



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ADYELLE DANTAS RIBEIRO**

**DESENVOLVIMENTO DE EMULGEL À BASE DE R-(+)-LIMONENO PARA  
TRATAMENTO DE ÚLCERAS TRAUMÁTICAS DA CAVIDADE ORAL**

**CAMPINA GRANDE, PB**

**2023**

**ADYELLE DANTAS RIBEIRO**

**DESENVOLVIMENTO DE EMULGEL À BASE DE R-(+)-LIMONENO PARA  
TRATAMENTO DE ÚLCERAS TRAUMÁTICAS DA CAVIDADE ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

**Área de concentração:**  
Clínica Odontológica.

**Orientadora:** Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques

**CAMPINA GRANDE, PB**

**2023**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

R484d Ribeiro, Adyelle Dantas.

Desenvolvimento de emulgel à base de R-(+)-limonenopara tratamento de úlceras traumáticas da cavidade oral [manuscrito] / Adyelle Dantas Ribeiro. - 2023.

111 p. : il. colorido.

Digitado.

Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadualda Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Profa. Dra. Jozinete  
Vieira Pereira, Coordenação do Curso de  
Odontologia - CCBS. "

1. Fitoterapia. 2. Úlceras traumáticas. 3. Mucosa oral. I. Título

21. ed. CDD 617.6

**ADYELLE DANTAS RIBEIRO**

**DESENVOLVIMENTO DE EMULGEL À BASE DE R-(+)-LIMONENO PARA  
TRATAMENTO DE ÚLCERAS TRAUMÁTICAS DA CAVIDADE ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

**Área de concentração:** Clínica Odontológica.

Aprovada em:31/07/2023.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Prof. Dr. Diego Romário Silva  
Universidade de Cuiabá (UNIC)



---

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho  
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



---

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Profa. Dra. Andrea Cristina Barbosa Silva  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças e possibilitou a concretização desse sonho. Sem Ele, nada é possível. A Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, por ser meu amparo nas horas difíceis e interceder por mim em todos os momentos de tribulação.

Aos meus pais, Elisabete de Aquino Dantas Ribeiro e Adalberto Ribeiro da Silva, às minhas irmãs, Adelle Dantas Ribeiro e Adaelle Dantas Ribeiro, e ao meu esposo Matheus de Medeiros Tavares, pelo amor e apoio incondicional e por abraçarem meus sonhos, sem nunca julgar. Por confiarem em mim e me permitirem alçar voos que até mesmo eu duvidava que seria capaz. Todas as vitórias conquistadas até hoje não são apenas minhas, são nossas.

As minhas gatinhas Amora (*in memorian*), Felícia e Dorinha, por serem verdadeiros anjos na minha vida, me trazendo paz, equilíbrio e carinho durante o dia-a-dia, com certeza a vida é mais leve e feliz com vocês.

A minha querida professora e orientadora, Jozinete Vieira Pereira, por toda dedicação, paciência, cuidado e confiança. Ser sua aluna é uma grande honra e um privilégio. A senhora ensina pelo exemplo. Exemplo de profissional, pesquisadora, professora e mulher. Sua orientação influenciou de forma determinante minha formação profissional e pessoal.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB (PPGO-UEPB) por contribuírem fortemente para o meu aprendizado.

A professora Pollianna Muniz Alves que me acolheu tão bem no Laboratório de Patologia Bucal e contribuiu grandiosamente com a pesquisa.

Ao professor Cassiano Francisco Weege Nonaka, por todo auxílio a mim concedido.

A técnica do laboratório de Patologia Bucal, Denize Nubia Souza, por todo o apoio e contribuição para a realização dos procedimentos experimentais.

Aos integrantes do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, em especial ao professor Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Dayanne Tomaz Casimiro da Silva, Livia e Kaline, que tiveram papel fundamental na realização da pesquisa.

Aos integrantes do Laboratório de Ensaio Farmacológicos, em especial a Profa. Vanda Lúcia dos Santos, Katharina, Wilma e Kiara, que foram essenciais para a conclusão da minha pesquisa, por toda generosidade e empenho para que desse tudo certo.

Aos integrantes do Biotério, em especial a Aletheia, Bianca, Eli e Anderson, por me receberem tão bem e ajudarem de todas as formas possíveis.

Aos professores internos e externos que aceitaram participar da banca, pelas sugestões e disponibilidade com nosso estudo.

A todos os funcionários que possibilitam toda a formação acadêmica com os cuidados na instituição, em especial Ahyanna por toda sua dedicação na Secretaria do PPGO e a colaboradora Dione sempre tão prestativa e gentil.

A todos os colegas de turma, do grupo de pesquisa e alunos que conheci e dividi a rotina durante esses anos de estudo e ensino, em especial a Paola por toda ajuda nas etapas desta pesquisa e pelas palavras de incentivo sempre que precisei.

Aos amigos Layrlla, Irla e Erasmo pela amizade, troca de conhecimentos, conversas e imenso apoio. Vocês são exemplos de generosidade e bondade.

Aos colegas Ernani, Julliana, Mariana, Waleska e Josinaldo Júnior, por estarem sempre disponíveis a tirar minhas dúvidas e me ajudarem durante todo esse processo.

Aos alunos Adilson, Damião, Hellen, Jaqueline, Antonio e Helbert por se disporem a me ajudar na execução da pesquisa.

A todos, que de alguma forma, colaboraram para o meu crescimento e desenvolvimento, em especial as minhas tias pelas orações e a todos familiares e amigos que torceram pela minha realização e felicidade.

“ Deus fará um caminho, quando parecer não ter mais um caminho.

Ele trabalha de uma forma que não podemos ver.

Ele será o meu guia, me colocará perto ao Seu lado.

Com amor e força para cada novo dia. Ele fará um caminho.”

## RESUMO

As úlceras traumáticas (UTs) da mucosa oral consistem em um grupo de alterações comuns na cavidade oral que provocam sintomatologia dolorosa e afetam o bem-estar do paciente acometido. As terapias disponíveis para o tratamento dessas lesões possuem limitações em relação a aplicação e ocorrência de efeitos adversos. Nesse contexto, destaca-se a busca de novas alternativas terapêuticas, provenientes de plantas medicinais, como o limoneno, um terpeno que apresenta propriedades de interesse farmacológico. Esse estudo avaliou *in silico* e *in vitro*, a atividade antifúngica do R-(+)-limoneno isolado sobre *Candida* spp, e incorporado a um emulgel suas propriedades físico-químicas, ação antifúngica, toxicológica, anti-inflamatória e cicatrizante deste emulgel. Por meio do ensaio *in silico*, foi avaliada a probabilidade do potencial biológico do monoterpene, sua biodisponibilidade oral teórica e toxicidade oral aguda. Foram utilizadas as cepas: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90031, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e isolados clínicos de *C. albicans* A1, e *C. albicans* A2. Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) por microdiluição, seu efeito sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* e o potencial antifúngico por redução logarítmica. As propriedades físico-químicas do emulgel à base de R-(+)-limoneno (ELI) foram determinadas por meio do pH, da resistência à centrifugação, viscosidade e espalhabilidade. A toxicidade oral aguda e o potencial clastogênico e aneugênico foram avaliados em camudongos *Mus musculus* (2000mg/kg). Ratos *Wistar* foram submetidos a aplicação de ácido acético a 5% em mucosa jugal para avaliar o potencial anti-inflamatório e cicatrizante da formulação, por meio de análise clínica e histopatológica. Os dados foram analisados por estatística descritiva e inferencial, analisados através do software GraphPad Prism 5.0®, San Diego, CA, EUA. Os ensaios *in silico* estimaram que o R-(+)-limoneno apresenta um amplo espectro de ação sobre microrganismos de grande importância clínica. A CIM do R-(+)-limoneno variou na faixa de 656,25 µg/mL a 2625 µg/mL e se classificou como fungistático sobre a cepa de *C. albicans* (ATCC 10231), enquanto para as demais espécies sua ação foi fungicida. O R-(+)-limoneno apresentou potencial efeito significativo sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* ( $p < 0,05$ ). O ELI apresentou pH de caráter ácido, de  $5,71 \pm 0,11$ ;  $5,71 \pm 0,09$  e  $5,97 \pm 0,05$  para formulação do emulgel com R-(+)-limoneno (ELI) a 1,2%, 2,4% e 5%, respectivamente, e  $5,74 \pm 0,21$  para a formulação controle, boa estabilidade e espalhabilidade, assim como boa viscosidade. Por meio das análises da cinética de crescimento e da redução logarítmica, pode-se constatar que o produto inibiu significativamente o crescimento de *C. albicans* em todas as diferentes concentrações testadas quando comparado ao controle de crescimento. O ELI não induziu sinais de toxicidade aguda nos camudongos submetidos ao tratamento por gavagem na dose única de 2000 mg/kg e produziu um menor número de micronúcleos estatisticamente significativo comparado ao controle positivo (ciclofosfomida a 50 mg/kg) em eritrócitos de camudongos. O R-(+)-limoneno demonstrou ser um potencial agente antifúngico contra espécies de *Candida*, tanto como composto isolado como incorporado ao emulgel. O ELI apresentou baixa toxicidade e mutagenicidade, além de uma boa ação anti-inflamatória e cicatrizante no tratamento de UTs na cavidade oral de ratos *Wistar*. Portanto, a formulação desenvolvida foi considerada promissora para o tratamento de UTs na cavidade oral.

**Descritores:** Fitoterapia; Lesão; Limoneno; Mucosa Oral.

## ABSTRACT

Traumatic ulcers (UTs) of the oral mucosa consist of a group of common changes in the oral cavity that cause painful symptoms and affect the well-being of the patient. The therapies available for the treatment of these injuries are isolated in terms of application and the occurrence of adverse effects. In this context, the search for new therapeutic alternatives from medicinal plants, such as limonene, a terpene with properties of pharmacological interest, stands out. This study evaluated *in silico* and *in vitro*, the antifungal activity of R-(+)-limonene isolated on *Candida* spp, and incorporated into an emulgel its physicochemical properties, antifungal, toxicological, anti-inflammatory and healing action of this emulgel. Through the *in silico* assay, the probability of the biological potential of the monoterpene, its theoretical oral bioavailability and acute oral toxicity were evaluated. The following strains were used: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90031, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) and clinical isolates of *C. albicans* A1, and *C. albicans* A2. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicide Concentration (MFC) was determined by microdilution, its effect on the growth kinetics of *C. albicans* and its antifungal potential by logarithmic reduction. The physicochemical properties of the emulgel based on R-(+)-limonene (ELI) were determined by means of pH, resistance to centrifugation, accelerated centrifugation and spreadability. Acute oral toxicity and clastogenic and aneugenic potential were evaluated in *Mus musculus* mice (2000mg/kg). Wistar rats were submitted to the application of 5% acetic acid in the buccal mucosa to evaluate the anti-inflammatory and healing potential of the formulation, through clinical and histopathological analysis. Data were analyzed using descriptive and inferential statistics, analyzed using GraphPad Prism 5.0® software, San Diego, CA, USA. The *in silico* assays estimated that R-(+)-limonene has a broad spectrum of action on microorganisms of great clinical importance. The MIC of R-(+)-limonene ranged from 656.25 µg/mL to 2625 µg/mL and was classified as fungistatic on the *C. albicans* strain (ATCC 10231), while for the other species its action was fungicide. R-(+)-limonene had a potentially significant effect on the growth kinetics of *C. albicans* ( $p < 0.05$ ). The ELI showed an acidic pH of  $5.71 \pm 0.11$ ;  $5.71 \pm 0.09$  and  $5.97 \pm 0.05$  for formulation of the emulgel with R-(+)-limonene (ELI) at 1.2%, 2.4% and 5%, respectively, and  $5.74 \pm 0.21$  for the control formulation, good stability and spreadability, as well as good viscosity. Through analysis of growth kinetics and logarithmic reduction, it can be seen that the product significantly inhibited the growth of *C. albicans* in all the different concentrations tested when compared to the growth control. ELI did not induce signs of acute toxicity in mice submitted to gavage treatment at a single dose of 2000 mg/kg and produced a statistically significant lower number of micronuclei compared to the positive control (cyclophosphamide 50 mg/kg) in mouse erythrocytes. R-(+)-limonene has been shown to be a potential antifungal agent against *Candida* species, both as an isolated compound and incorporated into the emulgel. The ELI showed low toxicity and mutagenicity, in addition to good anti-inflammatory and healing action in the treatment of UTs in the oral cavity of Wistar rats. Therefore, the developed formulation was considered promising for the treatment of UTs in the oral cavity.

**Descriptors:** Phytotherapy; Injury; Limonene; Oral Mucosa.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Etapa da cicatrização de feridas.....	27
Figura 2 –	Estrutura química do Limoneno.....	31
Figura 3 –	Enantiômeros do Limoneno.....	31
Figura 4 –	Fluxograma da Pesquisa.....	39
Figura 5 –	Ensaio de toxicidade oral aguda em camundongos <i>Mus musculus</i> . 48	
Figura 6 –	Teste de micronúcleo em camundongos <i>Mus musculus</i> .....	49
Figura 7 –	Produtos teste inoculados com <i>C. albicans</i> (A) e com <i>C. glabrata</i> (B).50	
Figura 8 –	Procedimentos clínicos realizados durante o experimento.....	52
Figura 9 –	Efeito do R-(+)-limoneno e da Nistatina na cinética de crescimento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 e <i>C. albicans</i> A2 expostas às concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM.....	59
Figura 10 –	Amostras submetidas ao teste de resistência por centrifugação das formulações contendo o ELI, e sem ELI, na centrífuga.....	61
Figura 11 –	Viscosidade em função da taxa de cisalhamento das formulações ELI 1,2% (F1), 2,4% (F2) e 5% (F3) e do emulgel base.....	63
Figura 12 –	Espalhabilidade das formulações ELI 1,2% (F1), 2,4% (F2) e 5% (F3) e do emulgel base.....	65
Figura 13 –	Análise térmica do emulgel puro e suas diferentes concentrações após incorporação do R-(+)-limoneno.....	65
Figura 14 –	Curvas DTA do emulgel puro e suas diferentes concentrações após incorporação do R-(+)-limoneno.....	66
Figura 15 –	Efeito do emulgel incorporado com R-(+)-limoneno (ELI 2000mg/kg) sobre a massa corpórea de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas.....	67
Figura 16 –	Fotomicrografias evidenciando ausência de sinais de toxicidade aguda em órgãos como baço, coração, estômago, fígado e rim entre o grupo controle (A-E) e grupo experimental (F-J). (H/E, 200x) .....	69
Figura 17 –	Micrografia de eritrócitos capturados com objetiva de 400x após administração das substâncias: exibindo diferenças quantitativas entre os grupos analisados.....	70
Figura 18 –	Redução logarítmica entre os grupos quando comparados ao controle de crescimento. (Valores expressos em LogUFC).....	72
Figura 19 -	Fotomicrografias de mucosa oral.....	73
Figura 20 -	Comparação clínica do processo de cicatrização tecidual de UTs na cavidade oral.....	73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição da base do emulgel formulado.....	44
Quadro 2 – Representação esquemática do experimento.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Potencial biológico previsto para o R-(+)-limoneno em alvos moleculares.....	56
Tabela 2 – Análise da toxicidade teórica do R-(+)-limoneno.....	57
Tabela 3 – Atividade antifúngica do LIM e de fármacos padrão sobre fungos do gênero <i>Candida</i> (valores de CIM e CFM expressos em µg/mL).....	58
Tabela 4 – Efeitos do R-(+)-limoneno e da Nistatina sobre a Cinética de Crescimento de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) e <i>C. albicans</i> A2 (Valores de média e desvio-padrão da viabilidade dos microrganismos).....	60
Tabela 5 – Distribuição segundo os valores do pH e viscosidade do ELI em diferentes concentrações e da base e nos diferentes ciclos do ensaio de estabilidade preliminar. F1 (ELI 1,2%,) F2 (ELI 2,4%), F3 (ELI 5%) e DP (Desvio Padrão).....	62
Tabela 6 – Efeito emulgel incorporado com R-(+)-limoneno (ELI 2000 mg/kg), por via oral sobre o peso absoluto (g) e relativo (%) de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas. Valores de média e desvio padrão (±) para n=3.....	67
Tabela 7 – Teste de micronúcleo de ELI (2000 mg/ kg) em células de sangue periférico de camundongos e os respectivos controles.....	69
Tabela 8 – Atividade antimicrobiana do R-(+)-limoneno, do ELI e da Nistatina sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> A2 e <i>Candida glabrata</i> (Valores de média e desvio-padrão da viabilidade dos microrganismos).....	70
Tabela 9 – Análise histopatológica da ação anti-inflamatória do ELI a 2,4%, 5,0% e do Ad-Muc no tratamento de UTs da cavidade oral de ratos Wistar.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

- C. = *Candida*
- ELI = Emulgel à base de R-(+)-limoneno
- F = Formulação
- LIM = R-(+)-limoneno
- OEs = Óleos Essenciais
- UTs = Úlceras traumáticas

## LISTA DE SIGLAS

- AhR = Hiperresponsividade das Vias Aéreas
- AMPc = Monofosfato Cíclico de Adenosina
- ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC = American Type Culture Collection
- ATP = Adenosine TriPhosphate
- ATR = Reflectância Total Atenuada
- BBB = blood-brain barrier
- CD-31 = Cluster de Diferenciação 31
- Certbio = Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais
- CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais
- CFM = Concentração Fungicida Mínima
- CFR = Code of Federal Regulations
- CIM = Concentração Inibitória Mínima
- CLSI = Clinical Laboratory and Standards Institute
- COX = Ciclooxigenase
- CSD = Caldo Sabouraud Dextrose
- D0 = Dia Zero
- DL = Dose Letal
- DL50 = Dose Letal Mediana
- DMSO = Dimetil-Sulfóxido
- DNA = Ácido Desoxirribonucleico
- DP = Desvio Padrão
- DTA = Análise Térmica Diferencial
- DTG= Termogravimetria Derivada
- Ear = Estomatite Aftosa Recorrente
- Ei = Espalhabilidade
- ELI = Emulgel de R-(+)-limoneno
- ERK1/2 = Extracellular signal-regulated kinases 1/2

- FGF = Fator de Crescimento de Fibroblastos
- FT-IR = Infravermelho Médio por Transformada de Fourier
- GPX = Glutathione Peroxidase
- GUSAR = General Unrestricted Structure–Activity Relationships
- H/E= Hematoxilina/Eosina
- IFA = Insumos Farmacêuticos Ativos
- IG = Imunoglobulina
- IL = Interleucina
- INOS = Óxido Nítrico Sintase
- INSA = Instituto Nacional do Semiárido
- LD50 = Dose Letal Mediana
- LDCPF = Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos
- LPS = Lipopolissacarídeo
- MBC = Concentração Bactericida Mínima
- MCP = Proteína Quimiotática de Monócitos
- MDR = Resistentes a Múltiplas Drogas
- MEC= Matriz Extracelular
- MIP = Miristato de Isopropila
- MMP 2 = Matriz Metaloproteinase 2
- MO = Mucosite Oral
- MPO = Mieloperoxidase
- mRNA = RNA Mensageiro
- mTOR = mammalian target of rapamycin
- N = Nitrogênio
- NADPH = Fosfato Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
- NALH = Aceptores de Ligação de Hidrogênio
- NDH = Doadores de Ligação de Hidrogênio
- NFκB = Fator Nuclear Kappa B
- NH = Amônia
- O = Oxigênio

- OE = Óleo Essencial
- OECD = Organization for Economic Cooperation and Development
- OH = Hidroxila
- OMS = Organização Mundial da Saúde
- ON = Óxido Nítrico
- PA = Probabilidade de Ser Ativo
- PAF = Fator Ativador de Plaquetas
- PDGF = Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
- PG = Prostaglandina
- P-gp = Permeabilidade a Glicoproteína P
- PI = Probabilidade de Ser Inativo
- POH = Álcool Perílico
- QSARs/QSPRs = Quantitative structure-activity/property relationships
- QT = Quimioterapia
- RTCP = Radioterapia de Cabeça e Pescoço
- SPP = Espécies
- TCLE = Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TG = Termogravimetria
- TGA = Análise Termogravimétrica
- TGF = Fator de Crescimento Transformante
- Th = T helper
- TNF- $\alpha$  = Fator de Necrose Tumoral Alfa
- TPSA = Área de superfície polar
- TRPA = Canal Potencial Receptor Transiente
- UEPB = Universidade Estadual da Paraíba
- VEGF = Fator de Crescimento Endotelial Vascular
- $\alpha$ -AML =  $\alpha$ -Actina de Músculo Liso

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	Copyright
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\pi$	Pi
$\gamma$	Gama
®	Marca Registrada
<	Menor que
X	Vezes
/	Dividido por
$\pm$	Mais ou menos
=	Igual
$\cong$	Aproximadamente
$\mu\text{g}$	Micrograma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	20
2.1 Etiopatogênese de Úlceras Traumáticas	20
2.2 Aspectos Clínicos e Histopatológicos de UTs	22
2.3 Inflamação	23
2.4 Cicatrização	26
2.5 Modalidades Terapêuticas no Tratamento de UTs	27
2.6 Terpenos	29
2.7 Considerações sobre o Limoneno	30
2.8 Propriedades Terapêuticas e Mecanismos de Ação do Limoneno	32
2.9 Formulações Farmacológicas em Emulgéis	37
<b>3 OBJETIVOS</b>	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
<b>4 METODOLOGIA</b>	39
4.1 Delineamento do Estudo	39
4.2 Local da Pesquisa	39
4.3 Ensaio <i>in silico</i>	40
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do LIM	41
4.5 Efeito do LIM Sobre a Cinética do Crescimento de <i>Candida Spp</i>	42
4.6 Material	42
4.6.1 Aquisição das Substâncias	42
4.6.2 Desenvolvimento do Emulgel de R-(+)-limoneno (ELI)	42
4.6.2.1 Preparação do Emulgel Com e Sem R-(+)-limoneno	42
4.7 Caracterização Físico-Químicas dos Emulgéis de R-(+)-limoneno	44
4.7.1 Determinação de pH	44
4.7.2 Medição de viscosidade e determinação de propriedades reológicas	44
4.7.3 Avaliação da estabilidade preliminar	45
4.7.3.1 Ciclo gelo-degelo dos emulgéis com R-(+)-limoneno	45
4.7.3.2 Resistência à centrifugação dos emulgéis com R-(+)-limoneno	45
4.7.4 Espalhabilidade	45
4.7.5 Análise Térmica	46
4.8 Aspectos Éticos	46
4.9 Toxicidade Aguda <i>in vivo</i> do ELI em Camundongos	47
4.10 Investigação do Potencial Clastogênico e Aneugênico em Eritrócitos de Camundongos	48

<b>4.11. Atividade Antifúngica por Redução Logarítmica.....</b>	<b>49</b>
4.11.1 Produtos teste.....	49
4.11.2 Redução Logarítmica.....	50
<b>4.12 Determinação do Potencial Anti-Inflamatório do ELI.....</b>	<b>50</b>
4.12.1 Indução de UT nos animais.....	50
4.12.2 Tratamentos dos Grupos.....	51
4.12.3 Alimentação.....	53
4.12.4 Avaliação Clínica.....	53
4.12.5 Procedimento de Retirada de Material Biológico dos Animais.....	53
4.12.6 Processamento do Material Biológico.....	53
4.12.7 Avaliação Histopatológica Semiquantitativa.....	54
<b>5ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>55</b>
<b>6RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>6.1 Ensaio <i>in Silico</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>6.2 Determinação da Atividade Antifúngica.....</b>	<b>58</b>
<b>6.3 Ação do R-(+)-limoneno Sobre a Cinética do Crescimento de <i>Candida albicans</i>.....</b>	<b>59</b>
<b>6.4 Caracterização Físico-Química dos Emulgéis de R-(+)-limoneno.....</b>	<b>61</b>
6.4.1 pH e resistência à centrifugação.....	61
6.4.2 Estabilidade Preliminar.....	61
6.4.3 Viscosidade.....	62
6.4.4 Espalhabilidade.....	63
6.4.5 Análises Térmicas do Emulgel Puro e Suas Diferentes Concentrações Após Incorporação do R-(+)-limoneno.....	64
<b>6.5 Determinação da Toxicidade Oral Aguda.....</b>	<b>66</b>
<b>6.6 Determinação do Potencial Clastogênico e Aneugênico.....</b>	<b>69</b>
6.6.1 Teste de Micronúcleo em Eritrócitos de Camundongos <i>Mus Musculus</i> , Linhagem Swiss.....	69
<b>6.7 Ação do R-(+)-limoneno e do ELI sobre Redução Logarítmica.....</b>	<b>70</b>
<b>6.8 Determinação do Potencial Anti-Inflamatório do ELI em UTs.....</b>	<b>72</b>
<b>6.9 Avaliação Clínica do Processo Cicatrizante de UTs com Uso do ELI.....</b>	<b>73</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As úlceras traumáticas (UTs) na cavidade oral são frequentes e resultam de injúrias, principalmente, mecânicas. Caracterizam-se pela perda do tecido epitelial e exposição do tecido conjuntivo, podendo ser dolorosas, provocando desconforto, dificultando a ingestão de líquidos e alimentos, interferindo diretamente na qualidade de vida do paciente (Lima et al., 2005; Cavalcante et al., 2011; Andisheh-Tadbir et al., 2021). Essa condição provoca alterações no microbioma oral, podendo tornar o local ulcerado propício ao desenvolvimento de infecções oportunistas, como as do gênero *Candida*, no entanto, os medicamentos usualmente utilizados apresentam sérios problemas relacionados à eficácia, toxicidade, baixa potência e farmacocinética inadequada (Scotti et al., 2012), sendo estimulada a busca por fármacos mais seguros e eficazes.

Desde o século V a.C, as plantas medicinais têm sido usadas para curar uma variedade de doenças. O uso de plantas e seus derivados sintéticos e semissintéticos contribuem para a maior parte dos medicamentos usados clinicamente para tratar doenças inflamatórias e infecciosas, bem como cânceres de diferentes origens. Embora os medicamentos convencionais tenham sido usados juntamente com o rápido desenvolvimento de tratamentos contra a inflamação, os efeitos adversos indesejáveis, tais como dor abdominal, azia e diarreia, limitam o uso de fármacos anti-inflamatórios. A contribuição dos estudos fitoquímicos e etnofarmacológicos desempenhou um papel fundamental que levou a identificação, isolamento, caracterização e pesquisa do mecanismo de ação de uma variedade de compostos ativos naturais (Tasneem et al., 2018; Oliveira et al., 2019).

O Brasil detém a maior parte da biodiversidade mundial (15-20%), assim, existe um vasto campo para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos (Leite; Camargo; Castilho, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) aconselha a comunidade científica a intensificar e divulgar os estudos com plantas, auxiliando na busca por insumos farmacêuticos ativos (IFA) e de moléculas isoladas (Gomes et al., 2016). Portanto, as plantas medicinais (extratos) e fitoterápicos, vêm sendo bastante pesquisados e utilizados no tratamento paliativo de UTs (Peterson; Bensadoun; Roila, 2011; Spezzia, 2020; Tanideh; Badie; Habibagahi, 2020; Gomes et al., 2021).

O Limoneno constitui um dos compostos de óleos essenciais mais estudados, fazendo parte da composição de 300 espécies de diferentes plantas (Jongedijk et al., 2016). Estudos prévios apontam que este produto possui diversas propriedades terapêuticas que o tornam um produto promissor nas pesquisas voltadas para a saúde, onde já demonstrou produzir apoptose nas células de câncer de mama, efeito contra acnes e dermatófitos, diminuição do refluxo gastroesofágico (Russo, 2011), efeito ansiolítico (Lima et al., 2012), atividade imunomodulatória (Lappas; Lappas, 2012), e de maior interesse para esse estudo, ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antinociceptiva (Zhang et al, 2014; Lemes et al., 2018; Gallegos-Flores et al., 2019; D'Arrigo et al., 2019; Liu et al., 2020).

A entrega controlada de drogas tem evoluído bastante nos últimos anos, entre as tecnologias existentes, os emulgéis surgem como materiais promissores, visto que seu conteúdo aquoso, natureza suave e a estrutura porosa se assemelham aos tecidos biológicos e os tornam adequados para acomodar células e para encapsular e liberar compostos solúveis em água, permitindo administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (Tatavarti; Hoag, 2006; Bhattarai; Gunn; Zhang, 2010; Censi et al., 2012).

