

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES  
ABORDAGENS TECNOLÓGICAS COM VISTAS À POTENCIALIZAÇÃO  
DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DO BETA-CARIOFILENO**

PATRÍCIA WEIMER

Porto Alegre, 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES  
ABORDAGENS TECNOLÓGICAS COM VISTAS À POTENCIALIZAÇÃO  
DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DO BETA-CARIOFILENO**

Tese apresentada por Patrícia Weimer para  
obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Scherer Koester  
Coorientadora: Dra. Rochele Cassanta Rossi

Porto Alegre, 2024

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de julho de 2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andresa Heemann Betti

Universidade Feevale (Feevale)

Profa. Dra. Fernanda Poletto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Roselena Silvestri Schuh

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

#### CIP - Catalogação na Publicação

Weimer, Patrícia

Desenvolvimento e caracterização de diferentes abordagens tecnológicas com vistas à potencialização dos efeitos terapêuticos do beta-cariofileno / Patrícia Weimer. -- 2024.

241 f.

Orientadora: Letícia Scherer Koester.

Coorientadora: Rochele Cassanta Rossi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Anti-inflamatório. 2. Microagulhas. 3. Nanoemulsão. 4. Sesquiterpeno. 5. Sinergismo. I. Scherer Koester, Letícia, orient. II. Cassanta Rossi, Rochele, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606), na Central Analítica (604), no Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e nos Laboratórios de Alimentos Funcionais e Nutracêuticos e Nutrição e Cultivo Celular da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). Todos os experimentos foram realizados com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.



## AGRADECIMENTOS

Aos que me perguntam se vale a pena fazer pós-graduação, sempre visualmente preocupados com a carreira profissional e conhecimentos que podem ser aprimorados, gosto de responder que é uma ótima oportunidade para uma jornada de autoconhecimento. Nessa jornada, não podemos prever o futuro, muito menos os momentos de reviravoltas e, aos que leem essas palavras agora, esses momentos podem ser velhos conhecidos. Ao mesmo tempo que a imprevisibilidade gera desconforto, a impermanência pode trazer um alento, afinal “nada é fixo, nem permanente”. Também gosto de ter em mente que a ciência é feita por pessoas e em instituições, das mais diversas, mas todas são permeáveis por questões individuais, coletivas e muitas vezes políticas. A construção da ciência é complexa, assim como a vida e nos cercar de pessoas que possam nos auxiliar nessa jornada, seja diretamente com alguma ferramenta, seja na esfera social, nossa jornada pode se tornar valiosa e juntos podemos lapidar nosso autoconhecimento e construir muitos pesquisadores.

Após muitos momentos de reviravoltas, pessoais, de calamidade pública e até mesmo ambiental, gostaria de agradecer.

À minha orientadora, Letícia Scherer Koester, pela confiança depositada em meu trabalho, por demonstrar que as coisas podem ser vistas de outra perspectiva e por ter topado em construir uma nova linha de pesquisa a partir de ideias que pareciam um tanto longe de serem empregadas.

À minha coorientadora, Rochele Cassanta Rossi, por ter me inserido na pesquisa acadêmica nos primórdios da minha graduação. Por ter me mostrado lampejos de luz em momentos em que tudo parecia difícil. Torço por sua recuperação.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico e aos que passaram por ele nesses últimos 6 anos de convivência, por demonstrarem que um lugar pode ter significados diferentes ao longo do tempo e nos reinventar faz parte. Assim como, acreditar no nosso potencial e acreditar que podemos fazer a diferença, mesmo que pareça uma gotinha na imensidão.

Em especial, gostaria de agradecer à minha amiga Nathalya Tesch Brazil, e partir daqui talvez falem palavras no vocabulário. Muito obrigada pela parceria, pelos

momentos de escuta, pelas palavras, às vezes, agridoces, mas necessárias e sempre dentro da comunicação não violenta. Tenho orgulho do nosso crescimento nessa jornada e dos nossos ajustes de rotas. Muito obrigada por todas as risadas, pelas viagens acadêmicas, pelos rolês em bazares, pelos doces com chá, afinal somos jovens senhoras pesquisadoras. E não posso deixar de mencionar, obrigada por me mostrar que podemos aproveitar os momentos de felicidade, mesmo que confusos por dentro, pois o momento presente é agora.

À Renata Fagundes, carinhosamente apelidada como minha coach de carreira, obrigada pelas conversas, às vezes, compostas de poucas frases, mas certeiras e sensatas. Fico contente em ter me aproximado de ti ao longo desses anos. Obrigada pelas gargalhadas características e por ver diversão nas minhas piadas.

Às minhas alunas de iniciação científica, Ketly, Isabella e Karen, pelo auxílio, pelas gargalhadas e por me mostrarem que posso contribuir para formação de pesquisadores.

À Geice Michele Pereira, profissional incrível e que cruzou meu caminho durante essa fase da vida. Obrigada por todo auxílio, pelo suporte nessa jornada, por me ensinar que comparações externas não são justas e que ganhamos muito mais quando reconhecemos e valorizamos nosso crescimento.

Aos meus amigos, em especial, Josué Guilherme e Graziela Lock, pelo suporte, pelos passeios e por mostrarem que a vida pode ser muito rica de coisas simples.

Por fim, agradeço à minha família, pelo apoio, por reforçarem meu valor e o valor do meu esforço. Ao meu pai por me ensinar que para tudo dar-se-á um jeito e pode ser aproveitando os recursos com um olhar criativo. À minha mãe que sempre demonstrou que desistir não é uma opção, nem sempre será como planejamos, mas que na busca da felicidade, cair fará parte, mas levantar é mais importante ainda. À minha irmã, que me entende pelo olhar, obrigada por me mostrar que a gente sabe a resposta, o que nos faz bem e devemos priorizar isso para não fugir de nós mesmos. À minha sobrinha, por me relembrar a alegria da descoberta. Ao meu amorzinho de quatro patas, Baunilha, por me alegrar, me confortar, demonstrar que o amor do cuidado é essencial na vida e que parar atividades cansativas para brincar recarregam as energias em poucos minutos.

*“O medo de errar faz com que você viva  
de acordo com as expectativas dos  
outros.”*

Carpinejar



## RESUMO

O sesquiterpeno bicíclico,  $\beta$ -cariofileno, tem se destacado como objeto de pesquisa devido à sua ação multialvo, marcada por notória atividade anti-inflamatória e ação agonista no sistema endocanabinoide. Contudo, em virtude da sua lipofilia e baixa biodisponibilidade, sua administração por formas farmacêuticas convencionais não atinge a total potencialidade terapêutica que este composto pode conferir ao paciente. Para contornar essas características intrínsecas da molécula e possibilitar concentrações ideais nos sítios e receptores alvo, abordagens tecnológicas podem ser aplicadas. Nesta temática, surge a proposta desta tese de doutorado com o objetivo de desenvolver e caracterizar abordagens tecnológicas, visando à potencialização dos efeitos terapêuticos do  $\beta$ -cariofileno. Sua execução se divide em dois capítulos principais. No primeiro capítulo foi avaliado o possível efeito sinérgico anti-inflamatório entre o  $\beta$ -cariofileno e um anti-inflamatório não esteroide (AINE) veiculados em sistemas nanoemulsionados para posterior aplicação tópica. Para tal, foram conduzidos estudos *in vitro* e *in vivo* para compreender o efeito de interação entre o  $\beta$ -cariofileno e indometacina. Os resultados obtidos sugerem potencialização do efeito anti-inflamatório *in vitro* do  $\beta$ -cariofileno veiculado em nanoemulsão, bem como, efeito sinérgico em associação com a indometacina. No entanto, ao espessar as nanoemulsões com hidroxiethylcelulose e mensurar o efeito pelo modelo *in vivo* de edema de orelha induzido por óleo de cróton (camundongos CF-1, n=6/grupo), os resultados foram inconclusivos. Por conseguinte, os respectivos resultados podem estar associados às diferentes proporções entre  $\beta$ -cariofileno e indometacina aplicadas nos modelos *in vitro* e *in vivo*, à interferência da rede polimérica de hidroxietilcelulose e a fatores específicos do modelo animal aplicado. Conforme exposto, o  $\beta$ -cariofileno apresenta ação multialvo, portanto, o segundo capítulo desta tese compreendeu o desenvolvimento de uma microagulha polimérica integrada com nanoemulsão, almejando a entrega transdérmica deste composto. O racional de desenvolvimento foi fundamentado em uma abordagem sistemática suportada por ferramentas de *Quality by Design*. A otimização da formulação integrada almejou composição que conferisse características mecânicas compatíveis com a inserção cutânea, sem ruptura das agulhas, dissolução após a inserção e maior valor de

doseamento após o processo de micromoldagem. Apesar da relativa volatilidade e lipofilia do  $\beta$ -cariofileno que impactam na elaboração de microagulhas poliméricas hidrossolúveis, a integração com sistema nanoemulsionado, a adequação da concentração de polímeros, o controle de proporções de associação do  $\beta$ -cariofileno, bem como o controle de variáveis críticas de processo, demonstraram ser possível a obtenção de um sistema integrado que favorecesse a liberação transdérmica. Em suma, os efeitos terapêuticos do  $\beta$ -cariofileno podem ser potencializados com o emprego de estratégias tecnológicas, estimulando sua aplicação farmacológica.

**Palavras-chave:** Anti-inflamatório; Microagulhas; Nanoemulsão; Sesquiterpeno; Sinergismo.

## ABSTRACT

The bicyclic sesquiterpene,  $\beta$ -caryophyllene, has been highlighted as an object of research due to its multitargeted action, marked by notorious anti-inflammatory activity and agonist action in the endocannabinoid system. However, because of its lipophilicity and low bioavailability, its administration by conventional pharmaceutical forms does not reach the full therapeutic potential. To circumvent these intrinsic characteristics of this molecule and enable optimal concentrations in the target sites and receptors, technological approaches can be applied. In this thematic, the proposal of this doctoral thesis arises with the objective of developing and characterizing technological approaches, aiming at potentiating the therapeutic effects of  $\beta$ -caryophyllene. Its execution is divided into two main chapters. In the first one, the possible synergistic anti-inflammatory effect among  $\beta$ -caryophyllene and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) carried in topical nanoemulsion systems was evaluated. To this end, *in vitro* and *in vivo* studies were conducted to understand the interaction effect between  $\beta$ -caryophyllene and indomethacin. The results obtained suggest potentiation of the *in vitro* anti-inflammatory effect of  $\beta$ -caryophyllene conveyed in nanoemulsion, as well as synergistic effect in association with indomethacin. However, the thickening the nanoemulsions with hydroxyethylcellulose followed by *in vivo* evaluation (ear edema model induced by croton oil; CF-1 mice, n=6/group), displayed inconclusive results. Therefore, the respective results may be associated with the different ratios between  $\beta$ -caryophyllene and indomethacin applied in *in vitro* and *in vivo* studies and with specific factors of the applied animal model. As exposed,  $\beta$ -caryophyllene presents multitarget action, therefore, the second chapter of this thesis comprised the development of a polymeric microneedle integrated with a nanoemulsion for transdermal delivery. The development rationale was based on a systematic approach supported by Quality by Design tools. The optimization of the integrated formulation aimed for a composition that would confer mechanical characteristics compatible with skin insertion, without needle breakage, dissolution after insertion and greater  $\beta$ -caryophyllene content value after the micromolding process. Despite the slight volatility and lipophilicity of  $\beta$ -caryophyllene, which impact on the development of water-soluble polymeric

microneedles, we can say that the integration with a nanoemulsion system, optimization of polymer concentration, control of  $\beta$ -caryophyllene association proportions, as well as control of critical process variables, made it possible to obtain an integrated system that favors transdermal release. In short, the therapeutic effects of  $\beta$ -caryophyllene can be enhanced through the use of technological strategies, stimulating its pharmacological use.

**Keywords:** Anti-inflammatory; Microneedles; Nanoemulsion; Sesquiterpene; Synergism.

## LISTA DE FIGURAS

### *INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA*

---

**Figura 1** – Alvos terapêuticos do  $\beta$ -cariofileno em processos inflamatórios e nociceptivos.....**40**

**Figura 2** – Distribuição dos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2) no organismo humano, com detalhamento para as estruturas cutâneas. A diferença na proporcionalidade entre os círculos dos receptores indicam a predominância de determinado receptor no local indicado.....**43**

**Figura 3** – Tipos de microagulhas para administração de fármacos ou substâncias.....**54**

**Figura 4** - Fluxograma das principais etapas do desenvolvimento da microagulha polimérica em associação com sistema nanoestruturado.....**57**

### *CAPÍTULO 1 – ARTIGO EXPERIMENTAL*

---

**Graphical abstract**..... **67**

**Figure 1** – Chemical structures of  $\beta$ -caryophyllene (a) and indomethacin (b)..... **69**

**Figure 2** – Inhibition of nitric oxide production by exposure of LPS-stimulated RAW 264.7 cell to free  $\beta$ -caryophyllene (**A**), free indomethacin (**B**), and combined doses of  $\beta$ -caryophyllene and indomethacin at a fixed ratio of 32:1 (**C**). Percentages of cell viability after 24 h of exposure to  $\beta$ -caryophyllene (**D**), free indomethacin (**E**), and combined doses of  $\beta$ -caryophyllene and indomethacin (**F**)..... **72**

**Figure 3** – Inhibition of nitric oxide production by exposure of LPS-stimulated RAW 264.7 cell to nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, Ncar (**A**), nanoemulsified indomethacin, Nind (**B**), and combined doses of Ncar-Nind at a fixed ratio of 50:1 (**C**). Percentages of cell viability after 24 h of exposure to nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, Ncar (**D**),

nanoemulsified indomethacin, Nind (**E**), and combined doses of Ncar-Nind (**F**)..... 72

**Figure 4** – Isobolograms of the association of free  $\beta$ -caryophyllene with free indomethacin (**A**); association of nanoemulsified substances (**B**). Fraction affected set at 0.5. Fa – fraction affected; CI – combination index. CI <1.0 synergistic effect..... 73

**Figure 5** – Cell viability of HaCaT cells after 24 h exposure to free  $\beta$ -caryophyllene (**A**), free indomethacin (**B**), combined doses of  $\beta$ -caryophyllene and indomethacin at a fixed ratio of 32:1 (**C**), nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, Ncar (**D**); nanoemulsified indomethacin, Nind (**E**), and combined doses of Ncar-Nind at a fixed ratio of 50:1 (**F**)..... 74

**Figure 6** – Cell viability of MRC-5 cells after 24 h exposure to free  $\beta$ -caryophyllene (**A**), free indomethacin (**B**), combined doses of  $\beta$ -caryophyllene and indomethacin at a fixed ratio of 32:1 (**C**), nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, Ncar (**D**); nanoemulsified indomethacin, Nind (**E**), and combined doses of Ncar-Nind at a fixed ratio of 50:1 (**F**)..... 74

**Figure 7** - Images of HET-CAM assay after 5 min exposure (n=6/group): (**A**) 0.1 M NaOH (IS  $13.38 \pm 0.15$ ); (**B**) 1.0% w/v Sodium lauryl sulfate (IS  $7.71 \pm 1.33$ ); (**C**) 0.9% w/v NaCl (IS 0.00); (**D**) Medium chain triglycerides, MCT (IS 0.00); (**E**) 20% w/w free  $\beta$ -caryophyllene in MCT (IS 0.00); (**F**) 1.0 mg/mL free indomethacin in MCT (IS 0.00); (**G**) 20% w/w  $\beta$ -caryophyllene and 1.0 mg/mL indomethacin in MCT (IS 0.00); (**H**) Blank nanoemulsion (IS 0.00); (**I**) Ncar (IS 0.00); (**J**) Nind (IS 0.00); (**K**) Ncar-Nind (IS 0.00).....75

**Figure S1** - Data from *in vitro* anti-inflammatory effect generated by CompuSyn software (version 1.0). Dose-response curves for free  $\beta$ -caryophyllene and indomethacin and its association (**A**) and for nanoemulsified substances (**B**), doses expressed in  $\mu$ g/mL. Median-effect plot for free (**C**) and nanoemulsified (**D**) substances.

Experimental logarithmic combination index for the association of free (E) and nanoemulsified substances (F).....	80
---	----

## ***CAPÍTULO 1 – SHORT COMMUNICATION***

---

<b>Graphical abstract</b> .....	<b>83</b>
---------------------------------	-----------

<b>Figure S1</b> - Characterization of nanoemulgels. Caryophyllene content (A); Indomethacin content (B); Droplet size (C); Polydispersity index (D); Zeta potential (E).....	<b>97</b>
---	-----------

<b>Figure S2</b> – Results of <i>in vivo</i> antin-inflammatory assay evaluated by croton oil-induced ear edema in mice (n = 6/group). All data were expressed as mean ± SD. Results expressed as edema mass (mg) per group (A) and optical density/biopsy per group from myeloperoxidase assay (B).....	<b>98</b>
--	-----------

<b>Figure S3</b> - Hematoxylin-eosin (H&E) staining of mouse ears sections after croton oil-induced edema. Photomicrographs examined under digital microscope. Groups: (A) Left ear (without induced edema); (B) Acetone – negative control; (C) Dexamethasone – positive control; (D) Blank nanoemulgel - BN; (E) β-caryophyllene; (F) Nanoemulgel of β-caryophyllene - Ncar; (G) Indomethacin; (H) Nanoemulgel of indomethacin – Nind; (I) mixture of β-caryophyllene and indomethacin; (J) Nanoemulgel of β-caryophyllene and indomethacin – Ncar-ind; (K) Nanoemulgel of β-caryophyllene and indomethacin – Ncar-ind/2, prepared at half the concentration contained in Ncar-ind.....	<b>99</b>
---	-----------

## ***CAPÍTULO 2 – ARTIGO DE REVISÃO***

---

<b>Figure 1</b> – Flowchart of the included studies. MN: microneedles.....	<b>110</b>
--	------------

<b>Figure 2</b> - Characteristics of the included studies. (A) Number of articles by year of publication; (B) Number of articles by country of origin, in detail United Kingdom and	
---	--

Portugal; (C) Delivery category; (D) Objective of the proof of concept.....111

**Figure 3** - General characteristics of the developed microneedles. (A) Polymers employed in the devices; (B) Type of nanostructured system associated in the microarray patch; (C) Graphic representation of the method of obtaining microneedles by micromolding.....112

**Figure 4** – Dot plot of the tests employed to analyze polymeric MNs in association with nanostructured systems (A) microscopy characterization, complementary physical and physicochemical characterization (FTIR, TGA, DSC, and XRD), mechanical properties, and *in vitro* assays. (B) *In vivo* assays concerning skin insertion, skin release/permeation/deposition, and in situ dissolution.....114

**Figure 5** - Graphic representation of the *in vitro* assays performed for the characterization of polymeric microneedles associated with nanostructured systems. (A) Mechanical properties, (B) Skin insertion, (C) Release and dissolution assays, (D) Skin permeation/deposition assay.....119

**Figure 6** - General parameters of *in vitro* permeation assay by number of studies (A); Characteristics of the stability tests by category (B) and comparative graph of the analysis of the nanostructured systems before and after insertion into the polymeric matrix of the microneedle (C).....123

**Figure S1** - Characterization tests of nanostructured systems prior to inclusion into the polymeric matrix of the microneedle by number of studies included in the review.....145

**Figure S2** - Characterization tests of MN device by number of studies included in the review.....146

**Figure S3** - General parameters of *in vivo* skin insertion assay (A), *in vivo* skin dissolution assay (B), and in vivo skin release/permeation/distribution assay (C) by number of studies.....147

## CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO EXPERIMENTAL

---

**Graphical abstract.....152**

**Figure 1** – Ishikawa diagram for manufacturing process of a dissolving microneedle integrated with nanoemulsion of  $\beta$ -caryophyllene indicating critical parameters.....**169**

**Figure 2** – Pareto chart plots of  $2^4$  Full Factorial Design for (A)  $\beta$ -caryophyllene content and (B) compression force; The horizontal bars beyond the dotted line represent statistically significant input factors by linear or interaction terms ( $p < 0.05$ ). Main effects plots of  $2^4$  Full Factorial Design for (C)  $\beta$ -caryophyllene content and (D) compression force.....**175**

**Figure 3** – Contour plots of Box–Behnken Design showing effects on  $\beta$ -caryophyllene content: (A)  $\beta$ -caryophyllene:polymer ratio (car:polymer ratio) versus polymer solids (% w/w); (B) PVP:PVA ratio versus polymer solids (% w/w); (C)  $\beta$ -caryophyllene:polymer ratio (car:polymer ratio) versus PVP:PVA ratio. Contour plot of optimized condition (D). The white region of the graph indicates the design space in which the  $\beta$ -caryophyllene content can be obtained above 90% with PVP:PVA ratio fixed at 1.54.....**176**

**Figure 4** - Transmission electron microscopy of (A)  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsion, (B)  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsion integrated into the polymeric matrix before the micromolding process, and (C, D) nanodrops of  $\beta$ -caryophyllene after dissolution of the microneedles array. Samples diluted at 1:20 v/v in water .....**180**

**Figure 5** – Macroscopic appearance of the dissolving microneedles integrated with  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsion after optimization by Box–Behnken Design (A). Digital microscopies of (B) microcavities of the mold filled with formulation, (C) perforated Parafilm<sup>®</sup> layers after in vitro skin insertion test (32.0 N application force), (D) porcine ear skin before and after perforation with microneedle array.....**179**

**Figure 6** - Scanning electron microscopy of (A - D) blank microneedles, needles composed of PVP 40 kDa and PVA 9-10 kDa in concentration equivalent to the optimized formulation, (E - H) formulation optimized by Box–Behnken Design, needles composed of PVP 40 kDa and PVA 9-10 kDa in association with nanoemulsion  $\beta$ -caryophyllene. The green markings indicate the dimensions of the needles generated at 10.0 kV and 150 $\times$  magnification (EVO MA10). X-ray microcomputed tomography (X $\mu$ CT) of formulation optimized by Box–Behnken Design (I, J).....**180**

