial.

2.3 Tratamento da dor orofacial

A terapia medicamentosa para o tratamento de DOR OROFACIAL é uma das mais utilizadas, principalmente quando se trata do alívio da dor. Dionne em 1997 ressalta que a intervenção farmacológica no tratamento da dor orofacial é usualmente considerada adjuvante ao tratamento definitivo. Normalmente, o objetivo da prescrição de medicamentos no tratamento de pacientes com dor orofacial destina-se, de forma importante, a ajudá-los a controlar seu desconforto ou disfunção, muitas vezes em conjunto com outras terapias, ou simplesmente reduzir a dor em um nível que não é excessivamente limitante para o paciente (PAUL;HERSH, 1989; HERSH, *et al.*, 2008).

A maioria das terapias farmacológicas relacionadas à dor orofacial é realizada por via sistêmica, sendo a primeira linha para o tratamento agudo, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (HERSH, *et al.*, 2008). Em um estudo realizado por Ekberg, *et al.* (1996), utilizando 32 pacientes com dor localizada na ATM, foram administrados 50 mg de diclofenaco de sódio 2 ou 3 vezes ao dia e comparado ao grupo placebo. A escala analógica visual foi utilizada para estimar se o tratamento com diclofenaco sódico diminuiu a dor. A frequência de dor na ATM mostrou uma redução significativa no grupo teste em relação ao grupo placebo; mostrou ainda, uma diminuição da dor à palpação nos músculos mastigatórios quando comparados ao grupo placebo.

Ta; Dionne (2004), demonstraram, em pacientes com dor na ATM, que o naproxeno foi capaz de reduzir a dor orofacial medida através da escala analógica visual em relação ao grupo placebo. No entanto, estudos com outros AINES, o ibuprofeno ou piroxicam, não encontraram diferenças significativas na redução da dor em pacientes com DTM miogênica quando comparado ao grupo placebo (GORDON, *et al.*, 1990; SINGER; DIONNE, 1997).

Conforme citado anteriormente, embora o uso dos AINES seja normalmente a terapia de escolha em casos de dor orofacial aguda, a sua administração sistêmica pode acarretar uma série de efeitos colaterais, especialmente se seu uso for crônico. Os AINES podem ser agrupados como sendo inibidores não-seletivos da COX, “semiseletivos” COX-2 ou altamente seletivo COX-2 (HERSH, *et al.*, 2005). Embora o uso crônico de inibidores altamente seletivos de COX-2 em relação aos não-seletivos ou semiseletivos, tenha sido associado com uma significativa redução de graves eventos gastrintestinais, incluindo ulcerações perfurações e sangramentos (SCHNITZER, *et al.*, 2004), a sua utilização crônica, em comparação com placebo está associado a maior risco cardiovascular (NUSSMEIER, *et al.*, 2005; SOLOMON, *et al.*, 2005).

Além dos AINES, outros agentes anti-inflamatórios são descritos na literatura para o tratamento da dor orofacial. Os anti-inflamatórios esteroidais (AIES) se mostraram eficazes em reduzir a dor e a severidade da disfunção em pacientes com dor orofacial (ARABSHAHI, *et al.*, 2005; FREDRIKSSON, *et al.*, 2005; SCHIFFMAN, *et al.*, 2007). No entanto, da mesma forma que os AINES, o uso sistêmico contínuo dos AIES podem desencadear uma série de efeitos colaterais tais como, diminuição da resistência a infecção, hiperglicemia, osteoporose e a supressão do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal (PEREIRA, *et al.*, 2007).

Ainda, outras terapias farmacológicas, que não os anti-inflamatórios, têm sido utilizadas de forma sistêmica para o tratamento da dor orofacial. Bonjardim *et al.* (2009) verificaram que a administração sistêmica de um analgésico opióide atípico (tramal) ou um analgésico periférico (dipirona) foi capaz de reduzir significativamente a resposta comportamental nociceptiva induzida pela injeção do óleo de mostarda (agente álgico) na ATM de ratos.

2.3.1 Tratamento tópico da dor orofacial

Di Rienzo Businco *et al.* (2004), objetivaram comparar a eficácia da aplicação tópica frente a administração por via oral do diclofenaco sódico no tratamento de sintomas dolorosos da dor orofacial. Os autores constataram que todos os pacientes relataram alívio da dor após o tratamento e que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Porém, no grupo em que o

diclofenaco foi administrado por via oral, a maioria dos pacientes relatou dor epigástrica.

Em um estudo randomizado, duplo-cego, Lobo *et al.*, (2004) avaliaram a eficácia do creme tópico Theraflex-ATM (cetoprofeno e lidocaína - nababo/Rx, San Mateo, CA) em 52 pacientes com dor no músculo masseter e na ATM. Os pacientes foram instruídos a aplicar o creme sobre o músculo masseter ou sobre a ATM duas vezes ao dia por duas semanas e, um grupo placebo foi instruído a aplicar apenas o creme, sem o componente ativo. Os pacientes foram avaliados antes (basal), 10 e 15 dias após a aplicação do creme e, cinco dias após a interrupção do tratamento (*follow-up*). No grupo em que o Theraflex-ATM foi aplicado houve uma diminuição significativa nos níveis de dor relatados, em relação ao basal, em todos os momentos avaliados. Para o grupo placebo, não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes períodos de tempo. Além disso, os autores relatam que não houve evidência de efeitos colaterais menores, tais como irritação da pele. Os resultados sugerem que o Theraflex-ATM (creme tópico) é seguro e eficaz para reduzir a dor no músculo masseter e na ATM.

Estudo recente publicado por Li, *et al.*, (2009) comparou a eficácia de uma pomada tópica (Ping On Ointment Company Limited, Hong Kong) contendo ervas naturais da medicina chinesa no tratamento da dor muscular mastigatória e da ATM. Tratou-se de um estudo randomizado, duplo-cego, controlado, onde 55 indivíduos com dor na ATM e/ou músculos da mastigação receberam a pomada ou placebo durante quatro semanas. Os indivíduos foram avaliados quanto à intensidade da dor utilizando a escala analógica visual, no início e após 4 semanas de tratamento. Foi verificado que a pomada reduziu significativamente os sintomas de dor na ATM e/ou músculos mastigatórios.

Desta forma, muitos relatos (STEIN, 1993; YOKOMIZO, SAGITANI, 1996; DI RIENZO BUSINCO, *et al.*, 2004; LOBO, *et al.*, 2004; LI, *et al.*, 2009; STEIN, LANG, 2009) de estudos sobre a ação local de medicamentos antiinflamatórios destacam a possibilidade de evitar os efeitos adversos causados pela administração oral, principalmente pelos distúrbios gastrintestinais e cardiovasculares decorrentes desta via. Isto se torna ainda mais grave quando se considera que os antiinflamatórios são administrados por longos períodos, sendo assim desejável reduzir as reações adversas e os efeitos colaterais.

Com isso, a disponibilidade de um tratamento local que possa agir de forma terapêutica controlada e duradoura, sem a necessidade de aparatos clínicos que muitas vezes distancia os pacientes do tratamento se caracteriza como uma ferramenta terapêutica de grande valor. É neste sentido que a utilização tópica de substâncias com ação analgésica e antiinflamatória pode trazer relevantes benefícios no tratamento da dor orofacial.

O uso de medicamentos via transdérmica tornou-se uma ótima via de administração de drogas devido as suas inúmeras vantagens (BUNGE, 1998; ASBILL;MICHNIAK, 2000; BARRY, 2001; KALIA; GUY, 2001). Esta via de administração geralmente reduz as reações adversas por maximizar o efeito local e minimizar a toxicidade sistêmica. O principal problema tem sido a adequada penetração no tecido-alvo e, portanto, a eficácia clínica. Para se obter eficácia, postula-se que o acúmulo local do fármaco, que ocorre por difusão direta, deve ter concentrações maiores que a obtida por absorção sistêmica e redistribuição através da vasculatura cutânea (PEREIRA, *et al.*, 2006).

2.3.2 O uso de produtos naturais no tratamento da dor

Dentre as substâncias que apresentam propriedades farmacológicas utilizadas para o tratamento da dor e inflamação destacam-se os princípios ativos oriundos de plantas medicinais que continuam despertando o interesse científico, em virtude da grande diversidade de compostos com propriedades farmacológicas, das quais se destacam as atividades analgésica e anti-inflamatória (CARLINI, 2003). Neste contexto estão inseridos os óleos essenciais, bem como os princípios ativos deles extraídos, os quais são responsáveis por uma gama de atividades farmacológicas. Uma das classes encontradas em abundância nos óleos essenciais são os terpenos, que correspondem aos derivados de unidades do isopreno (SIMÕES; FARO, 2004).

Os monoterpenos correspondem a moléculas de origem natural constituídas por duas unidades isoprênicas, as quais são formadas por 5 carbonos cada. Esta classe de metabólito secundário representa cerca de 90% dos constituintes de óleos essenciais e apresenta uma variedade de compostos (BAKKALI *et al.*, 2008). Muitos

destes monoterpenos apresentam uma gama de atividades farmacológicas já descritas na literatura científica que podem contribuir no tratamento da dor, tais como: antinociceptiva (MELO *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010), anti-inflamatória (ORHAN *et al.*, 2006; SANTOS & RAO, 2001) e antioxidante (GUIMARAES, *et al.*, 2010; PELTZER, *et al.*, 2009).

Dentro da busca pela caracterização farmacológica da ação terapêutica de diversos compostos químicos presentes em espécies vegetais, está inserido o estudo do carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol, Figura 1), um monoterpeno fenólico presente em óleos essenciais de plantas pertencentes à família *Labiatae*, incluindo espécies dos gêneros *Oregano*, *Satureja*, *Tymbra*, *Thymus* e *Crydothymus* (BASER, 2008). Pesquisas realizadas com óleos essenciais contendo carvacrol têm demonstrado efeitos antibacteriano, antifúngico, antioxidante e inseticida em diferentes organismos (DIDRY *et al.*, 1994; RICE; COATS, 1994; THOMPSON *et al.* 1996; ULTEE *et al.*, 1998).

Além disso, estudos realizados com óleos essenciais que possuem o carvacrol, têm apresentado propriedades analgésicas (AYDIN, *et al.*, 1996; HAJHASHEMI, *et al.*, 2002) antioxidantes, anti-inflamatória (HAJHASHEMI, *et al.*, 2002) e cicatrizante (ALTIOK, *et al.*, 2009). A aplicação tópica do óleo de orégano composto majoritariamente por carvacrol e seu isômero, timol, no controle da dor foi patenteada por Papaprodromou em 2001 (US 6203796), o qual demonstrou, por meio de estudo de casos, a eficácia do tratamento de dores associada a artrite, enxaqueca, dores de cabeça, injúrias e dores musculares.