Considerando a prevalência de UTs na cavidade oral e do desconforto que causam aos pacientes, prejudicando a mastigação, deglutição e a fonação, além da sintomatologia dolorosa, estudos à procura de novas formas de tratamento são necessários, em vista da necessidade de novas formulações e de opções naturais para o tratamento de UTs em cavidade oral. Este estudo avalia a utilização de um emulgel contendo R-(+)-limoneno, um composto sintético que possui amplo potencial terapêutico, sendo um provável agente anti-inflamatório e cicatrizante.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Etiopatogênese de Úlceras Traumáticas

O epitélio da mucosa oral é uma estrutura anatômica que protege os tecidos subjacentes de injúrias do meio externo, no entanto esta camada protetora pode ser rompida por diversos fatores desencadeando lesões erosivas ou ulcerativas da mucosa oral. Estas lesões apresentam alta prevalência, e geralmente manifestam sintomatologia dolorosa, devido a perda da integridade do epitélio resultando em exposição das terminações nervosas (Chiu et al. 2021; Li et al. 2017; Fernandes et al., 2022).

As lesões ulcerativas possuem etiologia multifatorial, incluindo desde causas sistêmicas associadas a doenças autoimunes, infecciosas ou nutricionais, até mesmo algumas manifestações clínicas de lesões malignas. No entanto, as úlceras provenientes de danos agudos ou crônicos de natureza mecânica, térmica ou química são denominadas de úlceras traumáticas (Schemel-Suárez; López-López; Chimenos-Küstner, 2015; Toljan; Vrooman, 2022).

As úlceras orais agudas são bastante comuns na rotina clínica, como exemplos podemos citar: as úlceras traumáticas (UTs), a estomatite aftosa recorrente (EAR) e a estomatite recorrente do vírus do herpes simples intraoral (Cui et al., 2016; France; Villa, 2020). Um outro grupo de lesões orais, a mucosite oral (MO), é ainda mais preocupante, pois é um efeito colateral da quimioterapia (QT) e radioterapia de cabeça e pescoço (RTCP) e pode durar todo tratamento oncológico (Pulito et al., 2020). O grande desconforto causado por essas lesões, associado aos efeitos adversos de outras terapias, revelou a necessidade de uma terapia de fácil aplicação e sem efeitos adversos que fosse capaz de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Mansano-Schlosser; Ceolim, 2012).

As úlceras de origem traumática são provocadas pela fricção de dentes na mucosa bucal, dentaduras mal adaptadas, escovação dentária, alimentos duros, aparatos de aparelhos ortodônticos, moderadura, queimaduras e acidentes com instrumentos pontiagudos durante o atendimento odontológico ocorrendo com maior prevalência em mucosa jugal, borda lateral de língua, lábio, gengiva e palato duro, podendo durar de dias até semanas (Abid; Alyaa 2021; Fernandes, 2022).

Conseguir um reparo tecidual adequado é essencial para garantir a homeostase local, já que a cavidade oral consiste num ambiente altamente contaminado e que a presença de infecções pode prolongar este processo (Mariano et al., 2015). Cabe ressaltar que alterações na cavidade oral, assim como processos inflamatórios e as ulcerações, provocam modificações no microbioma oral e, por conseguinte, favorecem a proliferação de espécies bacterianas e fúngicas como por exemplo as do gênero *Candida* (Edwards; Harding, 2004; Mariano et al., 2015).

*Candida* sp trata-se de um fungo comensal presente na microbiota oral de indivíduos saudáveis, numa média de 45-65% das crianças e 30-55% dos adultos, que necessita de um desequilíbrio no meio para tornar-se patogênico, o que pode acontecer como consequência de diversos fatores sistêmicos e locais, dentre os sistêmicos estão alterações hormonais, uso de algumas medicações, imunossupressão, Aids, radioterapia, quimioterapia e as próprias doenças sistêmicas, como a diabetes mellitus; e locais citam-se uso de aparelhos ortodônticos, uso de próteses, mudanças de hábitos alimentares, tabagismo, higiene oral precária e hipossalivação (Alcoba-Flórez et al., 2005; Miranda-Cadena et al., 2018; Moura et al., 2019).

A espécie mais frequente na cavidade oral é *C. albicans*, devido às suas características de aderência e ao elevado nível de patogenicidade, tratando-se de uma levedura dimórfica, que pode estar presente em forma de hifas e leveduras, dependendo do meio. Outras espécies relacionadas incluem *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis*. Apesar da *Candida albicans* ser o principal agente etiológico da candidose oral, a *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são consideradas causas emergentes dessa condição por minimizar a susceptibilidade aos agentes antifúngicos atuais, exibir resistência e perdurar o reparo da mucosa oral às terapias antifúngicas (Farah; Lynch; Mccullough, 2010; Millsop; Fazel, 2016; Miranda-Cadena et al., 2018; Santos et al., 2018).

Em vista da recorrência e resistência dessa infecção aos antifúngicos convencionais, terapias complementares são estudadas para seu tratamento. Nessa perspectiva, as plantas medicinais e os fitoterápicos têm uma grande importância como medicina alternativa no Brasil e no mundo, sendo um vasto celeiro de novas moléculas promissoras no tratamento de várias doenças, além de representarem uma

alternativa de custo mais acessível (extratos) e rápida viabilidade (Wu et al., 2008; Nomura et al., 2013).

Ademais, a presença de patógenos retarda o reparo tecidual através da produção de mediadores inflamatórios, resíduos metabólicos e toxinas, além da ativação de neutrófilos, associada a enzimas citolíticas e radicais livres (Enoch; Leaper, 2005). Neste sentido, são recomendados métodos e substâncias que favoreçam a cicatrização, com especial atenção aos antissépticos e antimicrobianos (Kozlovsky et al., 2007; Mariano et al., 2015). As lesões ulcerativas na cavidade oral representam, portanto, um desafio à prática clínica diária, visto que são suscetíveis ao trauma mastigatório e tendem a desenvolver processos infecciosos de natureza polimicrobiana (Wade, 2013; Gomez; Nelson, 2016).

## **2.2 Aspectos Clínicos e Histopatológicos de UTs**

Clinicamente, as UTs apresentam-se de forma isolada, sendo recobertas por uma pseudomembrana branco-acinzentada ou brancoamarelada, com um halo eritematoso persistente (Lima, 2005; Cavalcante, 2011). As UTs tratam-se de lesões sintomáticas com aspecto ovóide, que limitam-se à área submetida ao dano e podem apresentar-se com um centro necrótico branco-amarelado rodeado por halo eritematoso. Na grande maioria dos casos medem cerca de 1 cm e evoluem para cura espontânea entre 10 a 14 dias, sem deixar cicatriz (Rennick; Campbell et al., 2016; Fitzpatrick, Cohen, Clark, 2019; Gasmi et al., 2021; Costa et al., 2023; Melo et al., 2023).

Quanto ao aspecto histopatológico, apresentam descontinuidade do epitélio e são recobertas por uma membrana fibrinogranulocítica com presença de neutrófilos. O tecido de granulação pode ser observado na base da úlcera, onde estão presentes linfócitos, histiócitos, neutrófilos e, ocasionalmente, plasmócitos, com aspectos inflamatórios que variam de acordo com seu estágio de evolução (Cavalcante et al., 2011).

Microscopicamente, observam-se três estágios da doença: a fase pré-ulcerativa com um infiltrado de linfócitos na lâmina própria acompanhado de degeneração das células epiteliais suprabasais; um estágio ulcerativo, mais avançado, com a presença de edema e degeneração epitelial progredindo para uma úlcera recoberta por uma membrana de fibrina e aumento do infiltrado epitelial e, por

fim, a fase de reparação, na qual observa-se a regeneração epitelial progressivamente substituída por células mononucleares, inicialmente macrófagos (Cavalcante et al., 2011). A partir do terceiro dia de evolução, na medida em que a lesão regride, forma-se tecido de granulação na base da úlcera, o infiltrado inflamatório torna-se predominantemente linfoplasmocitário, e, as células do epitélio oral, células endoteliais e fibroblastos proliferam dando início à reparação, onde ocorre a restituição do recobrimento epitelial, fibroplasia e diminuição progressiva das células inflamatórias (Cavalcante et al., 2011; Mandelbaum et al., 2003).

### **2.3 Inflamação**

As barreiras epiteliais, incluindo as áreas mucosas, são os principais determinantes da defesa de primeira linha na imunidade inata, preservando a integridade das interfaces ambientais (Millan, Ridley, 2005; D'Alessio et al., 2014). A inflamação é uma resposta biológica complexa dos tecidos vasculares contra agentes agressivos, como patógenos irritantes ou células danificadas. A inflamação aguda é a resposta inicial e caracteriza-se pelo aumento da migração de células plasmáticas e do sistema imunológico inato, como neutrófilos e macrófagos, do sangue para os tecidos lesados. Já a inflamação crônica diz respeito a uma mudança progressiva no tipo de células presentes no local da reação inflamatória e é caracterizada pela destruição e cicatrização simultânea do tecido lesado (Ferrero-Miliani et al., 2007; Sá; Andrade; Sousa, 2013).

Os sinais padrões da inflamação consistem em aumento do fluxo sanguíneo, elevação do metabolismo celular, vasodilatação, liberação de mediadores solúveis, extravasamento de fluidos e influxo celular (Ferrero-Miliani et al., 2007; Sá; Andrade; Sousa, 2013). Na presença do agente inflamatório, as membranas celulares induzem a ativação da fosfolipase A2 seguida da liberação de ácido araquidônico e mediadores inflamatórios como citocinas, serotonina, histamina, prostaglandina e leucotrienos que aumentam a permeabilidade vascular, facilitando a migração de leucócitos para o local de inflamação (Castel et al., 2013; Guimarães; Andrade, 2022).

A inflamação se estabelece através do reconhecimento, pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), de estruturas moleculares características de patógenos microbianos. Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) – tais como o LPS, sequências não metiladas de DNA (CpG), e RNA de dupla fita –

reconhecem também as moléculas intracelulares derivadas do hospedeiro que são liberadas frente a um dano ou morte celular e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) – como quimiocinas (IL-8), citocinas (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1, IL-6). Ao serem reconhecidas, essas moléculas ativam as células em que são expressas para promoverem suas funções antimicrobianas e pró-inflamatórias (Kennedy; Deleo, 2009; Silva, 2015). Ao detectar a presença de microrganismos ou de uma lesão, os macrófagos presentes no tecido recrutam neutrófilos circulantes para o local lesado por meio do recrutamento leucocitário, nas seguintes fases: captura/ativação, rolamento, adesão e transmigração (Kennedy; Deleo, 2009; Kobayashi; Deleo, 2009; Bogdan, Röllinghoff; Diefenbach, 2000).

Nos estágios iniciais da inflamação, leucotrienos, prostaglandinas e histamina se ligam a seus receptores nas células endoteliais, levando à vasodilatação, contração das células endoteliais e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. A ligação da histamina desencadeia uma regulação positiva da P-selectina (uma molécula de adesão celular) e do fator ativador de plaquetas (PAF) nas células endoteliais que revestem as vênulas. A ligação subsequente da selectina P e do PAF aos leucócitos leva ao extravasamento seguido pela migração dos leucócitos para os agentes quimiotáticos (ex: proteína do complemento C5a e leucotrieno B4) produzidos pelas células no local da lesão. Além disso, macrófagos ativados e células endoteliais vasculares liberam citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1) que se ligam a receptores em células endoteliais mantendo a resposta inflamatória pela regulação positiva da produção da molécula de adesão E-selectin e mantendo a expressão de P-selectin. Então, a E-selectina liga-se aos leucócitos, que se direcionam através da membrana basal às quimiocinas, como a interleucina-8 (IL-8) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) geradas pelas células no local infectado (Ferrero-Miliani et al., 2007; Dassoler et al., 2004; Falcão et al., 2005; Sá; Andrade; Sousa, 2013).

As citocinas são as principais proteínas de sinalização na resposta do hospedeiro contra a inflamação e sistema. São classificadas como interleucinas, quimiocinas, interferons, fatores de necrose tumoral, fatores de crescimento e fatores estimuladores de colônias. Elas subdividem-se em citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23, fator de necrose tumoral  $\gamma$  (TNF $\gamma$ )), citocinas anti-inflamatórias

(IL-4, IL-10, IL-13, fator transformador de crescimento  $\gamma$  (TGF $\gamma$ ), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )) (Berczi; Szentivanyi, 2003).

O fator de necrose tumoral  $\gamma$  (TNF $\gamma$ ) é um importante mediador da inflamação entre as citocinas e diversos tipos celulares, como células inflamatórias, células endoteliais e fibroblastos (Berczi; Szentivanyi, 2003). As interleucinas, por sua vez, desempenham um papel fundamental no sistema imunológico, agindo na modulação na inflamação. Entre elas, a IL-1 está envolvida na transformação de infiltrados de fagócitos durante estados inflamatórios ou cânceres para a produção de ROS e RNS, síntese de moléculas como quimiocinas, integrinas e MMPs (Apte et al., 2006). A IL-6, presente principalmente em inflamações agudas, quando produzida descontroladamente leva a muitas doenças inflamatórias (Balkwill; Mantovani, 2010). Monócitos, macrófagos e as células T no local da inflamação são a principal fonte de sua produção. Enquanto isso, a produção e liberação de IL-6 depende de vários fatores de transcrição, principalmente NF- $\gamma$ B e AP-1 (Heinrich et al., 2003).

O TGF $\gamma$  (fator de crescimento transformador  $\gamma$ ) é uma citocina reguladora que desempenha um papel na regulação de inflamação. A alteração de sua atividade pode levar à inflamação crônica (Yang; Pang; Moses, 2010). Os fatores de transcrição desempenham um papel fundamental ao regular a expressão de proteínas pró-inflamatórias. Mediadores durante a inflamação envolvendo vários fatores de transcrição (TFs), como NF- $\gamma$ B, STAT1/STAT3, AP-1, Nrf2 e HIFs. Dentre estes, destaca-se o NF- $\gamma$ B, por ser considerado o fator de transcrição heterodimérico mais focal. Esta proteína compreende principalmente duas subunidades p50 e p65 também conhecidas como complexo NF- $\gamma$ B/Rel e permaneceram inativas citoplasmicamente com inibidor- $\gamma$ B (I $\gamma$ B) como uma forma complexa inativa (Gilmore, 2006). Estímulos pró inflamatórios e oxidativos como citocinas, vírus ou LPS, podem ativar o NF- $\gamma$ B através do proteossoma degradação e fosforilação de I $\gamma$ B, resultando na translocação e ligação de NF- $\gamma$ B a a região promotora de genes no núcleo, codificando mediadores pró-inflamatórios, como COX-2, iNOS e citocinas (Wu et al., 2014). A via de transdução do sinal NF- $\gamma$ B é desencadeada por estímulos pró-inflamatórios (IL-1, TNF- $\gamma$ ), oncogenes em células tumorais, vírus, fatores de crescimento, o complexo Toll-like receptor (TLR)-MyD88, estresse genotóxico e hipóxia (Fitzgerald et al., 2001; Takeda; Akira, 2004).

Um grande esforço tem sido despendido no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da inflamação, sendo necessário encontrar novos agentes anti-inflamatórios, visando tornar esse processo mais rápido, menos dolorido e com menos efeitos adversos provocados pelos medicamentos disponíveis no mercado. Isso pode ser feito com recurso a compostos farmacológicos ou substâncias naturais. Para este efeito, monoterpenos extraídos de óleos essenciais provaram ser úteis para controlar a inflamação do tecido lesado (Ferrero-Miliani et al., 2007; Sá; Andrade; Sousa, 2013).

## **2.4 Cicatrização**

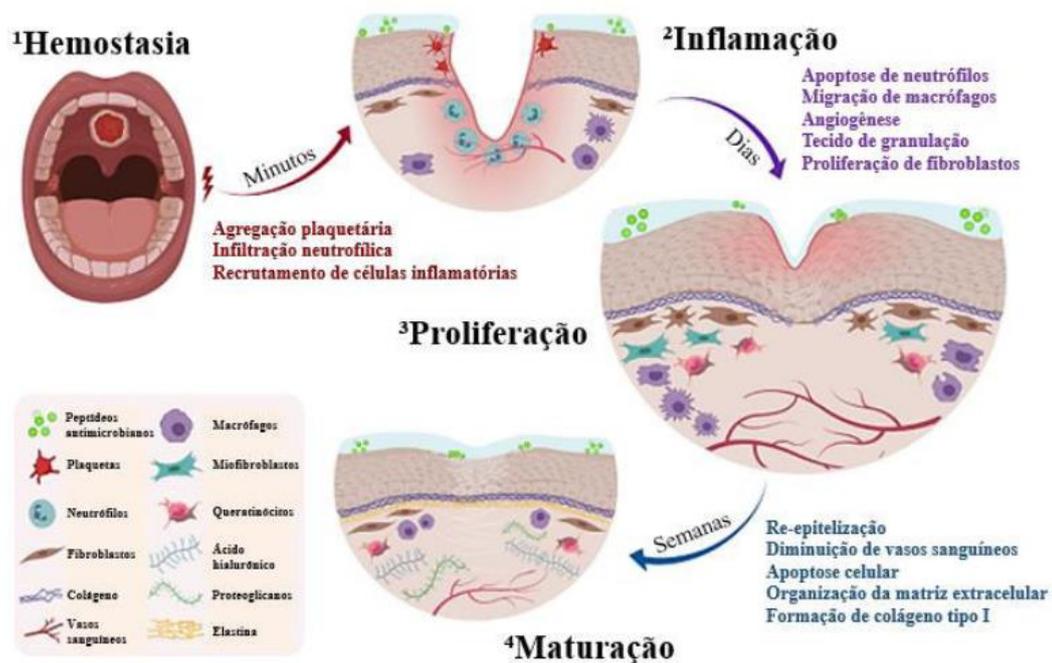
O trauma na mucosa oral pode ocorrer devido a alimentos cortantes, escovação excessiva ou mordidas acidentais. Dessa forma, ocorrem mais frequentemente na língua, lábios e mucosa jugal por serem locais mais suscetíveis aos agentes traumáticos. Geralmente apresentam-se como lesões individuais com uma área eritematosa que circunda uma membrana removível, central, fibrinopurulenta e evoluem para o reparo assim que o fator desencadeante é removido (Fernandes et al., 2022).

As UTs orais cicatrizam por segunda intenção, de modo que a disjunção do tecido epitelial e consequente exposição do tecido conjuntivo estimulam sínteses e liberação de mediadores vasoativos e pró-inflamatórios, dando início à fase inflamatória (González Roma, 2020).

A cicatrização de UTs, de maneira geral, divide-se em 4 etapas sobrepostas (Figura 1): Hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, que envolvem diferentes tipos celulares (neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos) e componentes da matriz extracelular (fibronectina, proteoglicanos e colágeno) (Gonzalez et al., 2016; Cheng et al., 2018). Esse processo é iniciado pelo extravasamento de constituintes do sangue, agregação plaquetária e migração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos (24-48h), para o local da ferida. Após cinco dias, macrófagos ativados produzem fatores de crescimento e citocinas inflamatórias [Interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ )] que desempenham um papel modulador, como estimulação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), síntese, quebra de proteínas da matriz extracelular e quimiotaxia de fibroblastos (Koh; Dipietro, 2011; Ridiandries, Tan; Bursill, 2018).

Na transição da fase inflamatória para proliferativa ocorrem a migração e proliferação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, seguidas pela angiogênese, levando à re-epitelização e formação de tecido de granulação. Durante essa etapa, fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, estimulados, principalmente, por TGF- $\beta$  mediado via ativação Smad3, que regula a transcrição de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -AML), que por suas características contráteis auxiliam no fechamento de feridas. Finalmente, na fase de remodelação, há uma tentativa de recuperação dos tecidos normais através da redução da celularidade e vascularização, além da deposição de colágeno (Muthukumar et al., 2014; Portou et al., 2015; Mia; Bank, 2016; Eming; Wynn; Martin, 2017; Wang et al., 2018).

Figura 1. Etapa da cicatrização de feridas



Fonte: adaptado de TOMA et al. (2021).

## 2.5 Modalidades Terapêuticas no Tratamento De UTs

A sintomatologia dolorosa causa grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos, pois interfere na capacidade de exercer atividades básicas como se alimentar, falar e manter a higiene oral, além de limitar a abertura bucal (Vale et al., 2015; Costa et al., 2023). Em decorrência do intenso desconforto causado ao

paciente, existem inúmeras terapias que podem ser empregadas visando o alívio da dor, modulação da inflamação e aceleração do reparo tecidual (Valle et al., 2017; Oliveira; Martins et al., 2019; Costa et al., 2023). Portanto, torna-se importante o tratamento dessas lesões com o objetivo de reduzir a dor e a inflamação, além de acelerar a cicatrização e restabelecer a ingestão alimentar (Amaral et al., 2020; Costa et al., 2023).

A escolha da terapêutica para úlceras aftosas recorrentes e traumáticas é inespecífica, baseia-se na gravidade, frequência, sintomatologia e promoção do processo cicatricial, utilizados na maioria das vezes opções terapêuticas paliativas como anti-inflamatórios, imunomoduladores, analgésicos, antibióticos e anestésicos, além de medicamentos com propriedades naturais e homeopáticos para restabelecer as funções orais normais (Belenguer-Guallar; Jimenez-Soriano; Claramunt-Lozano, 2014; Melo, 2023).

A administração de corticosteroides é o tratamento mais utilizado, visando o alívio da dor e a modulação da inflamação, além de estimular o reparo tecidual (Kurtulmusyilmaz et al., 2015; Finfter et al., 2021; Silva et al., 2017). Esses medicamentos são aplicados na forma tópica de orabase, como uma formulação de carboximetilcelulose, polietileno e óleo mineral, que conferem maior adesão à mucosa e resistência a dissolução e deslocamento. No entanto, apresentam efeitos adversos locais e sistêmicos que limitam suas aplicações (Elad et al., 2011; Kapugi; Cunningham, 2019; Costa et al., 2023).

As plantas medicinais surgem como uma alternativa, visto que, apresentam propriedades curativas de feridas devido à sua vasta variedade de constituintes, como alcalóides, óleos essenciais, flavonóides, monoterpenos e biomoléculas que interferem em uma ou mais fases de reparo, tornando-os um alvo importante para uso na prática clínica (Paulo Filho et al., 2000; Puspasari et al., 2018). Dentre estes bioativos, o d-limoneno tem efeitos positivos na cicatrização de feridas, provavelmente mediados por seu principal metabólito o álcool perílico (POH) que tem capacidade de diminuir tanto a inflamação quanto a neoangiogênese, podendo ter efeito direto nas células epiteliais (D'Alessio, 2014).

O tratamento das lesões orais é considerado difícil pelos pesquisadores devido à dificuldade de aplicação de medicamentos tópicos e sua rápida diluição na

cavidade oral relacionada à salivação e aos movimentos musculares (Mosvin; Buylin, 2006; Anand et al., 2013; Ribeiro; Marangoni, 2020). Neste âmbito, o limoneno é considerado um tensoativo que aumenta a permeabilidade do fármaco, além de reduzir o seu período de latência, podendo ser considerado uma boa alternativa nestes casos (Erasto; Viljoen, 2008).

## **2.6 Terpenos**

Os terpenos, também chamados de terpenóides ou isoprenóides, são uma família de produtos naturais encontrados em todos os organismos vivos. Muitas plantas são produtoras destes metabólitos secundários. Uma das características mais importantes é que os compostos são voláteis, têm odor e podem ser utilizados numa variedade de aplicações em diferentes segmentos industriais ou na medicina tradicional (Barrosa et al., 2023). Normalmente, podem conter centenas de moléculas individuais formadas essencialmente por monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides e isotiocianatos (Felipe; Bicas, 2017). A concentração dessas moléculas varia, e algumas moléculas podem compor até 70% do total de OE, sendo assim componentes principais e, portanto, responsáveis pela atividade biológica atribuída ao OE (Sharifi-Rad et al., 2017).

Os terpenos apresentam diversas funções, como mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos e fisiologia do desenvolvimento vegetal. Podem apresentar estrutura química diversa e são sintetizados por vias metabólicas por vários tipos de células vegetais especializadas (Zulak; Bohlmann, 2010; Cho et al., 2017). Os terpenos são empregados na prevenção e tratamento de doenças, oferecendo diversos efeitos antimicrobianos, antialérgicos, antioxidantes, anti-inflamatórios e propriedades imunomoduladoras (Theis; Lerdau, 2003), devido apresentarem propriedades farmacocinéticas favoráveis, como lipofilicidade e baixo peso molecular (Miguel, 2010; Rufino et al., 2015).

Os óleos essenciais (OEs) são uma mistura de substâncias voláteis e naturais, caracterizadas por um forte odor e produzidas por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Eles têm diversas aplicações e têm sido comercialmente importantes para as indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e de perfumaria (Sharifi-Rad et al., 2017). Os OEs de várias plantas medicinais têm demonstrado melhorar a cicatrização de feridas (Cavalcanti et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Gunal

et al., 2014; Karodi et al., 2009; Sumitra et al. 2009; Ximenes et al., 2013; Keskin et al., 2017).

Tratam-se de produtos obtidos por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação seca ou por um processo mecânico adequado sem aquecimento (para frutas cítricas) de uma planta ou parte dela. Tipicamente, óleos essenciais são compostos por terpenos, incluindo monoterpenos, que são os constituintes mais comuns (Rubiolo et al., 2010; Vieira et al., 2018).

Os óleos essenciais cítricos são caracterizados por uma fração volátil e uma não volátil, que podem ser constituídos por mais de 200 compostos. A fração volátil é composta principalmente por hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos, também por seus derivados oxigenados, aldeídos alifáticos, álcoois e ésteres, formando até 99% do óleo essencial. A fração não volátil pode conter hidrocarbonetos, esteróis, ácidos graxos, ceras, carotenóides, cumarinas, psoralenos e flavonóides (Tranchida et al., 2012; Vieira et al., 2018).

A variedade de atividades farmacológicas encontradas nos óleos essenciais é notável, tendo potencial no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de diversas doenças. O número de estudos clínicos e pré-clínicos sobre óleos essenciais e seus constituintes químicos vem aumentando a cada ano. Além disso, existem muitas substâncias bioativas que são sintetizadas a partir dos constituintes dos óleos essenciais. Algumas atividades farmacológicas desses óleos, como ação antitumoral e antinociceptiva, estão relacionadas aos seus efeitos anti-inflamatórios (Valério et al., 2007; Sousa, 2012; Sá et al., 2013).

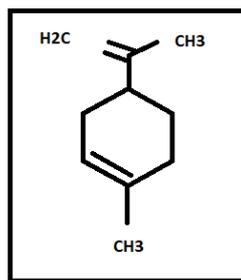
Nesse contexto, plantas medicinais e seus compostos isolados são empregados mundialmente na medicina popular para o tratamento de diversas condições inflamatórias, como inflamações pulmonares e cutâneas. Na busca contínua por novos produtos naturais bioativos contra a inflamação, os óleos essenciais são cada vez mais referidos como uma fonte rica desses produtos.

## **2.7 Considerações Sobre o Limoneno**

O Limoneno é um composto isolado presente em alguns dos óleos essenciais mais estudados ultimamente, e já foi encontrado em mais de 300 espécies de diferentes plantas (Jongedijk et al., 2016; Zahi; Liang; Yuan, 2015; Simas et al.,

2015). Trata-se de um monoterpene monocíclico, *4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno* (Badee; Helmy; Morsy, 2011), de fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>. Apresenta-se na forma de um líquido incolor, oleoso, apolar, com odor forte, característico dos citrinos, e que apresenta propriedade lipofílica (Ciriminna *et al.*, 2014). Consiste ainda, num dos principais compostos de diversos óleos voláteis das cascas de frutas cítricas (Lu; Chiang; Huang, 2014), com propriedades terapêuticas (Li; Chiang, 2012) e aromáticas (Zhang *et al.*, 2014).

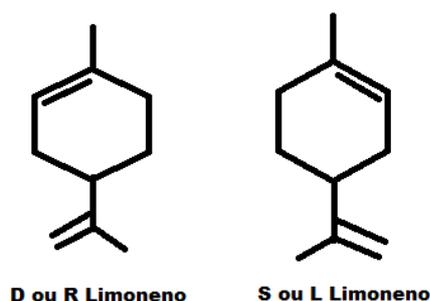
Figura 2: Estrutura química do Limoneno



Fonte: Próprio Autor

Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpene na natureza. S-(-)-limoneno (L-Limoneno) é principalmente encontrado em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto R-(+)-limoneno (D-Limoneno) é o componente preponderante dos óleos das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de *Carum carvi* L. (alcarávia) (Demyttenaere; Kimpe, 2011). Já no caso dos óleos essenciais dos cítricos em geral, o R-(+)- limoneno é seu componente predominante, alcançando concentrações de 90% a 96% (Maróstica; Pastore, 2007).

Figura 3: Enantiômeros do Limoneno



Fonte: Próprio Autor

O D-limoneno é um dos terpenos mais comuns na natureza e está listado no Código de Regulamentos Federais como “geralmente reconhecido como seguros” como agente aromatizante (CFR (Code of Federal Regulations), 2018). Trata-se de uma matéria prima renovável, economicamente viável e que possui baixa toxicidade (DL 50 = 5300mg/kg), não conferindo riscos para os seres humanos, e que vem sendo empregado clinicamente para dissolver cálculos biliares contendo colesterol e para alívio da azia e do refluxo gastroesofágico, devido ao seu efeito de neutralização do ácido gástrico. Além disso, estudos apontam a capacidade quimiopreventiva contra alguns tipos de câncer, como o mamário e o colo retal (Sun, 2007).