**Figure 7** - Data from the stability study of the optimized microneedle array stored in aluminum sachets. (A)  $\beta$ -caryophyllene content, (B) compression force, (C) in vitro skin insertion efficiency, (D) variation mass of the MN arrays.....**182**

**Figure S1** - Rheograms of polymeric dispersions composed of PVP 40 kDa : PVA 9-10 kDa at different combination ratios. (A) 20.0% w/w; (B) 30.0% w/w; (C) 40.0% w/w; (D) 50.0% w/w; (E) optimized formulation intermediate.....**193**

**Figure S2** - Macroscopic appearance by resting time of the formulations produced with PVP:PVA ratio of 1.0 for the full factorial design. The formulations are arranged from left to right in the following order: 20.0% w/w polymer blend with 3.0% w/w of nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, 20.0% w/w polymer blend with 15.0% w/w of nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, 40.0% w/w polymer blend with 3.0% w/w of nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, and 40.0% w/w polymer blend with 15.0% w/w of nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene. (A) initial time; (B) 30 min; (C) 1 h; (D) 2 h; (E) 4 h; (F) 6 h resting time. The white arrows indicate phase separation.....**194**

**Figure S3** - Macroscopic appearance by resting time of the formulations produced with PVP:PVA ratio of 2.5 for the full factorial design. The formulations are arranged from left to right in the following order: 20.0% w/w polymer blend with 3.0% w/w of nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, 20.0% w/w polymer blend with 15.0% w/w of nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, 40.0% w/w polymer blend with 3.0% w/w of nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene, and 40.0% w/w polymer blend with 15.0% w/w of

nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene. (A) initial time; (B) 30 min; (C) 1 h; (D) 2 h; (E) 4 h; (F) 6 h resting time. The white arrows indicate phase separation.....**195**

**Figure S4** - Residual plots of  $2^4$  Full Factorial Design for (A)  $\beta$ -caryophyllene content and (B) compression force. Residual plots of Box–Behnken Design for (C)  $\beta$ -caryophyllene contente.....**196**



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### *INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA*

---

**Quadro 1** – Esquema programático dos capítulos da tese de doutorado.....**36**

**Tabela 1** – Principais modelos de inflamação aguda in vivo empregados para avaliação de substâncias e formulações por via tópica.....**51**

**Tabela 2** – Elementos e ferramentas do *Quality by Design* aplicados ao desenvolvimento farmacêutico.....**59**

### *CAPÍTULO 1 – ARTIGO EXPERIMENTAL*

---

**Table 1** - Percentage composition (% w/w) of nanoemulsions .....**69**

**Table 2** - Physicochemical parameters of nanoemulsions .....**71**

### *CAPÍTULO 1 – SHORT COMMUNICATION*

---

**Table S1** - Percentage composition (% w/w) of nanoemulgels.....**96**

### *CAPÍTULO 2 – ARTIGO DE REVISÃO*

---

**Table 1** - Parameters of the tests used to characterize the mechanical properties of microneedles in association with nanostructured systems.....**116**

**Table 2** - *In vitro* skin insertion assay parameters.....**117**

**Table 3** - *In vitro* dissolution and release assays parameters.....**121**

**Table S1** - Detailed search strategy applied to PubMed, Embase, and Web of Science databases.....**139**

**Table S2** – Description of the assays applied to evaluate external stimuli in the release and therapeutic effect of nanostructured systems associated with dissolving microneedles .....**141**

## ***CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO EXPERIMENTAL***

---

**Table 1** - Identification of Quality Target Product Profile (QTPP) and Critical Quality Attributes (CQAs) for the dissolving microneedle integrated with  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsion and for the pharmaceutical formulation intermediates.....**165**

**Table 2** - Risk estimation matrix (REM) raising qualitative risks for the critical quality attributes (CQAs) against critical material attributes (CMAs) for a dissolving microneedle integrated with  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsion and its pharmaceutical formulation intermediate.....**170**

**Table 3** - Risk estimation matrix (REM) raising qualitative risks for the critical quality attributes (CQAs) against critical process parameters (CPPs) for a dissolving microneedle integrated with  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsion and its pharmaceutical formulation intermediate.....**172**

**Table S1** - Randomized experimental matrix for  $2^4$  Full Factorial Design.....**191**

**Table S2** - Randomized experimental matrix for Box–Behnken Design ( $3^3$ ).....**192**

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>25</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
1.1 OBJETIVOS .....	37
1.1.1 Objetivo Geral .....	37
1.1.2 Objetivos Específicos .....	37
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>39</b>
2.1 BETA-CARIOFILENO E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS .....	39
2.1.1 Efeitos Terapêuticos: Ação Anti-inflamatória e Analgésica .....	40
2.1.2 Sistema Endocanabinoide e sua Função na Modulação da Dor e Inflamação .....	42
2.1.3 Desafios na Formulação de Formas Farmacêuticas para Liberação de $\beta$ -cariofileno .....	45
2.2 POTENCIALIZAÇÃO DE EFEITO FARMACOLÓGICO .....	46
2.2.1 Associação de Substâncias para Obtenção de Efeito Sinérgico .....	46
2.2.1.1 Princípios de Métodos para Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da Atividade Anti-inflamatória .....	48
2.2.2 Sistemas Nanoemulsionados .....	52
2.2.3 Microagulhas Dissolvíveis .....	53
2.2.3.1 Integração de Sistemas Nanoestruturados e Microagulhas Dissolvíveis .....	56
2.3 <i>QUALITY BY DESIGN</i> NO DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO .....	57
<b>CAPÍTULO 1   AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO SINÉRGICO ENTRE B-CARIOFILENO E INDOMETACINA VEICULADOS EM SISTEMAS NANOEMULSIONADOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA</b> .....	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 2   PROTOTIPAGEM DE MICROAGULHAS DISSOLVÍVEIS EM ASSOCIAÇÃO COM SISTEMAS NANOEMULSIONADOS PARA LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE B-CARIOFILENO</b> .....	<b>81</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO</b> .....	<b>197</b>
<b>4 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>199</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>207</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>209</b>
<b>APÊNDICE A – DESCRIÇÃO DO RECONHECIMENTO DO ARTIGO DE REVISÃO PELO PATH CENTER OF EXCELLENCE FOR MICROARRAY PATCH TECHNOLOGY .....</b>	<b>221</b>
<b>APÊNDICE B - PARTICIPAÇÃO NO EDITAL CATALISA - ICT.....</b>	<b>223</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PROJETO N° 40087.....</b>	<b>235</b>
<b>ANEXO B – ADENDO AO PROJETO N° 40087 .....</b>	<b>237</b>
<b>ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PROJETO N° 39482 .....</b>	<b>239</b>
<b>ANEXO D – ADENDO AO PROJETO N° 39482.....</b>	<b>241</b>

Esta tese de doutorado foi conduzida entre março de 2020 e julho de 2024. Devido às restrições sanitárias impostas pela pandemia de SARS-CoV-2, declarada pela Organização Mundial da Saúde entre 11 de março de 2023 e 05 de maio de 2023, especialmente nos primeiros dezoito meses, e mediante a postura de cautela adotada pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o desenvolvimento desta tese se concentrou no domínio teórico dos conteúdos e na elaboração de uma revisão de escopo. Em paralelo, o aperfeiçoamento de habilidades, reconhecimento e capacitações oportunistas a partir deste trabalho são explorados nos Apêndices A e B. Portanto, a ordem de apresentação dos artigos e manuscritos neste documento difere da ordem cronológica de desenvolvimento.

Esta tese de doutorado está estruturada em uma parte introdutória, dois capítulos principais, e seções gerais, incluindo discussão geral e conclusões. Os conteúdos estão organizados da seguinte forma:

## **INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

A parte introdutória e fundamentação teórica compreendem a contextualização dos assuntos abordados na construção da Tese de Doutorado no âmbito do desenvolvimento e caracterização de abordagens tecnológicas com vistas à potencialização dos efeitos terapêuticos do  $\beta$ -cariofileno.

### **CAPÍTULO 1 | Avaliação do potencial efeito sinérgico entre $\beta$ -cariofileno e indometacina veiculados em sistemas nanoemulsionados para administração tópica cutânea**

---

Neste capítulo foi explorada a potencialização do efeito anti-inflamatório do  $\beta$ -cariofileno pelo emprego de nanotecnologia e associação com o anti-inflamatório não-esteróide, indometacina. Foram conduzidos ensaios *in vitro* e *in vivo*,

acompanhados de modelos gráficos e, quando aplicável, modelos matemáticos para caracterização do efeito sinérgico entre esses compostos. A produção gerada foi publicada em formato de artigo experimental e *short communication* em periódicos de impacto internacional.

## **CAPÍTULO 2** | Prototipagem de microagulhas dissolvíveis em associação com sistema nanoemulsionado para liberação transdérmica de $\beta$ -cariofileno

---

A temática de desenvolvimento explorada no segundo capítulo compreendeu a aplicação de nanotecnologia integrada em microagulhas dissolvíveis para liberação transdérmica do  $\beta$ -cariofileno, possibilitando a potencialização dos seus efeitos por obtenção de *drug delivery* superior à via tópica estudada anteriormente (Capítulo 1 e estudos prévios do grupo de pesquisa).

A produção gerada no capítulo 2 foi publicada em formato de revisão de escopo e os resultados experimentais, baseados na abordagem *Quality by Design*, foram organizados no formato de manuscrito experimental.

Por se tratar de um sistema recente para liberação de fármacos e, conseqüentemente, carecer de guias orientativos internacionais para sua caracterização, o primeiro passo do desenvolvimento compreendeu a elaboração de uma revisão de escopo sobre os métodos e técnicas aplicados no controle de qualidade desses sistemas. A respectiva revisão recebeu o reconhecimento pela PATH (*Center of Excellence for Microarray Patch Technology*) – organização internacional de desenvolvedores de microagulhas, como uma das principais revisões na temática de microagulhas. Detalhes desse reconhecimento são descritos no Apêndice A.

Outra oportunidade ímpar proporcionada pelo pilar inovador deste capítulo é detalhada no Apêndice B. Este apêndice compreende uma descrição narrativa das atividades realizadas durante a participação no edital Catalisa ICT – etapa 1 Mobilizar para Inovar (2021) promovido pelo SEBRAE, com o projeto intitulado

“Desenvolvimento de dispositivo transdérmico para administração de compostos terpênicos nanoestruturados no tratamento de dor inflamatória crônica”.

## **DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO**

---

A fim de compilar os dados obtidos, a discussão geral apresenta detalhamentos dos resultados experimentais não abordados e correlações entre os capítulos, com base nas aplicações terapêuticas e tecnológicas do  $\beta$ -cariofileno em associação ou não com indometacina, para administração por via tópica cutânea e transdérmica.



## **INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---



## 1 INTRODUÇÃO

O sesquiterpeno bicíclico  $\beta$ -cariofileno é um composto bioativo, volátil e amplamente distribuído no reino vegetal por diversas plantas aromáticas. São exemplos dessas espécies a erva baleeira (*Cordea verbenacea* DC), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), cânhamo (*Cannabis sativa*), copaiba (*Copaifera* spp.) e orégano (*Origanum vulgare*) (GERTSCH et al., 2008; RODRIGUES et al., 2012; SHARMA et al., 2016). Por meio de processos de extração torna-se possível a obtenção deste composto na sua forma isolada a partir das espécies vegetais mencionadas. Contudo, quando se almeja o uso industrial e a sua veiculação em formas farmacêuticas, esta quantidade pode ser ínfima. Ao longo dos anos e devido ao melhoramento dos processos químicos, sua síntese por mecanismos sustentáveis tornou-se possível. As inúmeras atividades biológicas relacionadas a este composto, somadas a sua disponibilidade em grandes quantidades, indicam e impulsionam a sua aplicabilidade farmacológica (IZUMI et al., 2012; MEZA; LEHMANN, 2018; SHARMA, C et al., 2016).

Entre todas as propriedades farmacológicas do  $\beta$ -cariofileno as mais promissoras consistem na atividade anti-inflamatória e analgésica, visto que a inflamação e a dor são caracterizadas como processos presentes em diferentes patologias (SHARMA, C et al., 2016). Desta forma, formulações contendo  $\beta$ -cariofileno apresentam aplicabilidade em diferentes sistemas do organismo humano. Em termos de alvos terapêuticos, o  $\beta$ -cariofileno é capaz de formar ligações aos receptores canabinoides do tipo 2 (CB2), opioides do tipo  $\mu$ , receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPRA- $\alpha$  e PPRA- $\gamma$ ) e receptores do tipo Toll. Por este motivo, este composto é considerado multialvo e tem sido explorado na área científica para o tratamento de diferentes patologias e sintomas. Além disso, já foi evidenciada a redução de mediadores inflamatórios, como as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), bem como redução da atividade da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), pelo  $\beta$ -cariofileno (GERTSCH et al., 2008; KLAUKE et al., 2014; OJHA et al., 2016; SHARMA et al., 2016). Portanto, o que torna este composto anti-inflamatório distinto de substâncias anti-inflamatórias não esteróides (AINES), usualmente prescritas na

prática clínica, é a sua ação agonista nos receptores CB2 e redução de um dos principais sinais cardinais e impossibilitantes da inflamação, a dor.

Substâncias exógenas e que possuem atividade sobre receptores CB2 têm despertado o interesse da comunidade científica. Os receptores CB2 foram identificados nas células do sistema imunológico, ossos, sistema nervoso periférico, baço, fígado e menos expressos em outros órgãos e tecidos do organismo (BURSTEIN; ZURIER, 2009; KUPCZYK; REICH; SZEPIETOWSKI, 2009; RÍO *et al.*, 2018; SARPIETRO *et al.*, 2015; TÓTH *et al.*, 2019).

Considerando o disposto, o  $\beta$ -cariofileno é um composto com promissora atividade anti-inflamatória, porém algumas características físico-químicas dificultam a sua administração e seu alcance em sítios ativos em concentrações eficazes, tais como lipofilia e um certo grau de volatilidade. Diante disso, torna-se necessário o estudo e desenvolvimento de alternativas tecnológicas que possam potencializar a ação do  $\beta$ -cariofileno. Por exemplo, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa evidenciaram o aumento da permeação cutânea, atividade anti-inflamatória e cicatrizante do  $\beta$ -cariofileno quando veiculado em nanoemulgeis de uso tópico (PETERLE *et al.*, 2020; WEIMER *et al.*, 2020).

Além disso, quando se objetiva a potencialização de um efeito farmacológico, outras abordagens podem ser contempladas no processo de desenvolvimento de medicamentos. Neste sentido, podem ser exploradas associações de substâncias que apresentam uma atividade farmacológica em comum e que, quando combinadas, aumentam a eficácia terapêutica (CHOU, 2006). A associação de um AINE, por exemplo, ao  $\beta$ -cariofileno pode conferir um aumento da atividade anti-inflamatória. A potencialização de efeito, também denominada de efeito sinérgico, pode ser mensurada através de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, com posterior aplicação de modelos gráficos e matemáticos, como o método isoblográfico associado ao cálculo do índice de combinação, por exemplo (CHOU, 2006; TALLARIDA, 2006, 2000, 2002).

Ademais, pressupondo a ampla distribuição dos receptores CB2 nas células do sistema imunológico e atuação de substâncias endógenas nesses receptores para o manejo da dor, o  $\beta$ -cariofileno indica potencial farmacológico em outras patologias inflamatórias crônicas. No Brasil, aproximadamente 37% da população brasileira (70

milhões de pessoas) é acometida pela dor crônica, sendo mais prevalente na região Sul (42%). De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor crônica é definida como dor persistente ou recorrente por um período de três meses ou mais e é um processo multifatorial, com envolvimento de fatores biológicos, psicológicos e sociais (IASP, 2021; TREEDE *et al.*, 2019). Entre as dores mais prevalentes destacam-se as dores de origem nociceptiva, principalmente na região lombar e articulações (CARVALHO *et al.*, 2018; SBED, 2019).

Ao propor o  $\beta$ -cariofileno como potencial substância no manejo da dor crônica, é importante considerar a via de administração mais promissora. Dados farmacocinéticos indicam a baixa biodisponibilidade do  $\beta$ -cariofileno por via oral (LIU *et al.*, 2013). Alternativamente à via oral, a via transdérmica exhibe vantagens como liberação controlada do fármaco na corrente sanguínea, elimina o efeito de primeira passagem hepático e degradação enzimática da substância, permitindo a presença de concentrações mais elevadas do fármaco no sítio alvo. Por meio de combinações de métodos físicos, químicos e sistemas nanotecnológicos, a permeação cutânea e absorção do fármaco pode ser potencializada (BANGA, 2011; ESCOBAR-CHÁVEZ, 2010). Portanto, a combinação de  $\beta$ -cariofileno veiculado em nanossistema, contendo promotores de permeação, e impregnação em sistema físico, facilitarão a absorção deste composto ativo. Microagulhas constituem sistemas físicos que poderiam ser explorados nesse contexto.

As microagulhas (*microneedles*) são dispositivos para liberação transdérmica relativamente recentes (HAO *et al.*, 2017; RZHEVSKIY *et al.*, 2018). Estas podem ser elaboradas em diferentes designs e polímeros. Entre os modelos existentes, há microagulhas sólidas, ocas, revestidas, dissolvíveis e formadoras de hidrogel, sendo que os dois últimos são mais promissores para aplicação, pois oportunizam o emprego de polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e reduzem o risco das microagulhas quebrarem na pele do paciente (HAO *et al.*, 2017; LEE; PARK; PRAUSNITZ, 2008). As microagulhas podem servir de suporte para administração de sistemas nanotecnológicos e em casos de dor inflamatória crônica, a combinação desses sistemas

contribuiriam para a liberação controlada do fármaco e diminuição da dor, preponderando a qualidade de vida do paciente.

Para investigar a potencialização dos efeitos terapêuticos do  $\beta$ -cariofileno, esta tese de doutorado está organizada em dois capítulos principais. O Quadro 1 apresenta informações referentes ao objetivo central de cada capítulo, a via de administração explorada para cada efeito farmacológico, as estratégias e sistemas tecnológicos desenvolvidos, assim como, o racional de desenvolvimento e principais modelos empregados para avaliação e produção científica gerada.

Quadro 1 – Esquema programático dos capítulos da tese de doutorado

Objeto de estudo	<b><math>\beta</math>-cariofileno</b>	
	CAPÍTULO 1	CAPÍTULO 2
Objetivo central	Avaliar a potencialização do efeito anti-inflamatório	Desenvolver e caracterizar um protótipo inovador, empregando o conceito de microagulhas poliméricas integradas com nanoemulsão
Estratégias e abordagens tecnológicas	1   Veiculação do $\beta$ -cariofileno em sistemas nanoemulsionados 2   Associação com indometacina (AINE)	1   Veiculação do $\beta$ -cariofileno em sistema nanoemulsionado 2   Integração da nanoemulsão com microagulhas poliméricas
Via de administração pretendida   sistema de liberação	Tópica (cutânea)   gradiente de liberação a partir do estrato córneo	Transdérmica   ruptura da pele e liberação direta na epiderme/derme
Sistemas desenvolvidos	Nanoemulsões e nanoemulsões espessadas em hidrogel	Microagulha polimérica integrada com sistema nanoemulsionado
Racional de desenvolvimento	Abordagem tradicional	Abordagem sistemática com emprego de ferramentas de <i>Quality by Design</i>
Modelos de avaliação	1   <i>In vitro</i> : macrófagos murinos estimulados por LPS seguido da simulação computacional para determinação de sinergismo	1   Caracterização físico-química, mecânica e morfológica das estruturas 2   Liberação transdérmica e retenção cutânea <i>in vitro</i>

Produção	2  <i>In vivo</i> : edema de orelha induzido por óleo de cróton	
	- Artigo experimental (1) - <i>Short Communication</i> (1)	- Revisão de escopo (1) - Manuscrito experimental (1)

AINE: anti-inflamatório não-esteróide; LPS: lipopolissacarídeo.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar sistemas de administração tópica e transdérmica de  $\beta$ -cariofileno com emprego de sistemas nanoemulsionados integrados ou não em microagulhas poliméricas, visando a potencialização de seus efeitos terapêuticos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver e caracterizar sistemas nanoemulsionados para aplicação tópica (cutânea) de  $\beta$ -cariofileno e indometacina;
- b) Mensurar o efeito da associação de  $\beta$ -cariofileno e indometacina na forma livre e nanoemulsionada por modelo de inflamação *in vitro* com macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS), seguido da aplicação de método isolobológico e cálculo do índice de combinação;
- c) Conduzir estudo preliminar de toxicidade cutânea das nanoemulsões de  $\beta$ -cariofileno e indometacina pelo método alternativo de Hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM) e cultivo celular 2D;
- d) Avaliar a ação anti-inflamatória tópica e possível efeito sinérgico de  $\beta$ -cariofileno e indometacina, veiculados em nanoemulgéis, por modelo *in vivo* de edema de orelha induzido por óleo de cróton.
- e) Realizar revisão de escopo no âmbito de métodos de controle de qualidade aplicáveis à microagulhas poliméricas desenvolvidas em associação com sistemas nanoestruturados;

- f) Desenvolver e caracterizar nanoemulsões e outros sistemas nanoestruturados de  $\beta$ -cariofileno para posterior veiculação em dispositivo transdérmico;
- g) Empregar os conceitos de *Quality by Design* no desenvolvimento de microagulhas dissolvíveis contendo sistemas nanoemulsionados;
- h) Avaliar o emprego de diferentes moldes na obtenção de microagulhas dissolvíveis;
- i) Desenvolver e caracterizar um dispositivo para liberação transdérmica de  $\beta$ -cariofileno, pela associação de métodos físicos (microagulhas) e sistema nanoestruturado.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este tópico apresenta embasamentos teóricos sobre os principais tópicos que foram abordados ao longo desta tese.