As propriedades analgésicas do carvacrol isolado também tem sido descritas na literatura, através de estudos pré-clínicos, os quais mostraram que este monoterpeno apresenta atividade antinociceptiva em vários modelos de nocicepção aguda, mediada pelo envolvimento de mecanismos centrais e periféricos (GUIMARÃES, *et al.* 2010, 2012a), sendo também capaz de reduzir a nocicepção orofacial induzida por diferentes agentes álgicos (GUIMARÃES *et al.*, 2012b)

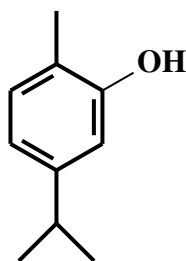


Figura 1: Estrutura química do carvacrol.

Com o objetivo de investigar o efeito de um gel tópico com base em carvacrol e chalconas na doença periodontal experimental em ratos, Botelho et al. (2008) trataram os animais com o gel logo após à indução da doença periodontal três vezes ao dia durante onze dias. Após esse tempo realizaram a mensuração da perda óssea, atividade da mieloperoxidase e a avaliação da flora bacteriana através da cultura do tecido gengival. Encontraram uma perda óssea alveolar significativamente ($p < 0,05$) inibida pelo gel de carvacrol e chalconas em comparação com os grupos não tratados e que utilizaram apenas o veículo. O tratamento com o gel reduziu a lesão tecidual combinada à diminuição da atividade de mieloperoxidase no tecido gengival e inibiu o crescimento de microrganismos orais, bem como diminuiu a perda de peso. Concluíram que o gel de carvacrol e chalconas tem um efeito benéfico sobre a doença periodontal neste modelo.

Botelho *et al.* (2009), com o objetivo de testar um gel de carvacrol e determinar a sua eficácia na prevenção da perda óssea alveolar induziu periodontite em ratos Wistar e posteriormente tratou com gel de carvacrol tópico e utilizou veículo como controle. Observaram que a perda óssea alveolar foi significativamente inibida pelo grupo tratado com gel de carvacrol em comparação com o grupo veículo, histopatologicamente o tratamento reduziu a lesão tecidual com preservação do periodonto, a atividade de mieloperoxidase em tecido gengival diminuiu e também impediu a proliferação de microrganismos periodontais e perda de peso. Concluíram que o gel de carvacrol mostrou atividade anti-inflamatória e antibacteriana em periodontite experimental mostrando uma potencial ação terapêutica.

Guimarães *et al.* (2010) examinaram as propriedades antioxidantes *in vitro* e o efeito antinociceptivo do carvacrol em vários modelos de dor em ratos. O carvacrol

apresentou um forte potencial antioxidante e atividade contra o sequestro de óxido nítrico além de impedir a peroxidação lipídica *in vitro*. No modelo de indução de contorções abdominais por ácido acético, o carvacrol (25, 50 e 100 mg/Kg, ip) reduziu ($p < 0,001$) o número de contorções em comparação com o grupo controle, sem a participação de opiáceos. No teste da formalina, o carvacrol também inibiu significativamente a (dor neurogênica) precoce e tardia (dor inflamatória), com valores percentuais de inibição de 56,8% (100 mg/Kg) para a fase neurogênica e 41,2% (25 mg/Kg), 73,8% (50 mg/Kg) e 99,7% (100 mg/Kg) para a fase inflamatória. O carvacrol também inibiu significativamente a dor provocada pela capsaicina (63,1, 67,1 e 95,8%, $p < 0,001$) e glutamato (46,4, 61,4 e 97,9%, $p < 0,01$). Quando avaliada em um modelo de dor térmica, o carvacrol (100 mg/Kg, i.p.) causou um aumento significativo ($p < 0,05$) na resposta de latência no teste da placa quente.

Guimarães *et al.* (2012a), testaram a atividade antihipernociceptiva do carvacrol em camundongos, através de modelos de hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina, e o envolvimento de mediadores importantes da mesma cascata de sinalização, tal como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostaglandina E2 (PGE2) e dopamina, foram avaliadas. Também foi investigado o efeito anti-inflamatório do carvacrol no modelo de pleurite induzida por carragenina e no edema da pata, e observaram que o lipopolissacarídeo (LPS) induziu a produção de nitrito em macrófagos murinos. O pré-tratamento sistêmico com o carvacrol (50 ou 100 mg/Kg, ip) inibiu o desenvolvimento de hipernocicepção mecânica e edema induzido pela carragenina e TNF- α , no entanto, nenhum efeito foi observado no modelo de hipernocicepção induzida por PGE2 e dopamina. Além disso, o carvacrol diminuiu significativamente os níveis de TNF- α no lavado pleural e suprimiu o recrutamento de leucócitos, sem alterar o perfil da morfologia de células. Carvacrol (1, 10 e 100 mg/mL) também reduziu significativamente ($p < 0,001$) a produção de nitrito induzida por LPS *in vitro* e não produziu citotoxicidade nos macrófagos murinos peritoneais *in vitro*. A atividade locomotora espontânea dos ratos não foi afetada pelo carvacrol. Concluíram que os efeitos benéficos do carvacrol em hipernocicepção mecânica e inflamação indicam que o monoterpene pode ser potencialmente interessante para o desenvolvimento de novas ferramentas de tratamento de condições dolorosas, incluindo aquelas relacionadas a estados inflamatórios e pró-oxidantes.

Guimarães *et al.* (2012b) avaliaram o efeito antinociceptivo do carvacrol em modelos de nocicepção orofacial induzida por formalina, capsaicina, e glutamato. Ratos machos foram pré-tratados com carvacrol [25, 50 e 100 mg/Kg de peso corporal (PC), por via intraperitoneal (i.p.)], morfina (5 mg/Kg de peso corporal, i.p.) ou veículo (água destilada + uma gota de 0,3% de cremophor em água destilada), antes da injeção de formalina (20 μ l, 2%), capsaicina (20 μ L, 2,5 μ g) ou glutamato (40 μ l, 25 μ M) no lábio superior direito. Os autores encontraram que o pré-tratamento com carvacrol foi eficaz na redução do comportamento de coçar a face em ambas as fases do ensaio de formalina e também produziu um efeito antinociceptivo significativo em todas as doses nos ensaios capsaicina e glutamato. Além disso, mostraram que a ação de carvacrol sobre o sistema nervoso central (SNC) não afetou estes resultados, uma vez que este composto não exerceu um efeito depressor significativo do SNC, tal como demonstrado pela hipnose induzida por pentobarbital. Sugeriram então, que o carvacrol pode representar uma importante ferramenta para o tratamento da dor orofacial.

Lima *et al.* (2013) investigaram a ação anti-inflamatória do carvacrol na modulação de citocinas em um modelo de indução de inflamação na pata de camundongos com adjuvante completo de Freund (CFA). O edema da pata foi medido e o tecido foi removido 2h após o estímulo inflamatório para determinar os níveis de prostaglandina E(2) (PGE (2)) por imunoensaio de enzima, os níveis de interleucina-1 β (IL-1 β), factor de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10) por meio de ELISA, ou a expressão de mRNA de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), IL-1 β , TNF- α , e IL-10 por PCR em tempo real. A administração de carvacrol produziu efeitos anti-inflamatórios contra a inflamação induzida por CFA. O tratamento com o carvacrol nas doses de 50 e 100 mg/Kg atenuou o edema da pata e reduziram os níveis de IL-1 β e PGE (2), mas não TNF- α . Da mesma forma, o carvacrol (100 mg/Kg) reduziu a COX-2 e a expressão do mRNA de IL-1 β . Os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, e a expressão do mRNA de IL-10 na pata inflamada foram reforçados por carvacrol. Os autores sugeriram então, que o carvacrol provoca efeitos anti-inflamatórios através da redução da produção de mediadores inflamatórios, tais como a IL-1 β prostanoídes e, possivelmente através de indução de liberação de IL-10.

2.4 Incorporação de fármacos em lipossomas

Liolios *et al.* (2009) relataram que a incorporação de óleos essenciais e seus componentes em lipossomas além de facilitar a penetração cutânea promove a necessária proteção do fármaco frente à oxidação. Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisas e aplicações terapêuticas (NEW, 1990; PUISIEUX, *et al.*, 1995; EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Estas vesículas são constituídas basicamente por fosfolipídeos (podendo ser de natureza sintética ou natural), esteróis e um antioxidante (VEMURI; RHODES, 1995). Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina e fosfatidilglicerol, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa.

Liolios, *et al.*, (2009) analisaram a composição química dos óleos essenciais de *Origanum dictamnus* L. (selvagem e planta cultivada orgânica) e identificaram carvacrol, timol, p-cymeno, e c-terpineno como principais componentes. Estes, foram encapsulados com êxito em lipossomas de fosfatidilcolina para melhorar a sua atividade antioxidante e antimicrobiana e testados contra microbiota selecionada. As propriedades antimicrobianas dos óleos foram ensaiados por técnica de difusão de contra quatro bactérias Gram positivas e Gram negativas e três fungos patogênicos humanos, bem como os agentes patogênicos de origem alimentar, *Listeria monocytogenes*. A percentagem de carvacrol encapsulado, o principal componente do óleo, foi determinado por GC-FID. A fim de investigar um possível efeito sinérgico ou antagonista entre o carvacrol / timol e carvacrol / c-terpineno, as atividades antimicrobianas das misturas, também foram determinados antes e depois da encapsulação em lipossomas. Todos os compostos testados apresentaram atividades antimicrobianas melhoradas após a encapsulação. Finalmente, em todos os casos, a atividade antioxidante utilizando calorimetria exploratória diferencial foi estudada, a fim de adquirir conhecimento sobre a sua estabilidade à oxidação. Concluíram que houve aumento na atividade antimicrobiana, após a encapsulação em lipossomas, podendo promover a utilização dos lipossomas como potente agente conservante, não só na indústria alimentar, mas também em produtos cosméticos e medicamentos.

Uma das principais vantagens da utilização de lipossomas como transportadores é a facilidade de incorporação de fármacos. A função dos lipossomas como veículos é liberar determinadas concentrações de fármacos em alvos específicos, evitando a toxicidade sistêmica (HAYWARD; SMITH, 1990). Na área farmacêutica, os lipossomas vêm sendo utilizados, tanto para aumentar a incorporação de substâncias ativas às células, quanto como veículo para liberação controlada de princípios ativos (SUZUKI; SAKON, 1990; MAGDASSI; BACH; MUMCUOGLU, 1997). As principais vantagens do emprego de lipossomas para a administração de agentes tópicos são o fato de apresentar alta afinidade pelas membranas biológicas (CITERNESI; SCIACCHITANO, 1995). Imbert, *et al.* (1994) citam que os lipossomas aumentam as concentrações do princípio ativo de forma local, sendo empregados principalmente para a aplicação de antimicóticos, antiinflamatórios e retinóides.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do gel contendo lipossomas contendo carvacrol administrado de forma tópica sobre a nocicepção orofacial em camundongos

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um gel contendo lipossomas incorporados com carvacrol;
- Determinar o tamanho das partículas, pH e a viscosidade do gel contendo lipossomas com carvacrol;
- Caracterizar o gel por técnicas termoanalíticas o gel inerte e contendo lipossomas com carvacrol;
- Avaliar a ação antinociceptiva local do gel contendo carvacrol carregado em lipossomas na nocicepção orofacial induzida por formalina;
- Avaliar a ação local do gel contendo carvacrol carregado em lipossomas na quantificação da enzima mieloperoxidase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação dos lipossomas contendo carvacrol

Os géis foram preparados nas concentrações de 1 e 5%. Para a preparação dos lipossomas contendo carvacrol a 1% foram utilizados 20mg de carvacrol e 240mg de fosfolípídeo e, para a preparação dos lipossomas contendo carvacrol a 5%, foram utilizados 100 mg carvacrol e 1200 mg de fosfolípídeo

Foram pesadas as quantidades respectivas de carvacrol e fosfolípídeo, em seguida, estes foram dissolvidos em uma solução 3:1 clorofórmio:metanol (sendo utilizados 100 mL para o preparo do lipossoma a 1% e 200 mL para o de 5%). A mistura foi levada ao rotaevaporador sob 300 rpm, onde permaneceu até que todo o solvente fosse evaporado e houvesse a formação de um filme na parede do balão.