Vale salientar que o Brasil é um dos países que se destaca mundialmente na produção e exportação de óleos essenciais, sobressaindo-se como o maior produtor e exportador do óleo essencial de laranja do mundo (Bizzo; Rezende, 2022). Portanto, a indústria farmacêutica e a prática clínica podem ser beneficiadas, através do investimento em pesquisa acadêmica na área, devido ao amplo potencial terapêutico dos mesmos (Bieski et al., 2022).

## **2.8 Propriedades Terapêuticas e Mecanismos de Ação Do Limoneno**

De acordo com a literatura, pode-se afirmar que o limoneno apresenta propriedades anti-inflamatórias, antidiabética, antioxidante, anticancerígena, antialérgica, antinociceptiva, e anti-estresse, além de efeitos positivos no tratamento de úlcera gástrica, colite, asma e inflamação das vias aéreas (Vieira et al., 2018; Huang et al., 2019; Doughari; Bazza, 2020).

A atividade anti-inflamatória do limoneno vem sendo bastante explorada (Rehman et al., 2014; Rufino et al., 2015), seu principal mecanismo envolve a inibição do Fator Nuclear Kappa B (NFkB) (D'Alessio et al., 2013). Evidências científicas apontam ainda que o limoneno possui potencial antinociceptivo (Do Amaral et al., 2007), exibindo sua ação como agonista dos receptores de adenosina A<sub>2</sub>, responsáveis pela regulação do sono, além de induzir a ativação da proteína quinase A, aumenta o AMPc citosólico (Park et al., 2011). Além disso, quando utilizado na forma tópica, estimula o canal potencial receptor transiente, o TRPA1 e, quando administrado sistemicamente, inibe a nocicepção induzida pelo estresse oxidativo (Kaimoto et al., 2016).

Existem ainda evidências de sua atividade anti-inflamatória, sendo considerado um inibidor de óxido nítrico induzido pela IL-1 $\beta$  (Rufino et al., 2015) e como opção do tratamento de alergia inflamatória pulmonar (Hansen et al., 2016). Araújo-Filho et al. (2017), observaram em seu estudo que a atividade antihiperálgica do limoneno diminui a expressão do gene c-FOS na medula espinhal, sugerindo uma modulação da transmissão de dor por meio das lâminas I e II do corno dorsal, encarregadas de transmitir os impulsos dolorosos até as áreas supramedulares.

Quando se buscou elucidar os mecanismos subjacente aos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos *in vivo* e *in vitro* do limoneno obtido de óleos essenciais de *Gynura procumbens*, foi visto que este apresenta efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos por meio da inibição de infiltrados inflamatórios induzidos por estímulo nociceptivo e superexpressão de cicloxigenase-2 (COX-2) (Huang et al., 2019). Em estudo que teve como objetivo investigar o papel protetor do limoneno na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos, sugere-se que o mecanismo de proteção do limoneno pode ser atribuído à redução de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) em BALF, diminuição da proporção W/D, além de inibir quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), ativação de JNK, p38 MAPK e NF- $\kappa$ B (Chi et al., 2013).

Outro mecanismo pelo qual o mesmo apresentou atividade anti-inflamatória, foi por meio da diminuição na infiltração de neutrófilos e subsequente produção de mieloperoxidase (MPO), levando a um efeito antioxidante por meio de um aumento na atividade da glutationa peroxidase (GPx), além de atuar na modulação de citocinas, produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10, acionados pela modulação da expressão dos genes *Gpx*, *Mpo*, *Il-1 $\beta$*  e *Nf-kb*, quando se investigou o efeito protetor do limoneno em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos *Wistar* (De Souza et al., 2019).

De Almeida et al. (2017) em seu estudo pesquisaram o potencial antiinflamatório e antinociceptivo do (+) - epóxido de limoneno, um composto obtido através da epoxidação do D-limoneno, e observou que este foi capaz de inibir a inflamação em edema de pata de camundongos por meio da inibição da liberação/atividade de mediadores inflamatórios (serotonina, histamina e prostaglandina E<sub>2</sub>), diminuição da permeabilidade vascular, diminuição na migração de neutrófilos, além

de apresentar efeitos periféricos dependentes de analgésicos no sistema opióide, sendo considerada então, uma molécula promissora para tratar a inflamação e transtornos relacionados à dor.

No estudo de Hirota et al. (2012), onde buscaram avaliar a atividade de inibição do limoneno na hiperresponsividade das vias aéreas induzida por dermatophagoides (AhR), infiltração eosinofílica e outros fatores histológicos de alterações pulmonares, produção de citocinas T helper (Th) 2 e remodelação das vias aéreas em um modelo de asma em camundongos. Nesse estudo, observou-se que o limoneno apresentou ação anti-inflamatória no tratamento da asma brônquica, por meio da inibição da produção de imunoglobulina E (IgE), citocinas Th-2 representativas, quimiocinas MCP-1 e TGF- $\beta$ 1, IgG1 específico de alérgeno, IgE; resultando na inibição de AhR (receptor de aril hidrocarbonetos), redução da deposição de colágeno e influxo de células inflamatórias nos pulmões dos camundongos.

Em estudo objetivando investigar a atividade anti-inflamatória do Limoneno obtido do óleo essencial de *Citrus latifolia Tanaka* (limão-taiti), em peritonite induzida por zymosan, constatou-se atividade antimigratória de neutrófilos associada a inibição de mediadores pró- inflamatórios presentes na fase exsudativa inflamatória e quimiotaxia leucocitária, com envolvimento de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  (Kummer et al., 2013). E, de acordo com Moraes et al. (2013), que avaliaram a atividade curativa do limoneno em úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos, observou que este promoveu um aumento na cicatrização epitelial, proliferação do antígeno nuclear celular, expressão da ciclooxigenase 2 na mucosa gástrica, formação de vasos sanguíneos mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular na margem da úlcera e produção de tecido mucoso, fortalecendo a barreira gástrica protetora.

Segundo Sumiwi et al. (2015), que pesquisaram o mecanismo molecular da atividade antiinflamatória do Limoneno obtido da *Cinnamomum sintoc* encontrou que este inibiu a produção de PGE2 em fibroblastos humanos induzidos por LPS, podendo ser categorizados como inibidores de COX. Apresentou também forte potencial antiinflamatório em edema de pata de ratos e camundongos, quando investigou-se seu potencial antiinflamatório, atividade hipoglicêmica e dose letal

mediana (LD50), visto que inibiu a produção de óxido nítrico, bem como apresentou uma inibição significativa da produção de interferon gama e IL-4 (Yilmaz; Özbek, 2018).

Em relação ao potencial cicatrizante, Ayuningtyas et al. (2023), em estudo observaram que a aplicação de óleo essencial de casca de *C. limon* contendo D-limoneno levou a um aumento na expressão de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e CD-31 (Cluster de Diferenciação 31) durante o processo de cicatrização de úlceras traumáticas no lábio inferior de ratos *Wistar* afligidos por diabetes, devido ao aumento do número de macrófagos como produtores de VEGF ou pela ativação indireta de macrófagos por meio de linfócitos ativados, podendo melhorar a cicatrização de feridas diabéticas através de quimiotaxia e angiogênese além de melhorar a função endotelial tanto na condução nervosa quanto na oxigenação tecidual, resultando na cicatrização acelerada da úlcera.

Ademais, no que se refere ao seu potencial antifúngico, o Limoneno age no aumento da fluidez da membrana, levando ao aumento da permeabilidade, perda de integridade celular e inativação da energia metabólica, favorecendo a prevenção da manutenção dos complexos entre enzima e membrana como, por exemplo, o complexo formado entre citocromo P450 monoxigenase e citocromo P-450 redutase dependente de NADPH (Fosfato Dinucleótideo de Nicotinamida e Adenina), que está envolvido na oxidação de terpenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteróides e outros compostos lipofílicos, originados por fungos (Maróstica; Pastore, 2007).

O limoneno, obtido do óleo essencial de *Mikania cordifolia*, foi testado isolado ou associado a medicamentos antibacterianos contra bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR) como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, demonstrou potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* por meio da modulação dos antibióticos contra as bactérias resistentes à múltiplas drogas, porém quando isolado seu efeito antimicrobiano não foi relevante (De Araújo, 2020). A atividade antimicrobiana deste composto foi avaliada também quando este foi extraído por destilação a vapor do pericarpo de *Camellia sinensis*, contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*, revelando uma Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 200 mg/mL

e Concentração Bactericida Mínima (MBC) na faixa de 300-400 mg/mL (Doughari; Bazza, 2020).

Mitropoulou et al. (2017) pesquisaram a atividade antimicrobiana e antiproliferativa do Limoneno obtido do óleo essencial de *Citrus medica*, e constatou ser eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fragi*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, obtendo com resultado valores de CIM e CBM que variaram de  $845 \pm 26$ - $2008 \pm 43$  mg/L<sup>34</sup> e 4184-8368 mg/L, respectivamente. Observou-se ainda na literatura que o Limoneno apresentou potencial antifúngico contra diferentes espécies de *Candida albicans* (Omran et al., 2011; Pinto et al., 2013, 2017; Thakre et al., 2018; D'Arrigo et al., 2019), *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* (Pinto et al., 2013, 2017; D'Arrigo et al., 2019), além de *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis* e *Candida Krusei* (Pinto et al., 2013, 2017), ), exibindo um efeito antagônico quando administrado junto ao Fluconazol, Voriconazol e à Caspofungina, essa interação pode resultar em maior eficácia, melhores efeitos antifúngicos devido ao seu mecanismo de ação na membrana, contribuindo para a diminuição das doses eficazes, reduzindo, portanto, a probabilidade de efeitos adversos (D'Arrigo et al., 2019).

Além disso, Kim et al. (2013) realizaram estudo de avaliação de risco no uso do d-limoneno e observaram que o composto apresenta um curto tempo de meia-vida (entre 12 e 24h) e sua excreção ocorre através da urina. Depois de inalado na dose de 450 mg/m<sup>3</sup> por duas horas, foram vistas três fases de eliminação, com meias-vidas de aproximadamente 3, 33 e 750 minutos, respectivamente, com 1% do absorvido sendo eliminado inalterado no ar exalado e aproximadamente 0,003% eliminado de forma inalterada pela urina. Em altas concentrações, o Limoneno mostrou-se irritante para a pele, porém não alergênico, conferindo a este composto a categoria de químico com baixa toxicidade. Rehman et al. (2014) em um estudo que analisou toxicidade renal induzida por doxorubicina encontrou que o d-limoneno mostra efeito protetivo, possivelmente atenuando o estresse oxidativo e dano inflamatório de tecidos, não encontrando evidências de toxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade ou ainda nefrotoxicidade.

Portanto, este estudo é importante para elucidar os efeitos clínicos

benéficos do LIM para a saúde humana, tendo em vista o seu potencial como agente anti-inflamatório, antinociceptivo e atividade antifúngica, bem como baixa toxicidade, que o tornam uma boa opção para o tratamento de UTs na cavidade oral.

## **2.9 Formulações Farmacológicas em Emulgéis**

Nos últimos anos a procura por novos sistemas carreadores de fármacos, como o emulgel, tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais reduzidos. Novas substâncias naturais ou sintéticas necessitam ser estudadas quanto à sua eficácia, toxicidade e reações adversas devido ao perfil limitante das opções terapêuticas e a alta frequência das UTs (Slaughter *et al.*, 2009; Vermonden; Censi; Hennink, 2012).

Visando desenvolver uma nova composição terapêutica e forma de administração, os emulgéis, que são redes poliméricas tridimensionais obtidas por meio de polímeros naturais e/ou sintéticos são uma alternativa relevante. Além de possuir características semelhantes às dos tecidos vivos (baixa tensão superficial, quantidade de água, consistência) e serem biocompatíveis, apresentam propriedades únicas que podem ser modificadas e direcionadas para o tratamento de infecções. Esse sistema vem sendo bastante empregado na medicina regenerativa e na engenharia tecidual, principalmente como sistema de liberação de drogas e/ou células através de mudanças na estrutura do gel em resposta a mudanças do ambiente. Os emulgéis bioadesivos são ideais para administração tópica na mucosa oral por exemplo, por permitir a liberação prolongada de agentes terapêuticos (Tatavarti; Hoag, 2006; Bhattarai; Gunn; Zhang, 2010).

Tendo em vista as limitações encontradas no tratamento das UTs e o quanto essa condição pode impactar a vida do paciente, aliado ao grande potencial farmacológico do Limoneno, julga-se importante a realização desta pesquisa de caráter inédito, para poder avaliar sua atividade anti-inflamatória, cicatrizante e anti-*Candida*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver, caracterizar e avaliar biologicamente um emulgel à base de R-(+)-limoneno (ELI) para o tratamento de úlceras traumáticas da cavidade oral de ratos Wistar.

#### 3.2 Objetivos Específicos

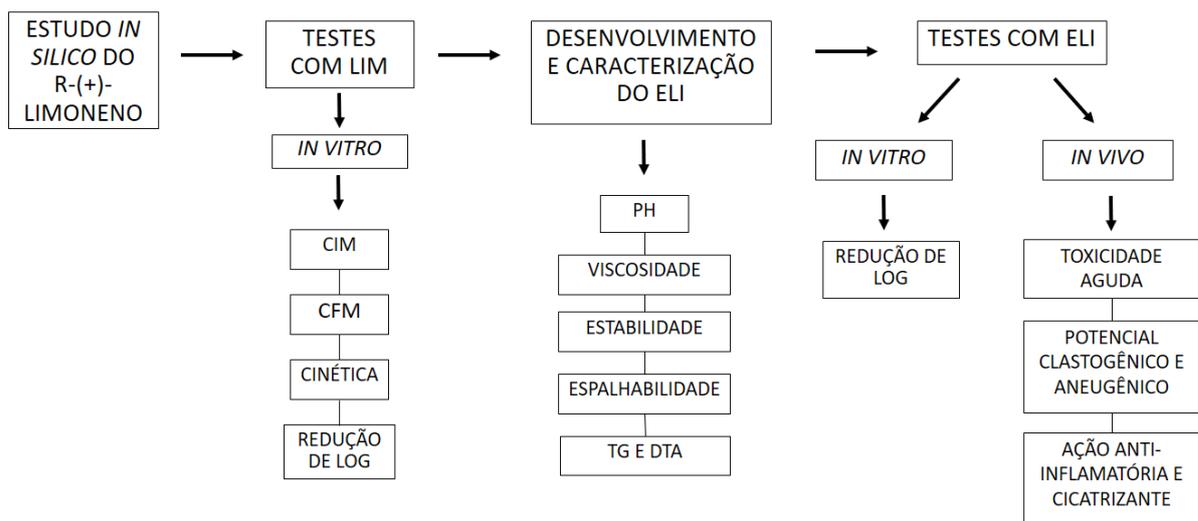
- Verificar através de ensaio *in silico* o potencial biológico do R-(+)-limoneno em espécies de microrganismos de interesse para Odontologia, assim como a biodisponibilidade oral teórica desse composto e a toxidez oral aguda em ratos em diferentes vias de administração;
- Avaliar a atividade antifúngica do LIM por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM), da Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre *Candida* spp;
- Determinar, por meio da curva de *time-kill*, o potencial anti-*Candida* do LIM sobre a cinética de crescimento de *C.albicans*;
- Desenvolver e caracterizar um ELI através da realização de análises físico-químicas aplicadas em formulações farmacêuticas como: pH, viscosidade, estabilidade, espalhabilidade e análises térmicas de TG e DTA;
- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* do ELI em camundongos e o potencial clastogênico e aneugênico do ELI por meio do teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos *Mus musculus*;
- Determinar o potencial antimicrobiano do LIM e do ELI sobre *Candida* spp; por meio de redução logarítmica;
- Avaliar, *in vivo*, a ação anti-inflamatória e cicatrizante do ELI no tratamento de UTs induzidas na cavidade oral de ratos, por meio de parâmetros semiquantitativos de intensidade de infiltrado inflamatório.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Delineamento Do Estudo

Trata-se de uma investigação experimental *in vitro* e *in vivo* que adotou um modelo de pesquisa animal de roedores, sendo caracterizado como estudo *in vivo* randomizado, cego e controlado.

Figura 4: Fluxograma da Pesquisa



Fonte: Próprio Autor

### 4.2 Local Da Pesquisa

O desenvolvimento e caracterização da formulação ELI foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDLCPF) da UEPB, Campus I, Campina Grande, Paraíba.

As análises térmicas foram realizadas no Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (Certbio) da UEPB, Campus I.

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Análises e Diagnóstico do Departamento de Odontologia da UEPB, Campus I.

As análises histopatológicas dos órgãos e tecidos foram realizadas no Laboratório de Patologia Oral da UEPB, Campus I.

Os testes *in vivo* foram realizados no Centro de Bioterismo da UEPB, Campus I.

### 4.3 Ensaio *in Silico*

Para os ensaios *in silico* o desenho da molécula foi realizado no programa *Chemdraw* (<http://www.chemspider.com/>), o qual fornece as informações químicas referente a molécula estudada. A partir desses dados seguiu-se aos estudos *in silico* propostos nessa pesquisa.

A análise da probabilidade do desenvolvimento de propriedades farmacológicas do monoterpene em estudo foi realizada através do *PASS ONLINE*®, software projetado como uma ferramenta para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula semelhante a um fármaco orgânico. O *PASS* fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividade biológica com base na estrutura dos compostos orgânicos. O programa fornece características da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (SRINIVAS et al., 2014).

Os parâmetros toxicológicos foram avaliados através da toxicidade oral aguda em ratos pelo programa GUSAR (General Unrestricted Structure–Activity Relationships) (<http://www.way2drug.com/gusar/acutoxpredict.html>). Esta ferramenta cria modelos QSAR/QSPR com base em semelhanças químicas entre compostos com efeitos tóxicos conhecidos e a presença de fragmentos tóxicos (Ghannay et al., 2020). A toxicidade oral aguda foi classificada com base nas categorias da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) que divide os compostos de acordo com seu valor de DL50 (conhecida como a dose letal mediana). A categoria I contém os compostos com valores de DL50 inferior ou igual a 5 mg/kg, a Categoria II contém compostos com valores DL50 superiores a 5 mg/kg e inferior a 50 mg/kg, a Categoria III inclui compostos com valores DL50 superiores a 50 mg/kg e inferior a 300 mg/kg, a Categoria IV consiste de compostos com valores DL50 superiores a 300 mg/kg e inferior a 2000 mg/kg e a categoria V, valores superiores a 2000 e inferior a 5000 mg/kg.

#### 4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do LIM

Para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana, os produtos foram solubilizados em Tween 80 a 2% e Dimetil- Sulfóxido (DMSO) a 5%. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 3 mL) para obter o R-(+)-limoneno (LIM) na concentração inicial de 21000 µg/mL (Cleeland; Squires, 1991; Hood et al., 2003).

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008). O inóculo fúngico foi padronizado em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) com comprimento de onda de 530nm e absorvância entre 0,08–0,1, correspondendo à concentração de  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Nos poços da microplaca, durante os testes de atividade anti-*Candida*, esta concentração caiu pela metade, resultando em  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL.

As cepas utilizadas para os testes foram: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750) e *Candida albicans* (A1 e A2), todas armazenadas no Laboratório de Análises e Diagnóstico do Departamento de Odontologia da UEPB.

A atividade anti-*Candida* do LIM foi determinada segundo a normatização M27-A3 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), por meio da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Microplacas de fundo chato com 96 poços (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas inserindo-se 100µL de meio de cultura CSD - Caldo Saboraud Dextrose (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) em todos os poços. Em seguida, 100µL do LIM foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca. Diluições seriadas (1:2) foram então realizadas por meio da transferência de 100 µL aos poços subsequentes. Posteriormente, 100µL do inóculo foram inseridos em todos os poços. Desse modo, o LIM foi ensaiado entre o intervalo das concentrações 21000µg/mL e 164,0625 µg/mL. O controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de microrganismos nos poços), e do veículo Tween 80 a 2%, DMSO a 5%

e água destilada esterilizada (q.s.p. 3 mL) (presença de microrganismos) foram realizados para garantir acurácia do método. Controles farmacológicos como nistatina e fluconazol foram realizados nas concentrações que variam de 64 a 0,5 µg/mL.

As placas foram então incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose. Após esse período, a CIM foi definida como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos avaliados. A viabilidade dos microrganismos foi determinada pela utilização do corante resazurina a 0,01% em todos os poços. A metabolização do corante pelos microrganismos viáveis resulta na produção de um pigmento de cor rosa.

A CFM do LIM foi determinada pela semeadura (10µL), em triplicata, em placas de Ágar Sabouraud Dextrose, de todos os poços correspondentes a concentrações iguais ou superiores a CIM. Após semeadura, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A CFM foi considerada a menor concentração capaz de evitar o crescimento dos sub-cultivos.

#### **4.5 Efeito do LIM Sobre a Cinética do Crescimento de *Candida Spp***

O efeito do LIM sobre a cinética do crescimento foi determinado pela curva de *time-kill*, segundo metodologia proposta por Klepser et al. (1997), Cantón et al. (2009) e de Castro et al. (2013) com modificações. Foi utilizado nesse teste cepa de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231) e isolado clínico *C. albicans* A2. O preparo do inóculo foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008), conforme descrito previamente. Após a obtenção do inóculo, e diluições sucessivas, obteve-se suspensões dos microrganismos equivalentes a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL.

Microplacas com 96 poços de fundo chato foram preparadas, inserindo-se 100 µL de meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) em todos os poços. Em seguida, foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca, 100 µL do R-(+)-limoneno (1000 µg/mL) assim como para o controle farmacológico a Nistatina (256 µg/mL). Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços) e controle do veículo (diluyente do R-(+)-

limoneno: DMSO e Tween 80) também foram realizados e avaliados para garantir acurácia do método.

Após a adição das substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 µL de alíquotas da primeira fileira de poços aos subsequentes. E em seguida, 100 µL da suspensão dos microrganismos diluído em Caldo Sabouraud Dextrose na concentração  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL foram inseridas em todos os poços. Posteriormente, as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose (CLSI, 2008). Para esse teste, as concentrações avaliadas para o R-(+)-limoneno e Nistatina corresponderam aquelas equivalentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM µg/mL.

Foi realizada a semeadura de alíquotas de 10 µL em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose nos intervalos de tempo de 0 (momento inicial), e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do ensaio. Após a coleta, as microplacas e placas de Petri foram incubadas em estufa a  $35 \pm 2$  °C por um período de 24h. Decorrido esse período, o número de microrganismos viáveis (UFC/mL) foi avaliado para cada concentração e tempo de análise. Desse modo, por meio deste teste, determinou-se o efeito das substâncias analisadas, segundo a sua concentração e o tempo de ação exercido sobre *Candida albicans*.

## **4.6 Material**

### **4.6.1 Aquisição das Substâncias**

O R-(+)-limoneno foi a substância requerida para o objeto de estudo dessa pesquisa. Os medicamentos licenciados utilizado para a execução dos testes foram a nistatina e o fluconazol. Todas as substâncias foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (Darmstadt - Alemanha).

### **4.6.2 Desenvolvimento do Emulgel de R-(+)-limoneno (ELI)**

#### **4.6.2.1 Preparação do Emulgel Com e Sem R-(+)-limoneno**

Os emulgéis foram obtidos levando em consideração a proporção massa/volume em percentagem. Foram misturados os tensoativos Kolliphor® HS15 e

Brij® 52 na proporção de 9:1. A essa mistura de tensoativos foi adicionada a fase oleosa (miristato de isopropila - MIP) a 22,5% e as respectivas concentrações do R-(+)-limoneno (1,2; 2,4 e 5,0%) para cada formulação. Cada mistura foi titulada com água destilada e submetida a quatro ciclos de sonicação (disruptor ultrassônico, Unique® DES 500, Brasil) e banho de ultra-som (lavadora de ultra-som, Unique® USC 2800A, Brasil) por 1 min cada. Em seguida foi acrescentado o Pluronic F127 a 10% diluído em água destilada, em baixas temperaturas (- 20 °C), a cada uma das formulações, obtendo assim a consistência de um emulgel branco-leitoso (Araújo et al., 2019) (Quadro 1).

Quadro 1: Composição da base do emulgel formulado.

Formulação	Kolliphor® HS15: Brij®52	Miristato de Isopropila	H2O	R-(+)-limoneno	Pluronic F127
Base	22,5%	23,9%	53,6%	-	10%
F1	22,5%	23,9%	52,4%	1,2%	10%
F2	22,5%	23,9%	51,2%	2,4%	10%
F3	22,5%	23,9%	48,6%	5,0%	10%

Fonte: Próprio autor.

## 4.7 Caracterização Físico-Químicas dos Emulgéis de R-(+)-limoneno

### 4.7.1 Determinação de pH

A análise de pH da formulação foi realizada em pHmetro digital (MPA 210-A, MS Tecnoyon, Piracicaba, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de fosfato e biftalato pH 7,0 e 4,0. A formulação foi diluída na proporção de 1:10 em água purificada e o eletrodo foi inserido diretamente, em temperatura ambiente (25°C), para verificação do potencial hidrogeniônico da formulação em relação ao tempo, conforme a orientação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ANVISA para produtos semissólidos (Brasil, 2004).

### 4.7.2 Medição de viscosidade e determinação de propriedades reológicas

Para avaliação da viscosidade empregou-se o viscosímetro rotativo digital de BROOKFIELD (modelo One, Fungilab Viscolead, Barcelona, Espanha) no qual a

amostra foi medida por velocidade de rotação de eixo metálico, com cone coaxial *spindle* R7, imerso no material. Uma quantidade de 10 g de amostra, após verificação da ausência de bolhas, em temperatura ambiente (25°C), foi acondicionada em frasco de polietileno cristal. A análise foi realizada, sob agitação rotacional variável, sob velocidade de rotação descendente. A leitura foi realizada, em triplicata, com valor em centiPoise (cP), de acordo com a capacidade de leitura do aparelho (Kong et al., 2015).

#### 4.7.3 Avaliação da estabilidade preliminar

A avaliação da estabilidade das formulações foi avaliada conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (Brasil, 2004) e o Guia para realização de estudos de estabilidade (RDC Nº 318, DE 6 DE NOVEMBRO DE 2019/ANVISA, 2019), contemplando as análises de estabilidade preliminar (centrifugação e ciclo gelo-degelo).

##### 4.7.3.1 Ciclo gelo-degelo dos emulgéis com R-(+)-limoneno

No ciclo gelo-degelo as amostras foram submetidas alternadamente a  $5 \pm 2$  °C por 24 h e  $40 \pm 2$  °C por 24 h. A leitura dos parâmetros avaliados foi realizada antes e após o teste. Desta forma, as amostras foram submetidas a seis ciclos na geladeira e seis ciclos na estufa, alternadamente, totalizando 12 dias de análise. Após esta etapa, as amostras foram avaliadas quanto à viscosidade e pH (ANVISA, 2019).

##### 4.7.3.2 Resistência à centrifugação dos emulgéis com R-(+)-limoneno

Amostras de 13,0 g foram centrifugadas à 6.000 rpm durante 30 minutos. O teste produziu estresse nas formulações, simulando um aumento da força de gravidade, podendo antecipar possíveis instabilidades, acelerando o aparecimento dessas (ANVISA, 2019).

#### 4.7.4 Espalhabilidade

Para determinar a espalhabilidade das amostras, uma placa circular de vidro, com diâmetro de (20 cm x 20 cm) e 0,2 mm de espessura, foi colocada sobre outra placa de suporte de mesma largura, entre ambas as placas, foi posicionado uma folha de papel milimetrado e em seguida adicionado uma terceira placa, com orifício

central de 1,2 cm de diâmetro. A amostra foi introduzida no orifício da placa e a superfície nivelada com uma espátula. Após a aplicação da amostra retirou-se completamente esse molde e sob esse material, foi disposto uma placa, com peso pré-determinado.

Após um minuto, foi calculada a superfície abrangida através da medição do diâmetro em duas posições opostas, calculando o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido, com a adição de 10 placas adicionadas sobre a amostra. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso adicionado. As análises foram realizadas em triplicata. A Equação 1 foi utilizada para os cálculos de espalhabilidade (Wathoni et al., 2020).

$$Ei (max) = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

E<sub>i</sub>: é a espalhabilidade da amostra para o peso i, em mm<sup>2</sup>;

d : é o diâmetro médio, em milímetros.