### 2.1 BETA-CARIOFILENO E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

O  $\beta$ -cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico, de massa molecular 204,36 g/mol e fórmula  $C_{15}H_{24}$ . Este composto pode ser identificado em óleos essenciais de diferentes espécies vegetais, tais como cânhamo (*Cannabis sativa*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (GERTSCH *et al.*, 2008; PubChem CID: 5281515 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2012; SHARMA, C *et al.*, 2016). A esta substância são atribuídas diferentes propriedades terapêuticas como anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária, analgésica e mais recentemente tem-se avaliado seus benefícios no tratamento de sepse, isquemia cerebral, diabetes mellitus e doença de Alzheimer, tendo em vista seu potencial anti-inflamatório e imunomodulador (CHANG *et al.*, 2013; CHENG; DONG; LIU, 2014; FRANCOMANO *et al.*, 2019; IZUMI *et al.*, 2012; MEZA; LEHMANN, 2018; SHARMA, C *et al.*, 2016; SOTTO *et al.*, 2010).

A biossíntese do  $\beta$ -cariofileno ocorre pela rota do ácido mevalônico. Inicialmente ocorre a formação de unidades de isopreno ( $C_5$ ), seguida da condensação dessas unidades até a obtenção de difosfato de farnesila ( $C_{15}$ ), composto precursor dos sesquiterpenoides por ação de enzimas ciclossintases (BOHLMANN; MEYER-GAUEN; CROTEAU, 1998). O  $\beta$ -cariofileno ao sofrer oxidação, dá origem ao óxido de cariofileno, portanto, a presença simultânea de ambos nos óleos essenciais ou fração volátil de oleorresinas é recorrente. Ademais, é possível obter o  $\beta$ -cariofileno por via sintética com alto grau de pureza, facilitando sua aplicação em escala industrial (LARIONOV; COREY, 2008).

### 2.1.1 Efeitos Terapêuticos: Ação Anti-inflamatória e Analgésica

As ações anti-inflamatória e analgésica exercidas pelo  $\beta$ -cariofileno são classificadas como multialvo, tendo em vista os diferentes alvos terapêuticos envolvidos (SCANDIFFIO *et al.*, 2020; SHARMA, C *et al.*, 2016). A Figura 1 descreve parcialmente os alvos terapêuticos do  $\beta$ -cariofileno em termos de receptores, enzimas, citocinas e quimiocinas. Na prática, não há como dissociar a ação anti-inflamatória da ação analgésica, no entanto uma ação poderá ser favorecida em detrimento da outra pelo quadro clínico apresentado, bem como, pela forma e via de administração. Neste contexto, a compreensão da fisiopatologia possibilita a escolha racional dos modelos pré-clínicos empregados durante o desenvolvimento tecnológico de novas alternativas terapêuticas. Igualmente, os aspectos fisiopatológicos também podem direcionar ajustes nos processos de dissolução e liberação para maior efetividade terapêutica (PATEL; GOWDA, 2012).

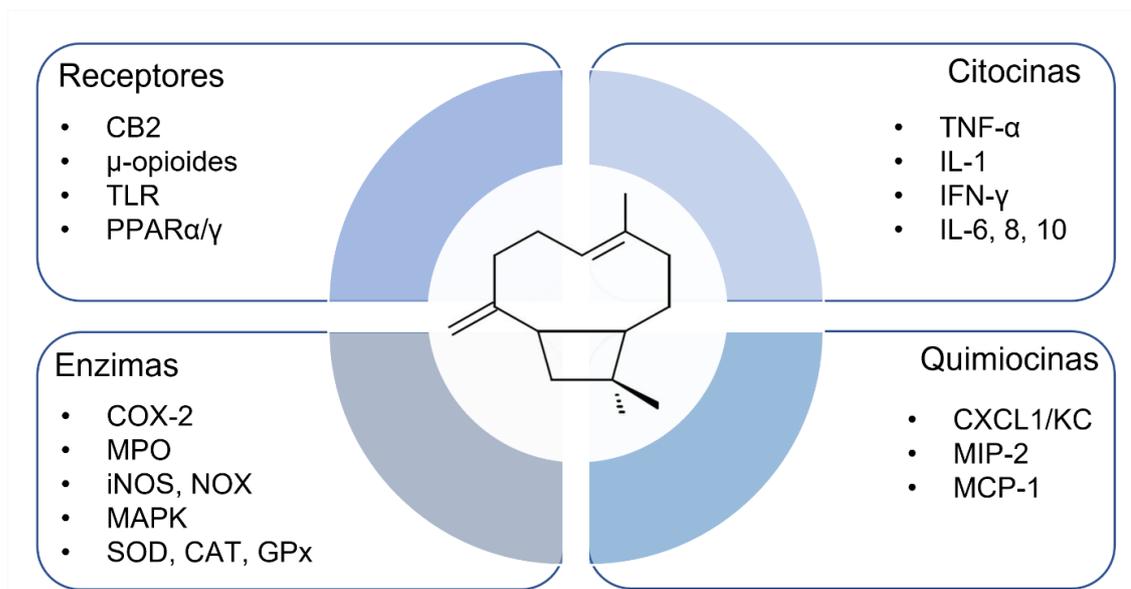


Figura 1 – Alvos terapêuticos do  $\beta$ -cariofileno em processos inflamatórios e nociceptivos. CB2: canabinoides do tipo 2; TLR: receptores do tipo Toll; PPAR: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; COX-2: ciclo-oxigenase 2; MPO: mieloperoxidase; iNOS: óxido nítrico-sintase induzida; NOX: NADPH oxidase; MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógeno; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutaciona peroxidase; TNF: fator de necrose tumoral; IL: interleucina; IFN: interferon; CXCL1/KC: proteína quimioatraente de queratinócitos e fibroblastos; MPI: proteína inflamatória de macrófagos; MCP: proteína quimioatraente de monócitos.

Fonte: Adaptado de SHARMA, C *et al.*, (2016)

Conforme apresentado na Figura 1, há um maior número de alvos terapêuticos relacionados aos processos inflamatórios. Entre estes, a inibição de alguns mediadores está mais associada à imunidade inata e processos inflamatórios agudos (ciclo-oxigenase 2, mieloperoxidase, catalase e citocinas), enquanto a ativação de receptores PPAR $\alpha/\gamma$  e inibição de determinadas enzimas estão associadas aos processos inflamatórios crônicos em quadros de síndrome metabólica, dislipidemias, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (BARTIKOVA *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2013; OJHA *et al.*, 2016; SCANDIFFIO *et al.*, 2020).

Em relação à ação analgésica, os principais alvos envolvidos são os receptores endocanabinoide do tipo 2 (CB2) e receptores opioides do tipo  $\mu$  (KLAUKE *et al.*, 2014; SHARMA, C *et al.*, 2016). No entanto, muitos processos inflamatórios resultam em dor nociceptiva e neuropática, portanto, a ação nos alvos terapêuticos anti-inflamatórios pode contribuir, de forma secundária, para redução da dor. Para ilustrar, uma das doenças que apresenta a dor como fator limitante acompanhada de quadro inflamatório é a osteoartrite (OA).

Também conhecida por artrose, a OA é uma doença multifatorial com desenvolvimento gradual e progressivo que causa alterações inflamatórias nas articulações (mãos, quadris e joelhos), causando inchaço, rigidez, dor crônica e limitações de movimento (CDC, 2020; COIMBRA; PLAPLER; DE CAMPOS, 2019). No Brasil, estima-se que a OA corresponde de 30 a 40% das doenças reumatológicas e nos Estados Unidos, projeções indicam que até 2040, 78 milhões de americanos serão diagnosticados e terão sua qualidade de vida afetada pela artrite (CDC, 2018; SBR, 2019). O tratamento farmacológico objetiva majoritariamente a redução da dor para melhora da qualidade de vida do paciente, sendo prescritos AINES, opioides (para os estágios mais graves) e corticoides por via oral (COIMBRA; PLAPLER; DE CAMPOS, 2019).

Até o momento, o  $\beta$ -cariofileno de forma isolada foi parcamente explorado como candidato a fármaco no manejo da dor crônica associada a OA. Em modelo de artrite induzida por anticorpo de colágeno, a administração oral de 10 mg/kg de  $\beta$ -cariofileno

em camundongos, por 12 dias, foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório na articulação e alterações histológicas (IRRERA *et al.*, 2019).

Neste contexto, considerando a necessidade de novas alternativas terapêuticas para quadros clínicos complexos, como o exemplo abordado sobre OA, o  $\beta$ -cariofileno pode ser explorado como uma alternativa terapêutica. Em comparação aos outros sistemas e receptores explorados no tratamento do dor aguda ou crônica, o sistema endocanabinoide é mais recente. Os primeiros estudos publicados sobre relação estrutura-atividade de substâncias endógenas e exógenas em receptores endocanabinoides datam do final da década de 1990 (KHANOLKAR; MAKRIYANNIS, 1999; PALMER; KHANOLKAR; MAKRIYANNIS, 2000). Ademais, ao verificar as publicações com o descritor “*endocannabinoid system*” nas principais bases de dados da área da saúde, é possível observar um número crescente de estudos a partir de 2005. Atualmente, o sistema endocanabinoide é considerado como o centro da investigação e desenvolvimento de medicamentos para manejo da dor, imunomodulação, neuroproteção e tratamento de distúrbios neurológicos.

### **2.1.2 Sistema Endocanabinoide e sua Função na Modulação da Dor e Inflamação**

O sistema endocanabinoide é associado aos processos de aprendizado, memória, resposta imunológica, neuroproteção, ingestão e percepção da dor (RÍO *et al.*, 2018). Tais funções biológicas estão correlacionadas às ligações de substâncias endógenas e exógenas em dois receptores, denominados de receptores canabinoides do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2). Estes receptores fazem parte da família de receptores transmembrana acoplados à proteína G e se distribuem de maneira distinta no organismo humano, conforme representação esquemática na Figura 2. Os receptores CB1 são expressos majoritariamente no sistema nervoso central, enquanto os receptores CB2 apresentam distribuição ampla pelos tecidos periféricos e sistema imunológico (AN *et al.*, 2020; CATERINA, 2014).

A ligação de substâncias nos receptores CB1 pode resultar em efeitos psicotrópicos ou efeitos psiquiátricos deletérios secundários (AN *et al.*, 2020). Por outro lado, tais efeitos não foram reportados em relação aos receptores CB2. Ademais, a

ligação de agonistas em CB2 auxilia na imunomodulação, evidenciada pela migração celular e liberação de citocinas, bem como, por modificações nos processos de neuroinflamação e nocicepção (BURSTEIN; ZURIER, 2009). Com base nessas premissas, a busca por agonistas seletivos de receptores CB2 constituem o objetivo central dos atuais estudos sobre esse sistema.

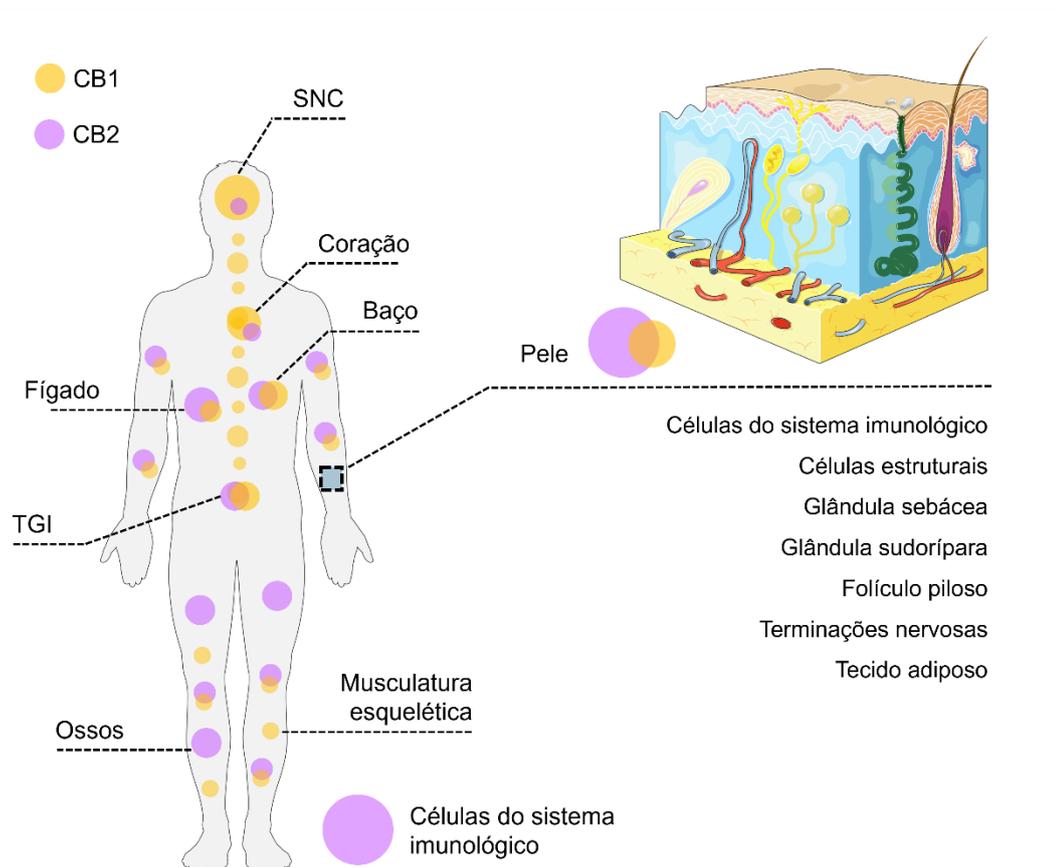


Figura 2 – Distribuição dos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2) no organismo humano, com detalhamento para as estruturas cutâneas. A diferença na proporcionalidade entre os círculos dos receptores indica a predominância de determinado receptor no local indicado.

Figura criada com o Servier Medical ART - SMART.

Na pele, por exemplo, os receptores CB2 estão presentes nas membranas celulares dos queratinócitos, células imunológicas (dendrítica, linfócito, neutrófilo, macrófago e mastócito), associados ao apêndices (sebócitos e folículo piloso) e aos neurônios sensoriais (RÍO *et al.*, 2018; TÓTH *et al.*, 2019). Quando ocorre um dano físico, químico ou biológico na pele, há liberação de ácido araquidônico por lesão nas

membranas celulares, conforme mencionado anteriormente, além da ativação de COX-2 e LOX-5, tendo-se a formação de dois endocanabinoides. A partir da molécula de ácido araquidônico a enzima fosfolipase D sintetiza o endocanabinoide anandamina (N-araquidonoil etanolamina) e a enzima diacilglicerol lipase sintetiza o 2-araquidonoil glicerol (RÍO *et al.*, 2018). Estes dois endocanabinoides foram isolados pela primeira vez em 1992 e ao se ligarem aos receptores CB2 aumentam o limiar da dor (DEVANE *et al.*, 1992; RÍO *et al.*, 2018).

Recentemente, estudos têm demonstrado modificações na expressão dos receptores CB2 mediante quadros inflamatórios, lesões nervosas, ansiedade e epilepsia, evidenciada principalmente pelo aumento da expressão em neurônios e na micróglia. A micróglia são células imunológicas do sistema nervoso responsáveis pelo monitoramento de ameaças e liberação de mediadores pró-inflamatórios, de forma similar aos leucócitos na circulação sanguínea. Uma vez que a micróglia é ativada por estímulos inflamatórios e lesões, a presença de receptores CB2 desperta para a hipótese de que agonistas CB2 possam modular esse cenário e gerar um fenótipo anti-inflamatório em quadros de dor crônica, modulando o circuito de transmissão nociceptiva (XU *et al.*, 2023).

A revisão conduzida por Donvito e colaboradores (2018), destacou o papel do sistema endocanabinóide na imunomodulação em modelos de dor inflamatória aguda e crônica. Em um estudo realizado com antagonistas de receptores CB2 (SR144528) e CB1 (rimonabante) foi observada a reversão da supressão das citocinas pró-inflamatórias INF- $\gamma$  e IL-12, destacando a importância desses receptores na nocicepção associada à inflamação. Em quadros de artrite reumatoide, já foram identificados os receptores CB1 e CB2 em sinoviócitos tipo fibroblastos isolados de pacientes. Ademais, foi identificada a expressão de CB2 no tecido sinovial desses pacientes, especialmente em macrófagos, linfócitos T-CD4<sup>+</sup>, T-CD8<sup>+</sup> e em linfócitos B. A presença dos endocanabinóides anandamina e 2-araquidonoil glicerol no fluido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide e ausência dos mesmos em pacientes saudáveis, levantou a hipótese da imunomodulação via CB2 nesses quadros clínicos de dor inflamatória crônica (DONVITO *et al.*, 2018).

O  $\beta$ -cariofileno é definido como um composto fitocanabinoide por ser encontrado em espécies vegetais e desempenhar ação agonista seletiva aos receptores CB2 (GERTSCH *et al.*, 2008). Neste contexto e considerando a distribuição dos receptores CB2, formas farmacêuticas de liberação tópica cutânea e transdérmica do  $\beta$ -cariofileno podem favorecer a sua ação nociceptiva e anti-inflamatória. Ainda, em quadros clínicos de dor crônica, como o exemplo da osteoartrite, as formulações e possíveis dispositivos transdérmicos podem ser administrados próximo ao local da dor (articulações).

### **2.1.3 Desafios na Formulação de Formas Farmacêuticas para Liberação de $\beta$ -cariofileno**

Considerando o disposto nas seções anteriores, o  $\beta$ -cariofileno é um composto com promissora atividade anti-inflamatória e analgésica, porém algumas características físico-químicas dificultam a sua administração por via oral, como a lipofilia ( $\text{Log}P$  4,4), e principalmente seu alcance em sítios ativos em concentrações eficazes (NCBI, 2022).

Um estudo conduzido com 24 indivíduos saudáveis (entre 18 e 50 anos) avaliou os parâmetros farmacocinéticos do  $\beta$ -cariofileno após a administração oral de 100 mg deste composto na sua forma livre. A quantificação deste composto no plasma dos indivíduos resultou em valores de área sob a curva de  $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$  260,7  $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$  305,9  $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $T_{\text{máx}}$  3,07 h). Em contrapartida, a administração da mesma dose de  $\beta$ -cariofileno associado a um sistema autoemulsificante (SEDDS) resultou em  $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$  549,5  $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$  553,4  $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $T_{\text{máx}}$  1,43 h) (MÖDINGER *et al.*, 2022).

De forma similar, estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram o favorecimento da permeação cutânea do  $\beta$ -cariofileno após veiculação em sistemas nanoemulsionados (PETERLE *et al.*, 2020; WEIMER *et al.*, 2022). Ou seja, as limitações físico-químicas desse sesquiterpeno podem ser contornadas com o emprego de alternativas tecnológicas, assim como, potencialização do efeito farmacológico pela administração próxima aos receptores CB2 e células do sistema imunológico.

## 2.2 POTENCIALIZAÇÃO DE EFEITO FARMACOLÓGICO

A potencialização de efeito farmacológico visa aumentar a eficácia terapêutica sem impactar de forma negativa no perfil de segurança. Para tal, diferentes estratégias podem ser avaliadas, tais como associação de substâncias, realização de modificações estruturais para maior afinidade aos receptores e alvos moleculares, e estratégias tecnológicas que buscam aumentar a biodisponibilidade. As próximas subseções descrevem as estratégias que foram exploradas nos capítulos experimentais dessa Tese de doutorado, abrangendo a associação de um anti-inflamatório não-esteróide com o  $\beta$ -cariofileno, veiculação em sistemas nanoemulsionados, bem como, integração desses sistemas com microagulhas dissolvíveis.

### 2.2.1 Associação de Substâncias para Obtenção de Efeito Sinérgico

As associações entre substâncias podem culminar na obtenção de efeitos farmacológicos do tipo aditivo, subaditivo ou sinérgico (CHOU, 2006). O efeito aditivo não apresenta potencialização do efeito, ou seja, a associação de duas substâncias resultará na soma de seus efeitos isolados. Por exemplo, uma substância (A) possui efeito de 40%, em determinada dose, e outra (B) possui 30%, se associadas estas produzirão efeito próximo a 70%. Na interação antagônica ou subaditiva, a associação de duas substâncias apresentará efeito inferior ao esperado, por exemplo,  $(A) + (B) = 50\%$ . Já o efeito sinérgico ocorre quando as substâncias em associação exercem efeito superior à soma, como exemplo,  $(A) + (B) = 95\%$  (CHOU, 2006; TALLARIDA, 2001, 2002).

Tendo em vista a gama e as intensidades de interações farmacológicas que podem ser obtidas, é recomendável a verificação do efeito combinatório por modelos matemáticos, como método isoblográfico e cálculo do índice de combinação. Em prática, o sinergismo de ação pode ser mensurado com o emprego de modelos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos. Independente da natureza do modelo, algumas etapas metodológicas devem ser conduzidas (CHOU, 2006; TALLARIDA, 2006, 2000, 2002):

- Elaboração de curvas dose-resposta das substâncias isoladas (determinação do efeito de cada substância);
- Definição das doses/concentrações das substâncias em associação;
- Determinação do efeito da associação;
- Emprego de modelos matemáticos para determinação do efeito.