Depois disso, adicionou-se 15 mL de água destilada para hidratar o filme e foi realizada agitação manual até o desprendimento total da parede do balão. Logo após, a mistura foi levada ao banho de ultrassom (sonicador) onde ficou por 30 min, de acordo com o método de hidratação do filme lipídico foi preconizado por Liolios *et al.* em 2009. Em seguida a mistura foi congelada e liofilizada.

4.2 Caracterização físico-química dos lipossomas

A determinação do tamanho de partículas foi realizada utilizando potencial zeta dos lipossomas a partir da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês, *dynamic light scattering*) em equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments, com laser de comprimento de onda de 633 nm. As medidas foram realizadas a 25°C.

4.3 Preparação do gel

O gel foi preparado a partir da adição com aquecimento em banho-maria do metilparabeno em água. Após a dissolução deste, foi adicionado Carbopol, e a mistura mantida sob agitação até a formação do gel. Uma vez formado, o mesmo foi resfriado até 40°C e mantido em agitação até completa homogeneização. A primeira parte do gel foi armazenada a 4°C, sendo considerado o placebo (grupo controle). À segunda parte do gel foram adicionados lipossomas com carvacrol a 1% (após

liofilização) e à terceira parte, lipossomas com carvacrol a 5% sob agitação leve em temperatura de 40°C. Os géis contendo lipossomas com carvacrol a 1 e 5% (grupos teste), assim preparados, foram mantidos sob refrigeração a 4°C até a realização dos ensaios *in vivo*.

4.4 Caracterização físico-química dos géis

As curvas Termogravimétricas/Termogravimétrica derivadas (TG/DTG) foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 900°C, utilizando-se termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, utilizando cadinho de platina contendo massa de amostra em torno de 3 mg. Antes dos ensaios verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monoidratado conforme norma ASTM (E1582 – 93).

As curvas DSC foram obtidas em Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC-50) da marca Shimadzu, utilizando uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, massa de amostra em torno de 2 mg, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) e porta amostra de alumínio fechada.

As análises do pH foram obtidas em pHômetro PHS-3B da PHTEK.

4.5 Ensaios *in vivo*

4.5.1 Animais

Foram utilizados vinte e quatro camundongos *Swiss* (n=6), machos (30 a 40 g) provenientes do Biotério Central da UFS. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro (12h), sendo oferecida alimentação e água, “*ad libitum*”.

Os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes propostas pelo Comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para o estudo da dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Esta pesquisa teve início após parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, CEPA (Protocolo de número 54/2012 – ANEXO I).

4.5.2 Material

Foram utilizados os seguintes reagentes: formalina 2% (consiste na diluição de formaldeído a 37% em solução de NaCl 0,9%), Cataflan emulgel (diclofenaco dietilamônio a 1,16%, Novartis) , e Carvacrol (98% (+), FCC SAFC, Aldrich).

4.5.3 Avaliação da atividade antinociceptiva

Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara entre 7 e 12 h em uma sala apropriada, com temperatura controlada em $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ROSLAND, 1991). Para a análise comportamental foi utilizada uma câmara de observação (30x30x30 cm) com base e laterais espelhadas e frente de vidro. Imediatamente antes do experimento, cada animal foi inicialmente colocado e mantido na câmara por 10 minutos para habituar-se ao local de experimentação e minimizar o estresse do ambiente.

4.5.3.1 Teste de nocicepção orofacial induzida por Formalina

O teste consistiu na injeção subcutânea de formalina 2% no lábio superior, conforme descrito por Luccarini *et al.* (2006). Inicialmente, os animais foram, 60 ou 120 minutos (no caso da droga de referência) antes da indução da nocicepção por formalina, gentilmente imobilizados para que fosse feita a aplicação tópica, na região do lábio superior direito em uma área de 1 cm^2 , do gel contendo carvacrol (1 e 5%), da droga referência (Diclofenaco dietilamônio gel a 1,16%) ou do gel de carbopol. A aplicação tópica foi realizada com o dedo indicador massageando a área do lábio superior por cinquenta vezes conforme descrito por Calvo (2006). Em seguida, foi induzida a nocicepção utilizando-se o agente álgico formalina e, posteriormente as respostas comportamentais nociceptivas quantificadas em dois períodos, de 0-5 minutos e de 15-40 minutos. Foi registrado, com auxílio de um cronômetro digital, o tempo em que o animal permaneceu friccionando a área injetada (região orofacial) com as patas traseiras e/ou dianteiras.

4.5.3.2 Ensaios *in vitro* – atividade da enzima mieloperoxidase

Após 4 horas da realização dos testes de nocicepção orofacial, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e em seguida foi realizada a remoção de tecido labial para a quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO), um marcador indireto do acúmulo de neutrófilo. Após a eutanasia foi removido o tecido sobre o qual foi administrado o agente álgico que foi congelado para posterior determinação da atividade de mieloperoxidase. O tecido coletado foi mantido à -70°C até sua análise. O processo de análise foi realizado com a diluição do tecido em tampão fosfato (pH 6,0) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio e aquecido a 60°C por 2 horas (para inativar a catalase endógena). Foi feita a centrifugação por 2 min e após esse tempo foi realizada a medida da atividade da MPO de acordo com o método descrito por Bradley, *et al.* (1982).

4.6 Eutanásia e descarte de carcaças

Como procedimento de rotina, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Após a eutanásia, as carcaças foram embrulhadas em jornal, colocadas em saco plástico apropriado para lixo infectante e, posteriormente, acondicionadas em freezer aguardando a coleta de lixo biológico da UFS.

4.7 Análise estatística

A comparação das respostas comportamentais nociceptivas entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste de análise de variância ANOVA de uma via. Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste de Tukey. Para todos os testes, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Os dados foram apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média. O programa utilizado para a realização dos cálculos estatísticos foi o *GraphPad Prism* versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização físico-química do gel contendo lipossomas com carvacrol

A análise do gráfico de distribuição do tamanho de partículas por Zetasizer nos permitiu obter o valor do tamanho médio das vesículas de 98 nm (Figura 2). A dispersão lipossomal apresentou uma viscosidade de 0,8872 cP (centiPoise), indicando que as vesículas apresentaram uma distribuição relativamente uniforme.

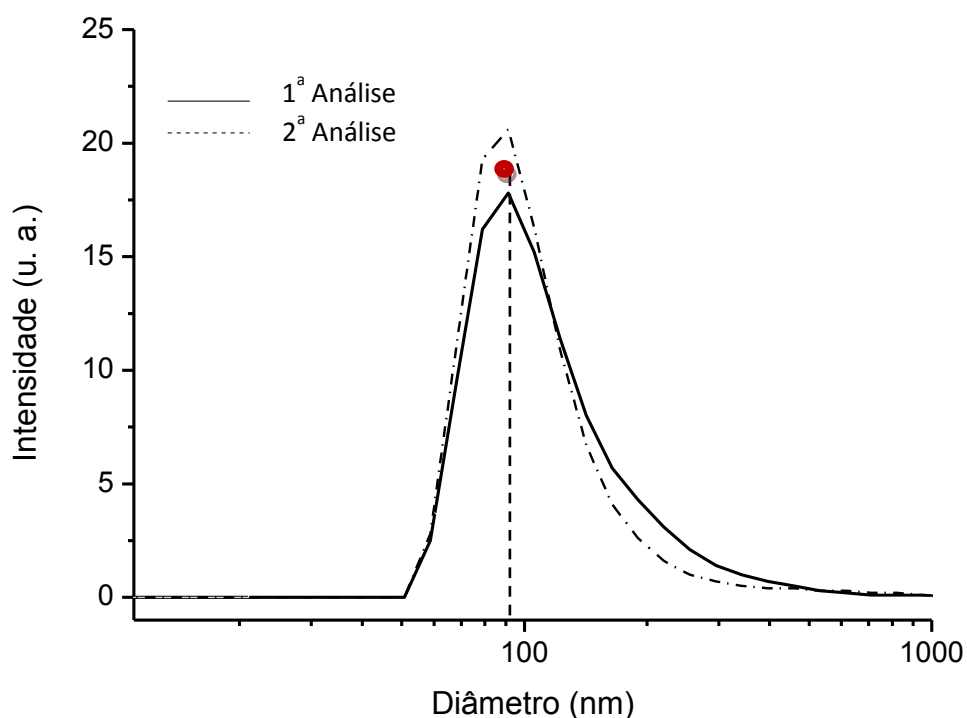


Figura 2. Distribuição do tamanho de partícula dos lipossomas contendo carvacrol determinados utilizando aparelho Zetasizer® (Nano-ZS90, Malvern Instruments, United Kingdom), na temperatura de 25°C.

Na Figura 3 são apresentadas as curvas termogravimétricas e termogravimétricas derivadas do gel utilizado como controle e dos géis contendo carvacrol a 1% e 5%. De acordo com essa figura pode-se observar que para uma mesma faixa de temperatura houve uma maior perda de massa a medida que aumentou-se a concentração de carvacrol no sistema. O fator do carvacrol apresentar-se como um componente com maior volatilidade mostra que na mesma

faixa de temperatura (até 200°C) ocorre uma maior perda de massa do material, o que sugere a liberação do carvacrol nas formulações.