#### 4.7.5 Análise Térmica

As análises térmicas dos emulgéis foram obtidas com um analisador simultâneo de TG/DTA (modelo SDT Q600, TA Instruments, New Castle, EUA) utilizando cadinhos de alumina contendo amostras com  $8 \pm 0,1$  mg, em azoto atmosfera, sob um fluxo de 50 mLmin<sup>-1</sup>. Os experimentos foram conduzidos com temperatura variando entre 25 e 900 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Para a calibração do equipamento, foi utilizado um padrão de oxalato de cálcio monohidratado, conforme as metodologias utilizadas por Cartaxo-Furtado et al. (2017) e Santana et al. (2018).

#### 4.8 Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Paraíba/UEPB, sob número de parecer 0012/2021.

#### 4.9 Toxicidade Aguda *in vivo* do ELI Em Camundongos

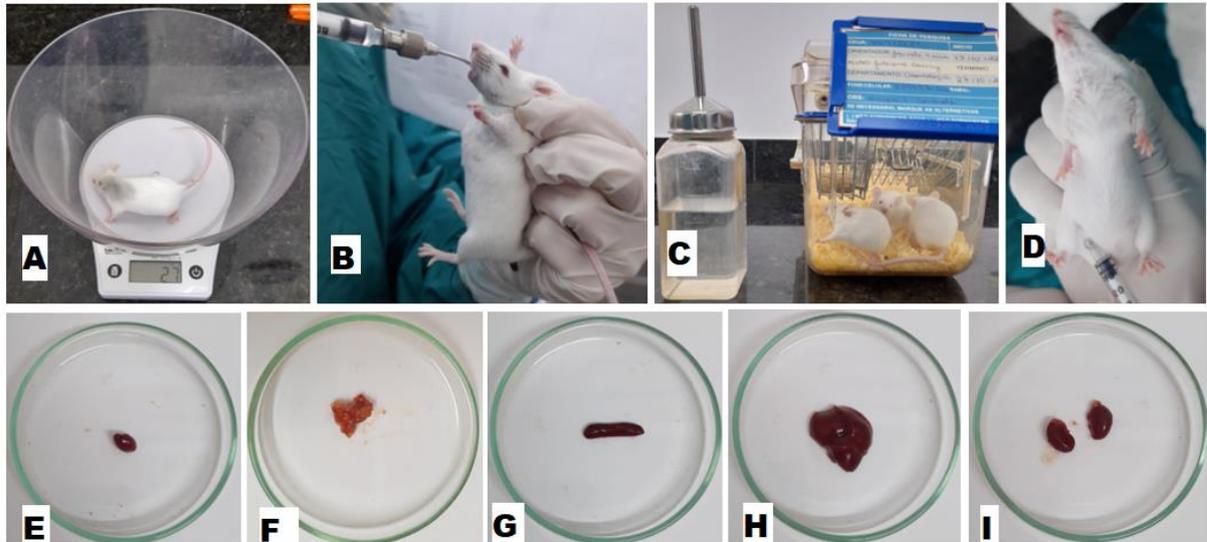
Para a análise de toxicidade aguda foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos fêmeas, linhagem *Swiss*, idade seis semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da UEPB, todos mantidos a uma temperatura de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , ciclo de claro e escuro de 12h. Os mesmos foram mantidos em microisoladoras com grade, tampa e sistema de válvulas para insuflamento e exaustão de ar, medindo  $435 \text{ cm}^2$  e forradas com maravalha de pinus, esterilizada por radiação gama, e alimentados com ração para roedores marca Quintia, esterilizada por radiação gama, servida *ad libitum* e água filtrada em carvão ativado 5 micras, esterilizada por autoclavação a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos, *ad libitum*.

O grupo experimental foi tratado com ELI, os animais receberam uma dose de 2000 mg/kg. No grupo controle foi utilizado o veículo (emulgel sem incorporação do R-(+)-limoneno) (OECD, 2001). Ambas substâncias administradas por gavagem (Figura 5). Cada grupo foi composto por três animais (fêmeas), totalizando seis animais.

O consumo de comida e água foi monitorado diariamente, e o peso corporal registrado no dia 0 (antes da dosagem) e dia 14. Após esse período, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso (30 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de cetamina), por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada a excisão de material biológico (coração, estômago, fígado, baço e rins).

Os órgãos foram examinados macroscopicamente, a ressecção foi feita com consecutiva pesagem do coração, estômago, fígado, baço e rins. Os índices de órgãos foram calculados de acordo com a equação: índice = peso do componente (g)/peso do animal(g)x100. As secções de tecidos dos órgãos excisados, foram fixadas em solução de formaldeído a 10%, após 72 horas foi realizada a clivagem para processamento histopatológico para observação qualitativa de presença ou ausência de sinais de toxicidade como: hiperemia, presença de infiltrado inflamatório, binucleação, sinusóides dilatados e megalocitose (no fígado), mineralização da luz tubular (nos rins) (Magalhães et al., 2018).

Figura 5 - Ensaio de toxicidade oral aguda em camundongos *Mus musculus*. Em A) Pesagem dos camundongos no início do experimento. B) Introdução do produto testado por gavagem. C) Acomodação dos camundongos em gaiolas de prolipileno devidamente identificadas. D) Eutanásia dos camundongos por via intraperitoneal após 15 dias de observação e pesagem de ração e água. E) Órgãos excisados: coração. F) Estômago. G) Baço. H) Fígado. I) Rins.



Fonte: Autoria Própria

#### 4.10 Investigação do Potencial Clastogênico e Aneugênico em Eritrócitos de Camundongos

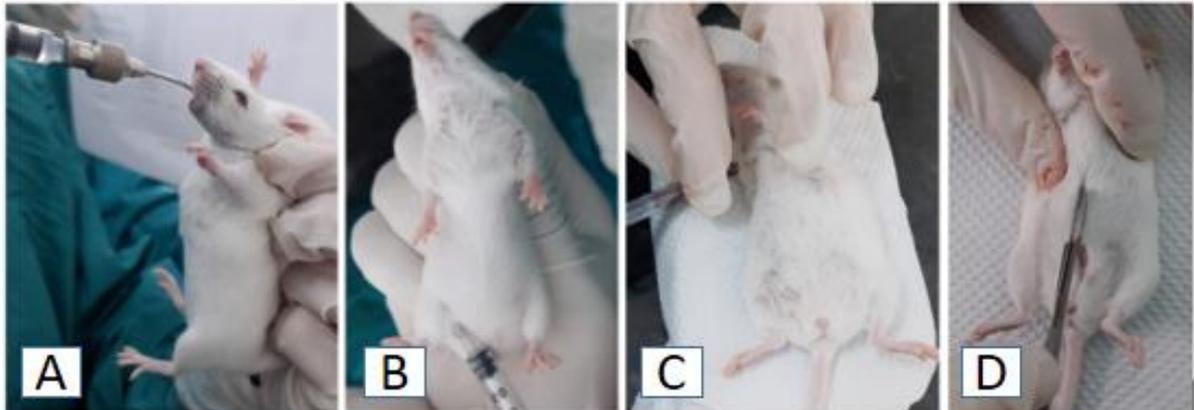
Para a realização desse teste foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas, linhagem *Swiss*, idade seis semanas. Os animais foram aclimatados e alimentados nas mesmas condições já citadas. Foram utilizados três grupos experimentais, contendo cada grupo um total de três machos e três fêmeas, totalizando 18 animais (Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013).

O grupo teste foi tratado a partir da administração por gavagem de ELI na dose de 2000 mg/kg. O grupo controle negativo recebeu tratamento apenas com emulgel sem incorporação do R-(+)-limoneno e o grupo controle positivo recebeu administração do agente mutagênico ciclofosfamida numa dose de 50 mg/Kg de peso do animal.

Vinte e quatro horas após a administração do ELI os animais foram anestesiados intraperitonealmente (Xilazina 10 mg/kg e Cetamina 100 mg/kg) e uma amostra de sangue foi coletada por via intracárdica (Figura 6). Em seguida, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso por via intraperitoneal (30 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de cetamina). As lâminas com

amostras de sangue foram preparadas por esfregaço e coradas com ácido panótico para observação da presença ou ausência de micronúcleos em eritrócitos de cada animal em microscópio óptico no aumento de 1000x. Para análise quantitativa, considerou-se cinco campos por lâmina, num total de 2000 eritrócitos (Hayashi et al., 2007). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão em comparação com o grupo controle positivo.

Figura 6: Teste de micronúcleo em camundongos *Mus musculus*. Em A) Introdução do produto teste. B) Anestesia por via intraperitoneal. C) Coleta de material biológico por via intracardíaca seguida de eutanásia D) Excisão para coleta de órgãos.



Fonte: Autoria Própria

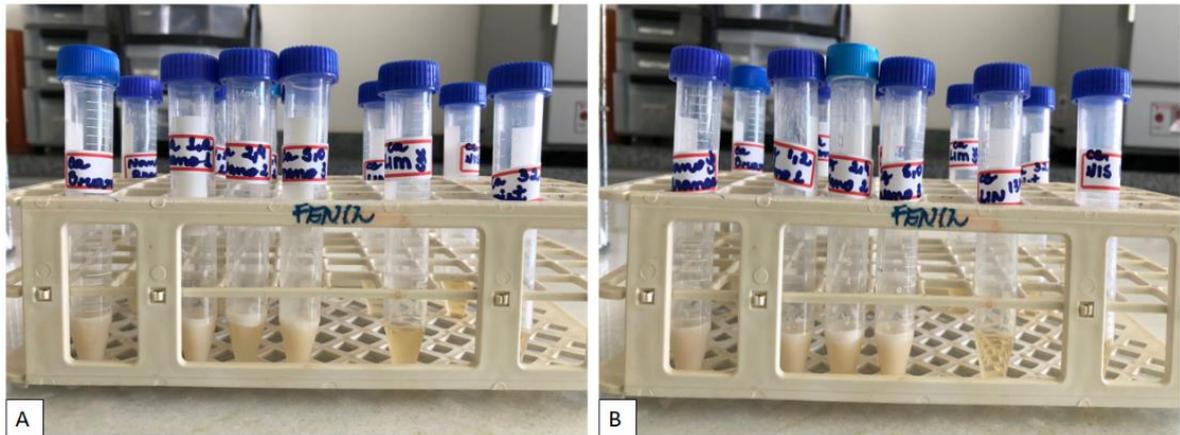
#### 4.11. Atividade Antifúngica Por Redução Logarítmica

##### 4.11.1 Produtos teste

Para a avaliação da atividade antifúngica contra *C. albicans* (isolado clínico A2) e *C. glabrata* (ATCC 90030), foi realizada a diluição de 2625 $\mu$ g/mL (2XCIM) do LIM em uma solução contendo Tween 80, água destilada estéril e dimetilsulfóxido (DMSO) e foram usadas as formulações de ELI em suas três concentrações: 1,2%, 2,4% e 5% (Figura 7).

Nas análises com o LIM e com o ELI, a Nistatina foi utilizada como controle positivo e a base do emulgel (veículo) foi usada como controle negativo. Foi realizado o controle de crescimento.

Figura 7: Produtos teste inoculados com *C. albicans* (A) e com *C. glabrata* (B).



Fonte: Próprio Autor.

#### 4.11.2 Redução Logarítmica

Foi adicionado 1 mL do inóculo de trabalho padronizado em  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  a um tubo de ensaio estéril junto com as amostras teste, a fim de obter concentração final de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/tubo, enquanto outros tubos continham as mesmas amostras diluídas em  $\frac{1}{2}$ . As amostras teste foram homogeneizadas manualmente e incubadas a 35 °C por 24 h. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de 1/10 até 1/100000, alíquotas de 10  $\mu$ l do crescimento de cada diluição foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose, após incubação em estufa a 35 °C por 24 h, foi realizada a contagem de colônias. Os resultados foram expressos em UFC/mL. O mesmo procedimento foi realizado com os controles (Bou-Chacra et. al., 2005; Da Farmacopeia et al., 2019).

#### 4.12 Determinação do Potencial Anti-Inflamatório do ELI

##### 4.12.1 Indução de UT nos animais

Para a indução e tratamento de UTs, foram utilizados Ratos Wistar, machos e fêmeas, com idade entre 5 e 7 semanas e pesando, em média, 300g, provenientes do Centro de Bioterismo da UEPB. Todos os animais foram mantidos nas condições adequadas relatadas nos testes anteriores.

No dia 1 os animais foram anestesiados com solução de Cloridrato de cetamina a 10% (100 mg/Kg) (Cetamin, Rhobifarma, São Paulo, Brasil) e receberam também, Cloridrato de xilasina a 2% (10 mg/Kg) (Xilazin, Rhobifarma, São Paulo, Brasil). Em seguida, foi realizada queimadura aplicando um disco de papel filtro

embebido em ácido acético 5,0% na mucosa jugal direita dos animais (Vilela-Goulart et al., 2008; Fujisawa; Miyamoto; Nagayama, 2003; Damy et al., 2010; Campos et al., 2016).

Os animais receberam analgesia com Butorfanol® (2mg/kg), por via subcutânea, 30 minutos antes da injúria na mucosa jugal, e passaram por repouso pós-trauma de 2h, ou seja, ficaram em gaiolas individuais e não foram submetidos a nenhuma intervenção neste período.

Quadro 2: Representação esquemática do experimento.

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Queimadura com ácido acético	X													
Fotografias da mucosa			X			X			X					X
Tratamento 1º Grupo		X												
Tratamento 2º Grupo		X	X	X	X									
Tratamento 3º Grupo		X	X	X	X	X	X	X						
Tratamento 4º Grupo		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Coleta de tecido para biópsia			X			X			X					X
Eutanásia			X			X			X					X

Fonte: Próprio Autor.

#### 4.12.2 Tratamentos dos Grupos

Foram utilizados quatro grupos experimentais com quatro animais cada. Desse modo, foram utilizados um total de 16 animais.

Grupo I: Grupo experimental, no qual os animais receberam tratamento com o ELI (5,0%).

Grupo II: Grupo experimental, em que os animais receberam tratamento com ELI (2,4%).

Grupo III: Controle positivo, no qual os animais receberam tratamento com Ad-Muc gel.

Grupo IV: Controle negativo, em que os animais receberam a base (emulgel sem incorporação do R-(+)-limoneno).

Nos grupos I e II os animais foram tratados com ELI diariamente, nas concentrações 5,0% e 2,4%, respectivamente. Já o grupo III, controle positivo, recebeu tratamento com o Ad-Muc gel. O grupo IV, controle negativo, recebeu aplicação do veículo. A aplicação das medicações foi realizada com o auxílio de um *Swab* estéril, a cada oito horas, em cada grupo.

O Ad-Muc®, extrato fluido da camomila, foi escolhido no presente estudo como controle positivo devido possuir reconhecidas propriedades antisséptica e anti-inflamatória, indicado clinicamente para o tratamento de UTs da gengiva e mucosas de revestimento oral (BIOLAB, 2022).

As aplicações foram realizadas com os animais imobilizados manualmente, por um operador previamente treinado (Figura 8). Após essa etapa, os animais ficaram 30 minutos sem beber água ou comer para que a medicação tivesse um período maior de absorção no local da lesão. Nesse experimento, a via de administração da medicação foi a tópica. É importante ressaltar que, foi realizado o cegamento, no qual o avaliador não sabia qual medicação era aplicada pelo operador.

Figura 8. Procedimentos clínicos realizados durante o experimento.



Fonte: Próprio autor.

#### 4.12.3 Alimentação

Todos os animais foram alimentados de forma controlada pelo pesquisador, administrando-se a quantidade de 100g/dia/gaiola de ração ao início de cada dia, durante todo o experimento, e após período de 24h era pesada a ração residual, para verificar a quantidade que os animais consumiram, visto que a presença das lesões pode provocar dor e dificuldade para ingestão de alimentos (Guimarães; Mazaro, 2004; Carvalho et al., 2009).

#### 4.12.4 Avaliação Clínica

As lesões foram avaliadas nos dias 3, 6, 9 e 14 a partir de registros fotográficos com uma câmera Canon T5i. A avaliação clínica do grau de severidade das lesões foi realizada a partir da observação das fotografias obtidas, que foram previamente embaralhadas, codificadas e analisadas de maneira cega por um único examinador previamente calibrado, avaliando parâmetros como a presença de hiperemia, erosão e formação de úlceras.

#### 4.12.5 Procedimento de Retirada de Material Biológico dos Animais

Nos dias 3, 6, 9 e 14, um animal de cada grupo, foi anestesiado, por via intraperitoneal com solução de Cloridrato de Cetamina a 10% (300 mg/Kg) (Cetamin, Rhobifarma, São Paulo, Brasil) e receberam também injeção de Cloridrato de Xilasina a 2% (10 mg/Kg) (Xilazin, Rhobifarma, São Paulo, Brasil) para melhor conforto. Em seguida, tiveram a mucosa jugal direita excisada. Os espécimes foram colocados em solução de formaldeído a 10%, e em seguida conduzidos ao Laboratório de Histopatologia Oral da UEPB, para fins de exame histopatológico. Posteriormente, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso (300 mg/kg de cetamina) associado a 30mg/kg de Xilasina por via intraperitoneal (Akgullu et al., 2015).

#### 4.12.6 Processamento do Material Biológico

Os espécimes coletados foram seccionados e mantidos em solução formol a 10% tamponado por aproximadamente 48 h, e submetidos a processamento e coloração em H/E, seguindo todo o protocolo do Laboratório de Patologia Oral da UEPB.

#### 4.12.7 Avaliação Histopatológica Semiquantitativa

As análises microscópicas foram realizadas em microscópio óptico com magnitude de 200x e 400x de aumento. As lâminas foram avaliadas a por meio de escores histopatológicos, divididos em “Alterações do tecido epitelial” (0 = Ausência de úlcera; 1 = Presença de úlcera) e “Alterações no tecido conjuntivo” (0 = Tecido conjuntivo remodelado; 1 = Fibrose/Presença de discretas células inflamatórias mononucleares dispersas; 2 = Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório mononuclear leve; 3 = Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório mononuclear moderado ou intenso; 4 = Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório misto (agudo e crônico); 5 = Processo agudo (Vasos ectásicos, edema, presença de infiltrado inflamatório, predominantemente, neutrofílico) (adaptado de Cavalcante et al., 2011). Para a obtenção das imagens, a identificação das lâminas foi bloqueada com papel pardo e numerada. As avaliações foram realizadas por profissional em cego para evitar viés no processo de avaliação.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados através do software GraphPad Prism 5.0®, San Diego, CA, EUA. Os dados foram avaliados por estatística descritiva e inferencial. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Tukey*. A normalidade foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk* ( $p > 0,05$ ), as amostras que apresentaram distribuição normal foram submetidos a Análise de variância de 1 via com teste *post-hoc* de *Tukey*. Nos grupos sem distribuição normal, a comparação entre eles foi realizada pelo teste de *Kruskal Wallis* e teste a posteriori de *Dunn*.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Ensaio *in Silico*

Através do software *PASS* online foi definido os valores para o R-(+)-limoneno de ser ativo ou inativo em determinados alvos moleculares (tabela 2). Constatou-se que esse composto apresenta possibilidade de obter ação contra vírus, fungos, bactérias, protozoários, além muitos outros potenciais, como anti-inflamatório, antiulcerativo e antineoplásico. A maior probabilidade de ser ativo pertenceu à atividade antienzimática ( $P_a=0,896$ ).

Tabela 2: Potencial biológico previsto para o R-(+)-limoneno em alvos moleculares.

<b>Pa</b>	<b>Pi</b>	<b>Atividade</b>
0,896	0,005	<i>Antienzimática</i>
0,812	0,010	<i>Antineoplástica</i>
0,665	0,005	<i>Antihelmintica (Nematodeos)</i>
0,610	0,029	<i>Anti-inflamatória</i>
0,610	0,009	<i>Antimicobacteriana</i>
0,613	0,005	<i>Antineoplastica (câncer ovariano)</i>
0,628	0,013	<i>Antiprotozoária (Leishmania)</i>
0,405	0,029	<i>Antibacteriana</i>
0,454	0,024	<i>Anticarcinogênica</i>
0,582	0,020	<i>Antifúngica</i>
0,094	0,091	<i>Potencial Antifúngico</i>
0,219	0,159	<i>Anti-inflamatória, intestinal</i>
0,232	0,223	<i>Antiinflammatoria, oftálmica</i>
0,249	0,127	<i>Dor Antineurogênica</i>
0,452	0,069	<i>Antinociceptiva</i>
0,157	0,094	<i>Antioxidante</i>
0,614	0,008	<i>Antiparasitária</i>
0,168	0,137	<i>Antiviral</i>
0,275	0,121	<i>Antiulcerativa</i>

Pa – Probabilidade do composto ser ativo. Pi – Probabilidade de ser inativo

Para a análise da toxicidade teórica do R-(+)-limoneno foi utilizado software admetSAR (<http://lmmmd.ecust.edu.cn:8000/>), a partir das informações preditivas farmacocinéticas do estudo *in silico* ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), dispostas na tabela 3 e observou que o composto trata-se de uma substância pouco metabolizada por enzimas hepáticas P450, com baixo risco teórico de toxicidade, pois não expressou mutagênicidade, carcinogenicidade além de baixa toxicidade aguda oral.

Tabela 3. Análise da toxicidade teórica do R-(+)-limoneno.

<b>ADMET Perfil Previsto - Classificação</b>		
Modelo	Resultado	Probabilidade
Absorção		
<i>Barreira Hemato-Encefálica</i>	<i>BBB+</i>	0.9444
<i>Absorção Intestinal Humana</i>	<i>HIA+</i>	0.9887
<i>Permeabilidade Caco-2</i>	<i>Caco2+</i>	0.7667
<i>Substrato Glicoproteína P</i>	<i>Não-substrato</i>	0.6027
<i>Inibidor Glicoproteína P</i>	<i>Não-inibidor</i>	0.7613
	<i>Não-inibidor</i>	0.8697
<i>Transportador Renal de Cations Orgânicos</i>	<i>Não-inibidor</i>	0.7484
Distribuição		
<i>Localização Subcelular</i>	<i>Lisossomo</i>	0.6471
Metabolismo		
<i>Substrato CYP450 2C9</i>	<i>Não-substrato</i>	0.8776
<i>Substrato CYP450 2D6</i>	<i>Não-substrato</i>	0.8152
<i>Substrato CYP450 3A4</i>	<i>Não-substrato</i>	0.6142
<i>Inibidor CYP450 1A2</i>	<i>Não-inibidor</i>	0.7497
<i>Inibidor CYP450 2C9</i>	<i>Não-inibidor</i>	0.9308
<i>Inibidor CYP450 2D6</i>	<i>Não-inibidor</i>	0.9398
<i>Inibidor CYP450 2C19</i>	<i>Não-inibidor</i>	0.8906
<i>Inibidor CYP450 3A4</i>	<i>Não-inibidor</i>	0.9257
<i>Inibidor de Promiscuidade CYP</i>	<i>Baixo Inibidor de Promiscuidade CYP</i>	0.7657
Excreção		
Toxicidade		
<i>Inibição do Gene Humano Relacionado ao Ether-a-go-go</i>	<i>Inibidor Fraco</i>	0.7745
	<i>Não-inibidor</i>	0.8679
<i>Toxicidade AMES</i>	<i>AMES Não-tóxico</i>	0.9356
<i>Cancerígeno</i>	<i>Não-cancerígeno</i>	0.6913
<i>Toxicidade em Peixes</i>	<i>FHMT Alta</i>	0.9866
<i>Toxicidade Tetrahymena Pyriformis</i>	<i>TPT Alta</i>	0.9632
<i>Toxicidade em Abelhas</i>	<i>HBT Alta</i>	0.7911
<i>Biodegradação</i>	<i>Pronto biodegradável</i>	0.7562
<i>Toxicidade Oral Aguda</i>	<i>III</i>	0.9069
<i>Carcinogenicidade (Três-classes)</i>	<i>Aviso</i>	0.5329
<b>ADMET Perfil Previsto --- Regressão</b>		
Modelo	Valor	Unid
Absorção		
<i>Solubilidade Aquosa</i>	-3.9372	LogS
<i>Permeabilidade Caco-2</i>	1.7462	LogPapp, cm/s
Distribuição		
Metabolismo		
Excreção		
Toxicidade		
<i>Toxicidade Aguda em Ratos</i>	1.4819	LD50, mol/kg
<i>Toxicidade em Peixes</i>	-0.7569	pLC50, mg/L
<i>Toxicidade em Tetrahymena Pyriformis</i>	0.6268	pIGC50, ug/L

Fonte: Próprio Autor.

## 6.2 Determinação da Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica do R-(+)-limoneno e dos fármacos padrão sobre *Candida* spp foi avaliada por meio de análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) capaz de exercer efeitos inibitórios e letais sobre o crescimento dos microorganismos. Os valores da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima (expressos em  $\mu\text{g/mL}$ ), bem como a descrição da relação CFM/CIM estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 - Atividade antifúngica do LIM e de fármacos padrão sobre fungos do gênero *Candida* (valores de CIM e CFM expressos em  $\mu\text{g/mL}$ ).

MICROORGANISMOS/SUBSTÂNCIAS	CIM	CFM	Relação CFM/CIM
<b><i>C. albicans</i> (ATCC 10231)</b>			
LIM	656,25	5250	8
Nistatina	32	32	1
Fluconazol	>64	>64	>1
<b><i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)</b>			
LIM	1312,5	1312,5	1
Nistatina	16	64	4
Fluconazol	>64	>64	>1
<b><i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)</b>			
LIM	656,25	1312,5	2
Nistatina	16	64	4
Fluconazol	4	>64	16
<b><i>C. krusei</i> (ATCC 6258)</b>			
LIM	1312,5	1312,5	1
Nistatina	4	4	1
Fluconazol	32	64	2
<b><i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)</b>			
LIM	2625	2625	1
Nistatina	16	64	4
Fluconazol	>64	>64	1
<b><i>C. albicans</i> (A1)</b>			
LIM	2625	2625	1
Nistatina	16	64	4
Fluconazol	>64	>64	>1
<b><i>C. albicans</i> (A2)</b>			
LIM	1312,5	1312,5	1
Nistatina	8	64	8
Fluconazol	>64	>64	>1

Fonte: Próprio Autor

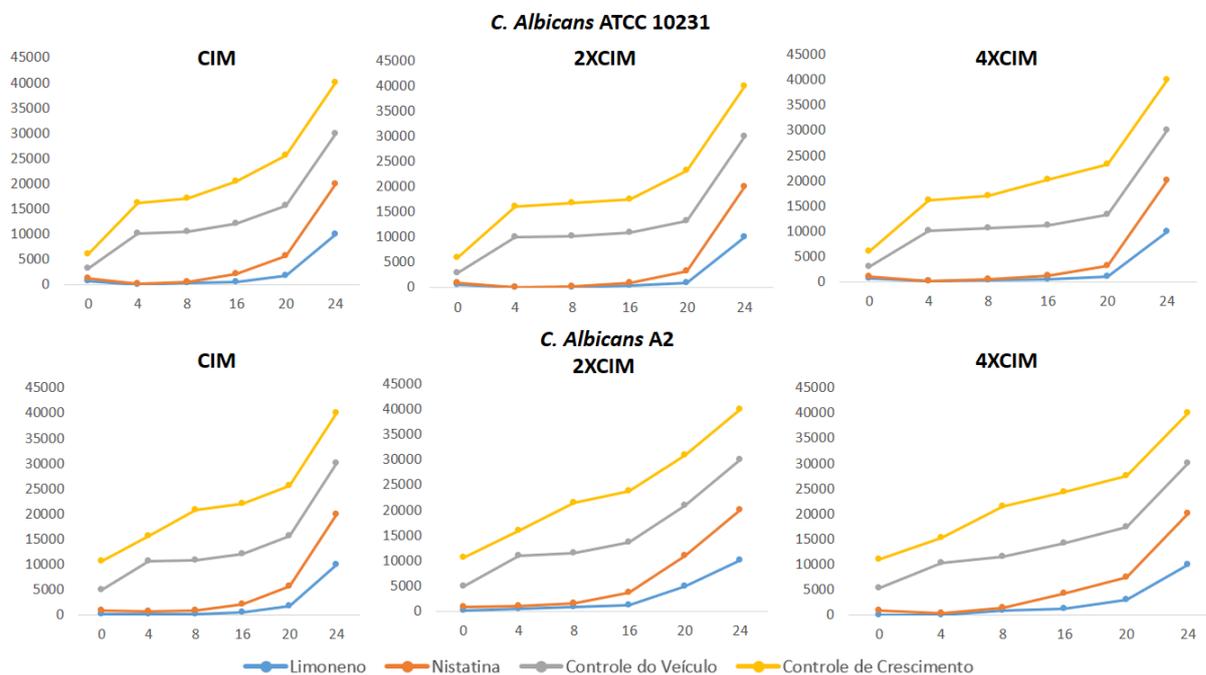
Diante dos dados, percebe-se que o R-(+)-limoneno apresenta efeitos antifúngicos sobre o crescimento das espécies de *Candida* testadas, demonstrado valores de CIM na faixa de 656,25  $\mu\text{g/mL}$  a 2625  $\mu\text{g/mL}$  para esses microorganismos. Observa-se que as cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) apresentam maior sensibilidade à ação antifúngica do R-(+)-limoneno, conforme a tabela 6. Além disso, evidenciou-se que o R-(+)-limoneno demonstra ação

fungistática sobre a cepa de *C. albicans* (ATCC 10231), enquanto para as demais espécies sua ação foi fungicida.

