



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE γ -TERPINENO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CARDIOVASCULAR E ANTIOXIDANTE

KÁSSIA KAROLINE LEAL BARROS GOMES

TERESINA – PI

AGOSTO - 2016

KÁSSIA KAROLINE LEAL BARROS GOMES

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE γ -TERPINENO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CARDIOVASCULAR E ANTIOXIDANTE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Co-Orientadora: Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira

TERESINA – PI

AGOSTO – 2016

Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde

G633d Gomes, Kássia Karoline Leal Barros.
Desenvolvimento de nanocápsulas de γ -terpineno e avaliação da atividade cardiovascular e antioxidante / Kássia Karoline Leal Barros Gomes. -- Teresina, 2016.
119 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.
“Orientadora: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim.”
Bibliografia

1. γ -terpineno. 2. Nanotecnologia. 3. Nanocápsulas. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.53

Kássia Karoline Leal Barros Gomes

Desenvolvimento de nanocápsulas de γ -terpineno e avaliação da atividade cardiovascular e antioxidante

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (Orientadora) – CCS/UFPI

Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CCS/UFPI

(Examinador interno)

Profa. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia–PPGF/UFPI

(Examinador externo)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRO-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

DEDICATÓRIA

Dedico este Trabalho a Deus por ter me guiado até aqui e em especial a minha família que acreditou em mim e aos meus bons e fiéis amigos que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a minha de fonte de águas vivas e que transborda em mim todo seu amor e capacita-me a todo instante.

A minha amada família por ser o reflexo de Deus em minha vida, por me apoiar incondicionalmente por momentos difíceis não me deixar desistir dos meus sonhos, muito obrigada minha mãe Normélia, meu pai Manoel Inácio, minhas irmãs Emanuella e Danielle e minha sobrinha Sofia.

Ao meu amor Sean por seu apoio incondicional, por me estimular, me ajudar durante toda essa jornada e com seu carinho sempre renovar as minhas forças. E a sua família, por me acolherem e serem minha segunda família.

A todos meus bons amigos que já conhecia e que encontrei pelos caminhos árduos até chegar aqui.

A Shayara e Alexandre que desde a graduação sempre foram grandes parceiros e na pós-graduação foram mais presentes ainda com toda amizade.

A todos os mestres que enriqueceram os meus conhecimentos ao longo da jornada, e a minha orientadora professora Dra. Hercília Maria Lins Rolim e a minha co-orientadora Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira.

A toda equipe do NANOSFAR, à Profa. Dra. Nereide Stela Santos e sua a equipe do SLC-NF, a toda equipe do Laboratório de Atividade Cardiovascular do NPPM e ao Prof. Dr. André e sua equipe da Farmácia Escola – UFPI que contribuíram de forma muito especial a concretizar esse sonho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, à UFPI e todos os docentes do programa por contribuir no meu crescimento intelectual e profissional.

EPIGRAFE

Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.

Martin Luther King

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS	Ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	Xi
LISTA DE TABELAS	Xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
RESUMO	Xv
ABSTRACT	Xvi
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Óleos essenciais	20
3.2 Doenças Cardiovasculares	21
3.3 Atividades farmacológicas dos monoterpenos e γ -terpineno	22
3.4 Nanotecnologia, nanopartículas, métodos de obtenção e caracterização	25
3.5 Referências Bibliográficas	28
• CAPÍTULO 1: Evidências científicas da utilização óleos essenciais para obtenção de nanoformulações	33
Resumo	34
1. Introdução	35
2. Metodologia	37
3. Resultados e Discussão	39
4. Conclusão	55
5. Referências	55
• CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas de plga contendo γ-terpineno	61
Resumo	62
1. Introdução	63
2. Material e Métodos	65
2.1. Preparação das Nanocápsulas	65
2.2. Caracterização das formulações	65
2.3. Determinação do teor de γ -terpineno nas nanocápsulas	66
2.4. Eficiência da encapsulação	67
2.5 Análises estatísticas	67
3. Resultados e Discussão	68