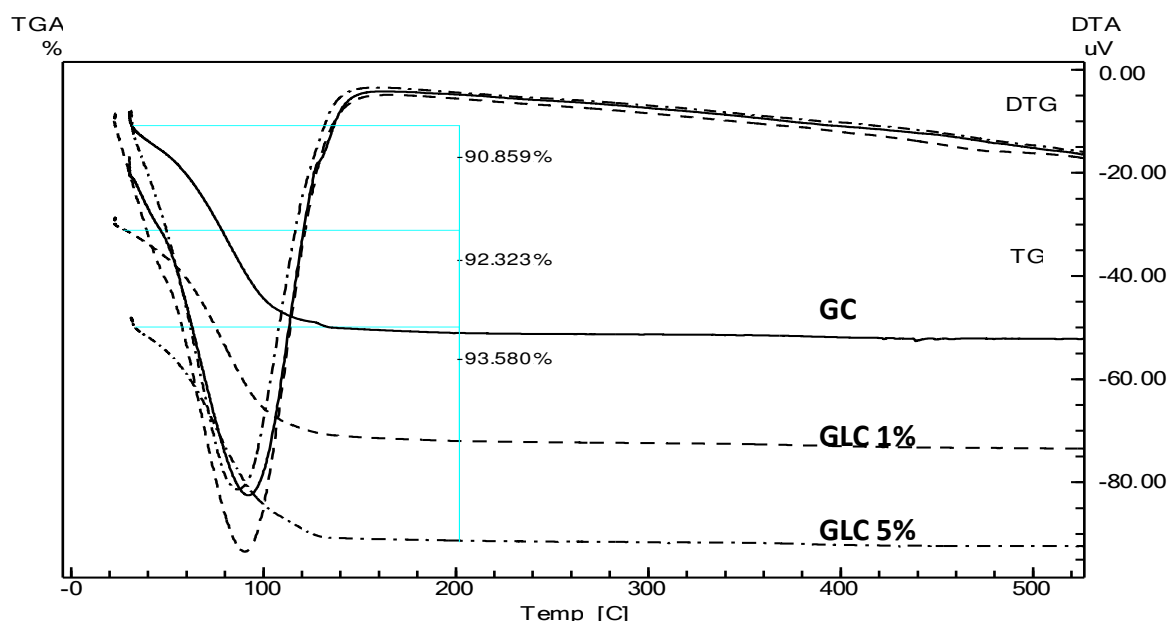


Figura 3. Curvas TG/DTG das amostras dos géis obtidas na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$)

A Figura 4 apresentada a seguir mostra as curvas DSC do gel de carbopol e dos géis de carbopol contendo lipossomas com carvacrol na concentrações de 1 e 5%. De acordo com a Figura 4 pode-se observar que houve mudança no perfil das preparações quando se compara o gel de carbopol inerte e os géis de lipossomas contendo carvacrol. O gel de carbopol inerte possui uma banda larga em torno de 81°C característico da eliminação da água. Os géis contendo lipossomas apresentaram um processo de eliminação de água bem mais lento e não mostrou um evento endotérmico pronunciado na mesma faixa de temperatura. Além disso, o gel a 5% mostrou um pico em 106°C , que pode sugerir a eliminação do carvacrol, já que o mesmo está em uma maior proporção nesta preparação, devendo este evento ser investigado com maior detalhe em estudos posteriores.

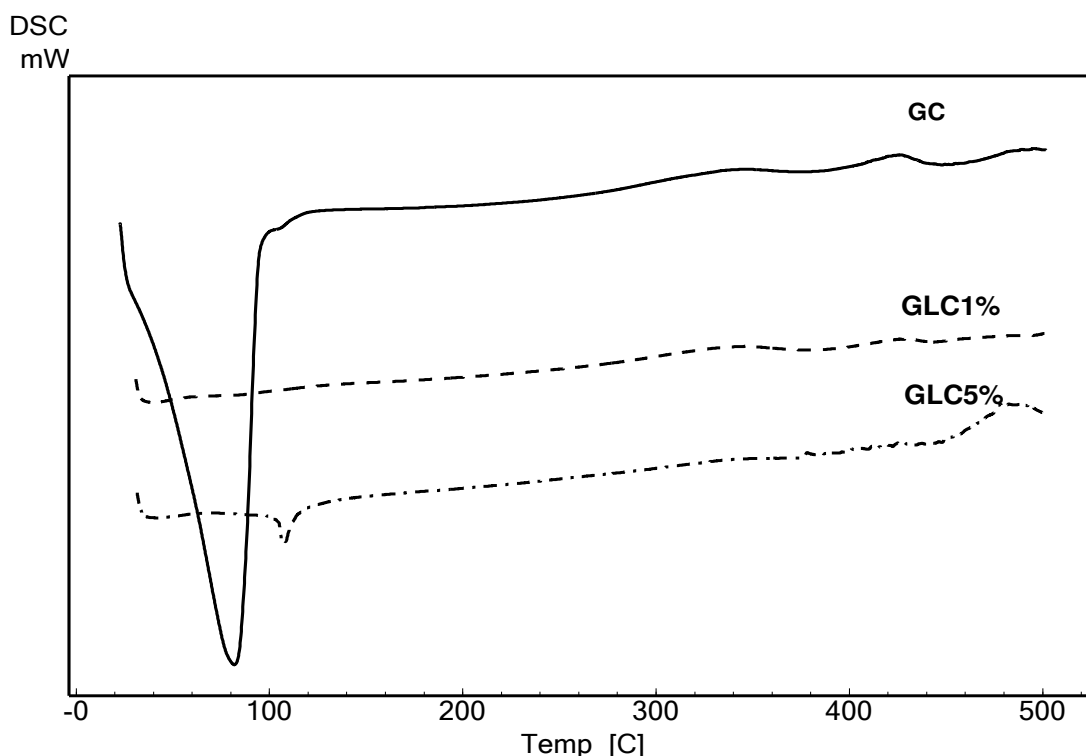


Figura 4. Curvas DSC das amostras dos géis de carbopol inerte e dos géis contendo lipossomas de carvacrol na concentração de 1 e 5%, obtidas na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$).

Além disso, foi determinado o valor do pH para cada tipo de gel preparado. O valor do pH encontrado foi de 6,78 para o gel de carbopol inerte (GC), 6,86 para o gel de lipossomas contendo carvacrol a 1% e de 6,92 para o gel de lipossomas contendo carvacrol a 5%. Isso mostra que a adição do carvacrol não provoca alterações significativas no pH das preparações.

5.2 Atividade antinociceptiva do gel contendo lipossomas com carvacrol

A aplicação tópica do gel de lipossomas contendo carvacrol 1%, uma hora antes da administração de formalina 2% na região orofacial, não foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo na primeira fase da formalina (Figura 5A), porém, foi capaz de reduzir de maneira significativa ($p < 0,001$) o comportamento nociceptivo apresentado pelos animais durante a segunda fase do teste ($34,4 \pm 4,6 \text{ s}$), quando comparado aos animais submetidos a aplicação do gel de carbopol ($74,1 \pm 4,6 \text{ s}$).

Este efeito foi equivalente à administração de diclofenaco dietilamônio gel, os quais promoveram uma redução estatisticamente significativa ($34,0 \pm 7,3$ s, $p < 0,001$) da resposta comportamental nociceptiva caracterizada pelo ato do animal coçar a região orofacial (Figura 5B). Ainda, o gel contendo carvacrol na concentração de 5% não foi capaz de reduzir de forma estatisticamente significativa o comportamento nociceptivo em nenhuma das fases do teste da formalina.

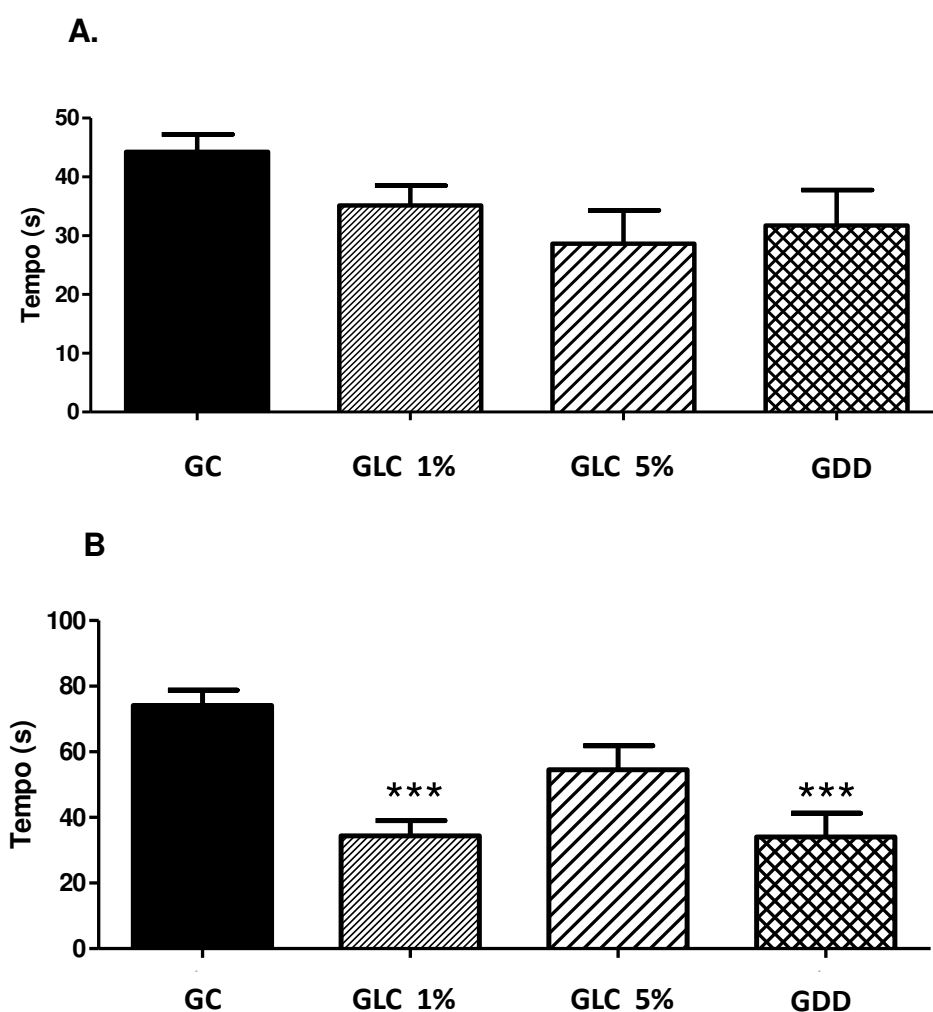


Figura 5. Efeito antinociceptivo da aplicação tópica do gel de lipossomas contendo carvacrol (GLC 1% e 5%) na 1ª fase (A) e 2ª fase (B) do teste da nocicepção orofacial induzida por formalina 2%. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média do tempo de coçar a região orofacial. $n=6$, *** $p < 0,001$, em relação ao grupo controle (GC).

Na Figura 6, foi verificado o efeito do gel sobre a atividade da enzima mieloperoxidase, o qual é um marcador de resposta inflamatória encontrado predominantemente dos grânulos de neutrófilos e monócitos, sendo liberada imediatamente após a ativação destas células, contribuindo para a defesa do organismo (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Após a administração tópica de formalina na região perinasal ocorreu um aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido, em virtude da infiltração de neutrófilos provocada por este agente nociceptivo. O gel de carvacrol 1% foi capaz de reduzir de maneira significativa ($p < 0,05$) a atividade da enzima MPO ($0,7 \pm 0,1$ UMPO/mg de tecido) quando comparado com o controle ($2,0 \pm 0,3$ UMPO/mg de tecido), de forma semelhante ao gel de diclofenaco dietilamonio ($0,5 \pm 0,2$ UMPO/mg de tecido).