### 6.3 Ação do R-(+)-limoneno sobre a Cinética do Crescimento de *Candida albicans*

O efeito antifúngico do R-(+)-limoneno e da nistatina sobre o crescimento de células planctônicas de *C. albicans* (ATCC 10231) e isoaldo clínico (*C. albicans* A2) foi avaliado sob diferentes concentrações e tempos de ação das substâncias, visando a investigação dos seus efeitos sobre a cinética de crescimento desses microrganismos. Os resultados descritivos estão apresentados na figura 9.

Figura 9. Efeito do R-(+)-limoneno e da Nistatina na cinética de crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* A2 exposta às concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM. Resultados expressos através da média do número de microrganismos (eixo vertical UFC/mL) segundo os diferentes tempos de ação (eixo horizontal).



Fonte: Próprio autor.

Os resultados da cinética demonstraram redução de crescimento microbiano a partir da primeira hora de observação para as concentrações testadas do R-(+)-limoneno e da nistatina em comparação ao controle de crescimento (Figura 17). *C. albicans* (ATCC 10231) permitiu crescimento microbiano a partir de 16 horas de exposição à CIM do R-(+)-limoneno, assim como a *C. albicans* A2 quando exposta à CIM, CIMX2 e CIMx4 do R-(+)-limoneno. Enquanto *C. albicans* ATCC permitiu

crescimento microbiano a partir de 20 horas de exposição para a CIMx2 e CIMx4 do R-(+)-limoneno.

Foram realizados os testes estatísticos ANOVA seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no crescimento das cepas submetidas aos tratamentos com o R-(+)-limoneno e com a Nistatina, entre suas referidas CIMs em comparação ao grupo controle (Tabela 8). Ou seja, o R-(+)-limoneno apresentou inibição estatisticamente significativa sobre o crescimento de *C. albicans* em todas as CIMs testadas.

Tabela 8: Efeitos do R-(+)-limoneno e da Nistatina sobre a Cinética de Crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231) e *C. albicans* A2 (Valores de média e desvio-padrão da viabilidade dos microrganismos).

<b><i>C. Albicans</i> ATCC 10231</b>				
<b>Substância</b>	<b>Concentração</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-Padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>R-(+)-limoneno</b>	Controle	3,781005a	0,140576	-
	CIM	2,355493b	0,745489	0,0007786
	CIMX2	2,02316b	0,936106	4,295E-05
	CIMX4	2,398126b	0,71161	0,001124
<b>Nistatina</b>	Controle	3,781005a	0,140576	-
	CIM	2,634551b	0,301161	0,0001925
	CIMX2	2,573285b	0,362171	9,094E-05
	CIMX4	2,584529b	0,338376	0,0001068
<b>Veículo</b>	Controle	3,781005a	0,140576	-
	CIM	3,780753a	0,281548	1,00
	CIMX2	3,786576a	0,274086	1,00
	CIMX4	3,733818a	0,327409	0,9806
<b><i>C. albicans</i> A2</b>				
<b>Substância</b>	<b>Concentração</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-Padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>R-(+)-limoneno</b>	Controle	3,799535a	0,198967	-
	CIM	1,879921b	0,419218	3,351E-05
	CIMX2	2,267886b	0,942809	0,0007587
	CIMX4	2,116366b	1,06991	0,0002239
<b>Nistatina</b>	Controle	3,799535a	0,198967	-
	CIM	2,7551124b	0,126507	5,846E-07
	CIMX2	2,8558738b	0,501674	4,696E-07
	CIMX4	2,6883015b	0,164094	1,588E-08
<b>Veículo</b>	Controle	3,799535a	0,198967	-
	CIM	3,888889a	0,226308	0,786
	CIMX2	3,900612a	0,200809	0,7143
	CIMX4	3,906485a	0,189219	0,6798

Fonte: Próprio autor.

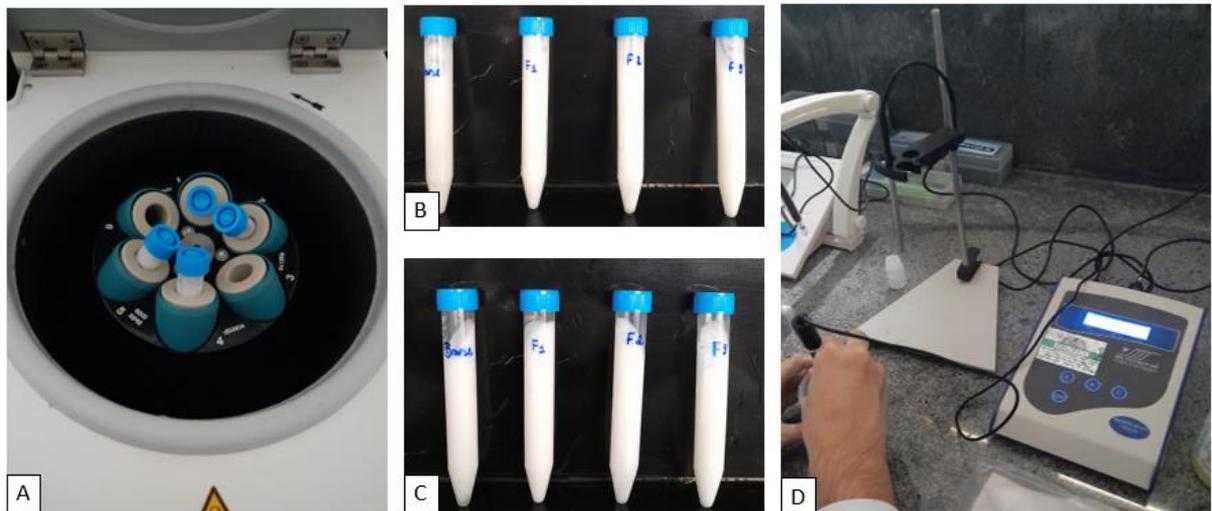
\*Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos quando comparados ao controle de crescimento.

## 6.4 Caracterização Físico-Química dos Emulgéis de R-(+)-limoneno

### 6.4.1 pH e resistência à centrifugação

A formulação apresentou cor branco leitoso, com odor cítrico. Os valores de pH para as amostras desenvolvidas foram de  $5,71 \pm 0,11$ ;  $5,71 \pm 0,09$  e  $5,97 \pm 0,05$  para formulação do emulgel com R-(+)-limoneno (ELI) a 1,2%, 2,4% e 5%, respectivamente, e  $5,74 \pm 0,21$  para a formulação controle (sem ELI). As amostras submetidas às condições extremas de centrifugação tem como objetivo acelerar as possíveis reações e instabilidades entre seus componentes como precipitação, separação de fases e turbidez. Foi possível observar visualmente, que nenhuma das formulações apresentaram instabilidade nas condições estudadas (Figura 10), indicando que possuem tendência a permanecer estáveis fisicamente ao longo do armazenamento.

Figura 10: Amostras submetidas ao teste de resistência por centrifugação das formulações contendo o ELI, e sem ELI, na centrífuga (A), antes da centrifugação (B) e após a centrifugação (C), e durante o teste de pH (D).



Fonte: Próprio Autor.

### 6.4.2 Estabilidade Preliminar

A leitura dos parâmetros avaliados (viscosidade e pH) foi realizada antes e após o ciclo gelo-degelo. Na avaliação do estresse quente/frio, as formulações permaneceram estáveis durante os seis ciclos de 48 h (24 h na geladeira/24 h na estufa), não sofrendo danos como turvação ou separação de fases. Ao término do ciclo gelo-degelo, averiguou-se o pH e a viscosidade, não observando consideráveis mudanças nesses valores, atestando, dessa forma, a estabilidade das formulações,

visto que as mesmas permaneceram estáveis após as diversas perturbações aplicadas no sistema.

Tabela 1: Distribuição segundo os valores do pH e viscosidade do ELI e da base em diferentes concentrações e nos diferentes ciclos do ensaio de estabilidade preliminar. F1 (ELI 1,2%), F2 (ELI 2,4%), F3 (ELI 5%) e DP (Desvio Padrão).

<b>pH</b>		<b>Viscosidade</b>	
<b>F1</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>F1</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>D0</b>	5,39±0,04	D0	4,84±0,58
<b>Ciclo 1</b>	5,23±0,23	Ciclo 1	4,87±0,58
<b>Ciclo 2</b>	5,31±0,06	Ciclo 2	4,93±0,60
<b>Ciclo 3</b>	5,22±0,04	Ciclo 3	4,94±0,61
<b>Ciclo 4</b>	5,11±0,02	Ciclo 4	4,96±0,61
<b>Ciclo 5</b>	5,07±0,04	Ciclo 5	4,98±0,62
<b>Ciclo 6</b>	4,99±0,08	Ciclo 6	4,99±0,62
<b>F2</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>F2</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>D0</b>	5,52±0,05	D0	4,85±0,61
<b>Ciclo 1</b>	5,43±0,03	Ciclo 1	4,89±0,62
<b>Ciclo 2</b>	5,33±0,05	Ciclo 2	4,91±0,63
<b>Ciclo 3</b>	5,23±0,09	Ciclo 3	4,92±0,64
<b>Ciclo 4</b>	5,14±0,11	Ciclo 4	4,95±0,64
<b>Ciclo 5</b>	5,06±0,07	Ciclo 5	4,96±0,65
<b>Ciclo 6</b>	4,91±0,05	Ciclo 6	4,97±0,64
<b>F3</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>F3</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>D0</b>	5,48±0,09	D0	4,87±0,57
<b>Ciclo 1</b>	5,19±0,35	Ciclo 1	4,89±0,59
<b>Ciclo 2</b>	5,32±0,05	Ciclo 2	4,91±0,59
<b>Ciclo 3</b>	5,23±0,03	Ciclo 3	4,93±0,59
<b>Ciclo 4</b>	5,09±0,06	Ciclo 4	4,94±0,58
<b>Ciclo 5</b>	4,90±0,02	Ciclo 5	4,96±0,57
<b>Ciclo 6</b>	4,82±0,05	Ciclo 6	4,98±0,57
<b>Base</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Base</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>D0</b>	5,25±0,04	D0	4,77±0,54
<b>Ciclo 1</b>	5,23±0,04	Ciclo 1	4,83±0,59
<b>Ciclo 2</b>	5,23±0,04	Ciclo 2	4,90±0,62
<b>Ciclo 3</b>	5,19±0,07	Ciclo 3	4,95±0,62
<b>Ciclo 4</b>	5,16±0,03	Ciclo 4	4,98±0,63
<b>Ciclo 5</b>	5,17±0,11	Ciclo 5	5,02±0,64
<b>Ciclo 6</b>	5,13±0,14	Ciclo 6	5,04±0,64

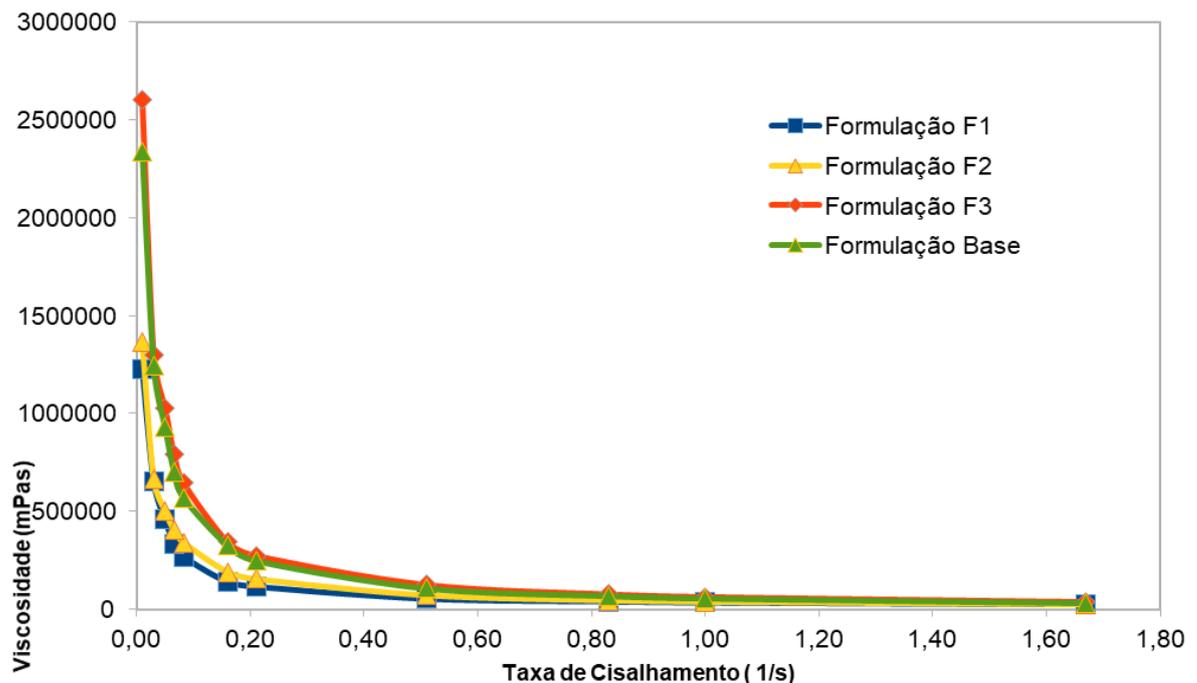
Fonte: Próprio Autor.

#### 6.4.3 Viscosidade

A Figura 11 apresenta o comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento, para as formulações ELI 1,2% (F1), 2,4% (F2) e 5% (F3) e do emulgel base. Esta mostra os valores de viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento, sob temperatura constante. A partir dessa análise, observa-se que o comportamento das formulações se caracteriza como fluido não-newtoniano do tipo

pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, influenciando assim que há um alinhamento das partículas na direção da tensão aplicada, o que tornam a resistência ao movimento cada vez menor. Isso é importante pois uma formulação oral ideal deve possuir baixa viscosidade quando aplicada na mucosa, e permanecer no local da aplicação, garantindo a ação tópica do ELI.

Figura 11: Viscosidade em função da taxa de cisalhamento das formulações ELI 1,2% (F1), 2,4% (F2) e 5% (F3) e do emulgel base.



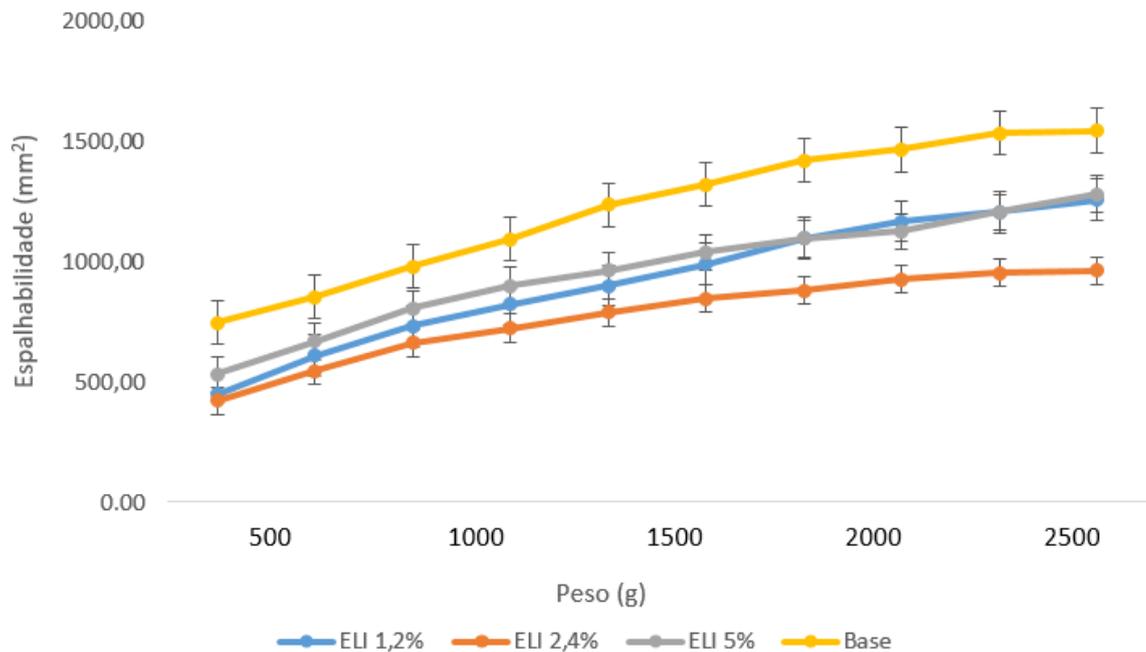
Fonte: Próprio Autor.

#### 6.4.4 Espalhabilidade

A espalhabilidade do ELI foi medida em termos do diâmetro médio do círculo de espalhamento. Os valores médios do índice de dispersão das formulações nas concentrações de 1,2%; 2,4% e 5% foram, respectivamente,  $9,22 \pm 2,7 \text{ cm}^2$ ;  $7,7 \pm 1,81 \text{ cm}^2$  e  $9,6 \pm 2,38 \text{ cm}^2$ . Já para o emulgel base foi de  $12,18 \pm 2,87 \text{ cm}^2$ . Esse resultado mostra que as formulações ELI apresentaram uma maior resistência a espalhabilidade devido a incorporação do LIM na formulação. Os testes de espalhabilidade realizados demonstraram uma relação entre resistência ao movimento forçado desta forma farmacêutica, correspondendo à relação entre a área de espalhamento, com a força aplicada ao produto, para todas as formulações

analisadas. Porém, um aumento maior pôde ser observado na formulação sem R-(+)-limoneno, havendo aumento da espalhabilidade, com aplicação de força (Figura 12).

Figura 12: Espalhabilidade das formulações ELI 1,2% (F1), 2,4% (F2) e 5% (F3) e do emulgel base.



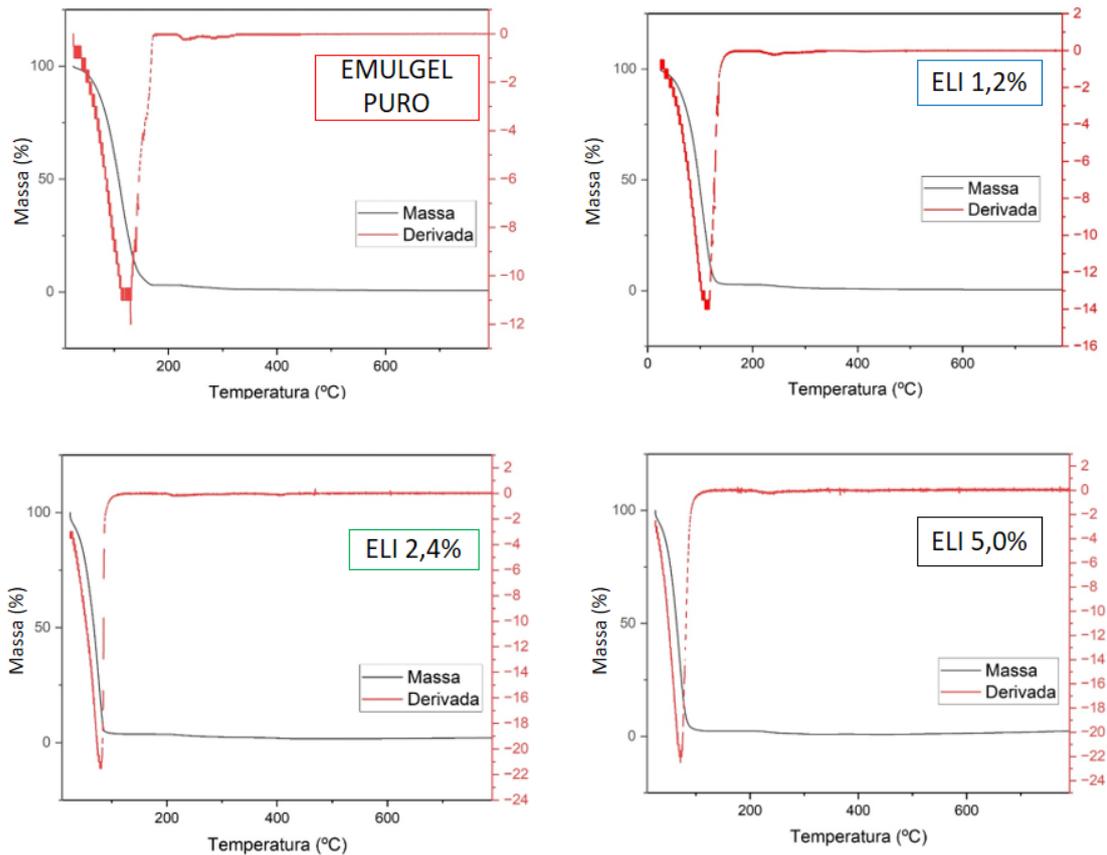
Fonte: Próprio Autor.

#### 6.4.5 Análises Térmicas do Emulgel Puro e Suas Diferentes Concentrações Após Incorporação do R-(+)-limoneno

As curvas de termogravimetria (TG) em todas as amostras analisadas revelou a ocorrência de apenas um evento endotérmico. Na curva TG do ELI 5,0% ocorreu na faixa de temperatura de 26,01 °C e 96,53 °C, em que houve uma perda de 95,4% da massa. Já no ELI 2,4% ocorreu na faixa entre 26,01 °C e 85,8 °C, havendo perda de 92,69% da massa.

No ELI 1,2% entre 25,04 °C e 131,18 °C, apresentando uma perda de 87,6% de sua massa, e no emulgel puro, esse evento aparece na faixa de 26,01 °C a 153,22 °C, revelando uma perda de 94,85% da massa (Figura 13).

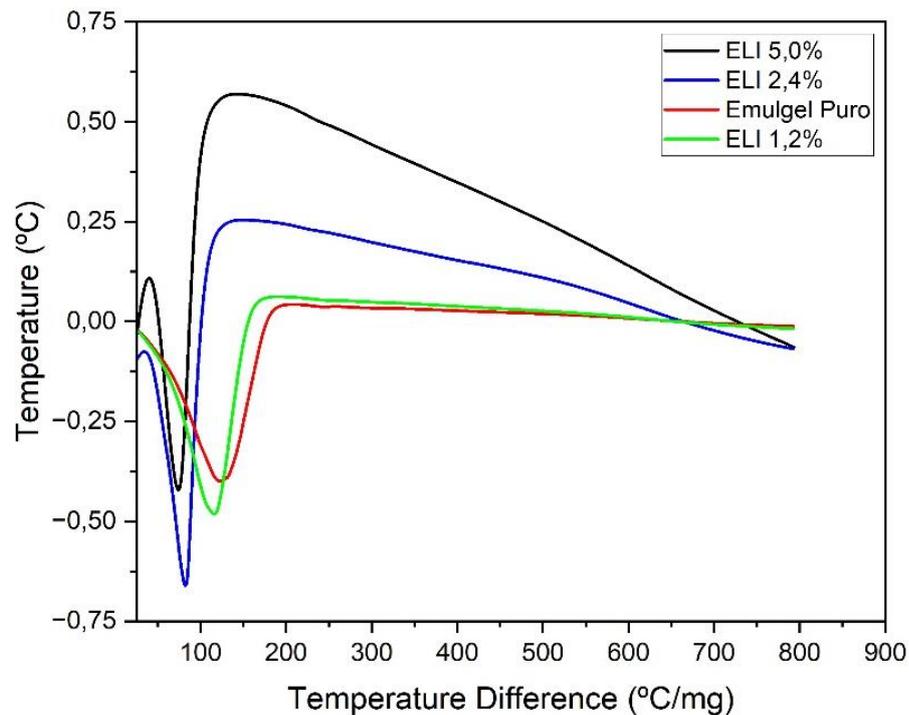
Figura 13. Análise térmica do emulgel puro (base) e do ELI em suas diferentes concentrações.



Fonte: Próprio autor.

O mesmo pôde ser observado nas curvas de análise térmica diferencial (DTA) das amostras, que revelaram a ocorrência de apenas um evento endotérmico em cada uma delas. No ELI 5,0% a ocorrência desse evento aconteceu na faixa de temperatura de 38,16°C a 129,73°C. Já no ELI 2,4% se deu na faixa entre 82,25 °C e 133,12 °C. No ELI 1,2%, ocorreu entre 116,17 °C e 173,82 °C. Enquanto no emulgel puro, o evento endotérmico aconteceu na faixa de temperatura entre 122,95 °C e 190,78 °C (Figura 14).

Figura 14. Curvas DTA do emulgel puro e suas diferentes concentrações após incorporação do R-(+)-limoneno.



Fonte: Próprio autor.

### 6.5 Determinação da Toxicidade Oral Aguda

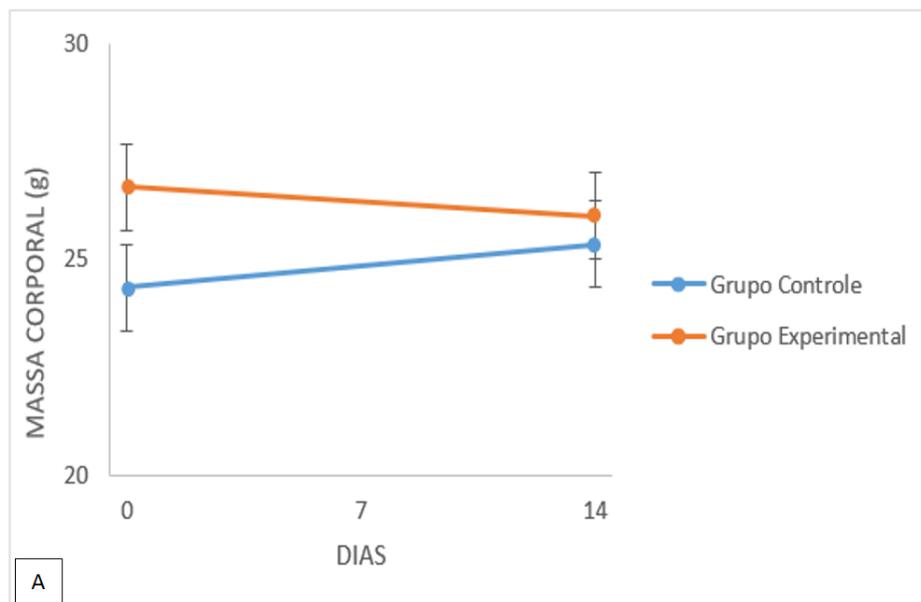
O emulgel incorporado ao R-(+)-limoneno na dose de 2.000 mg/kg administrado por gavagem em camundongos fêmeas, não produziu morte e não causou alteração comportamental no período de 14 dias de observação. A massa corpórea (Figura 15A), o consumo de água (Figura 15B) e o consumo de ração (Figura 15C) não diferenciaram do grupo controle (ANOVA -  $p > 0,05$ ). O peso absoluto e relativo do coração, estômago, fígado, rins e baço não foram afetados com a administração do ELI na dosagem de 2000 mg/kg (Tabela 4). Também não foram encontradas alterações morfológicas externas na textura ou cor desses órgãos quando comparados ao grupo controle. As análises histopatológicas dos órgãos não demonstraram evidências de alterações morfológicas (Figura 16).

Tabela 4: Efeito emulgel incorporado com R-(+)-limoneno (ELI 2000 mg/kg), por via oral sobre o peso absoluto (g) e relativo (%) de camundongos *Mus musculus* fêmeas. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) para n=3.