4. Conclusão	79
5. Referências Bibliográficas	79
• CAPÍTULO 3: potencial farmacológico do complexo NC-GT como agente hipotensor em ratos normotensos	83
Resumo	84
1. Introdução	85
2. Material e Métodos	86
2.1. Preparação das Nanocápsulas	86
2.2. Animais	87
2.3. Eutanásia dos animais	87
2.4. Efeito hipotensor da nanocápsula contendo γ -terpineno (NC-GT)	87
2.5. Análises estatísticas	90
3. Resultados e Discussão	90
4. Conclusão	95
5. Referências Bibliográficas	95
• CAPÍTULO 4: Determinação do potencial antioxidante in vitro do γ-terpineno e NC-GT	97
Resumo	98
1. Introdução	99
2. Material e Métodos	100
2.1. Capacidade antioxidante contra a peroxidação lipídica (TBARS)	100
2.2. Capacidade antioxidante contra o radical ABTS• (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	102
2.3. Capacidade antioxidante contra o radical nitrito (NO•)	103
3. Resultados	104
3.1. Potencial antioxidante frente às formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico	104
3.2. ABTS	105
3.3. Capacidade antioxidante contra o radical nitrito (NO*)	106
4. Discussão	107
5. Conclusão	111
6. Referências Bibliográficas	112
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	116
PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	117
ANEXOS	118

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH: dihidrocloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropinamida
ABTS: (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico).
Ag: prata
Au: ouro
BVS: Biblioteca virtual em saúde
CE₅₀: concentração efetiva mediana
CG: Cromatografia Gasosa
CG-EM: Cromatografia Gasosa associada ao espectrômetro de massa
DC: Doenças cardiovasculares
DL: Dose letal
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DMRI: Degeneração macular relacionada à idade
ECF: Espectroscopia de correlação de fótons
EE: Eficiência de encapsulação
EPO: European Patent Office
EROS: espécies reativas de oxigênio
ERN: espécies reativas de nitrogênio
FC: frequência cardíaca
FCf: frequência cardíaca final
GPx: Enzimas glutatona peroxidase
GT: γ -terpineno
h: Horas
INPI: Instituto Nacional de Propriedade Industrial
HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica
HEpG2: Células cancerígenas hepatocelulares
LDL: *Low Density Lipoprotein*
L-NAME: Nitro-arginina-metil-ester
MDA: malondialdeído
NC: nanocápsulas
NC-GT: nanocápsulas γ -terpineno
Nm: nanômetro
N&N: Nanociência e Nanotecnologia
NLS: nanopartículas lipídicas sólidas.
NO: Óxido Nítrico
NPs: nanopartículas
NPS: nitroprussiato de sódio
NPSAG: nanopartículas de prata
N γ C: nanocápsulas de γ -terpineno
o/a: óleo/água
OE: Óleos essenciais
OMPI: Organização Mundial da Propriedade Intelectual
OMS: Organização Mundial de Saúde
PCL: Poli- ϵ -capro-lactona
PA: Pressão arterial
PAM: Pressão arterial média
PAMf: Pressão arterial média final

PCL: poli(ϵ -capro-lactona)

PDI: Índice de polidispersão

pH: Potencial de hidrogênio

PLGA poli-(ácido láctico-co-glicólico ácido)

PVA: Álcool Polivinil

Rpm: rotações por minuto

SOD: Superóxido dismutase

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico

TCP: (Tratado de Cooperação de Patentes)

TP: tamanho de partícula

USPTO: United States Patent and Trademark Office

WIPO: World Intellectual Property Organization

μ m: micrômetro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. Estrutura química do γ -terpineno 24

CAPÍTULO 2

Figura 1. Representação esquemática nanocápsulas Poliméricas. 63

Figura 2. Esquematização do método de deposição interfacial de polímero pré-formado 65

Figura 3. Método para obtenção da taxa de eficiência de encapsulação. 67

Figura 4: Suspensões de Nanocápsulas Poliméricas após preparação. 76

CAPÍTULO 3

Figura 1. Protocolo de medida direta da pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos não anestesiados. 88

Figura 2. Aparato para registro de pressão arterial média após administração intravenosa da NC-Vazia, GT e NC-GT em ratos normotensos não anestesiados. 89

Figura 3. Esquema mostrando os grupos e doses utilizadas nesse estudo. 89

Figura 4. Registro original mostrando o efeito do GT sobre a PA de ratos normotensos. 91