Usualmente, a partir das curvas dose-resposta das substâncias isoladas são obtidos os valores de ED<sub>50</sub> e, posteriormente, são definidas as razões de combinação e as faixas de concentrações da associação. Na literatura científica são comumente reportadas as combinações entre ED<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub>/2, ED<sub>50</sub>/4, ED<sub>50</sub>/8 e ED<sub>50</sub>/16 de cada substância nas associações (MIRANDA *et al.*, 2006; MIRANDA; PINARDI, 2009; ORTIZ *et al.*, 2010; TALLARIDA *et al.*, 1999). Por exemplo, se pela aplicação de modelo *in vivo* forem encontrados os valores de ED<sub>50</sub> para as substâncias A e B, 100 µg/kg e 80 µg/kg, respectivamente, essas substâncias serão combinadas a 100 µg/kg + 80 µg/kg (ED<sub>50</sub> A + ED<sub>50</sub> B), 50 µg/kg + 40 µg/kg (ED<sub>50</sub> A/2 + ED<sub>50</sub> B/2) e assim sucessivamente. Após, se determinará o valor de ED<sub>50</sub> resultante da combinação (exemplo ED<sub>50</sub> A+B = 30 µg/kg). Por fim, pelo método isobolográfico e cálculo do índice de interação (Eq. 01) será evidenciada a obtenção de efeito sinérgico (TALLARIDA, 2001, 2002, 2006).

Eq. (01)

$$\gamma = \frac{a}{A} + \frac{b}{B} \quad (\text{TALLARIDA, 2002})$$

Onde: A (ED<sub>50</sub> da substância A isolada); B (ED<sub>50</sub> da substância B isolada); a, b (dose da combinação que produz o mesmo efeito).

O índice de interação indica a magnitude do efeito, sendo que, se  $\gamma = 1$ , o efeito observado é aditivo,  $\gamma > 1$ , efeito subaditivo ou antagônico e  $\gamma < 1$ , efeito supra-aditivo ou sinérgico (TALLARIDA, 2002). Para o exemplo anterior, ED<sub>50</sub> A+B seria composto por 16,7 µg/kg da substância A e 13,3 µg/kg da substância B. Desta forma, o índice de

interação resultante seria 0,33, indicando efeito sinérgico para a faixa de concentração e proporções aplicadas. Neste cenário, a aplicação de *softwares* para análise de sinergismo entre substâncias possibilitam uma compreensão aprimorada dos efeitos da associação em diferentes níveis por meio de extrapolações matemáticas (CHOU; MARTIN, 2005).

Em relação ao  $\beta$ -cariofileno, a associação com um anti-inflamatório não esteroide (AINE) pode conferir um aumento da atividade anti-inflamatória. Importante considerar que os AINES, em sua maioria, são substâncias ligeiramente lipofílicas. A indometacina, por exemplo, apresenta coeficiente de partição  $\text{Log}P$  de 4,3, valor semelhante ao  $\beta$ -cariofileno, que possui  $\text{Log}P$  de 4,4 (PubChem CID: 3715 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019; PubChem CID: 52815152019). Desta forma, a semelhança do caráter lipofílico é indicativa da capacidade de associação da indometacina com o  $\beta$ -cariofileno.

Se avaliado pelo ponto de vista de mecanismo de ação, a indometacina atua na inibição da cascata do ácido araquidônico, especialmente na inibição da enzima COX-2. Desta forma, este fármaco atuará de forma complementar ao  $\beta$ -cariofileno, potencializando o efeito anti-inflamatório. Seus efeitos estão bem estabelecidos na literatura científica e assim como o  $\beta$ -cariofileno, apresenta baixa permeação cutânea. Diferentes estudos já comprovaram que sua veiculação em sistemas transdérmicos ou na presença de carreadores lipídicos, sua permeação cutânea é aumentada. Outra vantagem da aplicação tópica desta substância é a minimização dos efeitos colaterais, em comparação à sua administração por via oral (EL-LEITHY; IBRAHIM; SOROUR, 2015; MIKULAK; VANGSNESS; NIMNI, 1998; SHAKEEL *et al.*, 2010).

#### 2.2.1.1 Princípios de Métodos para Avaliação *in vitro* e *in vivo* da Atividade Anti-inflamatória

Para a avaliação do efeito anti-inflamatório *in vitro* são empregados majoritariamente métodos de cultivo celular. A exemplo, cultivo celular de macrófagos murinos linhagem Raw 264.7 seguido da estimulação por lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. A presença de LPS no microambiente celular promove a estimulação dos

macrófagos evidenciada pela liberação de mediadores inflamatórios, como perfil de interleucinas pró-inflamatórias e liberação de óxido nítrico. Esses sinalizadores ocasionam o crescimento acelerado das células, quando comparado aos controles sem LPS. Em prática, existem algumas variações dos protocolos experimentais acerca da origem bacteriana do LPS e concentrações empregadas de LPS e células (YOON *et al.*, 2009). No entanto, algumas generalizações podem ser definidas na execução do protocolo, como o desenho experimental básico composto por quatro etapas, sendo elas:

- Dia 1: cultivo celular dos macrófagos em placas apropriadas (por exemplo, 96 poços);
- Dia 2: troca de meio de cultivo e adição do agente estimulante, LPS;
- Dia 3: adição dos tratamentos e grupos controle;
- Dia 4: Finalização do experimento e avaliação da produção de mediadores inflamatórios (NO e perfil de interleucinas, se desejável) e citotoxicidade celular.

Conforme o protocolo exposto, esse modelo é apropriado para simulação de quadros de inflamação aguda. Importante ressaltar que as limitações desse ensaio se fundamentam nas limitações usuais dos ensaios com cultivo celular 2D, tais como, interações celulares reduzidas em comparação ao cultivo 3D, ausência de matriz extracelular, restrição da solubilidade e aplicação de cossolvente citotóxicos, presença de apenas uma linhagem celular. No entanto, esse ensaio é apontado como uma ferramenta de *screening* útil para definição de concentrações dos ativos, otimização da composição de formulações e a citotoxicidade dos cossolventes pode ser reduzida ou compreendida pela análise paralela de grupos controle. E, ao se tratar de substâncias desconhecidas ou aquelas com informações escassas na literatura, este ensaio possibilita a elucidação inicial de mecanismos de ação por análises do perfil de citocinas e interleucinas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou citometria de fluxo.

A quantificação de óxido nítrico pode ser facilmente conduzida por técnicas espectrofotométricas, baseada na reação desse mediador com reagente de Griess. Esse reagente é composto por sulfanilamida (amina aromática) e por dicloridrato de N-(1-

naftil)-etilenodiamina. Inicialmente, os ânions nitrito oriundos da resposta inflamatória dos macrófagos reagem com a sulfanilamida, formando um sal diazônico, em meio ácido. Após, esse sal se liga ao reagente de acoplamento, dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, formando um diazo composto de coloração rósea, o qual pode ser facilmente mensurado por espectrofotometria (GREEN *et al.*, 1982; JOUNG *et al.*, 2012). A obtenção de coloração amarelada indica a presença de baixas concentrações de óxido nítrico no meio reacional, decorrentes da inibição do processo inflamatório pelos tratamentos ou da morte celular (citotoxicidade). Neste sentido, é necessário avaliar em conjunto os resultados da produção de NO e citotoxicidade (por exemplo, por ensaio de MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide), uma vez que os macrófagos são essenciais para as defesas do organismo, uma substância anti-inflamatória de interesse é aquela que reduz a ação anti-inflamatória, mas não ocasiona morte celular de forma expressiva.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* pela técnica de MTT se fundamenta na viabilidade mitocondrial para redução do sal de MTT (coloração amarela) em cristais de formazan (coloração roxa) insolúveis em meio aquoso e mediada pela enzima desidrogenase mitocondrial. Ou seja, células com dano mitocondrial não conseguem realizar essa conversão. Os cristais formados podem ser facilmente solubilizados com dimetilsufóxido e a intensidade de coloração pode ser mensurada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

No que tange os modelos *in vivo* para avaliação de atividade anti-inflamatória, estes apresentam uma maior gama de possibilidades, pela aplicação de diferentes espécies de animais, diferentes agentes indutores de processos inflamatórios e mimetização da inflamação associada a quadros patológicos distintos, por exemplo, doenças respiratórias e doenças articulares. As limitações desses modelos correspondem à capacidade de translação dos resultados obtidos para humanos. No entanto, os modelos *in vivo* apresentam vantagens em relação aos modelos *in vitro* por permitirem a avaliação de diferentes desfechos (perfil de mediadores inflamatórios teciduais e plasmáticos, análise histológica, nocicepção, análise de comportamento, toxicidade sistêmica, entre outros) e avaliação da interação de diferentes componentes da resposta

inflamatória (sistema do complemento, componentes celulares, imunidade inata e adaptativa, entre outros).

Ao longo do desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos, os modelos *in vivo* foram fundamentais para a compreensão de mecanismos de ação e *screening* de eficácia e segurança. Quando o objetivo do desenvolvimento é a avaliação da eficácia por via tópica, os modelos mais comumente empregados podem ser classificados em modelo de edema de orelha e modelo de edema de pata. A Tabela 1 apresenta as principais diferenças entre os modelos. Comparativamente, o modelo com maior tempo de protocolo é o edema de orelha induzido pela aplicação de óleo de cróton. Desta forma, ao se tratar de formulações projetadas com sistemas de liberação como nanoemulsões ou nanoemulsões espessadas em hidrogel, sugere-se que por este modelo o platô do processo inflamatório se sobrepõe ao tempo necessário para liberação da substância ativa.

Tabela 1 – Principais modelos de inflamação aguda *in vivo* empregados para avaliação de substâncias e formulações por via tópica

<b>Modelo</b>	<b>Agente flogístico e via de administração</b>	<b>Tempo total médio do protocolo</b>	<b>Referência</b>
	Histamina, via subcutânea	2 h	(GÁBOR, 2000)
	Ácido araquidônico, via tópica	1 h	(CRUMMEY <i>et al.</i> , 1987; YOUNG <i>et al.</i> , 1984)
Edema de orelha	Capsaicina*, via tópica	30 min	(GÁBOR, 2000)
	Fenol**, via tópica	1 h	(GÁBOR, 2000)
	Óleo de cróton***, via tópica	6 h	(TUBARO <i>et al.</i> , 1985)
Edema de pata	Carragenina, intraplantar	4 h	(WINTER; RISLEY; NUSS, 1962)
	Dextran sulfato de sódio, intraplantar	2 h	(LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982)

\* Possibilita a avaliação de mediadores não oriundos da cascata do ácido araquidônico – reação inflamatória neurogênica via receptores TRPV-1; \*\* Semelhante à dermatite de contato; \*\*\* Modelo de triagem para anti-inflamatórios não-esteroides (AINES) e corticoides.

O óleo de cróton é obtido de diferentes espécies vegetais e desempenha seu efeito irritativo através da ação de substâncias como 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e ésteres de forbol. O TPA ativa a proteína quinase C, que por sua vez ativa a proteína quinase ativada por mitógeno e a enzima fosfolipase A2. Na sequência, ocorre a ativação do fator plaquetário e a cascata do ácido araquidônico, com formação de mediadores inflamatórios decorrente da ação de ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e 5-lipoxigenase (PATEL; GOWDA, 2012). Considerando o exposto, este é um modelo *in vivo* versátil que permite a avaliação de substâncias anti-inflamatórias de diferentes classes.

### **2.2.2 Sistemas Nanoemulsionados**

As nanoemulsões são definidas como sistemas dispersos, formados por uma fase aquosa e uma fase oleosa, estabilizados por tensoativos e co-tensoativos. Estes sistemas podem ser do tipo A/O (fase interna aquosa) ou O/A (fase interna oleosa), em que as gotículas dispersas apresentam tamanho entre 200 e 500 nm (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; SINGH *et al.*, 2017). O tamanho de gotícula reduzido permite o aumento da permeação cutânea e a utilização de sistemas O/A, confere maior estabilidade para compostos voláteis como o  $\beta$ -cariofileno, reduzindo possíveis perdas do teor por volatilização (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; SHAKEEL *et al.*, 2012).

A opção pelo uso deste sistema em detrimento a outros carreadores nanoemulsionados ou poliméricos (como as nanocápsulas, NC) que também poderiam promover, por suas características, um grau de proteção ainda maior, reside especialmente em fatores inerentes à preparação desses sistemas. Os sistemas nanolipídicos sólidos, por exemplo, necessitam do emprego de calor, para a fusão dos lipídeos sólidos, enquanto as NC necessitam geralmente do emprego de solvente orgânico, para solubilização do polímero, mas que necessita ser removido

posteriormente, nos processos de manufatura. Tais condições são desfavoráveis quando substâncias voláteis estão envolvidas, pois pode ocorrer a degradação dos componentes bioativos nesses processos. As nanoemulsões são sistemas, portanto, mais simples, que podem ser preparados na ausência de calor, e de acordo com uma revisão da literatura recente, são os sistemas mais empregados para veicular óleos voláteis (DE MATOS; LUCCA; KOESTER, 2019).

A única desvantagem que pode ser associada às nanoemulsões é o tempo de residência na pele, devido a viscosidade relativamente reduzida, quando comparada a outras formulações também administradas pela via tópica. Porém, essa desvantagem pode ser contornada ao adicionar um polímero com propriedade gelificante, formando assim um nanoemulgel. O aumento na viscosidade confere um aumento na bioadesão e conseqüentemente aumenta o tempo de residência sobre a pele (CHELLAPA *et al.*, 2015; PRAJAPATI, 2018).

Os nanoemulgéis consistem em nanogotículas dispostas em uma matriz polimérica. A obtenção é dividida em duas etapas principais, sendo elas o preparo da nanoemulsão e adição do polímero na nanoemulsão (CHOUDHURY *et al.*, 2017). Após aplicação cutânea, as gotículas da nanoemulsão se desprendem da matriz polimérica, penetram no estrato córneo e permeiam pelas demais camadas. Adicionalmente, os nanoemulgéis também contribuem para melhor aceitabilidade pelo paciente, pois formulações com maior tempo de residência no sítio de aplicação necessitam de menor frequência de administração (KAUR; BEDI; NARANG, 2017; PRAJAPATI, 2018).

### **2.2.3 Microagulhas Dissolvíveis**

As microagulhas (MN) são dispositivos formados por uma base contínua e projeções em escala micrométrica no formato de agulhas de diferentes geometrias com altura entre 25 e 2000  $\mu\text{m}$ . Esses dispositivos podem ser compostos por diferentes materiais e podem ser aplicados para administração de fármacos ou substâncias terapêuticas, para imunização (vacinas) e para monitoramento em tempo real de biomarcadores (sensores) (ALIMARDANI *et al.*, 2021; AVCIL; ÇELIK, 2021).

Dados de análise de mercado estimam o mercado de MN no campo de sistemas de liberação de substâncias em USD 5,7 bilhões (ano base 2021) com projeções para USD 10,14 bilhões até 2030, com taxa de crescimento anual composto em 6,5%. Deste percentual de mercado, 35% corresponde à dispositivos para liberação de fármacos, 23% para vacinas, 11% para tratamento de câncer, 10% de dispositivos para manejo da dor e 9% para princípios ativos dermatológicos, com predomínio de participação da América do Norte (STRATEGIC MARKET RESEARCH, 2021). Entre os tipos MN utilizados para liberação de substâncias, os principais são: MN sólidas, revestidas, ocas, dissolvíveis e formadoras de hidrogel (ALIMARDANI *et al.*, 2021). A Figura 3 ilustra a liberação de substâncias a partir de cada tipo de MN.

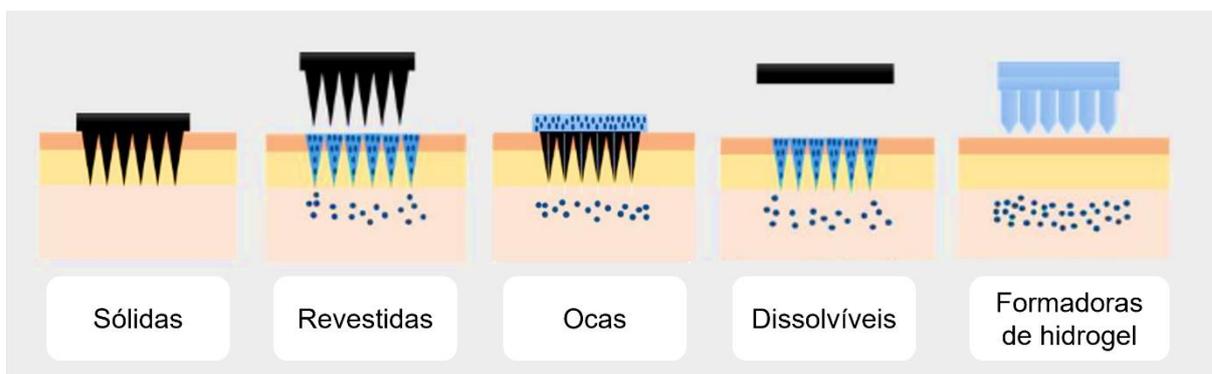


Figura 3 – Tipos de microagulhas para administração de fármacos ou substâncias.

Fonte: Adaptado de Alimardani et al. (2021)

As MN sólidas normalmente são compostas por materiais metálicos, como silício e titânio, e são aplicadas como pré-tratamento. Após a formação de microporos na pele, as substâncias ativas são aplicadas na forma de preparações semissólidas ou adesivos transdérmicos. Semelhantes às MN sólidas, as MN revestidas são formadas por agulhas metálicas que recebem uma etapa de revestimento polimérico no qual estarão dispersas as substâncias ativas. Após a penetração na pele, a MN é removida e a substância liberada a partir do polímero retido na pele. Ainda no contexto das MN com materiais metálicos, as MN ocas apresentam microcanais da base até o ápice das agulhas, sendo as substâncias liberadas na forma líquida a partir de um reservatório (ALDAWOOD; ANDAR; DESAI, 2021).

Os dois últimos tipos correspondem às MN poliméricas, classificadas em dissolvíveis e formadoras de hidrogel. As MN poliméricas apresentam as substâncias ativas dispersas na matriz, que ao entrar em contato com a pele se dissolve rapidamente. Já as MN formadoras de hidrogel intumescem em contato com a pele, liberando lentamente as substâncias por sistema gradiente. As MN poliméricas apresentam como vantagem a aplicação em única etapa e capacidade de modulação da taxa de liberação por modificações dos polímeros, geometria das agulhas e associação das substâncias em sistemas nanoestruturados (ALDAWOOD; ANDAR; DESAI, 2021; WAGHULE *et al.*, 2019). Ademais, as MN dissolvíveis não resultam em resíduos perfurocortantes (JUNG; JIN, 2021).

Em relação aos métodos de obtenção das microagulhas dissolvíveis, o método mais empregado é a micromoldagem. Por esta técnica a mistura dos polímeros e substâncias em solução é transferida para um molde com dimensões e geometria das agulhas pré-definidas. Para tal, é necessária a produção prévia de moldes mestre e a partir destes os contramoldes (micromoldes) que serão efetivamente empregados na obtenção das MN dissolvíveis (DONNELLY *et al.*, 2011).

O molde mestre (*master mold*), normalmente formado por compostos metálicos ou poliméricos, pode ser obtido por  $\mu$ EDM (*electrical discharge machining*) (JANPHUANG *et al.*, 2018), por foto ou estereolitografia (WANG *et al.*, 2021) e por impressão 3D (DABBAGH *et al.*, 2021; KRIEGER *et al.*, 2019). Adicionalmente, microagulhas sólidas comerciais podem servir como molde mestre (BAL *et al.*, 2010; SRIVASTAVA; THAKKAR, 2020). A partir do micromolde são preparados contramoldes (*female mold*) de polidimetilsiloxano (PDMS).

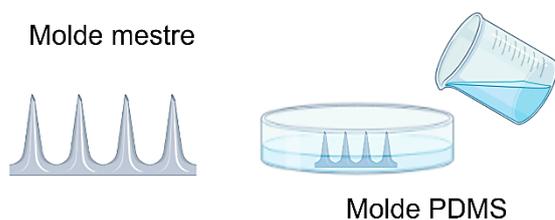
Alguns estudos já descreveram a viabilidade de obtenção direta das MN dissolvíveis por impressão 3D (JOHNSON; PROCOPIO, 2019; LUZURIAGA *et al.*, 2018). Contudo, para a aplicação da impressão 3D a substância deverá permanecer estável na temperatura e condições do processo de cura polimérica. Em relação às MN dissolvíveis para administração de substâncias lipofílicas voláteis, a micromoldagem é o método mais adequado por permitir a realização de todos os processos à temperatura ambiente ou inferior.

### 2.2.3.1 Integração de Sistemas Nanoestruturados e Microagulhas Dissolvíveis

As microagulhas dissolvíveis são constituídas de polímeros hidrossolúveis, preferencialmente biodegradáveis e biocompatíveis, sendo comumente empregados polivinil álcool (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), quitosana, derivados de celulose e hialuronato de sódio. Esses podem ser combinados em diferentes proporções, além de apresentarem uma vasta gama de pesos moleculares e em alguns casos, graus de hidrólise. Tais aspectos impactam diretamente nas características mecânicas das agulhas e perfil de liberação dos fármacos associados e devem ser considerados na etapa de desenvolvimento (WEIMER; ROSSI; KOESTER, 2021).

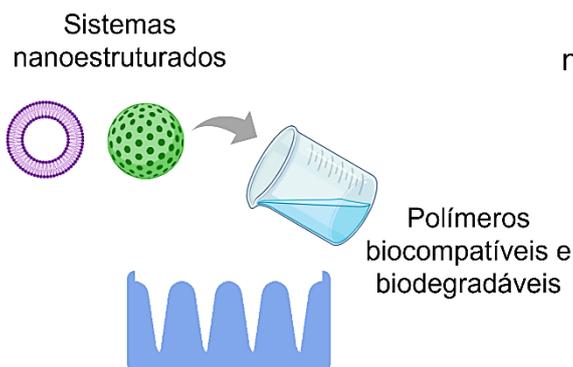
Conforme abordado, as matrizes são hidrofílicas e podem apresentar restrições para a veiculação de compostos lipofílicos no que tange a estabilidade desses compostos e uniformidade de distribuição na matriz. Entre as alternativas exploradas na literatura, a partir de 2010, surgiram estudos de veiculação de compostos lipofílicos em sistemas nanoestruturados seguida da posterior integração em microagulhas poliméricas (WEIMER; ROSSI; KOESTER, 2021). No entanto, a combinação dessas tecnologias emergentes deve ser acompanhada de ensaios de caracterização e pode ser beneficiada pelo emprego de ferramentas de *Quality by Design* (QbD, qualidade pelo desenho) que buscam identificar e controlar atributos críticos da qualidade vinculados às características intrínsecas dos materiais empregados e de variáveis do processo (BRASIL, 2019; INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION, 2006, 2009).