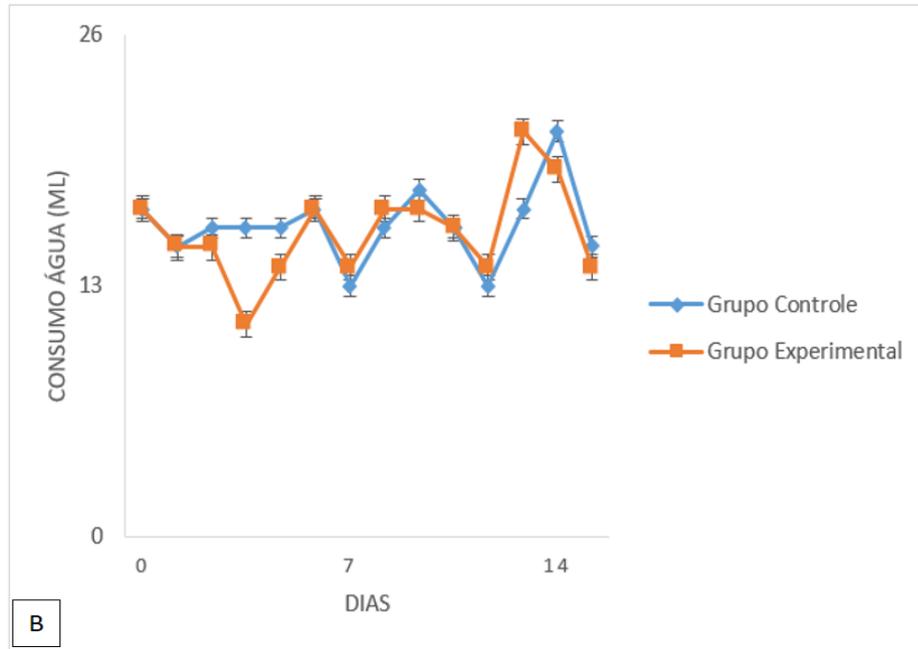
Grupo	Peso/Órgão	Coração	Estômago	Fígado	Baço	Rim
<b>Controle</b>	Peso absoluto	0,11 $\pm 0,008$	0,24 $\pm 0,012$	1,11 $\pm 0,159$	0,10 $\pm 0,001$	0,16 $\pm 0,009$
	Peso relativo	0,42 $\pm 0,03$	0,92 $\pm 0,065$	4,15 $\pm 0,510$	0,38 $\pm 0,040$	0,62 $\pm 0,034$
<b>Experimental</b>	Peso absoluto	0,10 $\pm 0,007$	0,27 $\pm 0,056$	1,11 $\pm 0,173$	0,08 $\pm 0,017$	0,17 $\pm 0,019$
	Peso relativo	0,40 $\pm 0,015$	1,05 $\pm 0,015$	4,28 $\pm 0,395$	0,32 $\pm 0,057$	0,67 $\pm 0,062$

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados, ANOVA ( $p > 0,05$ ).  
Fonte: Próprio Autor.

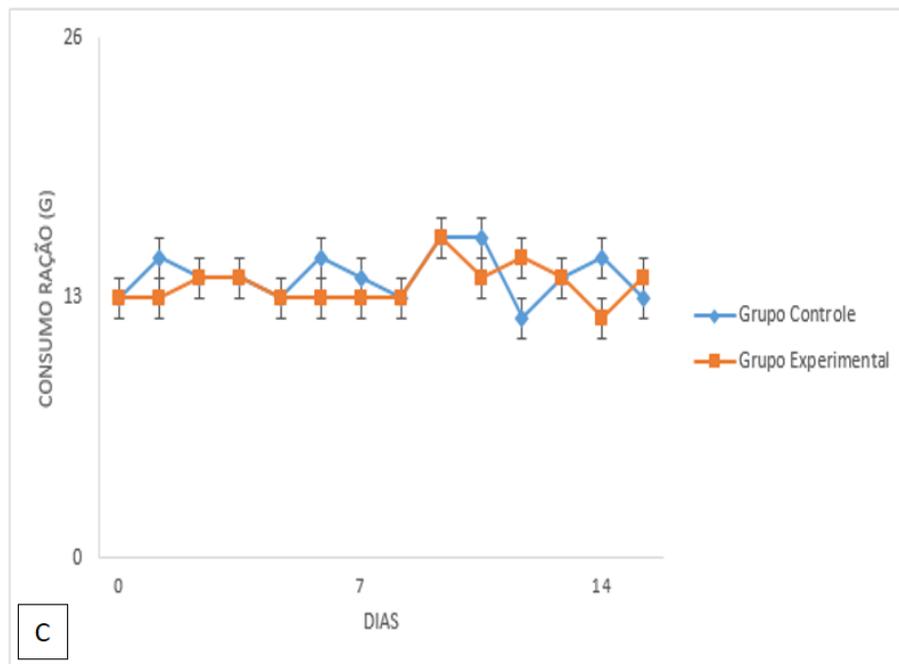
Figura 15: Efeito do emulgel incorporado com R-(+)-limoneno (ELI 2000mg/kg) sobre a massa corpórea de camundongos *Mus musculus* fêmeas (A); consumo de água (B) e consumo de ração (C). Os valores representam as médias  $\pm$ d.p.m. (n= 3/grupo). Não houve diferença significativa comparado ao grupo controle, ANOVA ( $p > 0,05$ ).



Fonte: Próprio Autor.

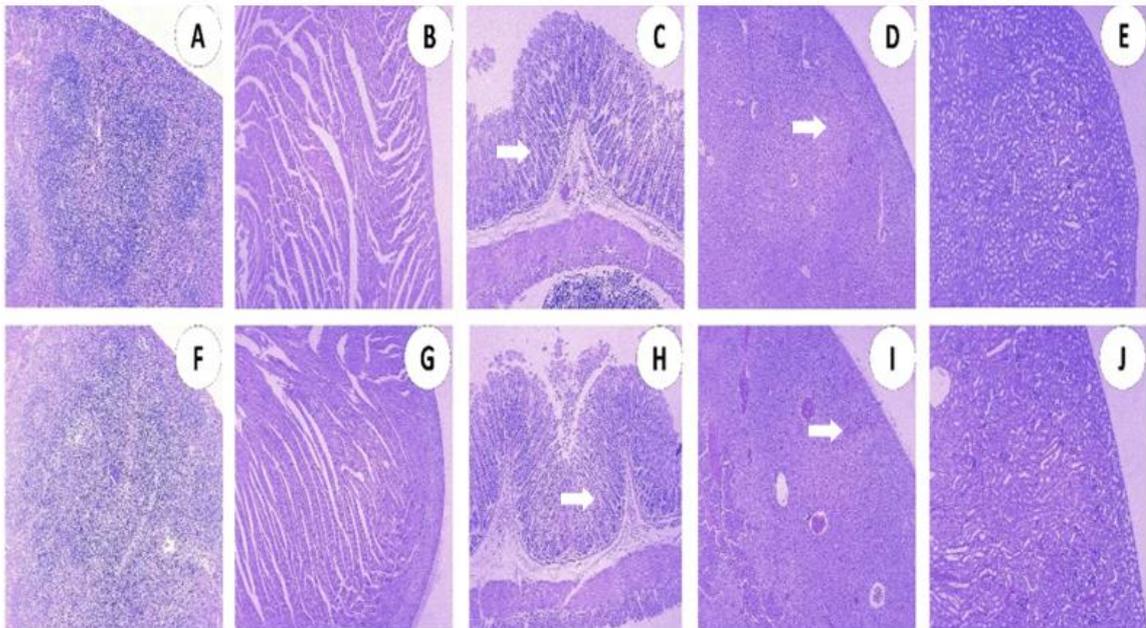


Fonte: Próprio Autor.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 16: Fotomicrografias evidenciando ausência de sinais de toxicidade aguda em órgãos como baço, coração, estômago, fígado e rim entre o grupo controle (A-E) e grupo experimental (F-J). (H/E, 200x). Foram observadas características semelhantes entre os grupos. Visualiza-se em C e H integridade epitelial e em D e I morfologia bem preservada, não demonstrando alterações teciduais.



Fonte: Próprio Autor

## 6.6 Determinação do Potencial Clastogênico e Aneugênico

### 6.6.1 Teste de Micronúcleo em Eritrócitos de Camundongos *Mus Musculus*, Linhagem *Swiss*

A tabela 5 demonstra os valores médios do Teste de micronúcleo do ELI. Após administração de uma dose única de 2.000 mg/kg, foi observado que o ELI não induziu um aumento na frequência de micronúcleos quando comparado com o grupo de controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5 e Figura 17).

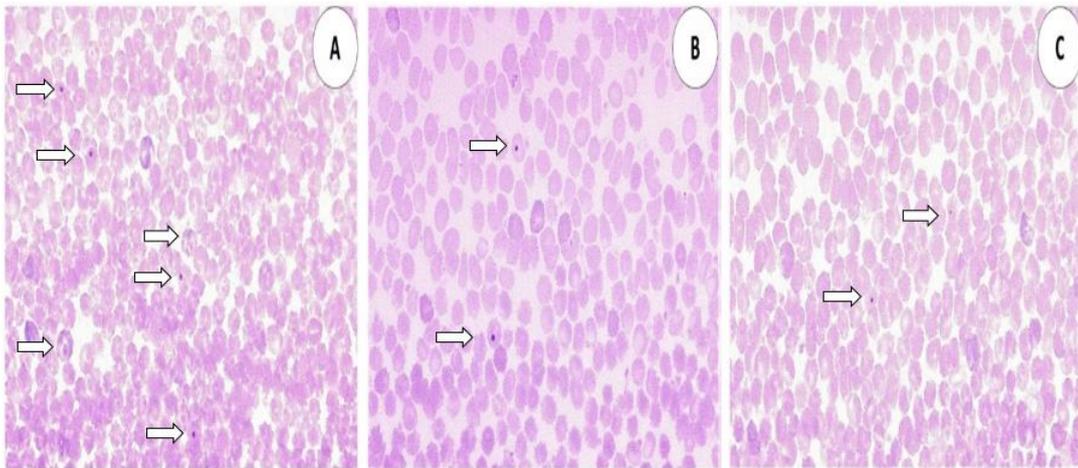
Tabela 5- Teste de micronúcleo de ELI (2000 mg/ kg) em células de sangue periférico de camundongos e os respectivos controles.

Tratamento	Eritrócitos micronucleados (Média $\pm$ D.P.) <sup>1</sup>
Ciclofosfamida 50 mg / kg (controle positivo)	15,3 $\pm$ 1,77
Veículo (controle negativo)	1,58 $\pm$ 0,99
ELI	1,16 $\pm$ 0,93

<sup>1</sup> Dados representam a contagem de micronúcleos por 2000 eritrócitos.

Fonte: Próprio autor.

Figura 17. Micrografia de eritrócitos capturados com objetiva de 400x após administração das substâncias: exibindo diferenças quantitativas entre os grupos analisados. A) Ciclofosfamida (50mg/kg). B) Veículo e C) ELI (2000mg/kg). Diferenças quantitativas em relação aos micronúcleos observados nos diferentes grupos.



Fonte: Próprio Autor.

### 6.7 Ação do R-(+)-limoneno e do ELI Sobre Redução Logarítmica

Os resultados da análise do potencial antifúngico do R-(+)-limoneno (LIM) e de um emulgel carregado com R-(+)-limoneno (ELI), demonstraram que houve uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) sobre o crescimento das espécies de *Candida* analisadas nos grupos testes em que o ELI ou LIM estava presente tanto para a isolado clínico *C. albicans* A2, como para *C. glabrata* (ATCC 90030), em relação ao controle de crescimento (Tabela 7).

Tabela 7: Atividade antimicrobiana do R-(+)-limoneno, do ELI e da Nistatina sobre o crescimento de *Candida albicans* isolado clínico A2 e *Candida glabrata* ATCC 90030 (Valores de média e desvio-padrão da viabilidade dos microrganismos).

<i>Candida albicans</i> A2 (média $\pm$ desvio padrão)	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 (média $\pm$ desvio padrão)
Emulgel base (2,66 $\pm$ 4,61)b	Emulgel base (8,25 $\pm$ 0,24)ac
Emulgel 1,2 % de R-(+)-limoneno (6,49 $\pm$ 0,19)ab	Emulgel 1,2 % de R-(+)-limoneno (6,01 $\pm$ 0,23) abc
Emulgel 2,4 % de R-(+)-limoneno (6,20 $\pm$ 0,17) abc	Emulgel 2,4 % de R-(+)-limoneno (6,20 $\pm$ 0,17)a
Emulgel 5,0 % de R-(+)-limoneno (4,90 $\pm$ 0,05)b	Emulgel 5,0 % de R-(+)-limoneno (6,10 $\pm$ 0,17)bc
Nistatina CIM (0,00 $\pm$ 0,00)c	Nistatina CIM (4,43 $\pm$ 0,37)b
R-(+)-limoneno CIM (6,43 $\pm$ 0,22)b	R-(+)-limoneno CIM (5,80 $\pm$ 0,19)b
Controle (9,28 $\pm$ 0,18)a	Controle (9,34 $\pm$ 0,06)a

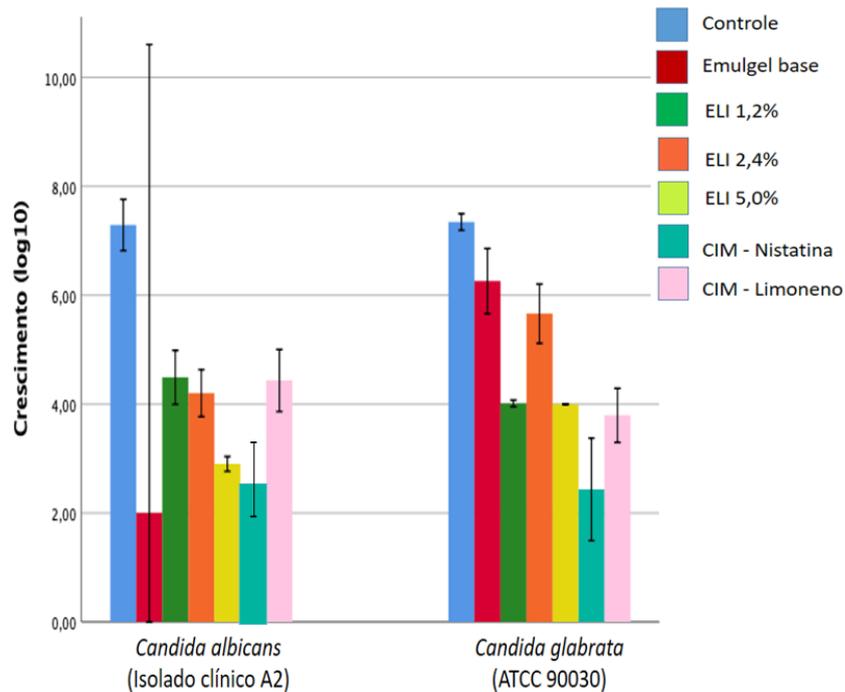
Fonte: Próprio autor.  $P < 0.05$

\*Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos quando comparados ao controle de crescimento.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas cepas de *C. albicans* (isolado clínico A2) entre: (controle x R-(+)-limoneno CIM); (Controle x Nistatina); (Controle x Emulgel 5,0 % de R-(+)-limoneno); (controle x Emulgel base); (Nistatina CIM x Emulgel base); (Nistatina CIM x R-(+)-limoneno CIM); (Nistatina CIM x Emulgel 1,2 % de R-(+)-limoneno); (Nistatina CIM x Emulgel 5,0 % de R-(+)-limoneno). E nas cepas de *C. glabrata* (ATCC 90030), entre: (Controle x R-(+)-limoneno CIM); (Controle x R-(+)-limoneno CIM) (Controle x Emulgel 5,0 % de R-(+)-limoneno); (Controle x Nistatina CIM); (R-(+)-limoneno CIM x Emulgel 2,4 % de R-(+)-limoneno); (R-(+)-limoneno CIM x Emulgel base); (Nistatina CIM x Emulgel 2,4 % de R-(+)-limoneno); (Nistatina CIM x Emulgel base).

De acordo com May et al. (2000), Jones et al. (2002) e Shelburne et al. (2004), uma redução de 3 log<sub>10</sub> significa efeito fungicida e redução de 2 log<sub>10</sub> equivale a efeito fungistático. Portanto, o ELI e o LIM foram considerados fungistáticos para *C. albicans* (isolado clínico A2) e *C. glabrata* (ATCC 90030) nas concentrações de 1,2%, 2,4% e 5,0% demonstrando o potencial antifúngico da formulação para ambas as espécies (Figura 18). O emulgel base não apresentou redução logarítmica quando comparado ao controle negativo, dessa forma é possível constatar que foi a adição do LIM ao emulgel que permitiu a redução do crescimento microbiano. A nistatina apresentou redução microbiana de 4 log<sub>10</sub> (99,99%) para *C. glabrata* (ATCC 90030), e de 100% para *C. albicans* (isolado clínico A2), visto que não permitiu o crescimento de nenhum microorganismo nesta espécie.

Figura 18: - Redução logarítmica entre os grupos quando comparados ao controle de crescimento. (Valores expressos em LogUFC).



Fonte: Próprio autor.

### 6.8 Determinação do Potencial Anti-Inflamatório do ELI em UTs

Na tabela 9 pode-se observar, em análise histopatológica, a ação anti-inflamatória do ELI nas concentrações de 2,4%, 5,0%, da base (sem incorporação do LIM) e do Ad-Muc® (Biolab, São Paulo, Brasil) no tratamento de UTs da cavidade oral de ratos Wistar. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre as alterações dos tecidos epitelial e conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento.

Tabela 9. Análise histopatológica da ação anti-inflamatória do ELI a 2,4%, 5,0% e do Ad-Muc no tratamento de UTs da cavidade oral de ratos *Wistar*.

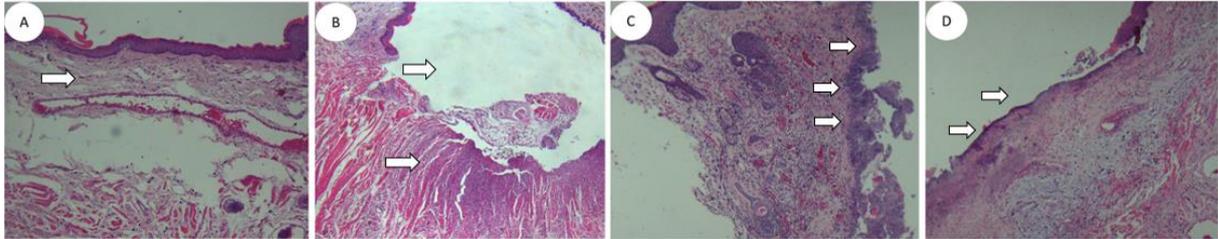
Tratamentos	Alteração epitelial	$p$	Alteração conjuntiva	$p$
GI (ELI 5,0%)	Ausência de epitélio	0,262	Granulação + Infiltrado leve	0,392
GII (ELI 2,4%)	Ulceração e necrose		Infiltrado leve	
GIII (BASE) C-	Ulceração e necrose		Granulação + infiltrado leve	
GIV (Ad-Muc) C+	Ulceração e necrose		Granulação + infiltrado leve	

Fonte: Próprio autor.

Na análise histopatológica semiquantitativa pode-se observar nos fragmentos da mucosa oral que não foi submetida a injúria, a presença de tecido íntegro revestido por epitélio pavimentoso estratificado ortoceratinizado (Figura 18 A),

enquanto a mucosa que recebeu queimadura com ácido acético a 5,0% mostrou a presença de áreas de ulceração e necrose, com presença de infiltrado inflamatório crônico (Figura 19 B, C e D).

Figura 19: Fotomicrografia de mucosa oral íntegra, revestida por epitélio pavimentoso estratificado ortoceratinizado B) Fragmento de mucosa oral exibindo extensa área de ulceração e, subjacente a essa área, intenso infiltrado inflamatório crônico. C) e D) Fotomicrografias de mucosa oral ulcerada exibindo extensas áreas de necrose em sua superfície (H/E, 100X).

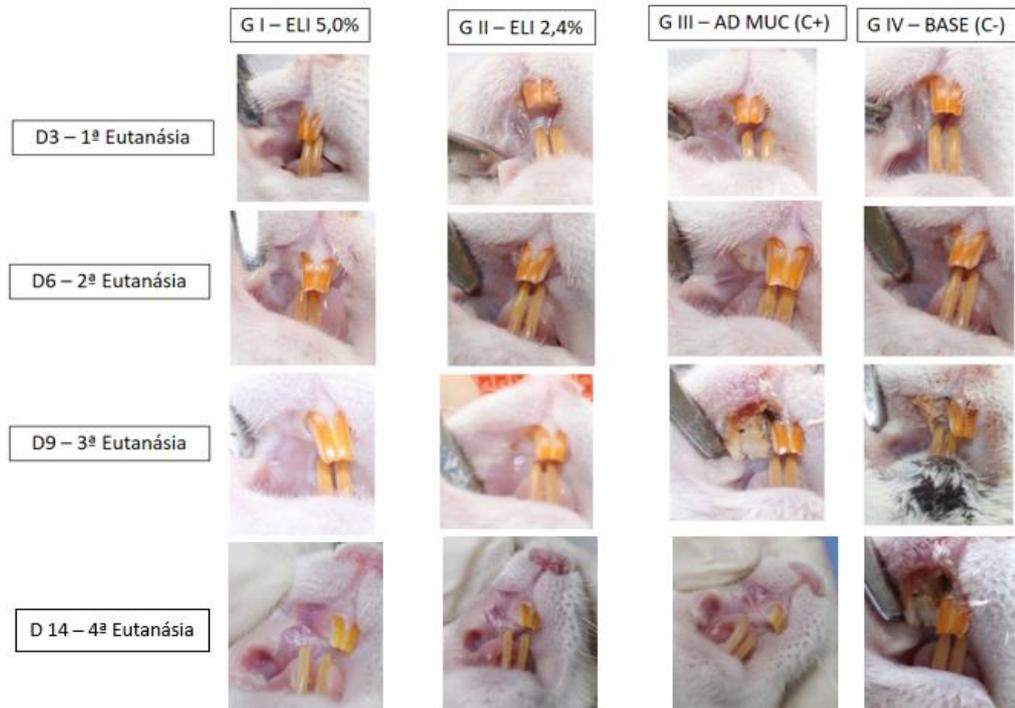


Fonte: Próprio autor.

### 6.9 Avaliação Clínica do Processo Cicatrizante de UTs com Uso do ELI

Clinicamente, no nono e décimo quarto dias de tratamento, pode-se observar uma melhor cicatrização nos grupos tratados com ELI 2,4% e 5%, em relação aos grupos tratados com Ad-Muc ou apenas com a base do emulgel (sem a incorporação do LIM) (Figura 20).

Figura 20: Comparação clínica do processo de cicatrização tecidual de UTs na cavidade oral.



Fonte: Próprio Autor.

## 7 DISCUSSÃO

O modelo de estudo *in silico* permite caracterizar, propriedades e estrutura proteicas, bem como prever suas singularidades físico-químicas, estabilidade e interação ligante-receptor. As simulações biocomputacionais são uma alternativa acessível aos experimentos *in vivo*, vez que constituem uma ferramenta tecnológica contemporânea com aceitável poder de predição (Mello et al., 2021).

Os resultados obtidos no *PASS online* apontam que o R-(+)-Limoneno apresenta possibilidade de obter ação contra vírus, fungos, bactérias, protozoários, além muitos outros potenciais biológicos, como anti-inflamatório, antiulcerativo e antineoplásico, resultado que corrobora com diversas pesquisas desenvolvidas *in vitro* e *in vivo* disponíveis na literatura (Araújo-Filho et al., 2017; Amini et al., 2020; Meeran et al., 2020), confirmando o potencial terapêutico do composto.

A genotoxicidade é um fator importante nos testes de toxicidade pré-clínica do design da droga (Wang, et al., 2015). Para os parâmetros de toxicidade foi possível observar que o composto avaliado é um fraco inibidor do gene codificador de canais de potássio (HERG), não apresentou toxicidade pelo teste AMES.

O composto não apresentou característica carcinogênica, sendo um ponto favorável, visto que quando ocorrem mutações no material genético (DNA) de células, estas recebem instruções erradas para as suas atividades, dando origem ao câncer. As alterações celulares são decorrentes de danos em genes específicos. Estas ocorrem no genoma celular por meio de metabólitos reativos endógenos, mutágenos ambientais e drogas terapêuticas que podem alterar sua integridade. Dessa forma, a carcinogênese pode ser espontânea ou induzida por agentes mutagênicos (Da Silva; Oliveira, 2017).

O R-(+)-Limoneno apresentou-se como um composto pronto biodegradável, e com potencial antimicrobiano. A importância da pesquisa do perfil biodegradável do fármaco tornou-se importante após a detecção de produtos farmacêuticos em sistemas terrestres e aquáticos. A biodegradação é um processo que determina a eliminação da maioria dos xenobióticos, incluindo fármacos, através de organismos que têm a capacidade de degradar diversos poluentes, presentes nas águas residuais e os biotransformar recuperando a contaminação, contudo isto só

ocorre se o composto não for capaz de inibir a atividade microbiana devido ao seu ao poder de toxicidade (Domaradzka, et al., 2015; Kiel; Engesser, 2015).

O objetivo dos modelos de toxicidade *in silico* é complementar os métodos existentes de toxicidade *in vitro* para prever os efeitos de toxicidade dos produtos químicos, minimizando tempo, e a necessidade de testes em animais. A previsão precisa de toxicidade aguda é um grande desafio porque os mecanismos de ação são bastante diversos. Para os requisitos de rotulagem de precaução, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA) estabeleceu categorias de toxicidade com base na dose letal mediana (DL50) ou na concentração letal média (CL50). Para toxicidade oral aguda, existem quatro categorias (categorias I, II, III e IV) para indicar o nível de toxicidade (LI et al., 2014). O R-(+)-limoneno foi classificado na Categoria III que inclui compostos com DL50 valores superiores a 500 mg/kg e inferiores a 5000 mg/kg, fato confirmado com a estimativa da DL50 teórica pela ferramenta que foi de 1.4819 (LD50, mol/kg).

Estudos microbiológicos mostraram que *Candida albicans* representa mais de 80% das espécies isoladas na candidíase oral e que o número de infecções por espécies não *albicans* é crescente. No entanto, as infecções causadas por outras espécies, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* estão aumentando devido ao tratamento com dose única, regimes de manutenção com azóis de baixa dosagem, e o uso de antimicóticos de venda livre que podem induzir resistência aos medicamentos (Saracino et al., 2022).

Os tratamentos mais prevalentes contra a candidíase envolvem fluconazol, itraconazol, miconazol e caspofungina. Além disso, a anfotericina B associada à administração prolongada de azóis é utilizada para controlar os casos graves. Atualmente, inúmeras diretrizes recomendam equinocandinas para tratar a candidíase invasiva (Munoz, 2020). Entretanto, o uso desses fármacos tem sido limitado, devido à presença de cepas resistentes, casos onde o R-(+)-limoneno em determinadas concentrações mostra-se eficaz em inibir o crescimento microbiano (Thakre et al., 2018; D'Arrigo et al., 2019; Muñoz et al., 2020).

Observou-se na literatura que o R-(+)-limoneno apresentou potencial antifúngico contra diferentes espécies de *Candida*: *Candida albicans* (Omran et al., 2011; Pinto et al., 2013, 2017; Thakre et al., 2018; D'Arrigo et al., 2019; Leite-Andrade,

2022), *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* (Pinto et al., 2013, 2017; D'Arrigo et al., 2019; Leite-Andrade et al., 2022), além de *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* (Pinto et al., 2013, 2017) e *Candida auris* (Zapata-Zapata et al., 2022).

Os óleos essenciais são conhecidos por suas atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antioxidantes, anticancerígenas e imunomoduladoras, além de também serem usados como medicamentos analgésicos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais (Saracino et al., 2022). O modo de ação dos óleos essenciais é multidirecional, de modo que levam à ruptura da parede celular e da membrana celular através de um processo de permeabilização (Karpinski, 2020). O R-(+)-limoneno, por sua vez, atua inibindo o crescimento de *C. albicans* por superexpressão gênica, causando danos à membrana celular induzidos por estresse oxidativo, que levam a danos ao DNA, resultando na modulação do ciclo celular e indução de apoptose através do estresse nucleolar e da via dependente da metacaspase. Esse composto demonstrou excelente potencial anti-*Candida* contra as formas planctônicas (levedura), morfogênese (hifal), inibição de adesão e crescimento do biofilme de forma significativa, demonstrando atividade fungicida contra *Candida albicans* (Thakre et al., 2018).

O R-(+)-limoneno apresentou efeitos antifúngicos sobre o crescimento das espécies de *Candida* testadas, demonstrando valores de CIM na faixa de 656,25 µg/mL a 2625 µg/mL para esses microrganismos. Observou-se que as cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) apresentam maior sensibilidade à ação antifúngica do R-(+)-limoneno o, conforme a tabela 6. Neste estudo, os resultados de CIM para *C. parapsilosis* foi de 656,25 µg/MI (0,65 mg/mL), corroborando com os resultados obtidos na pesquisa desenvolvida por Klimek-Szczykutowicz et al. (2020), em que o potencial do LIM contra *Candida parapsilosis* apresentou uma CIM de 8 mg/mL.

Neste estudo, o R-(+)-limoneno apresentou ação fungistática sobre as cepas de *C. albicans* (ATCC 10231), enquanto para todas as outras cepas sua ação foi fungicida. Entretanto, em estudo realizado por Thakre et al. (2018), o limoneno demonstrou potencial anti-*Candida* contra as formas planctônicas (levedura), hifal e inibição de adesão e crescimento do biofilme de forma significativa, demonstrando atividade fungicida contra *Candida albicans*.