Figura 5. Registros originais mostrando o efeito do NC-GT sobre a PA de ratos normotensos. 91

CAPÍTULO 4

Figura 1. Esquema representativo da avaliação da capacidade antioxidante do GT e NC-GT pelo método TBARS•. 101

Figura 2. Esquema representativo da avaliação da capacidade antioxidante do GT E NC-GT pelo método ABTS•. 102

Figura 3. Esquema representativo da avaliação da capacidade antioxidante do GT e NC-GT pelo método do radical NO•. 103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Artigos encontrados e selecionados de acordo com as bases eletrônicas e as palavras-chave utilizadas. 37

Tabela 2. Caracterização dos artigos selecionados no estudo. 41

Tabela 3. Número de depósitos de patentes por base de dados envolvendo os diferentes termos utilizados. 50

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Características das nanopartículas formuladas. 70

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Características das nanopartículas formuladas. 63

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 1

Gráfico 1. Número de artigos com as respectivas nacionalidade das instituições vinculadas aos autores	38
Gráfico 2. Distribuição anual do número de artigos publicados.	39
Gráfico 3. Nanoformulações desenvolvidas nos artigos publicados.	39
Gráfico 4. Finalidades das formulações obtidas nos artigos publicados.	40
Gráfico 5. Total de depósitos de patentes pesquisados nas bases do WIPO, INPI, EPO e USPTO.	51
Gráfico 6. Distribuição do número de pedidos de depósitos patentários por ano.	52
Gráfico 7. Países depositantes de patentes sobre o γ -terpineno.	53
Gráfico 8. Patentes depositadas nos bancos tecnológicos por código de classificação internacional.	53

CAPÍTULO 2

Gráfico 1. Variação do tamanho de partícula em nanocápsulas de diferentes concentrações do γ -terpineno. .	71
Gráfico 2. Influência do γ -terpineno e do tempo sobre o Potencial Zeta.	72
Gráfico 3. Influência do γ -terpineno e do tempo sobre o pH sobre a NC-vazia e a NC-GT 6mg/ml.	73
Gráfico 4. Varreduras do γ -terpineno, NC-vazia, NC-GT 6mg/ml.	75
Gráfico 5. Ponto de anulação (Zero-crossing) escolhido (259,8nm).	76
Gráfico 6. Espectro de varredura do γ -terpineno em concentrações crescentes (800, 1.600, 2.400, 3.200 e 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na 1 ^o derivada ($\gamma = 259,8\text{nm}$).	77
Gráfico 7. Curva analítica do γ -terpineno (259,8 nm) na 1 ^o Derivada.	77

CAPÍTULO 3

Gráfico 1. Efeito da administração IV do GT e da NC-GT sobre a Pressão Arterial Média (A) e Frequência Cardíaca (B).	92
--	----

CAPÍTULO 4

Gráfico 1. Efeitos do GT e NC-GT na redução da peroxidação lipídica em decorrência das formas associadas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS•).	104
Gráfico 2. Efeitos do γ -terpineno (G) livre e nanoencapsulado (NG) na redução do radical ABTS•.	105

Gráfico 3. Efeitos do GT e NC-GT na inibição da formação do radical nitrito (NO*).

106

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE γ -TERPINENO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CARDIOVASCULAR E ANTIOXIDANTE. KÁSSIA KAROLINE LEAL BARROS GOMES. Orientador: HERCÍLICA MARIA LINS ROLIM. 119p Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia, UFPI, 2016.