Em relação ao método de produção em escala laboratorial, a Figura 4 apresenta um esquema gráfico das principais etapas de produção de microagulhas dissolvíveis em associação com sistemas nanoestruturados por micromoldagem, com as respectivas avaliações experimentais. As etapas de desenvolvimento se dividem em (i) preparo do micromolde em polidimetilsiloxano (PDMS) a partir do molde mestre, (ii) obtenção dos sistemas nanoestruturados, mistura com as dispersões poliméricas e preenchimento do micromolde, (iii) caracterização do perfil de qualidade do dispositivo (DONNELLY *et al.*, 2011; LEE; PARK; PRAUSNITZ, 2008; PARK *et al.*, 2007).



### 1. Obtenção dos moldes

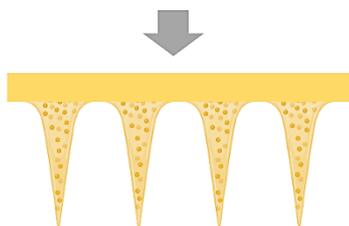
- Molde mestre de silício por fotolitografia, impressão 3D – estereolitografia (SLA)
- Utilização de MN metálicas comerciais como molde mestre
- Produção dos contramoldes de PDMS



### 2. Obtenção dos sistemas nanoestruturados e mistura na matriz polimérica

- Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados lipídicos, poliméricos ou inorgânicos
  - Seleção de polímeros
- Avaliação da compatibilidade entre o nanosistema e a matriz polimérica

Processo de micromoldagem



### 3. Caracterização do perfil de qualidade da MN dissolúvel

- Caracterização microscópica
  - Propriedades mecânicas
  - Inserção cutânea *in vitro*
- Perfil de liberação e dissolução *in vitro*
  - Perfil de deposição cutânea
- Avaliação de estabilidade do nanosistema

Figura 4 - Fluxograma das principais etapas do desenvolvimento da microagulha polimérica em associação com sistema nanoestruturado.

Figura elaborada com os recursos do Biorender.com

## 2.3 QUALITY BY DESIGN NO DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO

O desenvolvimento de sistemas avançados para liberação de substâncias, e que envolvem muitas etapas de manufatura ou condições distintas de produção com diferentes pontos críticos de qualidade, pode se beneficiar pela aplicação de elementos e ferramentas de *Quality by Design*. O termo QbD foi cunhado em 1960 por Joseph M.

Jurran que defendia que os problemas associados aos produtos eram decorrentes das etapas de desenvolvimento. Além disso, a qualidade dos produtos e a adequação dos mesmos ao uso pretendido poderiam ser asseguradas pela aplicação de processos sistematizados fundamentados na análise de risco e métodos estatísticos (BEZERRA; RODRIGUES, 2017; CASTILLO-HENRÍQUEZ *et al.*, 2022).

No âmbito do desenvolvimento farmacêutico, os elementos e ferramentas de QbD foram introduzidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2002, seguido da *European Medicines Agency* (EMA) e *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* (PDMA), sendo efetivamente implementados a partir de 2012. No Brasil, os termos relacionados ao QbD foram inseridos na prática farmacêutica a partir da publicação da RDC nº 301 de 2019, visando à adesão da ANVISA ao Esquema de Cooperação em Inspeção Farmacêutica (*Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme, PIC/S*). Além disso, as agências regulatórias mencionadas utilizam como base os guias da *International Conference on Harmonisation* (ICH) para implementação do QbD (BRASIL, 2019).

Os três guias principais da ICH sobre QbD são: ICH Q8 – Desenvolvimento farmacêutico, ICH Q9 – Gerenciamento do risco da qualidade e ICH Q10 – Sistema Farmacêutico da qualidade (INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION, 2006, 2007, 2009). Na prática, o QbD é dividido em elementos e em ferramentas. Os elementos direcionam os objetivos do projeto e a adequabilidade às necessidades do paciente (uso pretendido), identificando os pontos críticos de controle. Já as ferramentas constituem instrumentos para monitoramento e controle sistemático dos pontos críticos. Em suma, o QbD permite assegurar a qualidade pelo controle das variáveis durante o processo de produção e, conseqüentemente, assegurar a eficácia e segurança de medicamentos (LEE *et al.*, 2022).

A Tabela 2 apresenta a relação dos elementos e ferramentas do QbD farmacêutico (LEE *et al.*, 2022-; YU *et al.*, 2014).

Tabela 2 – Elementos e ferramentas do *Quality by Design* aplicados ao desenvolvimento farmacêutico

	<b>Classificação</b>	<b>Definição</b>
<b>Elementos</b>	Perfil do produto ( <i>Quality target product profile, QTPP</i> )	Atributos finais do produto acabado e que garantem a eficácia e segurança.
	Atributos críticos da qualidade ( <i>Critical quality attributes, CQA</i> )	Descrevem as propriedades físico-químicas e microbiológicas ideias para assegurar a qualidade do produto. Os CQA estão correlacionados com os CPP/CMA e determinam o QTPP.
	Atributos críticos do material ( <i>Critical material attributes, CMA</i> )	Descrevem os atributos mínimos de qualidade das matérias-primas.
	Parâmetros críticos do processo ( <i>Critical process parameters, CPP</i> )	Avaliam o impacto na qualidade do produto final causados por variações nos parâmetros do processo.
	Espaço do projeto ( <i>Design space, DS</i> )	Espaço virtual onde são avaliadas as interações entre as variáveis do processo e seus parâmetros.
<b>Ferramentas</b>	Planejamento experimental ( <i>Design of experiments, DoE</i> )	Aplicação de programas para planejamento experimental. Permitem a otimização dos experimentos/processos e avaliação das interações das variáveis envolvidas (DS).
	Avaliação do risco ( <i>Risk assesment, RA</i> )	Auxiliam na identificação de fontes de variações e na priorização dos pontos dos processos a serem investigados. São exemplos de ferramentas: diagrama de Ishikawa e análise da árvore de falhas.
	Técnicas analíticas do processo ( <i>Process analytical techniques, PAT</i> )	Constituem ferramentas de controle de processo que empregam análise estatística desde o planejamento dos experimentos, aquisição e análise dos dados.



**CAPÍTULO 1 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO SINÉRGICO ENTRE  
β-CARIOFILENO E INDOMETACINA VEICULADOS EM SISTEMAS  
NANOEMULSIONADOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA**

---



## APRESENTAÇÃO – CAPÍTULO 1

O Capítulo 1 está dividido em duas partes principais, contemplando um artigo sobre a avaliação do efeito sinérgico em modelo *in vitro* e uma e uma Short Communication com a descrição dos resultados de estudos *in vivo*, ambos publicados em periódicos de impacto internacional.

- **Artigo experimental:** O artigo “*Co-delivery of beta-caryophyllene and indomethacin in the oily core of nanoemulsions potentiates the anti-inflammatory effect in LPS-stimulated macrophage model*”, publicado no periódico *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (FI 4,90), compreende a avaliação do efeito sinérgico entre  $\beta$ -cariofileno e indometacina, veiculados em nanoemulsões tópicas. Para elucidação do efeito sinérgico foi empregado o modelo *in vitro* de inflamação por estimulação de macrófagos (RAW 264.7) com LPS e ensaios complementares para evidenciar o perfil de segurança preliminar das formulações desenvolvidas.

O artigo na versão completa da Tese compreende o intervalo de páginas de 65-80 e poderá ser consultado na íntegra pela referência descrita abaixo.

**WEIMER, P.; KIRSTEN, C.; LOCK, G. A. et al.** Co-delivery of beta-caryophyllene and indomethacin in the oily core of nanoemulsions potentiates the anti-inflammatory effect in LPS-stimulated macrophage model. **Eur J Pharm Biopharm.** v. 191, p. 114-123. 2023. doi: 10.1016/j.ejpb.2023.08.020.

- **Short Communication:** Esta seção compreende descrição da metodologia e resultados referentes à avaliação do potencial anti-inflamatório de nanoemulgeis de  $\beta$ -cariofileno e indometacina pelo modelo *in vivo* de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os dados são apresentados na forma de Short Communication

intitulada “*Association effect of the phytocannabinoid beta-caryophyllene and indomethacin carried in topical nanoemulgels: an evaluation by in vivo anti-inflammatory model*”, publicada no periódico *Natural Product Research* (FI 2,20).

A *Short Communication* na versão completa da Tese compreende o intervalo de páginas de 81-99 e poderá ser consultado na íntegra pela referência descrita abaixo.

**WEIMER, P.;** LOCK, G. A.; NUNES, K. A. A. et al. Association effect of the phytocannabinoid beta-caryophyllene and indomethacin carried in topical nanoemulgels: an evaluation by in vivo anti-inflammatory model. **Natural Products Research**. v. 21, p. 1-7. 2024. doi: 10.1080/14786419.2024.2317887.

---

**CAPÍTULO 1 | ARTIGO EXPERIMENTAL**

**Co-delivery of beta-caryophyllene and indomethacin in the oily core of nanoemulsions potentiates the anti-inflammatory effect in LPS-stimulated macrophage model**

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2023, 191, August, 114-123.  
[https://doi.org/ 10.1016/j.ejpb.2023.08.020](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.08.020) | FI 4,90































---

**CAPÍTULO 1 | SHORT COMMUNICATION**

**Association effect of the phytocannabinoid beta-caryophyllene and indomethacin carried in topical nanoemulgels: an evaluation by *in vivo* anti-inflammatory model**

Natural Products Research, 2024, 21, February, 1-7.

[https://doi.org/ 10.1080/14786419.2024.2317887](https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2317887) | FI 2,2







































**CAPÍTULO 2 | PROTOTIPAGEM DE MICROAGULHAS DISSOLVÍVEIS EM  
ASSOCIAÇÃO COM SISTEMAS NANOEMULSIONADOS PARA  
LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE  $\beta$ -CARIOFILENO**

---



## APRESENTAÇÃO CAPÍTULO 2

O Capítulo 2 apresenta os resultados gerados durante o desenvolvimento de microagulhas poliméricas, contendo:

- **Artigo de revisão:** O artigo de revisão intitulado “*Dissolving microneedles developed in association with nanosystems: A scoping review on the quality parameters of these emerging systems for drug or protein transdermal delivery*”, publicado no periódico *Pharmaceutics* (FI 6,23), aborda uma revisão de escopo sobre o panorama de microagulhas poliméricas dissolvíveis desenvolvidas em associação com sistemas nanoestruturados e os métodos empregados para avaliação e caracterização desses dispositivos.

O artigo na versão completa da Tese compreende o intervalo de páginas de 105-148 e poderá ser consultado na íntegra pela referência descrita abaixo.

**WEIMER, P.; ROSSI, R.C.; KOESTER, L. S.** Dissolving microneedles developed in association with nanosystems: A scoping review on the quality parameters of these emerging systems for drug or protein transdermal delivery. **Pharmaceutics**. v. 13, 1601. 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13101601.

- **Manuscrito experimental:** O manuscrito "*Micro-nano: development of dissolving microneedle based on Quality by Design approach for transdermal release of a nanoemulsified volatile compound*" descreve o desenvolvimento de um dispositivo micro-nano dérmico com emprego de duas tecnologias, microagulhas e sistema nanoemulsionado, objetivando a liberação transdérmica do  $\beta$ -cariofileno.

O manuscrito experimental na versão completa da Tese compreende o intervalo de páginas de 149-196, sendo a respectiva seção suprimida nesta versão por conter dados a serem publicadas em periódico de impacto internacional.

---

## **CAPÍTULO 2 | ARTIGO DE REVISÃO**

**Dissolving microneedles developed in association with nanosystems: A scoping review on the quality parameters of these emerging systems for drug or protein transdermal delivery**

Pharmaceutics 2021, 13, 1601. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101601> | FI 6,525























































































---

## CAPÍTULO 2 | MANUSCRITO EXPERIMENTAL

Esta seção compreende o manuscrito “**Micro-nano: development of dissolving microneedle based on quality by design approach for transdermal release of a nanoemulsified volatile compound**” a ser submetido em periódico de alto fator de impacto.































































































---

## **DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO**



## 4 DISCUSSÃO GERAL

O  $\beta$ -cariofileno é um composto de origem natural, mas por síntese orgânica é possível obtê-lo em escala industrial e com alto grau de pureza. Associada à facilidade de obtenção deste sesquiterpeno, sua ação multialvo desperta interesse cada vez maior da comunidade científica (JHA *et al.*, 2021; SHARMA, Charu *et al.*, 2016). Ao longo desta tese de doutorado foram destacadas suas principais atividades, mecanismos de ação, bem como, as limitações físico-químicas no emprego deste composto bioativo como alternativa terapêutica, ainda no estágio pré-clínico.

De acordo com as definições do sistema de classificação biofarmacêutica e características intrínsecas do  $\beta$ -cariofileno, tais como, baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade e moderada lipofilia, este composto é enquadrado na classe IV. Apesar de constituir uma desvantagem para veiculação em formas farmacêuticas convencionais, os ingredientes farmacêuticos ativos das classes II e IV são desejáveis no desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados (ANAND *et al.*, 2019; KAWABATA *et al.*, 2011).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa verificaram a viabilidade de veiculação do  $\beta$ -cariofileno em nanoemulsões do tipo O/A, e, igualmente, o espessamento das nanoemulsões com diferentes agentes poliméricos (PETERLE *et al.*, 2020; WEIMER *et al.*, 2022). Tanto nos estudos conduzidos com o  $\beta$ -cariofileno na sua forma isolada, quanto como composto majoritário (35 – 41%) na oleorresina de *Copaifera multijuga* Hayne, foi evidenciada a potencialização de efeito anti-inflamatório e cicatrizante dos sistemas nanoemulsionados desenvolvidos (LUCCA *et al.*, 2017; PETERLE *et al.*, 2020; WEIMER *et al.*, 2022). Tendo em vista que todos os sistemas almejavam a aplicação tópica, estudos complementares demonstraram que a potencialização desses efeitos farmacológicos *in vivo* estava associada às mudanças nos perfis de permeação/retenção cutânea. Sem estar veiculado no sistema nanoemulsionado, o  $\beta$ -cariofileno permaneceu retido no estrato córneo e epiderme, atingindo as camadas mais profundas (derme) somente mediante a veiculação.

Considerando os resultados dos estudos anteriores e a expertise do nosso grupo de pesquisa no desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados, optou-se por direcionar as pesquisas para a potencialização do efeito anti-inflamatório tópico de nanoemulsões de  $\beta$ -cariofileno espessadas ou não em hidrogel. Uma vez que o  $\beta$ -cariofileno pode ser empregado como um substituto de triglicerídeos biologicamente inertes e comumente utilizados para formação do núcleo oleoso desses sistemas, surgiu a hipótese de associar o fármaco indometacina com o  $\beta$ -cariofileno e investigar possível efeito sinérgico. A avaliação do efeito sinérgico pela lei de ação das massas e aplicação do *software* CompuSyn nessa tese foi pioneira dentro do nosso grupo de pesquisa. Ademais, devido às restrições impostas pelo caráter emergencial da pandemia de SARS-CoV-2, priorizou-se inicialmente a condução dos estudos *in vivo*, diferindo da ordem dos resultados apresenta no Capítulo 1 (estudos *in vitro* e após *in vivo*), decisão amparada nos estudos experimentais do grupo de pesquisa.

A primeira versão aprovada do projeto (nº 39482) junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRGS) descrevia a condução do estudo de sinergismo em quatro etapas: (1) estudo piloto, (2) elaboração das curvas dose-resposta, (3) avaliação do sinergismo e (4) confirmação do efeito sinérgico com a formulação otimizada, sendo todos os experimentos previstos em camundongos da linhagem BALB/c, já utilizada em outros estudos. No entanto, devido à impossibilidade de aquisição dessa linhagem foi necessário conduzir os experimentos com a linhagem CF-1 (ANEXO D - Adendo 1). A atividade anti-inflamatória do nanoemulgel de  $\beta$ -cariofileno foi inferior na nova linhagem, em comparação com estudo anterior. Ademais, na tentativa de maximizar o efeito farmacológico, foram elaborados nanoemulgéis com a concentração máxima de  $\beta$ -cariofileno e indometacina no núcleo oleoso, correspondendo a 20,0% m/m e 1,0 mg/mL, respectivamente (proporção 200:1).

Importante ressaltar que no estudo conduzido com a linhagem BALB/c foi aplicado como agente flogístico ácido araquidônico, o qual implica em tempo total de avaliação de 2 h (WEIMER *et al.*, 2022; YOUNG *et al.*, 1984). Neste ponto, considerando o tempo necessário para penetração e permeação do sistema nanoemulsionado na pele, assim como, liberação do  $\beta$ -cariofileno a partir do núcleo oleoso, as formulações deveriam ser aplicadas antes da indução, caracterizando uma

condição experimental de pré-tratamento. Para contornar essa problemática, optou-se por aplicar óleo de cróton como agente indutor. O óleo de cróton foi utilizado anteriormente na linhagem CF-1 para avaliação de nanoemulsões do óleo essencial de *Aniba canelilla* (Kunth) Mez espessadas em hidrogel (KREUTZ *et al.*, 2023). Como vantagem, o óleo de cróton apresenta o platô do quadro inflamatório em 6 h, ou seja, as formulações podem ser administradas após a indução (condição experimental de tratamento).

Conforme já explorado na *Short Communication* (Capítulo 1), o efeito antagônico inesperado entre  $\beta$ -cariofileno e indometacina pode ser decorrente de um conjunto de variáveis: especificidades do modelo animal (linhagem e agente flogístico) e proporção de  $\beta$ -cariofileno e indometacina empregada. No que tange às especificidades do modelo animal não foram encontradas evidências na literatura científica que pudessem elucidar as hipóteses. Indubitavelmente, novas perguntas de pesquisa surgiram a partir dos resultados, por exemplo, os compostos diterpênicos presentes no óleo de cróton podem interferir no perfil de permeação do  $\beta$ -cariofileno? Ou, o  $\beta$ -cariofileno pode favorecer a permeação e potencial irritante do óleo de cróton?

Ensaio preliminares de irritabilidade do óleo de cróton em combinação com  $\beta$ -cariofileno (dados não apresentados) sobre a membrana corioalantoide de ovos embrionados (HET-CAM) não demonstraram efeitos irritantes dessa combinação. No entanto, o tempo de exposição é reduzido e a mistura extremamente lipofílica. Portanto, estudos complementares de permeação e irritação cutânea podem ser conduzidos em futuros estudos para responder a essas questões. Enquanto isso, apesar de ser um modelo difundido no *screening* de atividade inflamatória, o edema de orelha induzido por óleo de cróton deve ser aplicado com cautela quando se trata da avaliação de compostos com unidades de isopreno (terpênicos). Uma vez que o óleo de cróton pode apresentar composição variável e decorrente da fonte de extração e compostos terpênicos eventualmente presentes nesse óleo podem interferir no perfil de permeação de compostos da mesma classe. Tal hipótese foi elencada a partir de um estudo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, no qual foi verificada modificação do perfil de permeação cutânea de  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno quando aplicados na forma isolada ou como oleorresina de *Copaifera multijuga* (WEIMER *et al.*, 2022). Traçando um

paralelo, a hipótese da influência da composição do óleo de cróton sobre a permeação de compostos terpênicos poderá ser aprofundada em futuros estudos com o devido delineamento de grupos controle.

A fim de investigar o efeito sinérgico por outro método que permitisse a avaliação de uma faixa ampla de concentrações para elaboração das curvas dose-resposta, foi implementado o ensaio anti-inflamatório *in vitro* com macrófagos murinos estimulados por LPS (YOON *et al.*, 2009). Os macrófagos quando estimulados produzem mediadores inflamatórios, incluindo a liberação de óxido nítrico que pode ser facilmente mensurado por métodos espectrofotométricos. Contudo, a experiência revelou a necessidade de alguns cuidados durante a sua aplicação. Sempre que avaliada a atividade anti-inflamatória, deverá ser mensurado concomitantemente o percentual de citotoxicidade, uma vez que a inibição da produção de óxido nítrico pode ser decorrente da morte celular. Neste caso, substâncias anti-inflamatórias não devem comprometer de forma expressiva a viabilidade celular, pois macrófagos constituem células de defesa dos organismos. Os resultados dos sistemas nanoemulsionados devem ser analisados com cautela e sempre deverão ser investigados possíveis efeitos das nanogotículas no espalhamento ou absorção da luz (espectrofotometria), pelo emprego de grupos controle adequados.

Durante a determinação do sinergismo por aplicação do *software* CompuSyn são realizadas extrapolações a partir dos dados experimentais, obtendo-se assim o índice de combinação. Ou seja, o resultado encontrado é dependente das faixas de concentrações e proporções de combinação entre as substâncias. Conforme o método de Chou-Talalay, faixas amplas de combinações, incluindo combinações entre  $IC_{50}/16$  até duas ou quatro vezes os valores de  $IC_{50}$  possibilitam melhor compreensão do efeito combinatório (Fa 0,05 a 0,95) (CHOU, 2006). Porém, o cultivo celular 2D apresentou restrições para aplicação de altas concentrações de  $\beta$ -cariofileno, como separação da fase lipofílica (morte celular por impedimento das trocas gasosas com o ambiente externo) ou concentração elevada de cossolventes como DMSO ou surfactantes (morte celular pelo cossolvente). Desta forma, em estudos de associação, o resultado sempre deverá ser reportado em conjunto com as concentrações e proporções aplicadas.