Os resultados da cinética (Figura 9) demonstraram redução de crescimento microbiano a partir da primeira hora de observação para as concentrações testadas do R-(+)-limoneno e da nistatina em comparação ao controle de crescimento. *C. albicans* (ATCC 10231) permitiu crescimento microbiano a partir de 16 horas de exposição à CIM, no entanto, para as outras concentrações, CIMx2 e CIMx4, do R-(+)-limoneno, percebeu-se crescimento após as 20 horas de exposição. Observou-se semelhança em relação ao resultado da CIM do R-(+)-limoneno entre o isolado clínico (*C. albicans* A2) e a *C. albicans* (ATCC 10231). Já no estudo de Munoz et al. (2020), visando avaliar os efeitos do R-(+)-limoneno contra diferentes *Candida* spp., o R-(+)-limoneno por um período de 12 h, apresentou inibição de crescimento nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$ , sendo observada uma diminuição significativa na viabilidade celular de *C. albicans* quando as leveduras foram previamente tratadas com R-(+)-limoneno, nas concentrações de 500  $\mu\text{M}$  e 600  $\mu\text{M}$ , por um período de 8 h.

Os emulgéis são amplamente utilizados na indústria farmacêutica na administração tópica de insumos farmacêuticos ativos (IFA), visto que permitem o aumento da biodisponibilidade e mascaramento de sabor e odor desagradáveis, sendo considerados uma boa opção para a mucosa oral devido serem tixotrópicos, sem gordura, facilmente espalhados, facilmente removíveis, emolientes, não mancham, são solúveis em água, possuem vida útil mais longa, são biocompatíveis e apresentam aparência clara e agradável ao toque (Yadav et al., 2016; Yousuf et al., 2022).

Eles são considerados o melhor veículo para IFAs hidrofóbicos e não estáveis, como é o caso do R-(+)-limoneno, que é um óleo essencial volátil e fotossensível. O procedimento de formulação desse produto é simples, barato e consome menos tempo. As formulações apresentam-se cremosas, viscosas e brancas com uma textura homogênea e suave com aparência brilhante, favorecendo a aceitação dos pacientes (Shivappa et al., 2018; Charyulu et al., 2021).

O limoneno foi escolhido pois além de suas diversas propriedades terapêuticas, é considerado um intensificador de penetração dérmica, que tem demonstrado bastante eficácia quando incorporado em formulações tópicas como agentes de permeação química, que facilitam e ampliam a penetração de IFA (Sousa et al., 2021).

Optou-se por utilizar o Pluronic® F127 por tratar-se de um copolímero atóxico, biocompatível e termoativo, capaz de gelificar à temperatura corporal, podendo ser utilizado para a preparação de hidrogéis e organogéis destinados à administração local de medicamentos (Wróblewska; Szymanska; Winnicka, 2021). Além disso, a transição líquido-gel dependente da temperatura que é uma propriedade interessante para o desenvolvimento de formulações mucoadesivas (Giuliano et al., 2018).

Esses sistemas termossensíveis gelificam à temperatura corporal e são mais convenientes de administrar; sua matriz formada pode proteger IFAs sensíveis e controlar a sua liberação da pela matriz polimérica, melhorando a eficácia e reduzindo reações adversas (Huang et al., 2019). Além disso, a transição sol-gel do emulgel *in situ* acomoda sua forma à geometria da área tratada (Valentino et al., 2022) e a gelificação facilita a fixação do ativo no local alvo (Zhou et al., 2017).

O pH é um importante fator que determina quanto erosivos os produtos podem ser. A desmineralização do esmalte induzida por ácido afeta muitos indivíduos por exposição a dietas ácidas, produtos erosivos (erosão dentária) ou ácidos provenientes do biofilme dentário (cárie dentária) (Harper et al., 2021). A saliva possui um efeito protetor limite para o esmalte até o pH crítico 5,5. Valores de pH, inferiores a este, criam condições para que haja aumento da solubilidade e dissolução dos cristais de esmalte. Quando episódios de redução do pH são intercalados com maiores períodos de retorno ao pH fisiológico, há um retorno ao equilíbrio entre os íons provenientes da saliva e do esmalte dentário (Loke et al., 2016). O pH do ELI nas concentrações de 1,2%, 2,4% e 5% apresentou caráter ácido, porém acima do pH crítico para que a saliva atue como proteção à desmineralização do esmalte dentário, quando da aplicação deste produto na cavidade oral.

A espalhabilidade das formulações é um critério importante para aplicação padronizada e simples na mucosa, além disso, a eficácia terapêutica depende da sua disseminação, com aplicação uniforme, satisfazendo a qualidade para aplicação tópica, impactando em quão bem o medicamento é administrado na dosagem adequada (Dantas et al., 2016; Djekic et al., 2020). O ELI demonstrou estabilidade quando submetido a condições extremas, indicando permanecer estável fisicamente ao longo do armazenamento. As formulações com e sem LIM apresentaram bons resultados físico-químicos, ainda que o LIM tenha alterado os resultados de pH,

viscosidade e espalhabilidade, seu comportamento continuou dentro do aceitável para um fitofármaco de uso tópico, o mesmo também foi observado quanto a resistência à centrifugação. Portanto, para estes testes, a presença do LIM no emulgel não alterou sua estabilidade, indicando que é facilmente espalhado por uma pequena quantidade de cisalhamento, o que resulta no aumento da capacidade do IFA difundir-se pela mucosa oral. Sendo também, um dos aspectos fundamentais para a aceitabilidade do ponto de vista do paciente.

Para as formulações orais tópicas, os principais critérios de desempenho para uma resposta ideal são o tempo de retenção do gel na mucosa oral, a taxa de difusão do ativo para fora do gel e a estabilidade do composto no gel, propriedades que são controladas pela composição da formulação. A viscosidade do emulgel é um fator fundamental na taxa de difusão e retenção do ativo na mucosa oral e, portanto, a composição do gel precisa ser otimizada para atender a todos esses critérios de desempenho (Kong et al., 2015). O gráfico apresentado na Figura 11 demonstra que à medida que a taxa de cisalhamento aumentou, a viscosidade do emulgel à base de R-(+)-limoneno diminuiu, sugerindo sua difusão no meio para exibir seu efeito terapêutico.

O estudo preliminar avalia a estabilidade de formulações durante a fase inicial do desenvolvimento do produto, a partir de variações que possam afetar a forma farmacêutica ou o IFA. Para a sua realização, as fórmulas propostas são submetidas a condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações de degradação entre seus componentes, e avaliar o surgimento de sinais de instabilidade e/ou características específicas de cada tipo de produto (Mazzo et al., 2020; Pereira et al., 2020; Cavalcante et al., 2022).

Ao realizar o teste de triagem na centrífuga, neste estudo, todas as formulações mantiveram-se estáveis não apresentando nenhuma separação de fase, reação de oxidação ou mudanças organolépticas. Assim, todas as formulações foram dirigidas para a fase posterior. Durante os seis ciclos de estresse térmico, macroscopicamente, foram observadas as condições organolépticas, pH e viscosidade, constatando que não houve alteração significativa na cor, odor e separação de fases em nenhuma das formulações, ou seja, tanto a base como a formulação nas três concentrações de LIM, em qualquer temperatura, mantiveram

suas respectivas características organolépticas, bem como os padrões de pH e viscosidade, atestando assim a estabilidade das formulações.

A análise térmica tem sido um método analítico amplamente utilizado para analisar as propriedades da amostra em função de variações da temperatura (Santana et al., 2018). Trata-se de uma ferramenta útil para avaliar rapidamente uma possível interação entre os componentes ativos e os excipientes em estudos de compatibilidade na pré-formulação, além de avaliar a existência de polimorfismo, compostos de inclusão e dispersões sólidas, determinação de pureza química, estudos de reações no estado sólido, análise de formas farmacêuticas sólidas e controle de qualidade (Cordella et al., 2002; Lambi et al., 2003; Tomassetti et al., 2005; Mamede et al., 2006).

A análise termogravimétrica (TGA) é uma análise térmica em que a variação de massa da amostra é determinada como uma função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura e atmosfera. É importante na área farmacêutica, pois fornece informações sobre reações de decomposição, oxidação, e de processos físicos como vaporização, sublimação e dessorção, contribuindo para o controle de qualidade do medicamento e para o melhoramento do produto final. Seu uso é descrito na caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação (Oliveira, 2011).

Os resultados deste estudo, apresentados na Figura 14 apontam que as formulações iniciam a alteração de sua estabilidade por volta de 26 °C quando ocorre o início da perda de massa e a liberação das substâncias voláteis, como é o caso do limoneno. Segundo Matos et al. (2009), a temperatura em que se inicia a perda de massa é a temperatura inicial do evento, ou seja, o ponto onde a amostra deixou de ser estável termicamente e iniciou a liberação de substâncias voláteis, enquanto a temperatura final, indica o final da etapa de perda de massa (liberação total das substâncias voláteis).

Outro dado importante obtido através da curva TG é a curva termogravimétrica derivada (DTG). A DTG expressa a derivada primeira da variação de massa ( $m$ ) em relação ao tempo ( $dm/dt$ ), sendo registrada em função do tempo ou

temperatura. Na curva DTG são obtidos picos cujas áreas são proporcionais a variação de massa da amostra, apresentando informações mais facilmente visualizadas (como eventos sobrepostos) que em uma curva TG (Matos et al., 2009).

O limoneno apresenta ponto de ebulição: 176°C e ponto de fusão: -74,35 °C e evaporação a 20 °C. No entanto, os medicamentos comerciais apresentam máximos de temperatura diferentes do IFA, sendo que esta diferença pode ser atribuída a interação do excipiente com o IFA (Mamed et al., 2006). No que se refere ao Polaxamer F-127 (P127), usado nos emulgéis, trata-se de um material solúvel em água fria (4 - 5°C) e solução aquosa, e apresenta transição gel (6 - 8°C) com aquecimento. A uma temperatura mais baixa em solução aquosa, uma camada de hidratação envolve moléculas responsáveis por sua solubilidade a frio, mas com o aumento da temperatura, as cadeias de copolímeros hidrofílicos tornam-se dessolvatadas que favorecem interações hidrofóbicas entre unidades de polioxipropileno e conduzem a formação de gel (Boonlai et al., 2017; Dewan et al., 2015; Kuroiwa et al., 2018).

De acordo a análise térmica realizada por Leão (2021), o P127 obteve um pico exotérmico logo no início (61,7 °C) atingindo um grau de cristalinidade de 124,82% e uma temperatura de transição vítrea (Tg) 55 °C, e tanto as nanopartículas quanto a mistura física também apresentaram eventos térmicos no início. Portanto, os picos endotérmicos observados podem estar relacionados à fusão deste polímero. A temperatura à qual ocorre a transição de estado solução-gel, conforme a literatura é de aproximadamente 29,2 °C (Nie et al., 2011). Contudo, a propriedade de termogelificação do sistema P127 ainda não se encontra totalmente esclarecida (Adeli, 2016; Nascimento et al., 2018; Nie et al., 2011).

Com base nos achados dos ensaios das curvas de TG, a perda de massa ocorrida na primeira etapa de decomposição da amostra pode ser atribuída à perda de água e certos produtos voláteis da amostra, como é o caso do limoneno, dada as semelhanças entre as faixas de temperaturas e os percentuais de perdas de massas ocorridas na etapa de decomposição observada nos emulgéis e os dados obtidos por Rupp; Binder (2020), que avaliaram a estabilidade térmica do limoneno e observaram que o início da variação de temperatura se deu em 102°C e o fim em 177 °C, ocorrendo uma perda de massa de 99.9% a 400 °C.

As reações endotérmicas incluem desidratação, redução em uma atmosfera gasosa e decomposição, então devido à grande quantidade de água presente nos emulgéis e à natureza volátil do limoneno, é provável que o evento se trate de um caso de desidratação, visto que acima de 100 °C ocorre a evaporação da água, e que nos emulgéis aos quais foi incorporado R-(+)-limoneno, a perda de massa foi proporcional a concentração do bioativo adicionado. Entretanto, de acordo com Morais (2009), na natureza, os óleos essenciais, na maioria das vezes, apresentam um aumento em seu teor quando as plantas produtoras se encontram em ambientes com temperatura elevada, porém, em dias muito quentes, pode-se observar perda excessiva dos mesmos. As curvas DTA das amostras revelaram a ocorrência de apenas um evento endotérmico em cada uma delas, referentes à decomposição do óleo com a carbonização do material, concordante com a perda de massa apresentada nas curvas TG/DTG.

Os resultados obtidos por TG/DTG e DTA (Figuras 14 e 15, respectivamente) em atmosfera inerte evidenciaram o comportamento térmico dos produtos analisados. Com a utilização destes métodos foi possível determinar a estabilidade desses materiais, que é um fator determinante no controle de qualidade de óleos e gorduras durante o processamento, estocagem e utilização na indústria farmacêutica. No estudo de Silva (2017), a curva de TG/DTG do P127 apresentou um único evento em aproximadamente 397 °C, com perda de  $\cong$  97% de massa, característico da decomposição das cadeias principais das moléculas do polímero, corroborando com os resultados encontrados na presente pesquisa.

Em relação ao teste de toxicidade oral aguda, o ganho de peso dos animais pode ser afetado pela dificuldade na digestão e absorção de alimentos e nutrientes, uma indicação de possível efeito tóxico. A *Organization of Economic Co-operation and Development* (OECD) considera aceitável uma variação de até 20% do peso corporal. Além das variações comportamentais, a toxicidade de um composto pode ser avaliada por meio de mudanças no ganho de peso animal, redução no consumo de água e comida, e alterações na excreção de urina e fezes (OECD, 2001).

Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas foram observados, além disso, parâmetros como alteração da locomoção, aumento da frequência respiratória, diarreia, sialorréia,

convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológicos foram investigados. A observação se deu nas primeiras quatro horas após administração do emulgel (sem ou com LIM), nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos. Após findar a primeira hora, o acompanhamento ocorreu a cada 60 minutos até se completarem as quatro horas. Durante os 14 dias após administração do emulgel (sem ou com LIM), as observações foram diárias e sempre no mesmo horário do início do experimento (Brasil, 2004).

Os testes toxicológicos realizados em animais experimentais visam fornecer informações seguras sobre os efeitos tóxicos produzidos por um agente químico, a natureza desses efeitos e as doses seguras de exposição (Pires et al., 2010). O ELI pode ser considerado de baixa toxicidade aguda de acordo com o método de classes recomendado pela OECD 423 (OECD, 2001) e enquadra-se na classe 5 (DL50 superior a 2.000 mg/kg), pois não foram registrados sinais clínicos de toxicidade geral como alterações no peso corpóreo e no consumo de água e ração, como também não foram observados óbitos durante todo período experimental. A administração do ELI também não promoveu evidências de alterações morfológicas nos órgãos pela análise histopatológica. As características histológicas de cada órgão foram verificadas, e não foram encontradas evidências de alterações promovidas por toxicidade aguda como: hiperemia, presença de infiltrado inflamatório, binucleação, sinusóides dilatados e magalocitose em fígado, mineralização na luz tubular renal.

O método de micronúcleo baseia-se na análise da frequência de danos ocorridos ao DNA, resultantes de mitoses ou meiose celular que, em contato com agentes clastogênicos e aneugênicos podem gerar a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros, formando assim os micronúcleos. Os micronúcleos são indicativos de perdas irreversíveis de DNA (Hayashi et al., 2007). O ELI não induziu aumento na formação de micronúcleos em eritrócitos de camundongo, visto que a frequência de eritrócitos micronucleados nos grupos experimental e controle negativo foram semelhantes e não revelou diferença significativa. Em relação ao controle positivo (ciclofosfamida) houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo experimental e controle negativo. De acordo com esses resultados, sugere-se que o ELI não apresenta potencial clastogênico e aneugênico.

Quanto à redução logarítmica, os resultados da análise do potencial antifúngico do LIM e do ELI, demonstraram que houve uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) sobre o crescimento das espécies de *Candida* analisadas nos grupos testes em que o ELI ou LIM estava presente tanto para a isolado clínico *C. albicans* A2, como para *C. glabrata* (ATCC 90030), em relação ao controle de crescimento (Tabela 8). Essa atividade anti-*Candida* demonstrada pela redução do número de colônias fúngicas (UFC/mL) na presença do composto corrobora com os estudos de Pinto et al. (2017), Thakre et al. (2018) e D'Arrigo et al. (2019) que sinalizaram o efeito inibitório do LIM sobre o crescimento de *Candida* spp.

O ELI e o LIM foram considerados fungistáticos para *C. albicans* e *C. glabrata* nas concentrações de 1,2%, 2,4% e 5,0% demonstrando o potencial antifúngico da formulação para ambas as espécies. Em particular, *C. glabrata* é uma preocupação crescente como causa de infecções da mucosa e está relacionada a aproximadamente 15% de todas as infecções sistêmicas da corrente sanguínea associadas a *Candida* spp., e que exibe suscetibilidade reduzida aos antifúngicos usados comumente. A taxa de infecção mista (com duas ou mais *Candida* spp.) tem aumentado progressivamente e este fato é de grande importância clínica, uma vez que a suscetibilidade e resistência aos antifúngicos difere consideravelmente entre *Candida* spp (Rodrigues, Silva, Henriques, 2014; Cleveland, 2015; Berkow, Lockhart, 2017).

Em relação ao potencial anti-inflamatório e cicatrizante do ELI em úlceras traumáticas induzidas na cavidade oral de ratos Wistar, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as alterações dos tecidos epitelial e conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento (Tabela 9). Porém clinicamente, pode-se observar uma melhor cicatrização nos grupos tratados com ELI 2,4% e 5%, visto que no nono dia de avaliação estes já apresentavam o tecido cicatrizado, enquanto nos grupos tratados com Ad-Muc ou apenas com a base do emulgel (sem a incorporação do LIM), ainda foi observado a presença de úlceras, ao final do tratamento clínico (14<sup>o</sup> dia), todos os grupos apresentavam tecido cicatrizado, exceto o grupo tratado com a base do emulgel (Figura 20). Isso pode se justificar devido ao LIM provocar um aumento do número de macrófagos e produtores de fator de crescimento endotelial vascular, ou pela ativação indireta de macrófagos por meio de linfócitos ativados, podendo melhorar a cicatrização de feridas através de quimiotaxia e angiogênese, além de

melhorar a função endotelial tanto na condução nervosa quanto na oxigenação tecidual, resultando na cicatrização acelerada da úlcera, conforme mostram os resultados obtidos por Ayuningtyas et al. (2023) ao avaliar a aplicação de óleo essencial de casca de *Citrus limon* contendo R-(+)-limoneno em úlceras traumáticas no lábio inferior de ratos *Wistar* diabéticos.

Esses resultados corroboram com os de Keskin et al. (2017), que revelam que o limoneno pode ser útil para acelerar a cicatrização de feridas agudas e crônicas, protegendo o local da lesão contra infecções, inibindo células inflamatórias e aumentando a formação de tecido conjuntivo no tecido reparado. Ainda neste sentido, Yu, et al. (2017) encontraram em seus resultados considerações sobre o uso do LIM em colite ulcerativa induzida em ratos em que foi observado que o R-(+)-limoneno suprime os níveis de expressão de Matriz Metaloproteinase 2 (MMP-2) e -9 RNA mensageiro (mRNA) via regulação das vias de sinalização de óxido nítrico sintase (iNOS), COX-2, prostaglandina E2, TGF- $\beta$  e (Extracellular signal-regulated kinases) ERK1/2, indicando suas potenciais propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

Os resultados encontrados no presente estudo, ressaltam que, efetivamente, o ELI é capaz de modular as fases que envolvem o processo de cicatrização tecidual. Ao comparar com o controle positivo (Ad-Muc), apenas histopatologicamente, as terapias não se sobrepõem uma a outra de forma evidente, porém clinicamente os emulgéis incorporado com LIM permitiram a cicatrização do tecido ulcerado em nove dias de tratamento, enquanto o grupo tratado com Ad-Muc mostrou ausência de úlcera apenas após 14 dias. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Oliveira et al. (2016), que compararam o uso tópico do extrato fluido de camomila (Ad-muc®) e da triancinolona acetonida (Omcilon-A) no tratamento de úlceras orais em ratos diabéticos e concluíram que o extrato de camomila pôde otimizar a cicatrização de UTs através da redução da apoptose no epitélio e expressão de TNF- $\alpha$ .

Neste sentido, as lesões ulcerativas da mucosa oral consistem em um grupo de alterações comuns que geralmente apresentam sintomatologia dolorosa, provocando desconforto, interferindo na função e qualidade de vida do paciente acometido e que tendem a desenvolver processos infecciosos de natureza polimicrobiana. Os resultados desse estudo revelam que o limoneno é um composto

com potencial ação antifúngica e promissor para o desenvolvimento de medicamento contra espécies de *Candida*, além de mostrar um bom desempenho como anti-inflamatório e cicatrizante em UTs induzidas na cavidade oral de ratos Wistar. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento de UTs é uma opção interessante, de modo que o ELI demonstrou ser um produto promissor para o tratamento das UTs orais, porém, mais análises devem ser realizadas, assim como a avaliação terapêutica em estudos clínicos para verificar sua ação e segurança como fármaco.

## 8 CONCLUSÕES

- Os ensaios *in silico* estimaram que o R-(+)-limoneno apresenta um amplo espectro de ação sobre microrganismos de grande importância clínica; também possui boa biodisponibilidade oral teórica e baixa toxicidade oral aguda em ratos;
- O ELI apresentou pH ácido, boa espalhabilidade, viscosidade, estabilidade e resistência a centrifugação adequadas;
- A atividade antifúngica do R-(+)-limoneno considerando a relação CFM/CIM se classificou como fungistático sobre as cepas de *C. albicans* (ATCC 10231), enquanto para as demais cepas sua ação foi fungicida.
- O R-(+)-limoneno interferiu na cinética de crescimento das cepas padrão e clínica de *C. albicans*, inibindo seu crescimento em todas as CIMs testadas;
- O ELI apresentou baixa toxicidade aguda oral e produziu um menor número de micronúcleos estatisticamente significativo comparado ao controle positivo (ciclofosfomida a 50 mg/kg) em eritrócitos de camudongos.
- Na análise por redução logarítmica, o ELI e o LIM foram considerados fungistáticos para *C. albicans* e *C. glabrata* nas concentrações de 1,2%, 2,4% e 5,0% demonstrando potencial antifúngico da formulação para ambas as espécies.
- O ELI apresentou ação anti-inflamatória e cicatrizante no tratamento de UTs na cavidade oral de ratos Wistar.

## REFERÊNCIAS

ABID, W. K.; ALYAA I. N. The efficacy of a new paste formulation as an alternative therapeutic agent for traumatic ulcers. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v.16, n.5, p.724–32, 2021.

ADELI, E. The use of supercritical anti-solvent (SAS) technique for preparation of Irbesartan-Pluronic® F-127 nanoparticles to improve the drug dissolution. **Powder Technology**, v. 298, p. 65–72, 2016.

AKGULLU, C. et al. Nebivolol to attenuate the effects of hyper-homocysteinaemia in rats. **Atherosclerosis**, v. 240, n. 1, p. 33e39-39, 2015.

ALCOBA-FLÓREZ, J. et al. PCR protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6194–6196, dez. 2005.

AMARAL, R.B. et al. A. Terapia de fotobiomodulação no tratamento das lesões orais da síndrome de Stevens-Johnson: relato de caso. **Hurev**, v.45, n.4, p.478–82, 2020.

AMINI, R.; ASLE-ROUSTA, M.; AGHAZADEH, S. Hepatoprotective effect of limonene against chronic immobilization induced liver damage in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, p. 2053–2059, 2020.

ANAND, V.; GULATI, M.; GOVILA, V.; ANAND, B. Low level laser therapy in the treatment of aphthous ulcer. **Indian Journal of Dental Research**, v.24, n.2, p.267-70, 2013.

ANDISHEH-TADBIR, A. et al. The effect of indocyanine green-mediated photodynamic therapy in healing of experimentally induced oral mucosal traumatic ulcer in rat. **Lasers in Medical Science**, v.36, n.3, p.611-618, 2021.

ANDRADE-JORGE, E. et al. Novel synthesis of isoindoline/isoindoline-1, 3-dione derivatives under solventless conditions and evaluation with the human D 2 receptor. **Medicinal Chemistry Research**. v. 26, n. 10, p. 2420-2431, 2017.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Versão 2**, p. 1–48, 2019.

ANVISA. Guia de estudos de estabilidade. **Versão 1**, p. 1-47, 2019.

APTE, R. N. et al. Effects of micro-environment-and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour–host interactions. **European journal of cancer**, v. 42, n. 6, p. 751-759, 2006.

ARAÚJO, G.M.F. et al. Nanoemulsions Loaded with Amphotericin B: Development, Characterization and Leishmanicidal Activity. **Curr Pharm Des**, v. 25, n. 14, p. 1616-1622, 2019.

ARAÚJO-FILHO, H.G. et al. D-limonene exhibits superior antihyperalgesic effects in a  $\beta$ -Cyclodextrincomplexed form in chronic musculoskeletal pain reducing Fos protein expression on spinal cord in mice. **Neuroscience**, v.358, p.158-169, 2017.

AYUNINGTYAS, N.F. et al. Expression of VEGF and CD-31 in traumatic ulcer of diabetic *Wistar* rats after application of *Citrus limon* peel essential oil. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 13, p. 380–385, 2023.

BADEE, A.Z.M.; HELMY, S.A.; MORSY, N.F.S. Utilisation of orange peel in the production of  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202). **Food Chemistry**, v.126, p.849–854, 2011.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 4, p. 401-406, 2010.

BARROSA, D.B. et al. Antifungal activity of terpenes isolated from the Brazilian Caatinga: a review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, e. 270966, p. 1-9, 2023.

BERCZI, I.; SZENTIVANYI, A. Cytokines and chemokines. In I. Berczi & A. Szentivanyi (Eds.), **NeuroImmune Biology**, v. 3, p. 191-220: Elsevier, 2003.

BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237, 2017.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010.

BIESKI, I.G.C. et al. Potencial econômico e terapêutico dos óleos essenciais mais utilizados no Brasil. **Revista Fitos**, v. 15, n. 1, p. 125-137, 2022.

**Biolab Farmacêutica Ltda**: São Paulo – Ad-Muc [citado 2022 mar 01]. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/ad-muc/bula>.

BIZZO, H.R.; REZENDE, C.M. O Mercado de óleos essenciais no brasil e no mundo na última década. **Quim. Nova**, v. 45, n. 8, p. 949-958, 2022.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64-76, 2000.

BOONLAI, W. et al. The effect of the preservative methylparaben on the thermoresponsive gelation behavior of aqueous solutions of poloxamer 407. **Journal of Molecular Liquids**, v. 240, p. 622–629, 2017.

BRASIL. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, p. 7, 2004.

CANTÓN, R. et al. IRT and CMT  $\beta$ -lactamases and inhibitor resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. SUPPL. 1, p. 53–62, 2008.

CARVALHO, P.A.G.; PEREIRA-JÚNIOR, A.J.A.; NEGREIROS, W.A. Avaliação da dor causada pela mucosite oral em pacientes oncológicos. **Rev Dor**. v.10, n.1, p.47-50, 2009.

CASTEL, B.M.M. et al. As bases farmacológicas dos cuidados farmacêuticos: o caso dos AINEs. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 2, n. 2, p. 79-87, 2013.

CAVALCANTE, G. M. et al. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.26, p.227-234, 2011.

CAVALCANTI, J.M. et al. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **J. Ethnopharmacol**, v.144, p.240–247, 2012.

CENSI, R. et al. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 680–692, 2012.

CHARYULU, N.P. et al. Emulgel: A boon for enhanced topical drug delivery. **J Young Pharm**, v. 13, n.1, p.76-79, 2021.

CHENG, T. L. et al. Plasminogen/thrombomodulin signaling enhances VEGF expression to promote cutaneous wound healing. **Journal of Molecular Medicine**, v.96, n.12, p.1333-1344, 2018.

CHI, G. et al. Suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. **Inflammation**, v. 36, n. 2, p. 501–511, 2013.

CHIU, Y-H. et al. "Radiation-Induced swallowing dysfunction in patients with head and neck cancer: a literature review." **Journal of the Formosan Medical Association**, 2021.

CHO, K.S. et al. "Terpenes from forests and human health." **Toxicological Research**, v. 33, p. 97-106, 2017.

CIRIMINNA, R. et al. Limonene: A versatile chemical of the bioeconomy. **Chemical Communications**, v. 50, n. 97, p. 15288–15296, 2014.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Williams; Wilkins, p. 739-788, 1991.

CLEVELAND, A. A. *et al.* Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard NCCLS document M27- A3. Wayne, PA, 2008.

Code of Federal Regulations (CFR), 40, 141, 261, 268.40, Office of the federal register, national archives and records administration. US Government Printing Office, Superintendent of Documents, Washington, DC. 2018.