RESUMO

O γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4) (GT) é um monoterpene constituinte dos óleos essenciais de inúmeras plantas aromáticas com diversas propriedades farmacológicas tais como: atividade antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, antinoceptiva e anti-inflamatória. Realizou-se uma busca de artigos científicos sobre os efeitos biológicos dos óleos essenciais aplicados na nanotecnologia e uma prospecção tecnológica sobre as propriedades biológicas do γ -terpineno. No intuito de identificar os estudos utilizando óleos essenciais aplicados na nanotecnologia e buscar o que há patenteado sobre o γ -terpineno. A prospecção científica apontou um recente interesse na abordagem de nanoformulações contendo óleos essenciais. As formulações mais pesquisadas foram as nanoemulsões, nanocápsulas e nanopartículas de prata. A prospecção tecnológica mostrou 54 pedidos de patente que se referiam ao γ -terpineno. Não há depósitos de patentes com aplicação na nanotecnologia e suas principais aplicações são para fins médicos, odontológicos e/ou higiene. Essa pesquisa corresponde ao primeiro estudo que se obteve nanocápsulas contendo γ -terpineno. O segundo capítulo apresenta o encapsulamento do γ -terpineno em nanocápsulas (NC-GT) seguido da caracterização da formulação obtida. Tais formulações foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Em relação ao aspecto microscópico a formulação mostrou-se estável apresentando tamanho de partícula $173,43 \pm 4,5$, índice de polidispersão $0,197 \pm 0,03$, potencial Zeta - 16, 33 mV e pH $7,6 \pm 0,01$. O teor de γ -terpineno foi de 109% e a taxa de encapsulação, 97%. Assim, obteve-se uma formulação com alta taxa de encapsulação. O terceiro capítulo traz a avaliação da atividade da NC-GT sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos *Wistar* normotensos, não anestesiados, e 24 h antes da administração os animais foram submetidos a uma cirurgia para canulação da veia e artéria femoral. Houve administração intravenosa de nitroprussiato de sódio (NPS), nanocápsula vazia (NC-vazia), γ -terpineno (GT) e NC-GT (1,5; 3; e 4,5 mg/kg para os dois últimos). Observou-se que o GT não mostrou efeito nas doses administradas e a NC-GT promoveu um efeito hipotensor nas três doses utilizadas. Não existe diferença significativa entre a maior dose e o controle positivo, NPS. Avaliou-se, também, a atividade antioxidante do complexo NC-GT via inibição dos radicais: nitrito, substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e contra o radical 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS•+). O Trolox foi utilizado como controle positivo. De acordo com o cálculo de suas concentrações efetivas medianas (CE50) é possível observar que a NC-GT exibiu um maior potencial antioxidante em relação à sua forma isolada (GT), um resultado promissor no que se refere à nanotecnologia aplicada a produtos de origem natural. Os resultados dessa pesquisa enriquecem a literatura sobre este monoterpene e trazem perspectivas para a realização de novos testes a fim de permitir o uso farmacológico do NC-GT.

Palavras-chave: γ -terpineno; Nanotecnologia; Nanocápsulas; Monoterpenos; Antioxidante; Hipertensão.

DEVELOPMENT OF γ -TERPINENE NANOCAPSULES AND EVALUATION OF CARDIOVASCULAR AND ANTIOXIDANT ACTIVITY. KÁSSIA KAROLINE LEAL BARROS GOMES. Orientador: HERCÍLICA MARIA LINS ROLIM. 119p Master's Thesis Defense. Post-. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Health Science Center. UFPI, 2016.

ABSTRACT

γ -terpinene (1-Isopropyl-4-methyl-1,4-cyclohexadiene) (GT) is monoterpene constituent of essential oils of numerous aromatic plants with diverse pharmacological properties such as: antimicrobial, cytotoxic, antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activity. In first chapter was sought journal articles on biological effects of essential oils applied in nanotechnology and technological prospecting on biological properties γ -terpinene in order to identify studies using essential oils applied in nanotechnology and look for γ -terpinene patents. Scientific prospecting pointed a recent interest in approaching nanoformulations containing essential oils. The most researched formulations were nanoemulsions, nanocapsules and silver nanoparticles. Technological prospecting showed 54 patent applications referring to γ -terpinene. Main applications are for medical, dental and/or hygiene purposes. There are no patent applications with application in nanotechnology. This research corresponds to first study to obtain nanocapsules containing γ -terpinene. Second chapter presents encapsulation of γ -terpinene in nanocapsules (NC-GT) followed by characterization obtained formulation. Such formulations were prepared by interfacial deposition method of preformed polymer. Regarding microscopic aspect, the formulation was stable with a particle size of 173.43 ± 4.5 , polydispersion index 0.197 ± 0.03 , zeta potential $-16,33$ mV and pH 7.6 ± 0.01 . γ -terpinene content was 109% and encapsulation rate was 97%. Thus, formulation with high encapsulation rate was obtained. The third chapter presents the evaluation of NC-GT activity on blood pressure and heart rate of normotensive, unanesthetized Wistar rats. 24h prior to administration animals underwent surgery for cannulation of femoral vein and artery. There was intravenous administration of sodium nitroprusside (NPS), empty nanocapsule (NC-empty), γ -terpinene (GT) and NC-GT (1,5; 3 and 4,5 mg/kg for last two). Was observed that GT had no effect on doses administered and the NC-GT promoted a hypotensive effect in three doses used. There is no significant difference between highest dose and the positive control, NPS. The antioxidant activity of NC-GT complex was also evaluated by inhibiting radicals nitrite, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS +). Trolox was used as positive control. According calculation of median effective concentration (EC50), observed that NC-GT exhibited higher antioxidant potential in relation to isolated form (GT), a promising result regarding nanotechnology applied to products of natural origin. The results of research enrich literature on this monoterpene and provide perspectives for realization of new tests in order to allow pharmacological use of the NC-GT