Com base no potencial farmacológico do  $\beta$ -cariofileno e sua ação agonista em receptores CB2 (KLAUKE *et al.*, 2014), o segundo capítulo desta tese de doutorado avaliou o desenvolvimento de um dispositivo transdérmico, visando futura aplicação em quadros de dor inflamatória crônica. Nessa temática, a exploração de novos alvos terapêuticos, como os receptores CB2, pode implicar em benefícios terapêuticos para sintomas ou condições crônicas, como osteoartrite, que carecem de alternativas farmacológicas. Atualmente os fármacos administrados para o tratamento de dor crônica pertencem às classes de anti-inflamatórios não esteroides, corticoides, opioides, antidepressivos tricíclicos e ansiolíticos análogos ao GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) (BRASIL, 2012).

Todavia, ao se tratar de um sintoma ou condição clínica complexa, muitas vezes é necessário o emprego de sistemas farmacológicos de liberação modificada, associações farmacológicas e administração por diferentes vias. Neste contexto, a via transdérmica pode ser uma alternativa interessante para a administração do  $\beta$ -cariofileno, aumentando a disponibilidade deste sesquiterpeno nos receptores CB2 e próximas ao sítio alvo.

Um dos sistemas mais recentes para a administração de substâncias e que possibilita a incorporação de sistemas nanoestruturados consiste nas microagulhas poliméricas. As pesquisas em bases de dados indicaram a possibilidade de veiculação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas nesses sistemas, porém a veiculação de compostos voláteis à temperatura ambiente é praticamente inexistente, bem como, a veiculação de compostos líquidos à temperatura ambiente. Portanto, a entrega do  $\beta$ -cariofileno a partir de sistema nanoestruturado disperso em microagulha polimérica para ação em receptores CB2 caracteriza o caráter inovador central dessa tese.

Atualmente, existem poucos estudos clínicos em andamento com microagulhas (MN) configurando sistemas de liberação de fármacos e substâncias de origem proteica (imunização). Isso se deve a quatro fatores principais: necessidade de (1) estabelecimento de guias e resoluções específicos pelas agências regulatórias, (2) domínio de técnicas de produção estéril das MN ou baixa carga microbiana em escala industrial, (3) desenvolvimento de métodos de controle de qualidade apropriados e (4) redução do custo final do produto. Diante desses fatores, o primeiro passo, após a

escolha pelo desenvolvimento de MN polimérica nessa tese, consistiu na elaboração de uma revisão de escopo para mapeamento dos métodos e técnicas de controle de qualidade empregados. Os dados compilados indicaram lacunas analíticas, como número reduzido de estudos que avaliam o doseamento dos compostos veiculados e que verificam a manutenção das características nanométricas após incorporação na matriz polimérica.

Considerando as particularidades desses sistemas e os desafios analíticos em sua caracterização, a aplicação dos elementos e ferramentas de *Quality by Design* (QbD) podem promover a identificação e controle de pontos críticos de qualidade (INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION, 2006, 2007, 2009). Além disso, o emprego de QbD na pesquisa acadêmica deve ser estimulado, tendo em vista futuras possibilidades de licenciamento de patentes ou transferência de tecnologia. Ainda, a aplicação de QbD contribui para posterior aprovação dos sistemas ou medicamentos pelas agências regulatórias, uma vez que este é um requerimento das principais agências na avaliação de dossiês de novos produtos (BRASIL, 2022).

A participação na capacitação CATALISA – ICT, promovida pelo SEBRAE, possibilitou identificar *insights* que foram aplicados em conjunto às ferramentas de QbD, a fim de aproximar o dispositivo proposto às necessidades reais do mercado. O primeiro passo experimental foi produzir moldes mestres com dimensões e características geométricas adequadas para confecção subsequente dos contramoldes de polidimetilsiloxano (PDMS). Nessa etapa foram testadas diferentes técnicas e materiais, como (a) aplicação de microagulhas sólidas ou poliméricas comerciais, (b) obtenção de moldes de silício piramidais por fotolitografia, (c) molde de fotorresina por impressão 3D – técnica de estereolitografia e (d) molde de fotorresina por impressão 3D – técnica de estereolitografia mascarada. As duas primeiras não possibilitaram a obtenção de moldes com características geométricas adequadas. Entre as técnicas de impressão 3D avaliadas, a estereolitografia mascarada resultou em moldes com maior precisão e detalhamento geométrico requerido, sendo a escolhida. Importante destacar que a obtenção direta das MN dissolvíveis integrada com sistema nanoestruturado de  $\beta$ -cariofileno por impressão 3D foi descartada, pois, as técnicas disponíveis implicariam

na desestabilização da nanoestrutura ou degradação do  $\beta$ -cariofileno (DABBAGH *et al.*, 2021; QUAN *et al.*, 2020).

O segundo passo experimental consistiu na escolha dos polímeros e das concentrações de trabalho, bem como as proporções de combinação. Considerando, informações como custo-benefício, testes preliminares, dados da literatura e características como biocompatibilidade e biodegradabilidade, foram escolhidos o álcool polivinílico (PVA) e polivinilpirrolidona (PVP). Amparado por ensaios de perfil reológico e testes de preenchimento dos moldes, foram escolhidos os pesos moleculares, proporções de combinação e concentrações de trabalho.

Conforme informações recuperadas e analisadas na revisão de escopo dessa tese, existe um gama de sistemas nanoestruturados que podem ser integrados em microagulhas dissolvíveis. Portanto, o desenvolvimento de diferentes sistemas nanoestruturados para veiculação do  $\beta$ -cariofileno consistiu no terceiro passo experimental. Inicialmente foram considerados três sistemas diferentes: (a) nanocápsulas de núcleo lipídico, (b) carreadores lipídicos nanoestruturados e (c) nanoemulsões de  $\beta$ -cariofileno. O primeiro sistema, quando preparado por deposição interfacial de polímero, conferiu teor de  $\beta$ -cariofileno abaixo do desejado, sendo esta opção descartada (FESSI *et al.*, 1989; MIR *et al.*, 2020). O segundo sistema não permitiu a distribuição uniforme do  $\beta$ -cariofileno na matriz polimérica e, portanto, também foi descontinuado. Já a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno apresentou resultados promissores. Para efetivamente comprovar a necessidade de veiculação do  $\beta$ -cariofileno em nanoemulsão, foram realizados ensaios comparativos com o  $\beta$ -cariofileno na sua forma livre e emulsionada (emulsão grosseira) misturados na dispersão polimérica (dados não apresentados). Como resultado, a nanoemulsão conferiu maior homogeneidade de distribuição do  $\beta$ -cariofileno na matriz polimérica e retardou a separação deste sesquiterpeno.

Paralelamente e permeando as demais etapas experimentais, foram validados os procedimentos de micromoldagem, incluindo temperaturas e pressão de trabalho, e foram instituídas todas as metodologias específicas para caracterização das MN no laboratório, salvo análises de microscopias especiais realizadas por meio de parcerias. Uma vez determinados os polímeros, sistema de veiculação do  $\beta$ -cariofileno e variáveis

de processo, foi iniciado o desenvolvimento do sistema integrado por *Quality by Design*. Inicialmente foi definido o perfil de qualidade alvo do produto em desenvolvimento, após foram mapeados os atributos críticos de qualidade, atributos críticos de materiais e parâmetros críticos de processo, assim como, possíveis interações entre estes pelo emprego de ferramentas de análise de risco (Diagrama de Ishikawa e Matriz Estimada de Risco). Este foi o primeiro trabalho conduzido com essas ferramentas na análise de um sistema integrado de MN dissolvível com nanoemulsão, pois até o momento as ferramentas de QbD eram empregadas para otimização dos sistemas nanoestruturados, antes da sua combinação com a matriz polimérica da MN (SRIVASTAVA; THAKKAR, 2020, 2021).

Após o mapeamento prévio e definição dos fatores que seriam avaliados na etapa de Design of Experiments (DoE) foi possível obter uma formulação otimizada com a veiculação de aproximadamente 1235 µg de β-cariofileno por dispositivo. Além disso, o sistema desenvolvido atendeu a todos os critérios de qualidade elencados nas fases iniciais da abordagem de QbD. Esse trabalho foi pioneiro em evidenciar a capacidade de veiculação e estabilidade de um composto sesquiterpênico nanoemulsificado, líquido à temperatura ambiente, moderadamente lipofílico e volátil em uma MN hidrossolúvel. Não obstante, o desenvolvimento sistemático possibilitou a liberação transdérmica desse composto, evidenciada pelos ensaios de liberação transdérmica *in vitro* com pele porcina.

Por fim, o racional de desenvolvimento explorado nessa tese poderá ser ampliado para outros compostos de origem terpênica, e que carecem do emprego de estratégias tecnológicas para viabilizar e potencializar sua ação farmacológica. Assim como, poderão ser exploradas associações sinérgicas com o β-cariofileno entregue por meio desse sistema integrado.

## 5 CONCLUSÃO

As características físico-químicas do  $\beta$ -cariofileno limitam sua administração por via oral. Na tentativa de promover a sua ação farmacológica multialvo, sistemas nanoemulsionados destinados à aplicação tópica e transdérmica foram investigados nessa tese. Os resultados evidenciaram a potencialização do efeito anti-inflamatório *in vitro* de nanoemulsões de  $\beta$ -cariofileno. Ademais, foi verificado que a associação deste sesquiterpeno com o anti-inflamatório não esteroide, indometacina, resultou em efeito sinérgico dependente da proporção combinada. Os respectivos achados indicam possibilidade de aplicação centrada no  $\beta$ -cariofileno como composto principal, mas também como adjuvante multifuncional.

No segundo cenário, o  $\beta$ -cariofileno pode ser avaliado em futuros estudos como substituinte dos triglicerídeos de cadeia média ou outros óleos inertes comumente usados na composição do núcleo oleoso de sistemas nanoemulsionados. Especialmente quando os sistemas desenvolvidos visam a atividade anti-inflamatória. No entanto, a solubilidade e estabilidade do composto a ser combinado em  $\beta$ -cariofileno deverão ser previamente investigadas.

Em relação à administração transdérmica do  $\beta$ -cariofileno, esta foi alcançada com a integração de duas tecnologias na liberação de substâncias ativas, a nanotecnologia e as emergentes microagulhas dissolvíveis. Por meio da ruptura física do estrato córneo e dissolução da matriz polimérica da microagulha, torna-se possível a liberação do  $\beta$ -cariofileno próximo à circulação sanguínea. Ademais, os achados detalhados nessa tese comprovam a viabilidade de veiculação de uma substância moderadamente lipofílica e volátil em uma matriz hidrossolúvel, a qual foi alcançada com o emprego da abordagem Quality by Design.



## REFERÊNCIAS

ABGI. **TRL: Recursos financeiros por níveis de maturidade tecnológica**. [S. l.: s. n.], [s. d.]. Disponível em: <https://brasil.abgi-group.com/radar-inovacao/artigos-estudos/trl-recursos-financeiros-por-niveis-de-maturidade-tecnologica/>. Acesso em: 23 jan. 2023.

ABNT. **NBR ISO 16290:2015 - Sistemas espaciais — Definição dos níveis de maturidade da tecnologia (TRL) e de seus critérios de avaliação**. Brazil: [s. n.], 2015.

ALDAWOOD, Faisal Khaled; ANDAR, Abhay; DESAI, Salil. A comprehensive review of microneedles: types, materials, processes, characterizations and applications. **Polymers**, [s. l.], v. 13, p. 1–34, 2021.

ALIMARDANI, Vahid *et al.* Microneedle arrays combined with nanomedicine approaches for transdermal delivery of therapeutics. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 181, 2021.

ALMEIDA, Manoela Enger; TEIXEIRA, Helder Ferreira; KOESTER, Letícia Scherer. Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 780–788, 2008.

AN, Dongchen *et al.* Targeting cannabinoid receptors: current status and prospects of natural products. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, p. 1–33, 2020.

ANAND, Kumar *et al.* Nano-emulgel: emerging as a smarter topical lipidic emulsion-based nanocarrier for skin healthcare applications. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 16–35, 2019.

AVCIL, Muhammet; ÇELIK, Ayhan. Microneedles in drug delivery: progress and challenges. **Micromachines**, [s. l.], v. 12, p. 1–15, 2021.

BAL, Suzanne M. *et al.* Influence of microneedle shape on the transport of a fluorescent dye into human skin in vivo. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 147, n. 2, p. 218–224, 2010.

BANGA, Ajay K. **Transdermal and Intradermal delivery of therapeutic agents: application of physical technologies**. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2011.

BARTIKOVA, Hana *et al.* Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 14, p. 2478–2494, 2014.

BEZERRA, Mariana Palmeira; RODRIGUES, Leticia Norma Carpentieri.

Quality By Design (Qbd) Como Ferramenta Para Otimização Dos Processos Farmacêuticos. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 5–12, 2017.

BOHLMANN, Jörg; MEYER-GAUEN, Gilbert; CROTEAU, Rodney. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 8, p. 4126–4133, 1998.

BRASIL. **Instrução Normativa - IN nº 47, de 21 de agosto de 2019**. [S. l.], 2019.

BRASIL. Portaria nº 1083, de 02 de outubro de 2012. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas de dor crônica. **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde**: Brazil, 2012.

BRASIL. **Resolução RDC nº 658, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Brazil: 2022.

BURSTEIN, Sumner H.; ZURIER, Robert B. Cannabinoids, Endocannabinoids, and Related Analogs in Inflammation. **The AAPS Journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 109–119, 2009.

CARVALHO, Ravana Carolina *et al.* Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study. **BrJP**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 331–338, 2018.

CASTILLO-HENRÍQUEZ, Luis *et al.* Quality by Design: A Suitable Methodology in Industrial Pharmacy for Costa Rican Universities. **Scientia Pharmaceutica**, [s. l.], v. 90, n. 2, 2022.

CATALISA - ICT. **Catalisa: catalise o potencial das suas pesquisas**. [S. l.]: SEBRAE, 2021. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/catalisa/ictedital>. Acesso em: 6 jan. 2023.

CATERINA, Michael J. TRP channel cannabinoid receptors in skin sensation, homeostasis, and inflammation. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 1107–1116, 2014.

CDC. **Arthritis-Related Statistics**. [S. l.], 2018. Disponível em: [https://www.cdc.gov/arthritis/data\\_statistics/arthritis-related-stats.htm](https://www.cdc.gov/arthritis/data_statistics/arthritis-related-stats.htm). .

CDC. **Osteoarthritis (OA)**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.htm>. .

CERTI. **Guia prático do TRL**. [S. l.: s. n.], 2023.

CHANG, Hyun-Joo *et al.* Protective effect of  $\beta$ -caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v.

16, n. 6, p. 471–480, 2013.

CHELLAPA, Padmadevi *et al.* Nanoemulsion and nanoemulgel as a topical formulation. **IOSR Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 43–47, 2015.

CHENG, Yujie; DONG, Zhi; LIU, Sha.  $\beta$ -caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 mice through CB2 receptor activation and the PPAR $\gamma$  pathway. **Pharmacology**, [s. l.], v. 94, n. 1–2, p. 1–12, 2014.

CHOU, Ting-chao. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006.

CHOU, Ting-Chao; MARTIN, Nick. **CompuSyn**. Versão 1.0. Paramus, NJ. 07652 USA: ComboSyn, Inc., 2005. Disponível em: <https://www.combosyn.com/feature.html>.

CHOUDHURY, Hira *et al.* Recent Update on Nanoemulgel as Topical Drug Delivery System. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 7, p. 1736–1751, 2017.

COIMBRA, Ibsen Bellini; PLAPLER, Pérola Grinberg; DE CAMPOS, Gustavo Constantino. Generating evidence and understanding the treatment of osteoarthritis in Brazil: A study through Delphi methodology. **Clinics**, [s. l.], v. 74, p. 1–7, 2019.

CRUMMEY, A. *et al.* Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, [s. l.], v. 20, n. 1–2, p. 69–76, 1987.

DABBAGH, Sajjad Rahmani *et al.* 3D-printed microneedles in biomedical applications. **iScience**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 102012, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.102012>.

DE MATOS, Sheila Porto; LUCCA, Leticia G.; KOESTER, Letícia Scherer. Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. **Talanta**, [s. l.], v. 195, p. 204–214, 2019.

DEVANE, William A *et al.* Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **Science**, [s. l.], v. 258, p. 1946–1949, 1992.

DONNELLY, Ryan F. *et al.* Design, optimization and characterisation of polymeric microneedle arrays prepared by a novel laser-based micromoulding technique. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 41–57, 2011.

DONVITO, Giulia *et al.* The endogenous cannabinoid system: a budding source of targets for treating inflammatory and neuropathic pain. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 52–79, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2017.204>.

DUL, Maria *et al.* Assessing the risk of a clinically significant infection from a Microneedle Array Patch (MAP) product. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 361, n. June, p. 236–245, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.07.001>.

EL-LEITHY, Eman S.; IBRAHIM, Howida Kamal; SOROUR, Rania M. In vitro and in vivo evaluation of indomethacin nanoemulsion as a transdermal delivery system. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1010–1017, 2015.

ESCOBAR-CHÁVEZ, José Juan. **Current Technologies to Increase the Transdermal Delivery of Drugs**. Cuautitlán Izcalli: Bentham Books, 2010.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

FRANCOMANO, Fabrizio *et al.*  $\beta$ -caryophyllene: A sesquiterpene with countless biological properties. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 9, n. 24, 2019.

GÁBOR, Miklós. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. 1st. ed. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GERTSCH, Jürg *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 6, p. 9099–9104, 2008.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

HAO, Ying *et al.* Microneedles-based transdermal drug delivery systems: A review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1581–1597, 2017.

IASP. **Definitions of chronic pain syndromes**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/advocacy/definitions-of-chronic-pain-syndromes/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. **ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system**. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002871.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002871.pdf).

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. **ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical Development**. [S. l.: s. n.], 2009.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. **ICH Guideline Q9 on Quality Risk Management**. [S. l.: s. n.], 2006.

IRRERA, Natasha *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene Mitigates Collagen Antibody Induced Arthritis (CAIA) in Mice Through a Cross-Talk between CB2 and PPAR- $\gamma$  Receptors. **Biomolecules**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2019.

IZUMI, Erika *et al.* Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012.

JAISWAL, Manjit; DUDHE, Rupesh; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.

JANPHUANG, Pattanaphong *et al.* Polymer based microneedle patch fabricated using microinjection moulding. **MATEC Web of Conferences**, [s. l.], v. 192, p. 1–4, 2018.

JHA, Niraj Kumar *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene, a natural dietary CB2 receptor selective cannabinoid can be a candidate to target the trinity of infection, immunity, and inflammation in COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 12, n. May, p. 1–24, 2021.

JOHNSON, Ashley R.; PROCOPIO, Adam T. Low cost additive manufacturing of microneedle masters. **3D Printing in Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2019.

JOUNG, Eun Ji *et al.* Anti-inflammatory effect of ethanolic extract from *Myagropsis myagroides* on murine macrophages and mouse ear edema. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 12, 2012.

JUNG, Jae Hwan; JIN, Sung Giu. Microneedle for transdermal drug delivery: current trends and fabrication. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 503–517, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40005-021-00512-4>.

KAUR, Gurjot; BEDI, P M S; NARANG, Jasjeet K. Topical Nanoemulgel: A Novel Pathway for Investigating Alopecia. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, [s. l.], v. 08, n. 06, p. 6–10, 2017.

KAWABATA, Yohei *et al.* Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 420, n. 1, p. 1–10, 2011.

KHANOLKAR, Atmaram D.; MAKRIYANNIS, Alexandros. Structure-activity relationships of anandamide, an endogenous cannabinoid ligand. **Life Sciences**, [s. l.], v. 65, n. 6–7, p. 607–616, 1999.

KLAUKE, A. L. *et al.* The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 24, p. 608–620, 2014.

KREUTZ, Tainá *et al.* Hydrogel-thickened nanoemulsion containing amazonian Aniba canelilla (Kunth) Mez essential oil: Skin permeation and in vivo anti-inflammatory efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 87, n. March, 2023.

KRIEGER, Kevin J. *et al.* Simple and customizable method for fabrication of high-aspect ratio microneedle molds using low-cost 3D printing. **Microsystems and Nanoengineering**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41378-019-0088-8>.

KUPCZYK, Piotr; REICH, Adam; SZEPIETOWSKI, Jacek C. Cannabinoid system in the skin - A possible target for future therapies in dermatology. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 669–679, 2009.

LARIONOV, O. V.; COREY, E. J. An unconventional approach to the enantioselective synthesis of caryophylloids: synthesis of (–)- $\beta$ -caryophyllene. **Journal of Americal Chemical Society**, [s. l.], v. 130, p. 2954–2955, 2008.

LARRAÑETA, Eneko *et al.* A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 472, n. 1–2, p. 65–73, 2014.

LEE, Sang Ho *et al.* **Quality by Design (QbD) application for the pharmaceutical development process**. [S. l.]: Springer Nature Singapore, 2022-. ISSN 20936214.v. 52

LEE, Jeong W.; PARK, Jung Hwan; PRAUSNITZ, Mark R. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. **Biomaterials**, [s. l.], v. 29, n. 13, p. 2113–2124, 2008.

LIU, Hua *et al.* Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of  $\beta$ -caryophyllene/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 450, n. 1–2, p. 304–310, 2013.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 221, n. 1, p. 261–267, 1982.

LUCCA, Letícia G. *et al.* Nanoemulsification potentiates in vivo antiedematogenic effect of copaiba oil. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 583–590, 2017.

LUZURIAGA, Michael A. *et al.* Biodegradable 3D printed polymer microneedles for transdermal drug delivery. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1223–1230, 2018.