Este resultado indica que o gel contendo lipossomas contendo carvacrol exerce um importante efeito sobre a migração células, principalmente dos leucócitos polimorfonucleares.

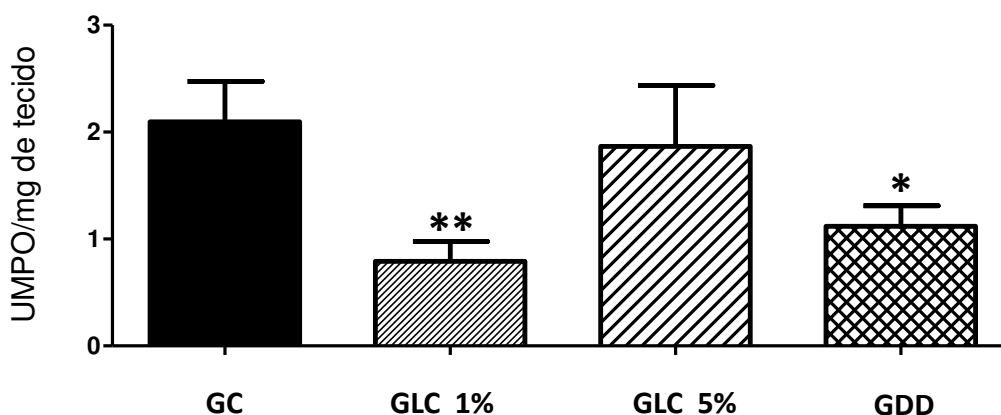


Figura 6. Efeito da aplicação tópica do gel contendo lipossomas com carvacrol (GLC 1% e 5%) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no lábios dos animais submetidos ao teste da nocicepção orofacial induzida por formalina 2%. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média do MPO/mg de tecido. $n=6$, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, em relação ao grupo controle (GC).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi desenvolvido um gel contendo lipossomas com carvacrol, o qual foi caracterizado físico-quimicamente e testado quanto à sua ação tópica na nocicepção orofacial. Como principais achados podemos destacar que as vesículas de lipossomas contendo carvacrol apresentaram distribuição uniforme, que o valor do pH encontrado tanto para o gel do grupo controle (GC – 6,78), quanto para os grupos teste (GLC 1% - 6,86 e GLC 5% - 6,92) são próximos ao valor do pH da pele (4,6 – 5,8) e que o gel contendo carvacrol 1% foi capaz de reduzir significativamente o comportamento nociceptivo na segunda fase do teste da formalina e reduzir a atividade da enzima mieloperoxidase.

O pH, isto é, a concentração hidrogeniônica da superfície cutânea é um importante indicador funcional da pele, devendo-se à produção de ácido láctico e conferindo à superfície cutânea aquilo que se convencionou designar por “manto ácido cutâneo” (ZLOTOGORSKI, 1987). Assim sendo, a pele apresenta pH levemente ácido (4,6 – 5,8), que contribui para que ocorra proteção bacteriana e fúngica em sua superfície (RODRIGUES, 1996; PINTO, GALEGO, SILVA, 1997; LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). Visto isso, os achados desse estudo mostram que o pH levemente ácido tanto do gel de carbopol inerte quanto dos géis de lipossomas contendo carvacrol a 1 e 5% podem ser utilizados topicamente sem causar prejuízo à superfície cutânea.

A formalina quando administrada subcutaneamente na região orofacial promove uma resposta nociceptiva bifásica (LUCCARINI *et al.*, 2006). A primeira fase (0 – 5 min) corresponde a estimulação direta dos nociceptores (SHIBATA *et al.*, 1989) sendo, por esta razão, sensível apenas a analgésicos que atuam no SNC (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). Posteriormente, segue-se o período de interfase (15 min), o qual resulta da inibição da excitabilidade dos nociceptores (TJOLSEN *et al.*, 1992). A segunda fase é derivada da sensibilização dos nociceptores e ação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina (5-HT), bradicinina, e prostaglandinas liberadas como resultado da injúria tecidual (HENRY *et al.*, 1999). Esta etapa da resposta nociceptiva pode ser inibida por AINES e fármacos opióides (HUNSKAAR *et al.*, 1985).

No presente estudo, a aplicação tópica do gel contendo lipossomas com carvacrol reduziu o comportamento nociceptivo na segunda fase do teste da formalina bem como atividade da enzima mieloperoxidase, um marcador indireto da inflamação. Diversos estudos pré-clínicos têm demonstrado os benefícios do carvacrol no controle da dor e inflamação (LIMA *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2010; 2012a; 2012b). Este monoterpene é um potente supressor da enzima COX-2, sendo seu efeito anti-inflamatório associado a redução dos níveis de mediadores como prostanóides (PGE₂) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α) (LIMA *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2012a, HOTTA *et al.*, 2010).

Lima *et al.* (2013) relacionam este efeito modulador da liberação de mediadores inflamatórios à capacidade do carvacrol de estimular a liberação de IL-10. De fato, a IL-10 atua como uma citocina anti-inflamatória potente, a qual suprime a ativação e função das células do sistema imunológico e bloqueia seletivamente a expressão de citocinas pró-inflamatória (MOORE *et al.*, 2001), incluindo IL-1 β (KARAM *et al.*, 2007).

Além disso, o carvacrol é um agonista dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) (HOTTA *et al.*, 2010). Este receptor é um fator de transcrição dependente de ligante pertencente a família de receptores nucleares (MANGELSDORF *et al.*, 1995) e seus agonistas, tais como os AINES, exercem efeito anti-inflamatório através da supressão da COX-2 e liberação de mediadores inflamatórios (PANG *et al.*, 2003; INOUE; TANABE; UMESONO, 2000). Adicionalmente, estes receptores uma vez ativados, são capazes de inibir o fator de transcrição NF- κ B, inibindo a expressão de diversas moléculas associadas ao desenvolvimento e manutenção de processos inflamatórios, como citocinas, prostanóides e NO (MORAES *et al.* 2006). Neste sentido, outro fator contribuinte para a atividade farmacológica observada é a forte ação antioxidante do carvacrol (GUIMARÃES *et al.*, 2010; MASTELIC *et al.*, 2008), a qual pode contribuir significativamente para o controle da dor e inflamação.

A gama de propriedades farmacológicas descritas para o carvacrol torna-o uma molécula de interesse para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, como tem sido observado na literatura (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Um exemplo da aplicabilidade de formulações compostas por carvacrol foi descrita por Botelho *et al.*

(2008), os quais demonstraram que a administração local de gel dental contendo carvacrol foi capaz de reduzir o processo inflamatório em modelos experimentais de periodontite. Neste estudo, o carvacrol reduziu a infiltração de neutrófilos, a qual foi evidenciada através da medida da atividade da enzima MPO e análise histopatológica do tecido gengival. Esses resultados corroboram os obtidos no presente estudo.

Mais recentemente, Liolios *et al.* (2009) desenvolveram lipossomas contendo carvacrol e demonstraram os benefícios deste sistema aplicado à otimização do uso dos monoterpenos obtidos a partir de óleos essenciais. Neste estudo foi observado que o carvacrol, quando encapsulado em lipossomas, apresentou melhor ação antioxidante e antimicrobiana. Desta forma, são inúmeras as vantagens da utilização da encapsulação com lipossomas destacando-se o aumento da estabilidade, devido a sua capacidade de diminuir a reatividade do composto ao ambiente (água, oxigênio, luz), diminuição da evaporação, mascara o sabor e aumenta a solubilidade e biodisponibilidade dos compostos nos sítios alvos (SHOJI; NAKASHIMA, 2004; GIBBS *et al.*, 1999; VERSIC, 1988).

Esta estratégia da indústria farmacêutica confere uma alternativa para o desenvolvimento de novas formulações destinadas ao controle da dor, a exemplo do lipossoma de bupivacaína, que teve seu efeito anestésico prolongado acompanhado da redução dos efeitos colaterais (CHAHAR; CUMMINGS, 2012).

Um fator intrigante, no entanto, é a ausência de efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios na concentração de 5%. Em estudo recente, Ozkan e Erdogan (2013) estudaram a atividade pró-oxidante e antioxidante do carvacrol e do timol em células humanas de câncer do pulmão resistentes a fármacos. Encontraram que o carvacrol age tanto com protetor quanto como agressor das células dependendo da sua concentração e sugerem que o carvacrol e timol apresentam efeitos de proteção ou efeito prejudicial dependendo da sua concentração e do tempo. Demonstraram ainda um efeito pró-oxidante do carvacrol em concentrações mais altas e anti-oxidante em concentrações mais baixas.

Neste sentido, os resultados significativos observados pelo tratamento tópico com gel de lipossomas contendo carvacrol na segunda fase do teste de nocicepção

orofacial induzida por formalina, bem como sua capacidade de suprimir a infiltração celular, reitera a contribuição deste monoterpene aplicado topicamente no controle de nocicepção inflamatória podendo fornecer uma nova opção terapêutica para processos dolorosos associados a região orofacial.

7 CONCLUSÃO

O gel contendo lipossomas com carvacrol que foi desenvolvido apresentou vesículas com distribuição de tamanho uniforme e na concentração de 1% demonstrou ação antinociceptiva, quando aplicado topicamente, sobre a nocicepção orofacial e diminuiu a migração de neutrófilos mensurada indiretamente por meio da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase. Na concentração de 5%, o gel contendo lipossomas com carvacrol não apresentou atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine** v.8; p.310-322; 2001.

ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **J Mater Sci Mater Med**, v.21, n.7, p.2227-2236, Jul 2009.

ALVES NETO, O. Dor: princípios e prática. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ANDERSON, L. C.; VAKOULA, A.; VEINOTE, R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Arc Oral Biology**, v. 48, n. 2, p. 161–169, Fev 2003.

ARABSHAHI, B., DEWITT, E.M.; CAHILL, A.M.; KAYE, R.D.; BASKIN, K.M.; TOWBIN, R.B.; CRON, R.Q. Utility of corticosteroid injection for temporomandibular arthritis in children with juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Rheum**, v.52, n.11, p.3563-3569, Nov 2005.

ARAMORI, I.; NAKANISHI, S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. **J Biol Chem**, v. 267, n. 18, p. 12468–12474, Jun 1992.

ASAKO, H.; KUBES, P.; WALLACE, J.; GAGINELLA, T.; WOLF, R.E.; GRANGER, D.N. Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxigenase products. **Am J Physiol**, v. 262, n. 5Pt1, p. G903–908, Mai 1992.

ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharm Sci Technolo Today**, v.3, n.1, p.36-41, Jan 2000.