Keywords: γ -terpinene; Nanotechnology; Nanocapsules; Monoterpene; Antioxidant; Hypertension.

1 INTRODUÇÃO

Transportadores de fármacos podem ser definidos como partículas de tamanho inferior a 1µm que carregam um fármaco. Estas partículas têm sido aplicadas com várias finalidades (ALI et al., 2014). Devido o pequeno tamanho das nanopartículas tornou-se possível o direcionamento de fármacos para o cérebro, tumores, e em outros órgãos (MUTHU; SINGH, 2009). As nanopartículas são aplicadas também para estabilizar e proteger os fármacos instáveis, tais como proteínas, peptídeos, moléculas de DNA ou da degradação, abrindo novas possibilidades para a distribuição de fármacos (POURMAND et al., 2012). A Terapia medicamentosa moderna tem como objetivo otimizar as ações farmacológicas dos fármacos, juntamente com a redução aos seus efeitos secundários tóxicos.

Nanocápsulas poliméricas (NC) são nanopartículas compostas de um núcleo oleoso rodeado por um invólucro polimérico com surfactantes lipofílicos e/ou hidrofílicos montados na interface. As principais vantagens de NC poliméricas incluem a possibilidade de uma carga elevada de moléculas de fármacos insolúveis para o núcleo oleoso, a sua estabilidade físico-química, e a proteção contra a degradação enzimática devido à presença da parede polimérica. Propõe-se também que as NC poderiam reduzir a toxicidade e melhorar o perfil farmacocinético de fármacos hidrófobos (EL-GOGARY et al., 2014).

Os óleos essenciais (OE) despertaram interesse em várias áreas pelas diferentes aplicações e atividades biológicas relevantes. Eles são utilizados na agricultura, na indústria de alimentos, indústria farmacêutica, indústria cosmética dentre outras, (MAYAUD et al., 2008; TIWARI et al., 2009). Por sua composição química complexa, muitas vezes comporta mais de 100 compostos terpênicos diferentes, os OE têm um amplo espectro biológico, são conhecidos pela atividade antimicrobiana (MAYAUD et al., 2008), analgésica (NÓBREGA; MOTTA; LEITE, 2003), anticonvulsivante (SOUSA et al., 2006) anti-inflamatória (JUERGENS et al., 2003) e cardiovascular (GUEDES et al., 2002). Na indústria os OE estão presentes em um número crescente e em variedade de formas farmacêuticas (ASBAHANI et al., 2015).

Os OE são os metabólitos secundários e podem ser biossintetizados em diferentes órgãos da planta (flores, folhas, frutas, casca, raízes etc.) que podem ser extraídos através de diferentes métodos. Devido à sua natureza hidrofóbica e densidade menor do que a água, eles são geralmente lipofílicos, solúveis em solventes orgânicos o que pode comprometer a absorção e biodisponibilidade do fármaco (ASBAHANI et al., 2015).

O γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4) é um hidrocarboneto terpênico constituinte de vários óleos essenciais isolados a partir de uma variedade de fontes vegetais

como *Thymus vulgaris*, *Protium icicariba*, *Citrus deliciosa Tenore*, *Origanum onites*, *Origanum hirtum*, *Satureja thymbra* entre outras. (GEDARA, 2008; PASSOS; LOPES; DE SOUSA; et al., 2015; PIARU et al., 2012). Foram identificadas diversas propriedades farmacológicas como: atividade antimicrobiana e citotóxica (GEDARA, 2008; PIARU et al., 2012), antioxidante de lipoproteínas de baixa densidade e potencial proteção de doenças crônicas e cardiovasculares (CHOI et al., 2000) e anti-inflamatória e analgésica (PASSOS; LOPES; ARAÚJO; et al., 2015).

Conforme o exposto acima e sabendo da existência da necessidade de novos medicamentos eficazes, seguros e acessíveis para o controle e tratamento de doenças, uma das principais justificativas para a realização desse trabalho consiste na obtenção de um nanocarreador que permita encapsular o monoterpeneo γ -terpineno direcionados futuramente ao tratamento de doenças cardiovasculares.

O trabalho foi dividido em 04 capítulos. No capítulo I foi realizada uma prospecção científica e tecnológica sobre as propriedades biológicas dos óleos essenciais aplicados na nanotecnologia e um levantamento das propriedades biológicas do γ -terpineno nos depósitos de patentes em bancos nacionais e mundiais. O capítulo II teve como objetivo obter e caracterizar uma nanoformulação utilizando o γ -terpineno. No capítulo III avaliou-se a atividade cardiovascular utilizando ratos normotensos. No capítulo IV avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* via inibição dos radicais nitrito, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^{o+}).

2 OBJETIVOS

◆ OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nanoformulação contendo γ -terpineno para testes de atividades biológicas.

◆ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⊕ Realizar uma prospecção científica sobre as atividades biológicas de óleos essenciais aplicadas na nanotecnologia em algumas bases de dados.
- ⊕ Realizar uma busca das atividades biológicas do γ -terpineno nos bancos de patentes.
- ⊕ Obter nanocápsulas contendo γ -terpineno e avaliar os parâmetros obtidos que sejam adequados para a realização de teste *in vivo*.
- ⊕ Investigar a ação cardiovascular *in vivo* e atividade antioxidante *in vitro* dos nanossistemas obtidos.
- ⊕ Verificar a influência da formulação encapsulada sobre a Pressão Arterial Média e a Frequência cardíaca.
- ⊕ Fazer um comparativo das atividades do γ -terpineno e da sua forma nanoencapsulada nos sistemas aplicados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE) tem grande relevância por suas diversas aplicabilidades, devido às variadas propriedades biológica. Eles também são denominados de óleos voláteis, de óleos etéreos ou de essências, em função de suas propriedades físicas. De maneira geral, são definidos como misturas complexas de substâncias aromáticas, voláteis e líquidas (REIS et al., 2007).

Os OE podem ser obtidos de diferentes partes do vegetal, podendo variar em cada espécie. Assim como a localização, o teor desses óleos pode modificar-se sob a influência: da floração, horário de colheita, fatores geográficos, irrigação, variação sazonal, tipo de estrutura secretora dentre outros (FIGUEIREDO; BARROSO; PEDRO, 2007). Os OE provenientes de diferentes partes da mesma planta podem ter aroma e propriedades completamente diferentes. (BOSCARDIN, 2012). A composição e concentração dos compostos químicos no óleo essencial dependem do controle genético e dos estímulos em resposta aos fatores do ambiente, mudando continuamente com o tempo e o espaço. Além disso, ainda há a estabilidade destes compostos após a extração, sendo que alguns não são usados pelas indústrias devido à sua baixa estabilidade (TAVARES, 2009).

Vários compostos orgânicos compõem os óleos essenciais sendo os terpenóides e os fenilpropanóides as classes de compostos mais encontradas (REIS et al., 2007). Os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que é a unidade básica dos ácidos cinâmicos e p-cumárico. Já os terpenóides resultados da condensação de unidades de isopreno (C_5), originado pela via do ácido mevalônico (MANN, 1987) e são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno em sua fórmula molecular de $(C_5H_8)_n$ (n é o número de unidades de isopreno). Conseqüentemente, há monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, e tetraterpenos com dois, três, quatro, seis unidades, e oito isopreno, respectivamente (ALDRED, 2009).