CORDELLA, C. et al. Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys. 1. Study of adulteration effect on honey thermal behavior. **J Agric Food Chem**; v. 203, p. 208-250, 2002.

COSTA, M.R.C. et al. Aplicação da fotobiomodulação laser em úlceras traumáticas na cavidade oral: revisão integrativa da literatura. **International Journal of Science Dentistry**, v.2, n.61, p. 145-161, 2023.

CUI, R.Z.; BRUCE, A.J.; ROGERS, R.S. Recurrent aphthous stomatitis. **Clin Dermatol**, v.34, n.4, p.475-481, 2016.

DAMY, S.B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103–111, 2010.

DANTAS, M. G. B. *et al.* Development and evaluation of stability of a gel formulation containing the monoterpene borneol. **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.

DA SILVA, M.R.; OLIVEIRA, R.G. Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do levonorgestrel através do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em células de *Drosophila melanogaster*. **Revista Perquirere**. v. 14, n.1, p. 200-217, 2017.

DASSOLER, M. et al. Perfil fitoquímico e ensaio farmacológico de *Averrhoa carambola* L. (*Oxalidaceae*). **J. Bras. Fitom**, v.2, p.4–8, 2004.

D'ALESSIO, P.A., et al. Oral administration of d-limonene controls inflammation in rat colitis and displays antiinflammatory properties as diet supplementation in humans. **Life Sciences**, n.10, p. 24-26, 2013.

D'ALESSIO, P.A., et al. Skin Repair Properties of d-Limonene and Perillyl Alcohol in Murine Models. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v.13, p.29-35, 2014.

D'ARRIGO, M. et al. *In vitro* evaluation of the activity of an essential oil from *Pistacia vera* L. variety Bronte hull against *Candida* sp. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 6, p. 1-7, 2019.

DE ALMEIDA, A.A.C. et al. Physio-pharmacological Investigations About the Anti-inflammatory and Antinociceptive Efficacy of (+)-Limonene Epoxide. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 511–522, 2017.

DE SOUZA, M. C. et al. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. **Phytomedicine**, v. 53, p. 37–42, 2019.

DJEKIC, L.; ČALIJA, B.; MEDAREVIĆ, Đ. Gelation behavior, drug solubilization capacity and release kinetics of poloxamer 407 aqueous solutions: The combined effect of copolymer, cosolvent and hydrophobic drug. **Journal of Molecular Liquids**, v. 303, p. 112639, 2020.

DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N.; Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 265-270, 2011.

DEWAN, M. et al. Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from poloxamer based ophthalmic formulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 706–710, 2015.

DO AMARAL, J.F., et al. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n. 30, p. 1217-20, 2007.

DOMARADZKA, D.; GUZIK, U.; WOJCIESZYŃSKA, D. Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. v. 14, n. 2, p. 229-239, 2015.

DOUGHARI, J.H.; BAZZA, M.J. Phytochemistry, GC-ms analysis, antioxidant and antibacterial potentials of limonene isolated from pericarp of *Citrus sinensis*. **International Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 22, 2020.

EDWARDS, R.; HARDING, K.G. Bacteria and wound healing. **Curr Opin Infect Dis**, v.17, n.2, p.91-96, 2004.

ELAD, S. et al. Topical immunomodulators for management of oral mucosal conditions, a systematic review; Part II: miscellaneous agents. **Expert opinion on emerging drugs**, [S. l.], v.16, n.1, p.183–202, 2011.

EMING, S. A.; WYNN, T. A.; MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**, v. 356, n. 6342, 1026–1030, 2017.

ENOCH, S.; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v.23, n.2, p.37-42, 2005.

ERASTO, P.; VILJOEN, A.M. Limonene - A review: biosynthetic, ecological and pharmacological relevance. **Natural Products Communications**, v.3, n.7, p.1193-1202, 2008.

FALCÃO, H. et al. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.15, p.381–391, 2005.

FARAH, C.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian Dental Journal**, v. 55, p. 48–54, jun. 2010.

FELIPE, L.O.; BICAS, J.L. Terpenos, aromas e química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERNANDES, N.D.L., et al. Lesões erosivas e ulcerativas da mucosa oral: uma revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, e20411931702, 2022.

FERRERO-MILIANI, L. et al. Inflamação crônica: Importância de NOD2 e NALP3 na geração de interleucina-1beta. **Clin. Exp. imunol.** v. 147, p.227–235, 2007.

FINFTER, O. et al. Photobiomodulation (low-level laser) therapy for immediate pain relief of persistent oral ulcers in chronic graft-versus-host disease. **SupportCareCancer**, v.29, n.8, p.4529–4534, 2021.

FITZGERALD, K. A. et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 78, 2001.

FITZPATRICK, S.G.; COHEN D.M.; CLARK, A.N. Ulcerated lesions of the oral mucosa: clinical and histologic review. **Head and Neck Pathology**, v.13, n.1, p.91-102, 2019.

FRANCE K.; VILLA, A. Acute oral lesions. **Dermatol Clin**, v. 38,4p. 41-450, 2020.

FUJISAWA, K.; MIYAMOTO, Y.; NAGAYAMA, M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 32, n. 6, p. 358–366, 2003.

GALLEGOS-FLORES, P.I. et al. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool,  $\alpha$ -terpineno y timol. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 22, p. 241–248, 2019.

GASMI, B.A. et al. Oral aphthous: pathophysiology, clinical aspects and medical treatment. **Archives of Razi Institute**, v.76, n.5, p.1155-1163, 2021.

GILMORE, T. D. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680, 2006.

GIULIANO, E. et al. Mucosal applications of poloxamer 407-based hydrogels: an overview. **Pharmaceutics**, v.10, n.3, p.159, 2018.

GOMEZ, A.; NELSON, K.E. The oral microbiome of children: development, disease, and implications beyond oral health. **Microb Ecol** 2016. Sep 14. [Epub ahead of print].

GOMES, N. M. L. et al. Fitoterapia como opção de tratamento para a mucosite oral. **Archives of Health Investigation**, v. 10, n. 1, p. 11–17, 2021.

GONZALEZ, A.C.D.O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v.91, p.614-620, 2016.

GONZÁLEZ ROMA, L. B. Ulceración por trauma crónico: una lesión simuladora. Informe de un caso clínico. **Rev. Asoc. Odontol**, v.108, n.2, p. 57-62, 2020.

GUIMARÃES, I.N.O.; ANDRADE, L.G. Atuação farmacêutica frente ao uso indiscriminado de antiinflamatórios não esteroidais (aines) por hipertensos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades**, Ciências e Educação. São Paulo, v.8, n. 4, 2022.

GUIMARÃES, M.A.; MÁZARO, T. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2004.

GUNAL, M.Y.; HEPER, A.O.; ZALOGLU, N. The effects of topical carvacrol application on wound healing process in male rats. **Pharmacogn. J**, v.6, p.10–14, 2014.

- HANSEN, J.S.; et al. Limonene and its ozone-initiated reaction products attenuate allergic lung inflammation in mice. **Journal of Immunotoxicology**, v.13, n.6, p.793-803, 2016.
- HARPER, R.S., et al. Acid-induced demineralisation of human enamel as a function of time and pH observed using X-ray and polarised light imaging. **Acta Biomater.** v. 15, n.120, p.240-248, 2021.
- HAYASHI, M. et al. Ensaio de micronúcleo de eritrócitos de roedores *in vivo*. **Mutation Research**, v. 312, p. 293–304, 1994.
- HEINRICH, P. C. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemical Journal**, v. 374(Pt 1), 2003.
- HIROTA, R. et al. Limonene inhalation reduces allergic airway inflammation in *Dermatophagoides farinae*-treated mice. **Inhalation Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 373–381, 2012.
- HOOD, K. A. et al. Peloruside A, a novel antimetabolic agent with paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity. **Cancer Research**, v. 62, n. 12, p. 3356–3360, 2002.
- HUANG, H. et al. Thermo-sensitive hydrogels for delivering biotherapeutic molecules: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 7, p. 990–999, 2019.
- HUANG, X. L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of active ingredients in the essential oils from *Gynura procumbens*, a traditional medicine and a new and popular food material. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, n. January, p. 111916, 2019.
- JONGEDIJK, E. et al. Biotechnological production of limonene in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 2927–2938, 2016.
- KAIMOTO, T.; et al. Involvement of transient receptor potential A1 channel in algescic and analgesic actions of the organic compound limonene. **European Journal of Pain**, v.20, n.7, p.1155-1165, 2016.
- KAPUGI, M.; CUNNINGHAM, K. Corticosteroids. **Orthopedic nursing**, [S. l.], v.38, n.5, p.336–339, 2019.

KARODI, R. et al. Evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Rubia cordifolia* L. (Indianmadder) in mice. **Int. J.Appl. Res. Nat. Prod**, v.2, p.12–18, 2009.

KARPINSKI, T.M. Essential oils of lamiaceae family plants as antifungals. *Biomolecules*, v. 10, n. 103, 2020.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, 2009.

KESKIN, I. et al. Effects of *Foeniculum vulgare* essential oil compounds, fenchone and limonene, on experimental wound healing, **Biotechnic & Histochemistry**, v.92, n.4, p.274-282, 2017.

KIEL, M.; ENGESESSER, K.H. The biodegradation vs. biotransformation of fluorosubstituted aromatics. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 99, n. 18, p. 7433-64, 2015.

KIM, Y.W. et al. Safety evaluation and risk assessment of d-Limonene. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.16, n.1, p.17-38, 2013.

KLEPSEK, M.E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207–1212, 1998.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. Wiley Interdiscip. **Rev. Syst. Biol. Med.**, v. 1, n. 3, p. 309-333, 2009.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert reviews in molecular medicine**, v.13, 2011.

KONG, E. F. et al. Development and *in vivo* evaluation of a novel histatin-5 bioadhesive hydrogel formulation against oral candidiasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 881-889, 2015.

KOZLOVSKY, A. et al. Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. **J Clin Periodontol**, v. 34, n.2, p.164-71, 2007.

KUMMER, R. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of *citrus latifolia Tanaka* essential oil and limonene in experimental mouse models. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

KUROIWA, Y. et al. Nano-scale and molecular-level understanding of wet-milled indomethacin/poloxamer 407 nanosuspension with TEM, suspended-state NMR, and Raman measurements. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1–2, p. 30–39, 2018.

LAMBI, J.N. et al. Synthesis, spectral properties and thermal behaviour of zinc(II) acetylsalicylate. **Thermochim Acta**, v. 398, n.1-2, p. 145-51, 2003.

LAPPAS, C.M.; LAPPAS, N.T. D-Limonene modulates T lymphocyte activity and viability. **Cellular Immunology**, v. 279, n.1, p.30-41, 2012.

LEÃO, D.A. Caracterização e avaliação da toxicidade da berberina encapsulada com poloxamer 407 em *Drosophila Melanogaster*. 2021. 86f. **Dissertação. (Mestrado em Tecnologia em Alimentos)** - Universidade Tecnológica do Paraná, Campo Mourão, 2021.

LEITE-ANDRADE, M.C. et al. Antifungal effect and inhibition of the virulence mechanism of D-Limonene against *Candida parapsilosis*. **Molecules**, v. 27, n. 8884, 2022.

LEITE, P. M.; CAMARGOS, L. M.; CASTILHO, R. O. Recent progress in phytotherapy: a brazilian perspective. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 41, p. 101270, 2020.

LEMES, R. S. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic Bactéria. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 1285- 1292, 2018.

LI, P.H.; CHIANG, B.H. Process optimization and stability of D-limonene-in water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p.192–197, 2012.

LI, W. et al. "Prevalence of dental erosion among people with gastroesophageal reflux disease in China." **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.117, n.1, p.48–54, 2017.

LI, X. et al. *In silico* prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. **Journal of chemical information and modeling**.v. 54, n. 4, p. 1061-1069, 2014.

LIMA, A.A.S.D.; GRÉGIO, A.M.T.; TANAKA, O.; MACHADO, M.Â.N.; FRANÇA, B.H.S. Tratamento das ulcerações traumáticas bucais causadas por aparelhos ortodônticos. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v.10, p.30-36, 2005.

LIMA DF, et al. Antinociceptive activity of the monoterpene alpha-phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n.2, p. 283–92, 2012.

LIU, Y. et al. Inhibitory effects of citrus lemon oil and limonene on *Streptococcus sobrinus* - Induced Dental Caries in Rats. **Archives of Oral Biology**, v. 118, p. 1-6, 2020.

LOKE, C. et al. Factors affecting intra-oral pH - a review. **Journal of oral rehabilitation**, v.43, n.10, p.778–785, 2016.

MAMEDE, L.C. et al. Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n.2, p.151-155, 2006.

MANDELBAUM, S.H. et al./ done at the Dermatology Service of the Teaching Hospital of Taubate, Dermatology course, MANDELBAUM, DI SANTIS & MANDELBAUM 393 **An bras Dermatol.** [S. l.], v. 78, n. 4, p. 393–410, 2003.

MANSANO-SCHLOSSER, T.C.; CEOLIM, M.F. Qualidade de vida de pacientes com câncer no período de quimioterapia. **Enfermagem**, v.21, n.3, p.600-607, 2012.

MARIANO, R.C. et al. Effect of topical application of chlorhexidine and metronidazole on the tissue repair of palatal wounds of rats: a clinical and histomorphometric study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.119, n.5, p.505-513, 2015.

MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: Uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 382– 387, 2007.

MATOS, J.R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacocinética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 4. p. 32-65.

MAZZO, J. S O. et al. Desenvolvimento farmacotécnico de formulações de fotoprotetores FPS 30 e avaliação da estabilidade preliminar. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 63696-63711, 2020.

MEERAN, M.F.N. et al. O limoneno pode ser um possível candidato para avaliação como agente ou adjuvante contra infecção, imunidade e inflamação no COVID-19? **Heliyon**, v. 6, e05703, 2020.

MELLO, G.D.; DANTAS, J.P.S.; BORGES, L.L. Busca in silico de moléculas com potencial antitumoral a partir da espécie *Aloysia citriodora*. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, v. 7, n. 17, 2021.

MELO et al., Cicatricial effect of *Libidibia ferrea* L. orabase formulation on traumatic ulcers oral in rats. **Concilium**, v.23, n.3, p.357-371, 2023.

MIA, M. M.; BANK, R. A. The pro-fibrotic properties of transforming growth factor on human fibroblasts are counteracted by caffeic acid by inhibiting myofibroblast formation and collagen synthesis. **Cell and Tissue Research**, v.363, n.3, p.775-789, 2016.

MIGUEL, M.G. "Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review." **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MILLAN, J.; RIDLEY, A.J.; Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodeling. **Biochem. J.**, v.385, p.329-337, 2005.

MILLSOP, J.W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487–494, jul. 2016.

MIRANDA-CADENA, K. et al. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of Oral Biology**, v. 95, p. 100–107, nov. 2018.

MITROPOULOU, G. et al. Citrus medica essential oil exhibits significant antimicrobial and antiproliferative activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 344–352, 2017.

MORAES, T. M. et al. Healing actions of essential oils from *Citrus Aurantium* and d-limonene in the Gastric Mucosa: The roles of VEGF, PCNA, and COX-2 in cell proliferation. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 12, p. 1162–1167, 2013.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050- 4063, 2009.

MOSVIN, C.V.; BUYLIN, B.A. Foundations of Laser Therapy. Triada Moskow, v.256, 2006.

MOURA, A.B.R. et al. Candidíase pseudomembranosa em crianças com idade pré-escolar: uma breve revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR**, v. 26, n. 2, p. 80–84, 2019.

MUNOZ, J.E. et al. *In Vitro* and *In Vivo* inhibitory activity of limonene against different isolates of *Candida* spp. **J. Fungi**, v. 6, n. 183, 2020.

MUTHUKUMAR, T. et al. Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing *Macrotyloma uniflorum* plant extract-*in vivo* wound healing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.121, p.178-188, 2014.

NASCIMENTO, M. H. M. et al. Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: Influence on physico-chemical properties and structural requirements for sustained drug-release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 1245–1254, 2018.

NIE, S. et al. Thermoreversible pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: *In vitro* drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 151–166, 2011.

NOMURA E.C. et al. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n.2, p.583-589, 2013.

OCDE. Diretrizes da OCDE para teste de produtos químicos. n. 19, p. 1–22, 2001

OLIVEIRA, B.V. et al. TNF-alpha expression, evaluation of collagen, and TUNEL of *Matricaria recutita* L. extract and triamcinolone on oral ulcer in diabetic rats. **J Appl Oral Sci**, v. 24, n. 3, p. 278-290, 2016.

OLIVEIRA, M. A. et al. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p.1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, M.L. et al. Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process. **J. Ethnopharmacol**, v.153, p.283–289, 2014.

OLIVEIRA, M.M.C. et al. O Uso Crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. **Revista Caderno de Medicina**, v. 2, n. 2, 2019.

OMRAN, S. M. et al. The effects of limonene and orange peel extracts on some spoilage fungi. **International Journal of Molecular and Clinical Microbiology**, v. 1, p. 82-86, 2011.

PARAMASHIVAM, S.K. et al. *In silico* pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. **Bioinformation**.v. 11, n. 2, n. 73, 2015.

PARK, H.M. et al. Limonene, a natural cyclic terpene, is an agonistic ligand for adenosine A (2A) receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 404, p. 345-348, 2011.

PAULO FILHO, W.; RIBEIRO, J.E.; PINTO, D.S. Safety and efficacy of *Eupatorium laevigatum* paste as therapy for buccal aphthae: randomized, double-blind comparison with triamcinolone 0.1% orabase. **Advances in therapy**, v.32, n.4, p.375-378, jul. 2000.

PEREIRA, G. C. et al. Avaliação da estabilidade de um xampu produzido com adição de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Teccen**. v. 13, n.1, p. 02-07, 2020.

PETERSON, D.E.; BENSADOUN, R. J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical practice guidelines. **Annals of Oncology**, v. 22, n. SUPPL. 6, p. 78–84, 2011.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of *Thapsia villosa* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* Species. **Molecules**, v. 22, p. 1-11, 2017.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, p. 1311–1320, 2013.

PIRES JUNIOR, H. B. Efeitos toxicológicos agudos de extrato de frutos verdes de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculares*) e *Artemia salina*. 2010. 70f. **Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal)** - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PORTOU, M. J. et al. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. **Vascular pharmacology**, v.71, p.31-36, 2015.

PULITO, C. et al. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 39, n. 1, p. 210, 2020.

PUSPASARI, A. et al. Effects of topical application of propolis extract on fibroblast growth factor-2 and fibroblast expression in the traumatic ulcers of diabetic *Rattus norvegicus*. **J Oral Maxillofac Pathol.**, v.22, n.1, p.54-58, 2018.

REHMAN, M.U., et al. D-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NFκB in kidneys of *Wistar* rats. **Experimental Biology and Medicine**, n.239, p. 465-476, 2014.

RENNICK, L.A. et al. Effectiveness of a novel topical powder on the treatment of traumatic oral ulcers in orthodontic patients: A randomized controlled trial. **Angle Orthod**, v.86, n.3, p.351–357, 2016.

RIBEIRO, T.E.; MARANGONI, A.F. Avaliação do efeito da fotobiomodulação em úlcera traumática em crianças: relato de caso clínico. **Revista Científica UMC**, v.5, n.1, p.1-12, 2020.

RIDIANDRIES, A.; TAN, J.; BURSILL, C.A. The role of chemokines in wound healing. **International journal of molecular sciences**, v.19, n.10, p.3217, 2018.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **European journal of clinical microbiology & infectious**

**diseases**, v. 33, n. 5, p. 673-688, 2014.

ROMERO, R.B.; ROMERO, A.L. Inibição de ciclooxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por monoterpenos: um estudo *in Silico*. **Journal of Health Sciences**. v. 16, n.4, 2015.

RUBIOLO, P. et al. "Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis." **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 282- 290, 2010.

RUFINO, A.T., et al. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of Ecaryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. **European Journal of Pharmacology**, n.750, p.141-150, 2015.

RUPP, H.; BINDER, W.H. 3D printing of core–shell capsule composites for post-reactive and damage sensing applications. **Adv. Mater. Technol.** v. 5, n. 2000509, 2020.

RUSSO, E.B. Taming THC: potencial cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v.163, n.7, p.1344-1364, 2011.

SÁ, R.C.S.; ANDRADE, L.N.; SOUSA, D.P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v.19, p.1227-1254, 2013.

SANTANA, C.P. et al. Compatibility study of dry extract of *Ximenia americana* L. and pharmaceutical excipients used in solid state. **J Therm Anal Calorim**, v. 133, p. 603–617, 2018.

SANTOS, S B.D. et al. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 356–361, jun. 2018.

SARACINO, I.M. et al. Antifungal activity of natural compounds vs. *Candida* spp.: A mixture of cinnamaldehyde and eugenol shows promising *in vitro* results. **Antibiotics**. v. 11, n. 73, 2022.

SCHEMEL-SUÁREZ, M.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.; CHIMENOS-KÜSTNER, E. Úlceras orales: diagnóstico diferencial y tratamiento. **Medicina Clínica**, [S. l.], v. 145, n. 11, p. 499–503, 2015.

SCOTTI, L. et al. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 17, n. 3, p. 2298–2315, 2012.

SHARIFI-RAD, J. et al. Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v.22, n.70, p. 1-55, 2017.

SHIVAPPA, N. et al. Design, development and evaluation of microemulgel containing econazole nitrate. **Int J Curr Res**. v.10, n.8, p.72727-72733, 2018.

SILVA, C.M. Formulação de gel termossensível mucoadesivo contendo cloridrato de pilocarpina para tratamento de xerostomia. 2017. 87f. **Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

SILVA D.C. et al. Treatment of Riga-Fede disease using laser therapy: clinical case report. **RGO**, v.65, n.1, p.87–91, 2017.

SILVA, G.A. et al. Cancer mortality in the capitals and in the interior of Brazil: a four-decade analysis. **Revista de Saúde Pública**, v. 54, n. 126, p. 1-18, 2020.

SILVA, I.C. Neutrófilos: Aspectos Clássicos, Plasticidade e Novas Funções Imunorregulatórias. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 7, n. único, p. 35-46, 2015.

SIMAS, D. L. R. et al. Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 36, n. 1, p. 15-26, 2015.

SLAUGHTER, B.V. et al. Hydrogels in Regenerative Medicine. **Adv. Mater.**, v. 21, p. 3307-3329, 2009.

SOARES, et al. Tratamento das ulcerações traumáticas bucais causadas por aparelhos ortodônticos. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, [S. l.], v.10, n.5, p.30–36, 2005.

SONIS, S.T. et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, s. 9, p. 1995-2025, 2004.

SOUSA, D.P. Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and therapeutic aspects, 1st ed.; **Nova Science Publishers**: New York, NY, USA, p. 236, 2012.

SOUSA, J.P.S. et al. Óleos vegetais como promotores de permeação cutânea em formulações tópicas e transdérmicas de anti-inflamatórios: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, e541101220308, 2021.

SPEZZIA, S. Mucosite oral em pacientes cancerosos submetidos a tratamento quimioterápico. **Revista Ciências e Odontologia**, v. 4, n. 1, p. 36–40, 2020.

SUMITRA, M. et al. Emblica officinalis exerts wound healing action through up-regulation of collagen and extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2). **Wound Rep. Regen**, v.17, p. 99–107, 2009.

SUMIWI, S.A. et al. A study to predict anti-inflammatory activity of eugenol, myristicin, and limonene of *Cinnamomum sintoc*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 12, p. 51–54, 2015.

SUN, J. D-limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259-264, 2007.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. **TLR signaling pathways**. Paper presented at the Seminars in immunology, 2004.

TANIDEH, N.; BADIE, A.; HABIBAGAH, R. Effect of topical 2 % eucalyptus extract on 5-FU -induced oral mucositis in male golden hamsters. **Brazilian Dental Journal**, v. 31, p. 310–318, 2020.

TASNEEM, S.; LIU, B.; LI, B.; CHOUDHARY, M.I.; WANG, W. Molecular pharmacology of inflammation: medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, 2018.

TATAVARTI, A.S.; HOAG, S.W. Microenvironmental pH modulation based release enhancement of a weakly basic drug from hydrophilic matrices, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 7, 2006.

THAKRAR, P.; CHAUDHRY, S.I. Oral Ulceration: An overview of diagnosis and management. **Primary dental journal**, [S. l.], v.5, n.1, p.30–33, 2016.

THAKRE, A. et al. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. **Medical Mycology**, v. 56, p. 565–578, 2018.

THEIS, N.; LERDAU, M. “The evolution of function in plant secondary metabolites.” **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. 3, p. 93–102, 2003.

TOMASSETTI, M. et al. Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures. **J Pharm Biomed Anal**, v. 37, n.5, p. 949-55, 2005.

TRANCHIDA, P.Q. et al. “Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. A review.” **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, p. 98-123, 2012.

VALE, F.A. et al. Low-level laser therapy in the treatment of recurrent aphthous ulcers: a systematic review. **Scientific World J**. v.2015:150412, 2015.

VALENTINO, A. et al. Thermo-responsive gel containing hydroxytyrosol-chitosan nanoparticles ( hyt@tgel ) counteracts the increase of osteoarthritis biomarkers in human chondrocytes. **Antioxidants**, v. 11, p. 1–17, 2022.

VALÉRIO, D.A.R. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **Eur. J. Pharmacol**, v.562, p.155–163, 2007.

VALLE, L.A. et al. Laser de baixa intensidade no tratamento de úlceras traumáticas: relato de casos. **RevAssocPaulCir Dent**, v.71, n.1, p.30-34, 2017.

VERMONDEN, T.; CENSI, R.; HENNINK, W.E. Hydrogels for Protein Delivery. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2853-2888, 2012.

VIEIRA, A. J. et al. Limonene: Aroma de inovação em saúde e doença. **Interações Químico-Biológicas**, v. 283, p. 97–106, 2018.

VILELA-GOULART, M. DAS G. et al. Homogenous amniotic membrane as a biological dressing for oral mucositis in rats: Histomorphometric analysis. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 12, p. 1163–1171, 2008.

VILLA, A.; SONIS, S. T. An update on pharmacotherapies in active development for the management of cancer regimen-associated oral mucositis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, Inglaterra, p. 1-8, 2020.

WADE, W.G. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacol Res**, v.69, n.1, p.137-43, 2013.

WANG, P. H. et al. Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v.81, n.2, p.94-101, 2018.

WANG, Y. et al. *In silico* ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly reviews of biophysics**. v. 48, n.4, p. 488-515, 2015.

WRÓBLEWSKA, M.; SZYMANSKA, E.; WINNICKA, K. The Influence of tea tree oil on antifungal activity and pharmaceutical characteristics of pluronic® f-127 gel formulations with ketoconazole. **Int. J. Mol. Sci**. v.22, n.11326, 2021.

WU, L.C. et al. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS induced inflammatory mediators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, n.7, p. 2341-2349, 2008.

WU, Y. et al. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. **Cancer letters**, v. 345, n. 2, p. 164-173, 2014.

WYNN, R.L. Aloe vera gel: update for dentistry. **General Dentistry**, v. 53, p.6-9, 2005.

XIMENES, R.M. et al. Anti-nociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. **J. Nat. Med**, v. 67, p.758–764, 2013.

YADAV, S.K. et al. Emulgel: Uma nova abordagem para melhor administração tópica de medicamentos. **Int. J. Curr. Farm. Res**.v.9, p.15–19, 2016.

YANG, L.; PANG, Y.; MOSES, H. L. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends in immunology**, v. 31, n. 6, p. 220-227, 2010.

YILMAZ, B. S.; ÖZBEK, H. Investigation of the anti-inflammatory, hypoglycemic activity and median lethal dose (LD50) level of limonene in mice and rats. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 56, n. 1, p. 85–94, 2018.

YOUSUF, M. et al. Chemical profiling, formulation development, *in vitro* evaluation and molecular docking of *Piper nigrum* Seeds Extract Loaded Emulgel for Anti-Aging. **Molecules**, v. 27, n. 5990, 2022.

ZAHI, M. R.; LIANG, H.; YUAN, Q. Improving the antimicrobial activity of D-Limonene using a novel organogel-based nanoemulsion. **Food Control**, v. 50, p. 554-559, 2015.

ZAPATA-ZAPATA, C. et al. *In vitro* activity of essential oils distilled from colombian plants against *Candida auris* and other *Candida* species with different antifungal susceptibility profiles. **Molecules**, v. 27, n. 6837, 2022.

ZHANG, X. Z. et al. Synergistic inhibitory effect of berberine and d-limonene on human gastric carcinoma cell line MGC803. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 9, p. 955–962, 2014.

ZHOU, P.R.; HUA, H.; LIU, X.S. Quantity of *Candida* colonies in saliva: a diagnostic evaluation for oral Candidiasis. **The Chinese Journal of Dental Research**, v. 20, n. 1, p. 27-32, 2017.

ZULAK, K.G.; BOHLMANN, J. "Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense." **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 86–97, 2010.