AYDIN, S.; OZTURK, Y.; BEIS, R.; BASER, K.H.C. Investigation of Origanum Onites, Sideritis congesta and Satureja cuneifolia essential oils for analgesic activity. **Phytother Res**, v.10, p.342–344, 1996.

BAJIC, D.; PROUDFIT, H. K. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. **J Comp Neurol**, v. 405, n. 3, p. 359–379, Mar 1999.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food chem toxicol**, v.46; n.2; p.446-475, 2008.

BANDELL, M.; STORY, G.M.; HWANG, S.W.; VISWANATHAN, H.V.; EID, S.R.; PETRUS, M.J.; EARLEY, T.J.; PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, n. 6, p. 849–857, Mar 2004.

BARROS V.DE.M.; SERAIDARIAN, P.I.; CORTES, M.I.; DE PAULA, L.V. The impact of orofacial pain on the quality of life of patients with temporomandibular disorder. **J Orofac Pain**, v.23, n.1, p.28-37, 2009.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur J Pharm Sci**, v.14, n.2, p.101-114, Set 2001.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, Out 2009.

BASER, K.H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Curr Pharm Des**, v.14, n.29, p.3106-3119, 2008.

BEKKERING, G. E.; BALA, M.M.; REID, K.; KELLEN, E.; HARKER, J.; RIEMSMA, R.; HUYGEN, F.J.; KLEIJNEN, J. Epidemiology of chronic pain and its treatment in The Netherlands. **Neth J Med**, v. 69, n. 3, p. 141–153, Mar 2011.

BESTER, H.; CHAPMAN, V.; BESSON, J.M.; BERNARD, J.F. Physiological Properties of the Lamina I Spinoparabrachial Neurons in the Rat. **J Neurophysiol**, v.83, n.4, p. 2239–2259, Abr 2000.

BIGNOLD, L.P.; LYKKE, A.W. Increased vascular permeability induced in synovialis of the rat by histamine, serotonin and bradykinin. **Experientia**, v.31, n.6, p.671–672, Jun 1975.

BISGAARD, H. Leukotrienes and prostaglandins in asthma. **Allergy**, v.39, n.6, p.413–420, Ago 1984.

BONJARDIM, L.R.; DA SILVA, A.P.; GAMEIRO, G.H.; TAMBELI, C.H.; FERRAZ DE ARRUDA VEIGA, M.C. Nociceptive behavior induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and a central opioid analgesic. **Pharmacol Biochem Behav**, v.91, n.3, p.321-326, Jan 2009.

BOTELHO, M.A.; RAO, V.S.; MONTENEGRO, D.; BANDEIRA, M.A.; FONSECA, S.G.; NOGUEIRA, N.A.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. **Phytother Res**. v.22, n.4, p.442–449, Abr 2008.

BOTELHO, M.A.; MARTINS, J.G.; RUELA, R.S.; I, R.; SANTOS, J.A.; SOARES, J.B.; FRANÇA, M.C.; MONTENEGRO, D.; RUELA, W.S.; BARROS, L.P.; QUEIROZ, D.B.; ARAUJO, R.S.; SAMPIO, F.C. Protective Effect of Locally Applied Carvacrol Gel on Ligature-induced Periodontitis in Rats: A Tapping Mode AFM Study. **Phytother Res**, v.23; n.10; p.1439-1448; Out 2009.

BOURGEAIS, L.; GAURIAU, C.; BERNARD, J.F. Projections from the nociceptive area of the central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. **Eur J Neurosci**, v.14, n.2, p.229–255, Jul 2001.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v.60; n.3; p.618-622, Set 1982.

BUCKLEY, C.D.; PILLING, D.; LORD, J.M.; AKBAR, A.N.; SCHEEL-TOELLNER, D.; SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends Immunol**, v. 22, n. 4, p.199–204, Abr 2001.

BUNGE, A.L. Release rates from topical formulations containing drugs in suspension. **J Control Release**, v.52, n.1-2, p.141-148, Mar 1998.

CALVO, M.I. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. **J Ethnopharmacol**, v.107, n.3, p.380-382, Out 2006.

CANETTI, C.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B4 mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br J Pharmacol**, v.134, n.8, p.1619–1628, Dez 2001.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol biochem behav**, v.75; n.3; p.501-12; Jun 2003.

CHAHAR, P; CUMMINGS, KC 3rd. Liposomal bupivacaine: a review of a new bupivacaine formulation. **J Pain Res**. v.5, p.257–264, 2012.

CITERNESI, U.; SCIACCHITANO, M. Phospholipid / active ingredient complexes. **Cosm. Toil.**, v.110, n.11, p.57-68, 1995.

CLAVELOU, P.; PAJOT, J.; DALLEL, R.; RABOISSON, P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**, v.103, n.3, p.349–353, Set 1989.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 429, n.1-3, p.161–176, Out 2001.

CROFFORD, L.J.; CASEY, K.L. Central modulation of pain perception. **Rheum Dis Clin North Am**, v.25, n.1, p.1–13, Fev 1999.

CUNHA, T.M.; VERRI JR, W.A.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Nati Acad Sci U S A**, v.102, n.5, p.1755–1760, Fev 2005.

CUNHA, T. M.; VERRI JR, W.A.; SCHIVO, I.R.; NAPIMOGA, M.H.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v.83, n.4, p. 824–832, Abr 2008.

DAMAS, J.; BOURDON, V.; REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. **Br J Pharmacol**, v.101, n.2, p.418–422, Out 1990.

DEMYTTENAERE, K.; BONNEWYN, A.; BRUFFAERTS, R.; BRUGHA, T.; DE GRAAF, R.; ALONSO, J. Comorbid painful physical symptoms and depression:

prevalence, work loss, and help seeking. **J Affect Disord**, v.92, n.2-3, p.185–193, Jun 2006.

DESBOIS, C.; VILLANUEVA, L. The organization of lateral ventromedial thalamic connections in the rat: a link for the distribution of nociceptive signals to widespread cortical regions. **Neuroscience**, v.102, n.4, p.885–898, 2001.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharm acta helv**, v.69; n.1; p.25-28, Jul 1994.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. **Ann N Y Acad Sci**, v.856, p.1–11, Set 1998.

DI RIENZO BUSINCO, L.; DI RIENZO BUSINCO, A.; D'EMILIA, M.; LAURIELLO, M.; COEN TIRELLI, G. Topical versus systemic diclofenac in the treatment of temporomandibular joint dysfunction symptoms. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, v.24, n.5, p.279-283, Out 2004.

DIONNE, R.A. Pharmacologic treatments for temporomandibular disorders. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.83, n.1, p.134-142, Jan 1997.

DUBNER, R.; REN, K. Brainstem mechanisms of persistent pain following injury. **J Orofac Pain**, v.18, n.4, p.299–305, 2004.

DUBOIS, M. Y.; GALLAGHER, R. M.; LIPPE, P. M. Pain medicine position paper. **Pain Med**, v.10, n.6, p.972–1000, Set 2009.

EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J. Analysis of liposomes. **Talanta**, v.68, n.5, p.1432-1441, Fev 2006.

EKBERG, E.C.; KOPP, S.; AKERMAN, S. Diclofenac sodium as an alternative treatment of temporomandibular joint pain. **Acta odontol scand**, v.54; n.3; p.154-159; Jun 1996.

ENDO, Y. Simultaneous induction of histidine and ornithine decarboxylases and changes in their product amines following the injection of escherichia coli lipopolysaccharide into mice. **Biochem Pharmacol**, v.31, n.8, p.1643–1647, Abr 1982.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration “in vivo” by indirect mechanisms. **Agents Actions**, v.30, n.3-4, p.344–349, Jun 1990.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, v.5, n.14, p.1317–1327, Nov 2003.

FREDRIKSSON, L.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Serotonergic mechanisms influence the response to glucocorticoid treatment in TMJ arthritis. **Mediators Inflamm**, v.2005, n.4, p.194-201, Ago 2005.

GABRIEL, S. E.; JAAKKIMAINEN, L.; BOMBARDIER, C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. **Ann Intern Med**, v.115, n.10, p.787–796, Nov 1991.

GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **Int j food sci nutr**, v.50; n.3; p.213-224, Mai 1999.

GILROY, D.W.; COLVILLE-NASH, P.R.; WILLIS, D.; CHIVERS, J.; PAUL-CLARK, M.J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nat Med**. v.5; n.6; p. 698-701; Jun 1999.

GONÇALVES, J.C.R.; OLIVEIRA, F.S.; BENEDITO, R.B.; DE SOUSA, D.P.; DE ALMEIDA, R.N.; DE ARAÚJO, D.A.M. Antinociceptive activity of (-)-carvone. **Biol Pharm Bull**, v.31; n.5; p.1017-1020, Mai 2008.

GONCALVES, D.A.; DAL FABBRO, A.L.; CAMPOS, J.A.; BIGAL, M.E.; SPECIALI, J.G. Symptoms of temporomandibular disorders in the population: an epidemiological study. **J Orofac Pain**, v.24, n.3, p.270-278, 2010.

GORDON, S.M.; MONTGOMERY, M.T.; JONES, D. Comparative efficacy of piroxicam versus placebo for temporomandibular pain. **J Dent Res**, n.69, 1990.

GUIMARAES, A.; MARTINS, A.; PINHO, E.D.; FARIA, S.; REIS, R.L.; NEVES, N.M. Solving cell infiltration limitations of electrospun nanofiber meshes for tissue engineering applications. **Nanomedicine (Lond)**, v.5, n.4, p.539-554, Jun 2010.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.; ARAÚJO, A.A.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v.107; n.6; p.949-957; Dez 2010.

GUIMARÃES, A.G.; XAVIER, M.A.; DE SANTANA, M.T.; CAMARGO, E.A.; SANTOS, C.A.; BRITO, F.A.; BARRETO, E.O.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; OLIVEIRA, R.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.385; n.3; p.253-263; Mar 2012a.

GUIMARÃES, A.G.; SILVA, F.V.; XAVIER, M.A.; SANTOS, M.R.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.G.; OLIVEIRA, A.P.; DE SOUZA, C.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Orofacial analgesic-like activity of carvacrol in rodents. **Z Naturforsch C**. v.67; n.9-10; p.481-485; Set-Out 2012b.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; PEZESHKIAN, S.K. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. **J Ethnopharmacol**, v.82, n.2-3, p.83-87, Out 2002.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 4-5, p. 413–421, Ago-Out 2002.

HARGREAVES, K. M. Orofacial pain. **Pain**, v. 152, n. 3 Suppl, p. S25–32, Mar 2011.

HARKER, J.; REID, K.J.; BEKKERING, G.E.; KELLEN, E.; BALA, M.M.; RIEMSMA, R.; WORTHY, G.; MISSO, K.; KLEIJNEN, J. Epidemiology of chronic pain in denmark and sweden. **Pain Res Treat**, v. 2012, p. 371248, 2012.