MEZA, Angel; LEHMANN, Christian. Betacaryophyllene – A

phytocannabinoid as potential therapeutic modality for human sepsis?. **Medical Hypotheses**, [s. l.], 2018.

MIKULAK, Stephen A.; VANGSNES, C. Thomas; NIMNI, Marcel E. Transdermal delivery and accumulation of indomethacin in subcutaneous tissues in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 153–158, 1998.

MIR, Maria *et al.* Enhancement in site-specific delivery of carvacrol for potential treatment of infected wounds using infection responsive nanoparticles loaded into dissolving microneedles: A proof of concept study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 147, n. December 2019, p. 57–68, 2020.

MIRANDA, Hugo F. *et al.* Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. **Pain**, [s. l.], 2006.

MIRANDA, Hugo F.; PINARDI, G. Lack of effect of naltrindole on the spinal synergism of morphine and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS). **Journal of Physiology and Pharmacology**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 71–76, 2009.

MÖDINGER, Yvonne *et al.* Enhanced oral bioavailability of  $\beta$ -Caryophyllene in healthy subjects using the VESIorb® formulation technology, a novel self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 9, 2022.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem CID: 3715**. [s. l.], 2019.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem CID: 5281515**. [s. l.], 2019.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. **Caryophyllene**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281515>. .

OJHA, Shreesh *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 428, n. 1–2, p. 59–70, 2016.

ORTIZ, Mario I. *et al.* The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], 2010.

PALMER, Sonya; KHANOLKAR, Atmaram; MAKRIYANNIS, Alexandros. Natural and synthetic endocannabinoids and their structure-activity relationships. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 6, p. 1381–1397, 2000.

PARK, Jung Hwan *et al.* Polymer particle-based micromolding to fabricate novel microstructures. **Biomedical Microdevices**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 223–234, 2007.

PATEL, Mitul; GOWDA, Shivalinge. In Vivo Animal Models in Preclinical Evaluation of Anti- Inflammatory Activity-A Review. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, [s. l.], v. 1, p. 2–1, 2012. Disponível em: [www.ijpras.com](http://www.ijpras.com).

PATH. **Microarray Patch Resources**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.path.org/programs/mdht/mapresources/>. Acesso em: 9 jan. 2023.

PETERLE, Jonathan Parisoto *et al.* Healing activity of hydrogel containing nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 148, 2020.

PETERLE, Jonathan Parisotto *et al.* Healing activity of hydrogel containing nanoemulsified  $\beta$ -caryophyllene. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 148, n. December 2019, p. 105318, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105318>.

PRAJAPATI, Bhupendra. “Nanoemulgel” Innovative Approach For Topical Gel Based Formulation. **Research and Reviews on Healthcare: Open Access Journal**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 18–23, 2018.

QUAN, Haoyuan *et al.* Bioactive materials photo-curing 3D printing technique and its challenges. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 110–115, 2020.

RÍO, Carmen del *et al.* The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 157, n. June, p. 122–133, 2018.

RODRIGUES, FabiolaF. G. *et al.* Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 161, 2012.

RZHEVSKIY, Alexey S. *et al.* Microneedles as the technique of drug delivery enhancement in diverse organs and tissues. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 270, p. 184–202, 2018.

S15. [s. l.],

SARPIETRO, Maria Grazia *et al.* Interaction of  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide with phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry study. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 600, p. 28–34, 2015.

SBED. **Campanha nacional pelo tratamento e controle da dor aguda e crônica**. São Paulo: Sociedade Brasileira para Estudo da Dor, 2019.

SBR. **Osteoartrite (artrose)**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/osteoartrite-artrose/>.

SCANDIFFIO, Rosaria *et al.* Protective effects of (E)- $\beta$ -caryophyllene (BCP) in chronic inflammation. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, p. 1–24, 2020.

SEBRAE. **Editais CATALISA - ICT para seleção de pesquisas com potencial de inovação**. [S. l.: s. n.], 2021.

SEBRAE. **Quem somos**. [S. l.], 2023. Disponível em: [https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/canais\\_adicionais/conheca\\_quemsomos](https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/canais_adicionais/conheca_quemsomos). Acesso em: 6 jan. 2023.

SHAKEEL, Faiyaz *et al.* Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 953–974, 2012.

SHAKEEL, Faiyaz *et al.* Preparation and in vivo evaluation of indomethacin loaded true nanoemulsions. **Scientia Pharmaceutica**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 47–56, 2010.

SHARMA, C *et al.* Polypharmacological properties and therapeutic potential of  $\beta$ -caryophyllene: a dietary phytocannabinoid of pharmaceutical promise. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 3237–3264, 2016.

SHARMA, Charu *et al.* Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of  $\beta$ -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 3237–3264, 2016.

SINGH, Yuvraj *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 252, p. 28–49, 2017.

SOTTO, Antonella Di *et al.* Inhibition by  $\beta$ -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 699, p. 23–28, 2010.

SRIVASTAVA, Praveen K.; THAKKAR, Hetal P. QbD-driven development of dissolving microneedle patch loaded with ultradeformable liposomes encapsulated Noopept: Exploring a patient friendly, once-daily option to manage dementia. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 164, n. June, p. 105909, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105909>.

SRIVASTAVA, Praveen K.; THAKKAR, Hetal P. Vinpocetine loaded ultradeformable liposomes as fast dissolving microneedle patch: Tackling treatment challenges of dementia. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 156, n. September, p. 176–190, 2020.

STRATEGIC MARKET RESEARCH. **Microneedle Drug Delivery Systems**

**Market: By Type (Solid, Hollow, Dissolving, Coated, Others), By Material (Silicon, Metal, Polymer, Others), By Application (Dermatology, Drug Delivery, Pain Management, Cancer Therapy, Vaccine Delivery, Others), By Geogra.** New York: [s. n.], 2021. Disponível em: <https://www.strategicmarketresearch.com/market-report/microneedle-drug-delivery-systems-market>. Acesso em: 23 fev. 2023.

TALLARIDA, R. J. An Overview of Drug Combination Analysis with Isobolograms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 319, n. 1, p. 1–7, 2006.

TALLARIDA, Ronald J. Drug synergism: its detection and applications. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 298, n. 3, p. 865–872, 2001.

TALLARIDA, Ronald. **Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis**. London: CHAPMAN & HALL/CRC, 2000.

TALLARIDA, R J *et al.* Response surface analysis of synergism between morphine and clonidine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 289, n. 1, p. 8–13, 1999.

TALLARIDA, Ronald J. The interaction index: A measure of drug synergism. **Pain**, [s. l.], v. 98, p. 163–168, 2002.

TÓTH, Kinga Fanni *et al.* Cannabinoid signaling in the skin: Therapeutic potential of the “c(ut)annabinoid” system. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 1–56, 2019.

TREEDE, Rolf-detlef *et al.* Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-11). **Pain**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 19–27, 2019.

TUBARO, A. *et al.* The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, [s. l.], v. 17, n. 3–4, p. 347–349, 1985.

WAGHULE, Tejashree *et al.* Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 109, n. September 2018, p. 1249–1258, 2019.

WANG, Jie *et al.* Preparation of microneedle array mold based on mems lithography technology. **Micromachines**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–13, 2021.

WEIMER, Patrícia *et al.* A comparative study between Copaifera multijuga oleoresin and its main compounds carried in topical nanoemulgels aiming to substantiate the application in pharmaceutical formulations. **No prelo**, [s. l.], 2020.

WEIMER, Patrícia *et al.* Correlation between the skin permeation profile of the synthetic sesquiterpene compounds, beta-Caryophyllene and caryophyllene oxide, and the antiedematogenic activity by topical application of nanoemulgels. **Biomolecules**, [s.

*l.*], v. 12, n. 8, 2022.

WEIMER, Patrícia; ROSSI, Rochele Cassanta; KOESTER, Letícia Scherer. Dissolving microneedles developed in association with nanosystems: A scoping review on the quality parameters of these emerging systems for drug or protein transdermal delivery. **Pharmaceutics**, [*s. l.*], v. 13, n. 10, 2021.

WINTER, Charles A; RISLEY, Edwin A; NUSS, George W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Experimental Biology and Medicine**, [*s. l.*], v. 111, p. 544–547, 1962.

XU, Kangtai *et al.* Microglial cannabinoid CB2 receptors in pain modulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [*s. l.*], v. 24, n. 3, 2023.

YOON, Seok Bin *et al.* Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, [*s. l.*], v. 125, n. 2, p. 286–290, 2009.

YOUNG, J. M. *et al.* The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, [*s. l.*], v. 82, n. 4, p. 367–371, 1984.

YU, Lawrence X. *et al.* Understanding pharmaceutical quality by design. **AAPS Journal**, [*s. l.*], v. 16, n. 4, p. 771–783, 2014.



## **APÊNDICE A – DESCRIÇÃO DO RECONHECIMENTO DO ARTIGO DE REVISÃO PELO PATH CENTER OF EXCELLENCE FOR MICROARRAY PATCH TECHNOLOGY**

O PATH *Center of Excellence for Microarray Patch Technology* foi fundado em 1977, inicialmente com o nome de *Program for the Introduction and Adaptation of Contraceptive Technology* (PIACT), sendo renomeado para PATH em 1981. Atualmente, o PATH compreende equipes de pesquisadores, investidores e instituições parceiras presentes em mais de 70 países, que atuam em práticas para promoção da saúde, objetivando o avanço da humanidade. Neste contexto, o PATH emprega esforços no desenvolvimento de microagulhas para entrega de vacinas e medicamentos essenciais em ambientes de poucos recursos (PATH, 2022). Ademais, o PATH classifica os adesivos transdérmicos que empregam microagulhas como uma tecnologia disruptiva, com base em quatro premissas:

- a) Aumento da cobertura e redução dos custos programáticos (em comparação às práticas de imunizações usuais);
- b) Entrega de vacinas e fármacos sem agulhas, reduzindo o risco associado aos utensílios perfurocortantes;
- c) Aumento da termoestabilidade, reduzindo os custos com refrigeração durante transporte e armazenamento e permitindo o acesso às áreas remotas;
- d) Facilidade de aplicação, incluindo a autoadministração.

Apesar do enfoque em plataformas para imunização, a PATH monitora grupos de pesquisa e instituições que trabalham no desenvolvimento de microagulhas, formando um centro que atua para o aprimoramento da produção e desenvolvimento de microagulhas, aspectos regulatórios, disseminação dessa tecnologia e estratégias de negócio. Após a publicação da revisão de escopo, a PATH recomendou a revisão para a rede de pesquisadores e incluiu a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



## APÊNDICE B - PARTICIPAÇÃO NO EDITAL CATALISA - ICT

O Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) foi instituído em 1972 com o objetivo de fomentar o empreendedorismo brasileiro, por meio do apoio às micro e pequenas empresas e empreendedores individuais. Desde a sua criação até 1990, o SEBRAE constituía uma entidade pública. Após a publicação do decreto nº 99.570, de 9 de outubro de 1990, o SEBRAE tornou-se uma instituição privada sem fins lucrativos, sustentada por repasses financeiros das maiores empresas do país. Atualmente, o SEBRAE conta com uma estrutura diversificada para o atendimento dos empreendedores, contando com mais de 700 pontos de atendimento físico e plataformas online. Neste contexto, esta instituição fomenta e capacita o empreendedorismo, buscando promover o desenvolvimento econômico sustentável no país através de parceria público-privada, acesso ao crédito e à inovação, realização de feiras e programas de capacitação (SEBRAE, 2023).

Entre os programas de capacitação recentes, em 2020, o SEBRAE lançou o CATALISA – ICT (Instituição Científica, Tecnológica e de Inovação). Alinhado à tendência de criação de *spin-offs* a partir da pesquisa acadêmica e estímulo ao empreendedorismo vinculado à ciência, como promovido pelo programa Doutor Empreendedor em parceria entre as Fundações de Amparo à Pesquisa estaduais e o SEBRAE, o CATALISA – ICT surgiu pela parceria com entidades do ecossistema de inovação. Estruturado em quatro etapas e com previsão para execução entre 2021 e 2024, o respectivo Programa objetivou acelerar e fomentar negócios inovadores de base tecnológica, para geração de riqueza e bem-estar da sociedade. As primeiras etapas foram elaboradas para inserção de mestres e doutores em pequenos negócios, como agentes de criação de empresas, assim como, para estimular a transferência de tecnologia de pesquisadores para as empresas (CATALISA - ICT, 2021). Para tal, a primeira etapa denominada de Mobilizar para Inovar, contemplou a submissão de propostas com potencial de inovação por mestres ou doutores (formados ou em formação) (SEBRAE, 2021).

As pesquisas com potencial de inovação são definidas pela aplicação de conceitos tecnológicos com enfoque na resolução de problemas reais do mercado ou da sociedade.

Portanto, este gênero de pesquisa se fundamenta na criação de novos dispositivos, ferramentas, produtos ou processos com potencial de impacto social ou econômico. Ao se tratar do aprimoramento de processos ou produtos, a inovação tecnológica deverá ser empregada na iniciativa de garantir um ganho efetivo de qualidade ou desempenho, quando comparados aos produtos e processos usuais. Importante ressaltar, portanto, que o pilar central da inovação tecnológica se sustenta na demanda apresentada pela sociedade ou mercado, ou seja, a resolução do problema suscita no bem-estar econômico, social e ambiental (SEBRAE, 2021).

Para inscrição na primeira etapa, as propostas deveriam contemplar uma necessidade real do mercado ou sociedade, se enquadrar em uma das áreas estratégicas (por exemplo, saúde), não agredir o meio ambiente e a saúde pública. Após aprovação, os membros das propostas selecionadas receberiam capacitações, incluindo *workshops*, entrevistas com especialista do ecossistema de inovação brasileiro e conteúdos elaborados para desenvolvimento de habilidades quanto aos temas de atitude empreendedora, inovação aberta, gestão da inovação, prospecção tecnológica e plano de inovação (SEBRAE, 2021).

No âmbito empreendedor, o plano de inovação corresponde a um documento estratégico de caráter orientativo voltado ao aproveitamento das oportunidades de inovação, sendo estas geradas a partir da pesquisa. Desta forma, ao longo do período de dois meses de capacitação, foram apresentadas e desenvolvidas ferramentas para elaboração do plano de inovação.

### **Ferramentas desenvolvidas durante a capacitação Mobilizar para Inovar**

As ferramentas, descritas no Quadro 1, foram elaboradas pela equipe do CATALISA – ICT (SEBRAE e Wylinka), permitindo a aplicação e compreensão dos conhecimentos desenvolvidos pelos pesquisadores. De forma didática, conforme exemplos nos Adendos A e B (Matriz C.S.D. e pesquisa desk, respectivamente), os *templates* de cada ferramenta foram preenchidos pelas equipes e discutidos durante encontros síncronos com a equipe organizadora. No Quadro 1 também são abordados os principais objetivos e tópicos de cada ferramenta. A ordem apresentada corresponde

a ordem adotada na capacitação. Importante ressaltar que as ferramentas quando aplicadas na ordem sequencial conferem maior coesão entre as informações para posterior elaboração do plano de inovação.

### **Contribuição das ferramentas no planejamento experimental do dispositivo transdérmico**

Inicialmente, a capacitação CATALISA – ICT se desenvolveu na forma de uma imersão nos temas relacionados ao ecossistema empreendedor. Por exemplo, foram apresentados o Sistema Nacional de Inovação, modelo tríplice hélice e núcleos de inovação tecnológica (NIT). A tríplice hélice, formada pela academia, indústria e Estado, apoia a inovação e o desenvolvimento tecnológico e econômico e é amparada pelos NITs. Neste contexto, os primeiros passos serviram para familiarizar o pesquisador com a infraestrutura brasileira de inovação e informar oportunidades muitas vezes inexploradas na pesquisa acadêmica, por exemplo, elaboração de pesquisas para produção de patentes ou transferência de tecnologia.

As ferramentas, conforme ilustrado nas Figuras 1 e 2, consistiam em recursos visuais e passíveis de colaboração da equipe de forma integrativa e dinâmica e podem ser facilmente incorporadas à rotina da pesquisa acadêmica. Em relação às doze ferramentas trabalhadas, destacam-se a Tecnologia, Pesquisa Desk, Pesquisa Etnográfica, Mapa de Empatia e Matriz de Riscos, uma vez que os temas elaborados nessas ferramentas são aprofundados com menor frequência na pesquisa acadêmica. Principalmente, no que tange à estruturação de projetos com embasamento no vocabulário empreendedor e validação da tecnologia frente a uma necessidade factual da sociedade. Ao passo que a pesquisa básica e provas de conceito são extremamente relevantes para o desenvolvimento da ciência e de novas estratégias terapêuticas, aqui, se refere à aproximação da pesquisa para captação de recursos do ecossistema de inovação e investidores.

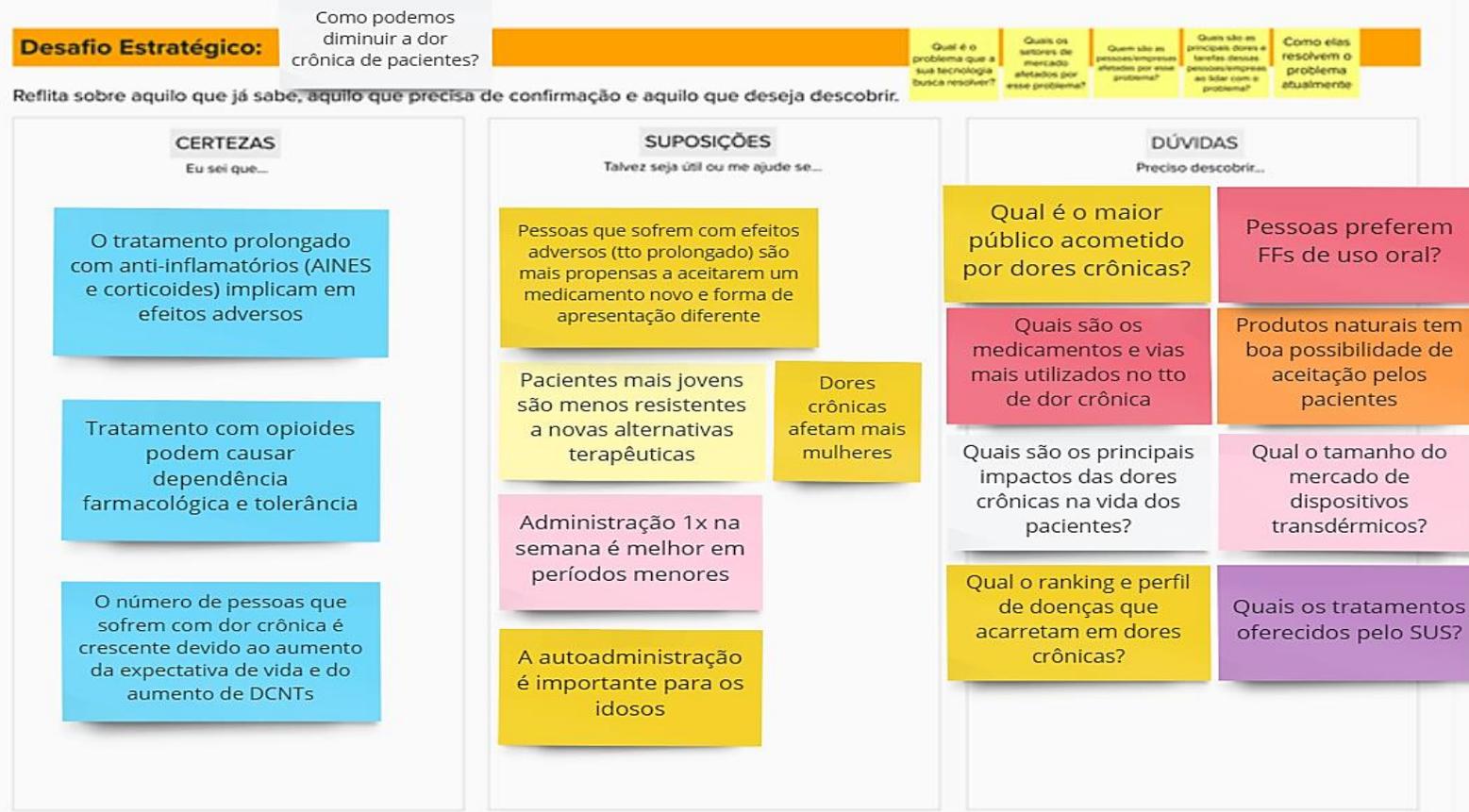
Quadro 1 – Ferramentas desenvolvidas e apresentadas durante a capacitação CATALISA – ICT, Mobilizar para Inovar

Ferramenta	Objetivo	Tópicos abordados
<b>Tecnologia</b>	Caracterizar o tipo de tecnologia e o estágio de desenvolvimento	A etapa inicial é conduzida para caracterizar a tecnologia, suas possíveis aplicações, identificar tecnologias semelhantes disponíveis no mercado/sociedade, além de classificar o nível de desenvolvimento tecnológico (TRL) e elencar os próximos passos. A definição da tecnologia auxilia no estabelecimento do desafio estratégico.
<b>Matriz C.S.D.</b>	Definir os conhecimentos prévios e aquilo que se deseja descobrir	Com base no desafio estratégico, são apontadas certezas (C), suposições (S) e dúvidas (D).
<b>Pesquisa Desk</b>	Pesquisar as suposições e dúvidas elencadas na matriz C.S.D.	A pesquisa desk é conduzida em fontes de consulta livres e diversificadas, por exemplo, websites, conteúdos de associações e notícias (para além da literatura científica). Após a sua realização é possível estabelecer onde estão as maiores necessidades da pesquisa, como a estratégia de recrutamento da pesquisa etnográfica deverá ser conduzida e categorias para o roteiro de entrevistas.
<b>Pesquisa Etnográfica</b>	Compreender comportamentos e situações relacionadas (ambiente real/prático) ao desafio estratégico	A pesquisa etnográfica é dividida em três guias de campo: (1) entrevista, (2) imersão e (3) observação. Em conjunto, estes guias proporcionam a validação do problema e possibilitam a identificação de insights.
<b>Representação visual</b>	Criar uma representação visual dos elementos que compõem o contexto do desafio	Por meio da representação visual podem ser visualizados os cenários complexos e pontos de interação entre os pontos centrais do desafio e os atores (ex. paciente).
<b>Temas e insights</b>	Compartilhar narrativas coletadas durante a pesquisa etnográfica	Ao agrupar as observações/narrativas nas categorias de falas, fatos, sentimentos e necessidades, é possível identificar grupos e, a partir destes criar aprendizados e insights.
<b>Mapa de empatia</b>	Criar personas com base no desafio estratégico	Para cada persona são definidos seus pensamentos, sentimentos (preocupações), possíveis comportamentos, suas interações com o ambiente e amigos, suas dores e são estipulados os seus ganhos com aplicação da tecnologia em desenvolvimento.