HAYWARD, J.A.; SMITH, W.P. Potential of liposomes in cosmetic science. **Cosm. Toil.**, v.105, n.7, p.47-54, 1990.

HELLIWELL, R.J.A.; ADAMS, L.F.; MITCHELL, M.D. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.70, n.2, p.101–113, Feb 2004.

HERSH, E.V.; LALLY, E.T.; MOORE, P.A. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? **Curr Med Res Opin**, v.21, n.8, p.1217-1226, Ago 2005.

HERSH, E.V.; BALASUBRAMANIAM, R.; PINTO, A. Pharmacologic management of temporomandibular disorders. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v.20, n.2, p.197-210, Mai 2008.

HICKEY, K.A.; RUBANYI, G.; PAUL, R.J.; HIGHSMITH, R.F. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. **Am J Physiol**, v. 248, n. 5Pt1, p. C550–556, Mai 1985.

HLA, T.; NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. **Proc Nati Acad Sci of the U S A**, v.89, n.16, p.7384–7388, Ago 1992.

HOTTA, M.; NAKATA, R.; KATSUKAWA, M.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. **J Lipid Res**, v.51; n.1; p.132-139, Jan 2010.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 365–376, Ago 2007.

HUGLI, T. E. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. **Complement**, v. 3, n. 3, p. 111–127, 1986.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Acetylsalicylic acid, paracetamol and morphine inhibit behavioral responses to intrathecally administered substance p or capsaicin. **Life sci**, v.37; n.19; p.1835-1841, Nov 1985.

IMBERT, D.; KANTING, G.B.; WICKETT, R.R. Influence of liposomal encapsulation on the penetration of retinoic acid through human skin *in vitro*. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.45, p.119-134, 1994.

INOUE, H.; TANABE, T.; UMESONO, K. Feedback control of Cyclooxygenase-2 expression through PPAR gamma, **J. Biol. Chem.** v.275, n.36, p.28028-28032, Set 2000.

IRVING, J.; WOOD, G.D.; HACKETT, A.F. Does temporomandibular disorder pain dysfunction syndrome affect dietary intake? **Dent Update**, v.26, n.9, p.405-407, Nov 1999.

JOHN, M.T.; REISSMANN, D.R.; SCHIERZ, O.; WASSELL, R.W. Oral health-related quality of life in patients with temporomandibular disorders. **J Orofac Pain**, v.21, n.1, p.46-54, 2007.

KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Modeling transdermal drug release. **Adv Drug Deliv Rev**, v.48, n.2-3, p.159-172, Jun 2001.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol**, v.24, n.1, p.25-29, Jan 2003.

KARAM, M.C.; HAMDAN, H.G.; ABI CHEDID, N.A.; BODMAN-SMITH, K.B.; BAROODY, G.M. Interleukin-10 reduces hyperalgesia and the level of Interleukin-1beta in BALB/c mice infected with *Leishmania major* with no major effect on the level of Interleukin-6. **J Neuroimmunol** v.183; n.1-2; p.43-49; Fev 2007.

KOIZUMI, T.; NEGISHI, M.; ICHIKAWA, A. Inhibitory effect of an intracellular glutathione on delta 12-prostaglandin J2-induced protein syntheses in porcine aortic endothelial cells. **Biochem Pharmacol**, v.44, n.8, p.1597-1602, Out 1992.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.G.M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An bras Dermatol**, v.77, n.5, p.563-569, 2002.

LEVIN, E. R. Endothelins. **N Engl J Med**, v.333, n.6, p.356-363, Ago 1995.

LEY, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends Mol Med**, v.9, n.6, p.263-268, Jun 2003.

LI, L.C.; WONG, R.W.; RABIE, A.B. Clinical effect of a topical herbal ointment on pain in temporomandibular disorders: a randomized placebo-controlled trial. **J Altern Complement Med**, v.15, n.12, p.1311-1317, Dez 2009.

LIMA, M.DA.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; DE SANTANA, W.A.; MARTINS KANETO, C.; PEREIRA SOARES, M.B.; VILLARREAL, C.F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **Eur J Pharmacol**, v.699, n.1-3, p.112-117, Jan 2013.

LIOLIOS, C.C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; I., C. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. **Food Chem**, n.112, p.77-83, 2009.

LIST, T.; DWORKIN, S.F. Comparing TMD diagnoses and clinical findings at Swedish and US TMD centers using research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. **J Orofac Pain**, v.10, n.3, p.240-253, 1996.

LOBO, S.L.; MEHTA, N.; FORGIONE, A.G.; MELIS, M.; AL-BADAWI, E.; CENEVIZ, C.; ZAWAWI, K.H. Use of Theraflex-TMJ topical cream for the treatment of temporomandibular joint and muscle pain. **Cranio**, v.22, n.2, p.137-144, Abr 2004.

LUCCARINI, P.; CHILDERIC, A.; GAYDIER, A.M.; VOISIN, D.; DALLEL, R. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. **J Pain**, v.7, n.12, p.908-914, Dez 2006.

LUSCINSKAS, F. W.; CYBULSKY, M.I.; KIELY, J.M.; PECKINS, C.S.; DAVIS, V.M.; GIMBRONE JR, M.A. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. **J Immunol**, v.146, n.5, p.1617-1625, Mar 1991.

MAGDASSI, S.; BACH, U.; MUMCUOGLU, K.Y. Formation of positively charged microcapsules based on chitosan-lecithin interactions. **J Microencapsul**, v.14, n.2, p.189-195, Mar-Apr 1997.

MAJIMA, M.; HAYASHI, I.; MURAMATSU, M.; KATADA, J.; YAMASHINA, S.; KATORI, M. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. **Br J Pharmacol**, v.130, n.3, p.641-649, Jun 2000.

MANGELSDORF, D.J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHÜTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v.83, n.6, p.835-839, Dez 1995.

MARCEAU, F.; LARRIVÉE, J.F.; BOUTHILLIER, J.; BACHVAROVA, M.; HOULE, S.; BACHVAROV, D.R. Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit. **Am J Physiol**, v.277, n.6Pt2, p.R1568-1578, Dez 1999.

MARKS, D. M.; SHAH, M.J.; PATKAR, A.A.; MASAND, P.S.; PARK, G.Y.; PAE, C.U. Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors for Pain Control: Premise and Promise. **Curr Neuropharmacol**, v.7, n.4, p.331-336, Dez 2009.

MASTELIĆ, J.; JERKOVIĆ, I.; BLAZEVIĆ, I.; POLJAK-BLAZI, M.; BOROVIĆ, S.; IVANCIĆ-BAĆE, I.; SMRECKI, V.; ZARKOVIĆ, N.; BRČIĆ-KOSTIĆ, K.; VIKIĆ-TOPIĆ, D.; MÜLLER, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. **J Agric Food Chem**, v.56; n.11; p.3989-3996, Jun 2008.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.7203, p.428–435, Jul 2008.

MELO, M.S.; SENA, L.C.; BARRETO, F.J.; BONJARDIM, L.R.; ALMEIDA, J.R.; LIMA, J.T.; DE SOUSA, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharm Biol**, v.48, n.4, p.411–416, 2010.

MONCADA, S.; FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and the Oedema of Inflammation. **Nature**, v.246, n.5430, p.217–219, Nov 1973.

MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Ann Rev Immunol**, v.19, p.683–765, 2001.

MORAIS, C.N.; CARVALHO, B.M.; MELO, W.G.; LOPES, E.P.; DOMINGUES, A.L.; JUCÁ, N.T.; SOUZA, W.; ABATH, F.G.; MONTENEGRO, S.M. Preliminar evaluation of cytokines in the hepatitis C-schistosomiasis co-infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.1001; Suppl.1; p.353–354, Set 2006.

MORELAND, L. W.; SCHIFF, M.H.; BAUMGARTNER, S.W.; TINDALL, E.A.; FLEISCHMANN, R.M.; BULPITT, K.J.; WEAVER, A.L.; KEYSTONE, E.C.; FURST, D.E.; MEASE, P.J.; RUDERMAN, E.M.; HORWITZ, D.A.; ARKFELD, D.G.; GARRISON, L.; BURGE, D.J.; BLOSCHE, C.M.; LANGE, M.L.; MCDONNELL, N.D.; WEINBLATT, M.E. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. **Ann Intern Med**, v.130, n.6, p.478–486, Mar 1999.

MOSER, R.; SCHLEIFFENBAUM, B.; GROSCURTH, P.; FEHR, J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. **J Clin Invest**, v.83, n.2, p.444–455, Feb 1989.

MOSSEY, J. M. Defining racial and ethnic disparities in pain management. **Clin Orthop Relat Res**, v.469, n.7, p.1859–1870, Jul 2011.

MULLOL, J.; BARANIUK, J.N.; LOGUN, C.; BENFIELD, T.; PICADO, C.; SHELHAMER, J.H. Endothelin-1 induces GM-CSF, IL-6 and IL-8 but not G-CSF release from a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B). **Neuropeptides**, v.30, n.6, p.551–556, Dez 1996.

NEW, R.R.C. **Liposomes: A practical approach** ed. Oxford: Oxford University Press, 1990.

NORTHOVER, A. M.; NORTHOVER, B. J. The effects of histamine, 5-hydroxytryptamine and bradykinin on rat mesenteric blood vessels. **J Pathol**, v.98, n.4, p.265–275, Ago 1969.

NUNEZ, D.J.; BROWN, M.J.; DAVENPORT, A.P.; NEYLON, C.B.; SCHOFIELD, J.P.; WYSE, R.K. Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. **J Clin Invest**, v.85, n.5, p.1537–1541, Mai 1990.

NUSSMEIER, N.A.; WHELTON, A.A.; BROWN, M.T.; LANGFORD, R.M.; HOEFT, A.; PARLOW, J.L.; BOYCE, S.W.; VERBURG, K.M. Complications of the COX-2

inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. **N Engl J Med**, v.352, n.11, p.1081-1091, Mar 2005.

OHAYON, M. M. Specific characteristics of the pain/depression association in the general population. **J Clin Psychiatry**, v. 65 Suppl 12, p. 5–9, 2004.

ORHAN, I.; KÜPELİ, E.; SENER, B.; YESILADA, E. Appraisal of anti-inflammatory potential of the clubmoss, *lycopodium clavatum* L. **J ethnopharmacol**, v.109; n.1; p.146-150, Jan 2007.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v.120, n.11, p.3779–3787, Nov 2010.

OZKAN, A.; ERDOGAN, A. A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. **Nat Prod Commun**, v.7, n.12, p.1557-1560, Dez 2012.

PANG L, NIE M, CORBETT L, KNOX AJ. Cyclooxygenase-2 expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human airway smooth muscle cells: role of peroxisome proliferator-activated receptors. **J Immunol**. v.170, n.2, p.1043-1045, Jan 2003.

PAUL, R.E.; HERSH, E.V. Clinical pharmacology of chronic orofacial pain medications. **Compendium**, v.10, n.9, p.492, 494-498, Set 1989.

PEIER, A.M.; REEVE, A.J.; ANDERSSON, D.A.; MOQRICH, A.; EARLEY, T.J.; HERGARDEN, A.C.; STORY, G.M.; COLLEY, S.; HOGENESCH, J.B.; MCINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. **Science**, v.296, n.5575, p.2046–2049, Jun 2002.

PELLISIER T, PAJOT J, DALLEL R. The orofacial capsaicin test in rats: Effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**. v.96, n.1-2, p.81–87, Mar 2002.

PELTZER, M.; WAGNER, J.; JIMENEZ, A. Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v.26, n.6, p.938-946, Jun 2009.

PEREIRA, H.L.A.; RIBEIRO, S.L.E.; CICONELLI, R.M. Topical Anti-inflammatory Drugs in Osteoarthritis of the Knee. **Rev Bras Reumatol**, v.46, n.3, p.188-193, mai/jun 2006.

PEREIRA, A.L.C.; BOLZANI, F.C.B.; STEFANI, M.; CHARLÍN, R. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão/ Systemic corticosteroids: A review. **Med Cutan Iber Lat Am**, v.35, p.15, 2007.

PINTO P, GALEGO N, SILVA N. Definição de critérios de avaliação dos efeitos sobre a superfície cutânea de cremes hidratantes: I – análise após uma aplicação. **Rev Port Farm**, v.47, n.1, p.23-34, 1997.

PUISIEUX, F.; COUVREUR, P.; DELATTRE, J.; DEVISAGUET, J.P. **Liposomes, new systems and new trends in their applications** ed. Paris: Éditions de Santé, 1995.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; NUNES, X.P.; SIQUEIRA, J.S.; OLIVEIRA, L.E.G. *et al.* Plants with anticonvulsant properties - a review. **Br J Pharmacol**, v.18; p.798-819, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR LJ, MELO MS, DE SOUSA DP, ARAUJO AA, ONOFRE AC, GELAIN DP, GONÇALVES JC, ARAÚJO DA, ALMEIDA JR, BONJARDIM LR. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **J Orofac Pain**. v. 24, n. 3, p. 305-312, 2010.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neurosci Biobehav Rev**, v.28, n.2, p.219–226, Abr 2004.

RAHMAN, W.; BAUER, C.S.; BANNISTER, K.; VONSY, J.L.; DOLPHIN, A.C.; DICKENSON, A.H. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. **Mol Pain**, v.5, p.45, 2009.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Curr Opin Neurobiol**, v.12, n.2, p.195–204, Abr 2002.

RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Peripheral mechanisms of somatic pain. **Anesthesiology**, v.68, n.4, p.571–590, Abr 1988.

RAMADORI, G.; MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K. H. [Acute phase reaction and its mediators. 1: Interleukin-1]. **Z Gastroenterol**, v.27, n.12, p.746–750, Dez 1989.

REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev**, v.32, n.1, p.1–46, Mar 1980.

REILLY, M.; FITZGERALD, G. A. Cellular activation by thromboxane A2 and other eicosanoids. **Eur Heart J**, v.14 Suppl K, p.88–93, Dez 1993.

RICE, P.J.; COATS, J.R. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (diptera: muscidae), red flour beetle (coleoptera: tenebrionidae), and southern corn rootworm (coleoptera: chrysomelidae). **J econ entomol**, v.87; n.5; p.1172-1179, Out 1994.

RODRIGUES L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Rev Port Farm**, v.45, n.1, p.52-59, 1995.

RODRIGUES L. Bioengenharia cutânea: novas perspectivas sobre a fisiologia da pele. **Cosmet Toiletr**, v.8, n.4, p.51-55, 1996.

ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, v.45, n.2, p.211-216, Mai 1991.

RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. **J Physiol Pharmacol**, v.48, n.4, p.675–688, Dez 1997.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig dis sci**, v.46; n.2; p.331-337, Fev 2001.

SCHIFFMAN, E.L.; LOOK, J.O.; HODGES, J.S.; SWIFT, J.Q.; DECKER, K.L.; HATHAWAY, K.M.; TEMPLETON, R.B.; FRICTON, J.R. Randomized effectiveness study of four therapeutic strategies for TMJ closed lock. **J Dent Res**, v.86, n.1, p.58-63, Jan 2007.

SCHNITZER, T.J.; BURMESTER, G.R.; MYSLER, E.; HOCHBERG, M.C.; DOHERTY, M.; EHRSAM, E.; GITTON, X.; KRAMMER, G.; MELLEIN, B.; MATCHABA, P.; GIMONA, A.; HAWKEY, C.J. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. **Lancet**, v.364, n.9435, p.665-674, Aug 2004.

SCOTT, D. T.; LAM, F. Y.; FERRELL, W. R. Acute joint inflammation—Mechanisms and mediators. **Gen Pharmacol**, v.25, n.7, p.1285–1296, Nov 1994.

SEBBAN, H.; COURTOIS, G. NF-kappaB and inflammation in genetic disease. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 9, p. 1153–1160, Out 2006.

SESSLE, B.J. Neurophysiology of orofacial pain. **Dent Clin North Am**, v.31, n.4, p.595-613, Out 1987.

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 11, n. 1, p. 57–91, 2000.

SESSLE, B.J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva anesthesiol**, v.71; n.4; p.117-136; Abr 2005.

SHIBATA M, OHKUBO T, TAKAHASHI H, INOKI R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v.38; n.3; p.347-352, Set 1989.

SHOJI, Y.; NAKASHIMA, H. Nutraceuticals and delivery systems. **J Drug Target**, v.12; n.6; p.385-391, Jul 2004.

SIMOES, I.; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **Eur J Biochem**, v.271, n.11, p.2067-2075, Jun 2004.

SIMON, L. S. COX-2 inhibitors. Are they nonsteroidal anti-inflammatory drugs with a better safety profile? **Gastroenterol Clin North Am**, v.30, n.4, p.1011–1025, Dez 2001.

SINGER, E.; DIONNE, R. A controlled evaluation of ibuprofen and diazepam for chronic orofacial muscle pain. **J Orofac Pain**, v.11, n.2, p.139-146, 1997.

SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. **Dor orofacial: diagnóstico, terapêutica e qualidade de vida**. ed. Curitiba: Editora Maio, 2001.

SMITH, C.W.; KISHIMOTO, T.K.; ABBASSI, O.; HUGHES, B.; ROTHLEIN, R.; MCINTIRE, L.V.; BUTCHER, E.; ANDERSON, D.C. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells *in vitro*. **J Clin Invest**, v. 87, n. 2, p. 609–618, Fev 1991.

SMITH, R.S.; SMITH, T.J.; BLIEDEN, T.M.; PHIPPS, R.P. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. **Am J Pathol**, v.151, n.2, p.317–322, Ago 1997.

SOLOMON, S.D.; MCMURRAY, J.J.; PFEFFER, M.A.; WITTES, J.; FOWLER, R.; FINN, P.; ANDERSON, W.F.; ZAUBER, A.; HAWK, E.; BERTAGNOLI, M. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. **N Engl J Med**, v.352, n.11, p.1071-1080, Mar 2005.

SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Exp Neurol**, v.151, n.1, p.138–142, Mai 1998.

SPERTINI, O.; KANSAS, G.S.; MUNRO, J.; GRIFFIN, J.D.; TEDDER, T.F. Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. **Nature**, v. 349, n. 6311, p. 691–694, Fev 1991.

SPIKE, R.C.; PUSKÁR, Z.; ANDREW, D.; TODD, A.J. A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. **Eur J Neurosci**, v.18, n.9, p.2433–2448, Nov 2003.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v.76, n.2, p.301–314, Jan 1994.

STEIN, C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Anesth Analg**, v.76, n.1, p.182-191, Jan 1993.

STEIN, C.; LANG, L.J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Curr Opin Pharmacol**, v.9, n.1, p.3-8, Fev 2009.

STEWART, J. M. Bradykinin antagonists: discovery and development. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 527–532, Mar 2004.

SUZUKI, K.; SAKON, K. The application of liposomes to cosmetics. **Cosm. Toil.**, v.105, n.5, p.65-78, 1990.

TA, L.E.; DIONNE, R.A. Treatment of painful temporomandibular joints with a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized placebo-controlled comparison of celecoxib to naproxen. **Pain**, v.111, n.1-2, p.13-21, Sep 2004.

TAKEMURA, M.; SUGIYO, S.; MORITANI, M.; KOBAYASHI, M.; YONEHARA, N. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. **Arch Histol Cytol**, v.69, n.2, p.79–100, Jun 2006.

TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br J Pharmacol**, v.124, n.7, p.1369–1374, Ago 1998.

TAYLOR, J. E.; DEFEUDIS, F. V.; MOREAU, J. P. Bradykinin-antagonists: Therapeutic perspectives. **Drug Develop Res**, v.16, n.1, p.1–11, 1989.

THOMPSON JD, CHALCHAT JC, MICHET A, LINHART YB, EHLERS B. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of thymus vulgaris chemotypes. **J chem ecol**, v.29; n.4; p.859-880, Abr 2003.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51; n.1;p.5-17, Out 1992.

TODD, A. J. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. **Exp Physiol**, v.87, n.2, p.245–249, Mar 2002.

TURP, J.C.; MOTSCHALL, E.; SCHINDLER, H.J.; HEYDECKE, G. In patients with temporomandibular disorders, do particular interventions influence oral health-related quality of life? A qualitative systematic review of the literature. **Clin Oral Implants Res**, v.18 Suppl 3, p.127-137, Jun 2007.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of aspirin-like drugs. **Semin Arthritis Rheum**, v.26, Suppl 1, n.0, p.2–10, Jun 1997.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm Acta Helv**, v.70, n.2, p.95-111, Jul 1995.

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

WANG, Y.; ROLLINS, S.A.; MADRI, J.A.; MATIS, L.A. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. **Proc Nati Acad Sci U S A**, v.92, n.19, p.8955–8959, Set 1995.

YOKOMIZO, Y.; SAGITANI, H. Effects of phospholipids on the *in vitro* percutaneous penetration of prednisolone and analysis of mechanism by using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. **J Pharm Sci**, v.85, n.11, p.1220-1226, Nov 1996.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-110, Jun 1983.

ZLOTOGORSKI A. Distribution of skin surface pH on the forehead and cheek of adults. **Arch Dermatol Res**, v.279, p.398-401, 1987.

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado
“**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE GEL CONTENDO
LIPOSSOMAS DE CARVACROL BORNEOL SOBRE A
NOCICEPÇÃO OROFACIAL EM CAMUNDONGOS.**” sob
coordenação da Prof. Dr. **LEONARDO RIGOLDI
BONJARDIM**(protocolo **CEPA 54/2012**) foi aprovado pelo Comitê
de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de
Sergipe, em reunião realizada dia 19/10/2012.

São Cristóvão, 31 de janeiro de 2013.

Prof. Dr. **FLÁVIA TEIXEIRA SILVA**
Presidente do CEPA/UFS