(continua)

(continuação)

<b>Brainstorm</b>	Vislumbrar novos potenciais a serem explorados	Nesta ferramenta são conduzidas sessões de brainstorming de forma individual e coletiva entre os membros da equipe.
<b>Hipótese de valor</b>	Avaliar se a proposta e tecnologia desenvolvidas realmente conferem valor ao usuário	O estabelecimento da hipótese de valor estabelece quem são os usuários e como estes se beneficiarão com a utilização da tecnologia. A partir das hipóteses são determinados os ensaios e métodos para experimentação da tecnologia.
<b>Matriz de priorização</b>	Selecionar e priorizar ideias a partir dos resultados do brainstorming	As ideias levantadas na etapa de brainstorming são elencadas de 1 a 6 (seis melhores ideias), após, as ideias são dispostas na matriz de priorização. A matriz é formada pelos eixos de impacto (Y, variando de baixo a alto) e complexibilidade (X, de baixa a média). A ideia disposta no quadrante de alto impacto e baixa complexidade deve ser priorizada na etapa de priorização.
<b>Protótipo e feedback</b>	Desenvolver um protótipo da ideia selecionada pela aplicação da matriz de priorização e avaliar o feedback pelo público	O protótipo avaliado está associado ao nível de desenvolvimento tecnológico, portanto, o protótipo poderá compreender uma versão do <i>minimum viable product</i> (MVP), um vídeo/folder explicativo sobre a tecnologia e suas aplicações. Então, o protótipo é apresentado ao público-alvo e são coletadas suas percepções e a partir destas são listadas as alterações necessárias na próxima versão do protótipo.
<b>Matriz de riscos</b>	Compreender o nível do impacto e probabilidade de ocorrência de situações hipotéticas, mas que apresentam risco potencial na execução da tecnologia	As situações de riscos são elencadas e classificadas de acordo com a probabilidade de ocorrência (baixa a alta) e impacto (baixo a alto). A disposição visual das situações na matriz auxilia na rápida identificação de riscos altos (alta ocorrência e alto impacto), risco moderado (nível médio de ocorrência e impacto) e risco baixo (baixa ocorrência e baixo impacto). Desta forma, as situações de alto risco devem ser controladas (indicadores de risco), mensuradas e serem incluídas nos processos de toma de decisão.
<b>Plano de inovação</b>	Orientar como se dará a exploração das tecnologias e suas oportunidades de aplicação	Este documento contempla a matriz de risco, plano de inovação propriamente dito e plano de ação para os próximos 12 meses. No plano de inovação são contempladas a justificativa, persona, proposta de valor, objetivos, indicadores, metas, hipóteses, equipe, descrição da solução proposta, restrições e barreiras externas e parcerias estratégicas. Sendo assim, as atividades anteriores apresentadas nesse quadro culminam da elaboração do plano de inovação.



AINE: anti-inflamatório não esteroide; FF: formas farmacêuticas; TTO: tratamento



Figura 1 - Matriz C.S.D. conduzida durante capacitação CATALISA – ICT, Mobilizar para Inovar

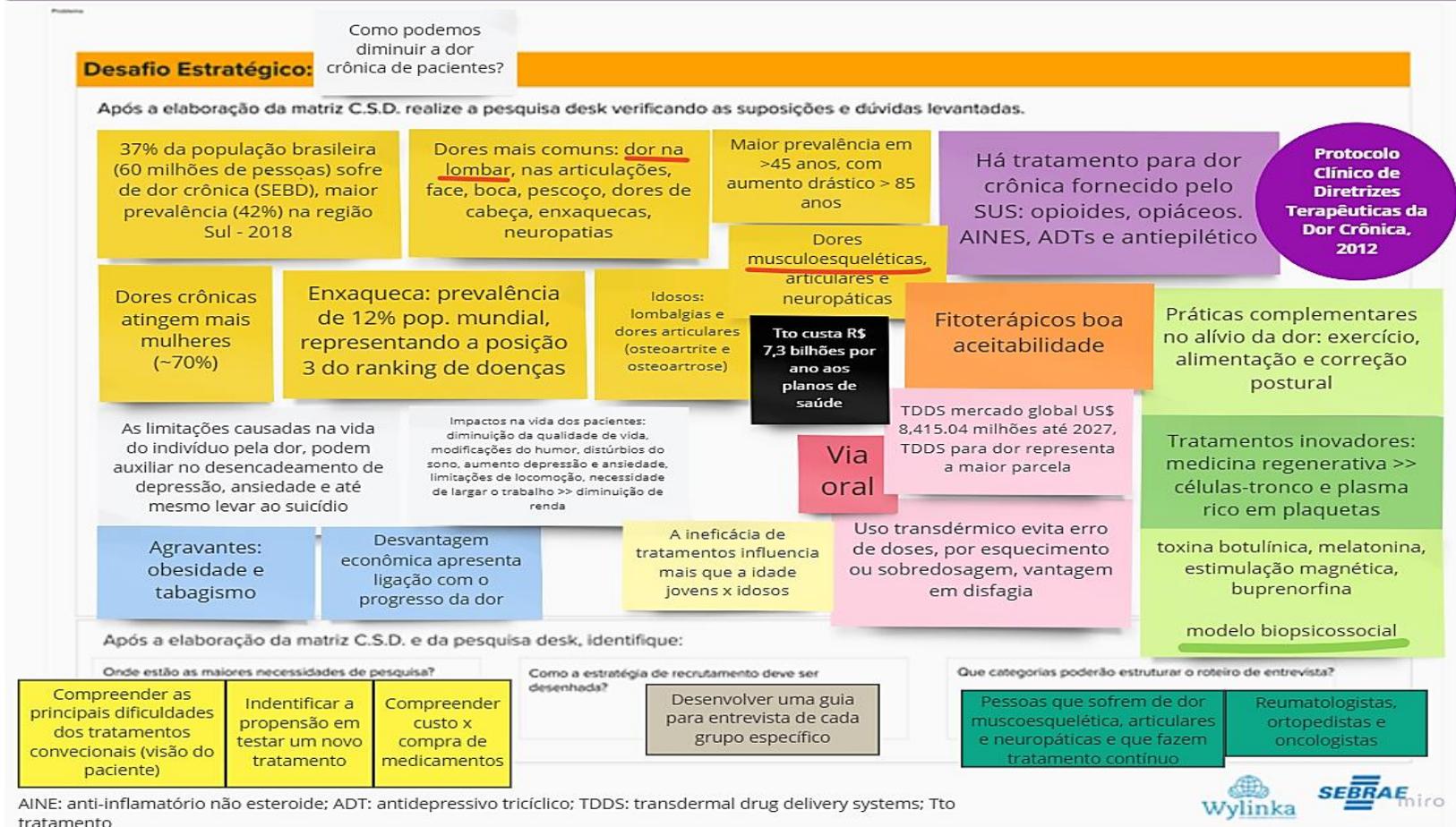


Figura 2 – Pesquisa DESK conduzida durante capacitação CATALISA – ICT, Mobilizar para Inovar

Para participação na capacitação foi submetida a proposta “Desenvolvimento de dispositivo transdérmico para administração de compostos terpênicos nanoestruturados no tratamento de dor inflamatória crônica”. No desenvolvimento do dispositivo transdérmico estava previsto aplicar duas tecnologias centrais, que são: a confecção de microagulhas e a elaboração de sistema nanoestruturado para veiculação e liberação controlada do composto terpênico de origem vegetal. Inicialmente foi previsto elaborar diferentes designs e formatos das microagulhas, compostas por polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, os quais espera-se apresentar mecanismo de liberação por dissolução. Em contato com a pele, as microagulhas devem se dissolver e liberar o nanosistema contendo o composto terpênico próximo à circulação sanguínea. Desta forma, a associação de um mecanismo físico (microagulhas) com um químico (nanosistema) potencializa a absorção do composto terpênico de caráter lipofílico, possibilitando ainda aplicação próxima ao local do organismo acometido pela dor inflamatória, como as articulações.

Neste contexto, a tecnologia da proposta compreende a associação de microagulhas e sistemas nanoestruturados. O nível de desenvolvimento tecnológico (TRL - *Technology Readiness Levels*) do dispositivo se classifica em nível 3, pois ambas as tecnologias envolvidas já tiveram seus conceitos validados em outros estudos. Conforme a NBR ISO 16290:2015, o nível TRL 3 compreende a etapa de desenvolvimento analítico e experimental da função crítica da tecnologia, ou seja, o TRL 3 inicia a fase de desenvolvimento experimental (ABNT, 2015). Ademais, conforme demonstrado na Figura 3, entre os níveis 3 e 6 são conduzidos testes em escala laboratorial e simulações para posterior prototipação e aumento de escala. Portanto, as ferramentas do Quadro 1, visam identificar o TRL inicial e traçar estratégias para avançar o a tecnologia dentro do ciclo de vida do projeto, estando a nomenclatura apresentada diretamente relacionada à gestão de projetos de inovação.

Na pesquisa acadêmica é usual a exploração dos TRLs de 1 a 4, contudo, para a geração de *spin-offs* e transferência de tecnologia para empresas torna-se importante o alcance de níveis superiores de TRL, até mesmo para a captação de recursos compatíveis. Enquanto os níveis iniciais de TRL requerem menos recursos e são usualmente contemplados em editais de agências de fomento e subvenção, os níveis

superiores requerem aproximadamente de 100 a 10000 vezes o valor inicial empregado (entre desenvolvimento experimental e comercialização). Por exemplo, a Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (EMBRAPII) apoia o desenvolvimento de tecnologias entre TRL 3 e 6, enquanto o BNDES Funtec apoia níveis entre 3 e 8. Reconhecer fontes de investimentos e o ecossistema de inovação é essencial para transpor o hiato, denominado como “vale da morte da inovação” entre a pesquisa essencialmente acadêmica (TRL 1 a 3) e o desenvolvimento operacional (TRL 7 a 9) (CERTI, 2023).

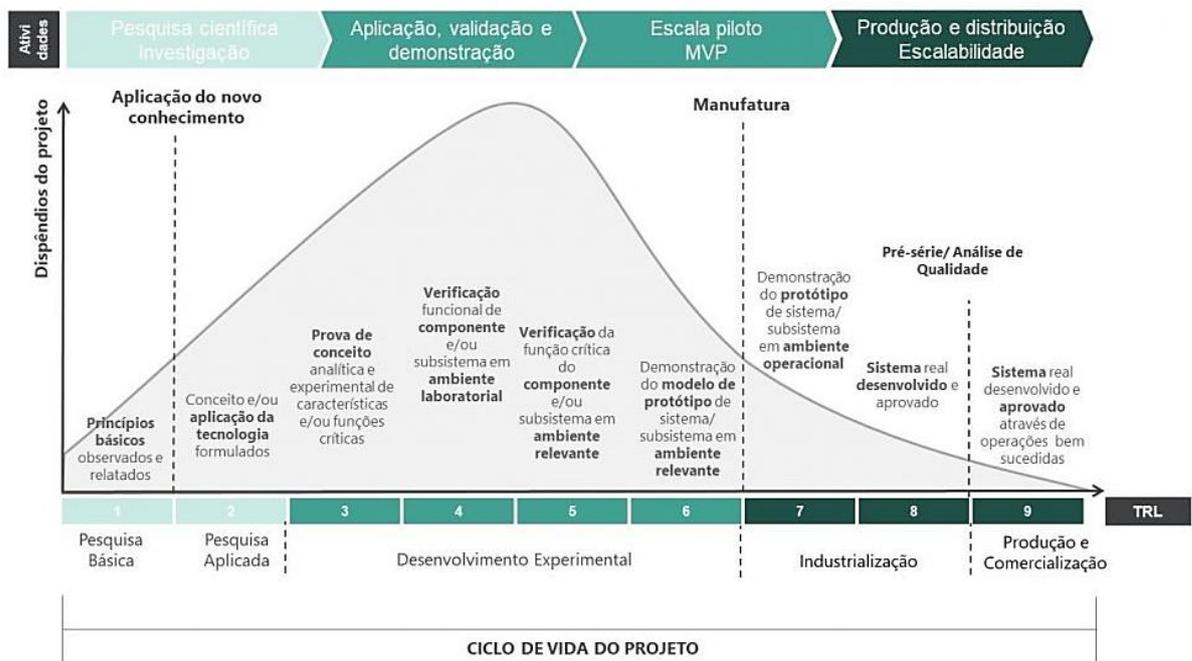


Figura 3 – TRL e o ciclo de vida do projeto.

Fonte: ABGI, 2023

Em relação à pesquisa Desk, a qual possibilita a consulta ampliada de informações, incluindo fontes não usuais na pesquisa acadêmica como websites, *meeting papers*, blogs, entrevistas de especialistas (literatura cinzenta), entre outras, essa ferramenta possibilita vislumbrar *insights*. Por exemplo, ao realizar a pesquisa Desk foi identificada a prevalência de dor crônica no país, os tipos mais prevalentes e características dos pacientes na visão biopsicossocial. Aproximadamente 37% da população brasileira é acometida pela dor crônica, sendo mais prevalente na região Sul

(42%) do Brasil e em mulheres. Entre as dores mais prevalentes destacam-se as dores de origem nociceptiva, principalmente na região lombar e articulações (CARVALHO *et al.*, 2018; SBED, 2019).

Tanto a pesquisa Desk, quanto a pesquisa etnográfica serviram para identificar um componente importante nesse projeto, a incapacitação gerada ao indivíduo pela dor crônica. As restrições de movimentos e de atividades impelidas pela dor crônica, tornam os pacientes mais propensos a transtornos de ansiedade e depressão, mas ao mesmo tempo, mais dispostos à experimentação de novas terapias. Ademais, tais informações auxiliam na construção de personas pelo mapa de empatia, que, por sua vez, podem direcionar a elaboração de materiais para divulgação da nova tecnologia de forma mais assertiva ao público-alvo. Nesse cenário, é elaborada para despertar o interesse do usuário e dos possíveis investidores, diferindo da comunicação científica usual.

Traçando um paralelo entre as ferramentas do CATALISA – ICT e os elementos de *Quality by Design*, apresentados na seção de Fundamentação Teórica, é possível sugerir que, enquanto as ferramentas do CATALISA focam nas características/condições do usuário e na adequação da tecnologia para uma demanda de mercado, as ferramentas de QbD auxiliam na adequação do produto ao uso pretendido. Além disso, as ferramentas de QbD podem ser empregadas na otimização do desenvolvimento, promovendo o avanço entre os níveis de TRL, pautado na eficácia, qualidade e segurança do dispositivo transdérmico. O processo de otimização também é útil para identificação dos pontos críticos de controle e definição dos *Key Performance Indicators* (KPI) a serem utilizados na manufatura em média e larga escala. Juntas essas ferramentas, conforme ilustrado na Figura 4, aumentam a probabilidade de transferência de tecnologia, adaptabilidade dos processos, assertividade às demandas de mercado e maior aceitabilidade da nova tecnologia.

Ferramentas CATALISA-ICT

Elementos e ferramentas QbD



Figura 4 – Relação entre ferramentas CATALISA – ICT e *Quality by Design* no desenvolvimento de novas tecnologias.



**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO  
DE ANIMAIS – PROJETO Nº 40087**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Projeto Nº: 40087**

**TÍTULO: AVALIACAO DO POTENCIAL IRRITANTE, ANTIANGIOGENICO E INSULINO-MIMETICO DE SUBSTANCIAS NATURAIS, SINTETICAS E/OU ASSOCIACOES VEICULADAS OU NAO EM SISTEMAS TECNOLOGICOS EM MODELOS IN OVO**

**Equipe UFRGS:**

Nome: LETICIA SCHERER KOESTER

Coordenador - Início: 01/01/2021 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: Patricia Weimer

Ensino: doutorado - Início: 01/01/2021 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: SHEILA PORTO DE MATOS

Ensino: doutorado - Início: 01/01/2021 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: Tainá Kreutz

Ensino: doutorado - Início: 01/01/2021 Previsão de término: 31/12/2022

A Comissão de Ética No Uso de Animais aprovou o projeto em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 4.332 ovos embrionados de galinha, provenientes dos aviários Grupo Vibra (Razão Social: Vibra Agroindustrial S/A; CNPJ: 93.586.303/0001-19; Endereço: Rodovia RS 124, Km 02, S/N, bairro Estação, Montenegro – RS, CEP 95780-000) e Mercoaves (Razão Social: Mercoaves Comércio de Aves Ltda; CNPJ: 04.137.827/0001-00; Endereço: Estrada Bom Fim Baixo, nº 1156, bairro Bom Fim Baixo, Bom Princípio – RS, CEP 95765-000). Os ovos serão transportados até a Faculdade de Farmácia seguindo normativas sanitárias e serão recebidos ao longo de 24 meses. O projeto foi aprovado de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

**Porto Alegre, 04 de março de 2021**

  
Alexandre Tavares Duarte de Oliveira  
Coordenador da CEUA/UFRGS



## ANEXO B – ADENDO AO PROJETO Nº 40087



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS

Porto Alegre, 04 de agosto de 2022.

De: Profa. Dra. Profa. Letícia Scherer Koester

Para: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS)

### ADENDO

**Projeto: 40087 - Avaliação do potencial irritante, antiangiogênico e insulino-mimético de substâncias naturais, sintéticas e/ou associações veiculadas ou não em sistemas tecnológicos em modelos in ovo**

I - Solicitamos a troca do local de aquisição dos ovos embrionados de galinha de Grupo Vibra (Montenegro, Rio Grande do Sul, CEP 95780-000) e Mercoaves (Bom Princípio, Rio Grande do Sul, CEP 95765-000) para Aviário de Ensino e Pesquisa UFRGS (Av. Bento Gonçalves, 7712 - Agronomia, Porto Alegre, CEP 91540-000, Rio Grande do Sul), pois as instituições constantes no projeto não poderão fornecer os ovos embrionados.

II - Também solicitamos a troca de grupos experimentais, conforme tabela abaixo, sem alteração do número total de ovos previstos.

Grupo constante no projeto	Grupo substituto
Hidrogel branco de HPMC	Nanoemulsão catiônica com poloxâmero
Hidrogel de HPMC contendo 3-O-metilquercetina	Nanoemulsão catiônica com poloxâmero e dexametasona
Hidrogel de HPMC contendo 3-O-metilquercetina e $\beta$ -ciclodextrina	Nanoemulsão aniônica com quitosana
Hidrogel de HPMC contendo 3-O-metilquercetina e Hidroxi propil $\beta$ -ciclodextrina	Nanoemulsão aniônica com quitosana e dexametasona

**Informamos que dos 4332 ovos aprovados no projeto, foram utilizados 240 ovos até o momento.**

Atenciosamente,

Dra. Letícia Scherer Koester



# ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PROJETO Nº 39482

	<b>U F R G S</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 39482

**Título:** Investigação do potencial efeito anti-inflamatório sinérgico de &#946;-cariofileno e indometacina veiculados em nanoemulgéis de uso tópico

**Vigência:** 01/07/2020 à 31/08/2023

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

LETICIA SCHERER KOESTER - coordenador desde 01/07/2020  
Tainá Kreutz - desde 01/07/2020  
Patricia Weimer - desde 01/07/2020  
BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - pesquisador desde 01/07/2020

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 28/09/2020 - Reunião via Webconferência - Sistema UFRGS - Mconf, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 229 camundongos CF-1, machos, aproximadamente quatro semanas, de origem CREAL-UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Quinta-Feira, 24 de Fevereiro de 2022

  
ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética



## ANEXO D – ADENDO AO PROJETO N° 39482



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS

Porto Alegre, 01 de fevereiro de 2022.

De: Profa. Dra. Profa. Leticia Scherer Koester

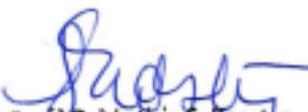
Para: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS)

### ADENDO

**Projeto: 39482 - Investigação do potencial efeito anti-inflamatório sinérgico de  $\beta$ -cariofileno e indometacina veiculados em nanoemulgéis de uso tópico**

Solicitamos a troca do local de aquisição dos camundongos de IBEX FEEVALE (Inovação em Biotério de Experimentação, Novo Hamburgo, CEP 95690-000, Rio Grande do Sul) para Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.300, Porto Alegre, CEP 91509-900, Rio Grande do Sul), pois a instituição constante no projeto não poderá fornecer os animais em tempo hábil para execução das atividades (2022/1). Também solicitamos a troca da linhagem dos camundongos de Balb-C para CF-1, totalizando 229 animais, uma vez que a linhagem Balb-C não é fornecida pelo CREAL. Salientamos que os experimentos não foram iniciados, portanto, todos os experimentos serão conduzido com a linhagem CF-1, mediante autorização prévia da CEUA-UFRGS.

Atenciosamente,

  
Prof.ª Dr.ª Leticia S. Koester  
Dpt. de Prod. e Contr. Med.  
Fac. Farmácia / UFRGS