A maioria dos constituintes voláteis pertence ao grupo dos terpenos, sendo que os componentes terpênicos mais frequentemente encontrados nos óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos (REIS et al., 2007). Os monoterpenos possuem diversos esqueletos de base variável e também exibem estereoisomerismo. Além disso, há uma vasta gama de derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos), essas formas oxigenadas são também conhecidas como terpenóides (CLARKE, 2009).

A forma de extração é um fator importante para o sucesso da obtenção dos óleos essenciais. Eles podem ser extraídos por meio de diversos processos, de acordo com a localização do óleo volátil no vegetal, da quantidade e do propósito de uso do mesmo.

Os métodos mais frequentes para sua extração são: enfloração ou *enfleurage*, prensagem ou expressão, extração com solventes orgânicos, extração por fluido supercrítico e destilação por arraste de vapor (REIS et al., 2007).

A análise da composição química de óleos essenciais é geralmente efetuada por meio da cromatografia gasosa (CG) e da cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-EM). A CG é um método usualmente empregado para a separação e para a análise de misturas de substâncias voláteis. O cromatógrafo gasoso separa a mistura de compostos em picos de substâncias químicas puras e o espectrômetro de massa identifica e faz a quantificação dos compostos químicos (HAMID; AIYELAAGBE; USMAN, 2011).

3.2 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As Doenças Cardiovasculares (DC) são responsáveis por acometer milhares de pessoas anualmente e é uma das principais causas de morte (GIELEN; LANDMESSER, 2014). Causam impactos na saúde humana e também no campo social e econômico, pela perda de produtividade no trabalho e a diminuição da renda familiar. Já são conhecidas como os fatores de riscos que acometem uma população cada vez mais jovem, com frequentes complicações e mortes prematuras (WHO, 2005).

Dentre as DC está a Hipertensão arterial sistêmica (HAS) corresponde ao principal fator de risco para complicações, como o acidente vascular encefálico, o infarto agudo do miocárdio e a doença renal crônica. A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada pelo nível elevado e sustentado da pressão arterial, associada frequentemente às alterações funcionais e/ou metabólicas em órgãos alvos com aumento do risco de eventos cardiovasculares, fatais ou não fatais (SBC, 2010). Entre as doenças associadas à HAS, a arteriosclerose é uma das mais importantes e é caracterizada pelo acúmulo de lipídios na parede das artérias devido ao seu espessamento e endurecimento dificultando o fluxo sanguíneo. A presença de altos níveis de gordura no sangue pode acelerar essa condição (FONSECA et al., 2002).

Em crises hipertensivas preconiza-se a rápida diminuição da pressão arterial (PA) no prazo de minutos a, no máximo, algumas horas, evitando-se o agravamento funcional dos

órgãos e o conseqüente risco de morte. Dentre os quadros relacionados a estes atendimentos, a emergência hipertensiva é a entidade clínica grave que merece cuidados intensivos, sendo caracterizada por PA marcadamente elevada e sinais de lesões de órgãos-alvo (encefalopatia, infarto agudo do miocárdio, angina instável, edema agudo de pulmão, eclâmpsia, acidente vascular encefálico) (FEITOSA-FILHO et al., 2008; RODRIGUES, 2002).

Mesmo com a existência de diversas classes de medicamentos para o tratamento da HAS e outras doenças associadas, há sempre uma necessidade na pesquisa por novos fármacos com melhor eficácia e menos efeitos adversos. Pela grande variedade de plantas existente no Brasil, o país apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos medicinais, pois as plantas são uma importante fonte para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas. Cerca de 48% dos medicamentos empregados na terapêutica tem origem direta ou indiretamente das plantas medicinais (SOUZA; MELLO; LOPES, 2011)

3.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS MONOTERPENOS E γ -TERPINENO

Os monoterpenos chamam atenção pela variedade estrutural aliada a atividades farmacológicas importantes. Por serem moléculas pequenas, possuem um grande potencial farmacológico, visto que, moléculas grandes não são aplicadas em diversos modelos experimentais. Há também uma facilidade de obtenção e identificação, que estimula estudos químicos e farmacológicos (MACHADO; FERNANDES JUNIOR, 2011).

Existe uma busca pelos efeitos biológicos dos óleos essenciais como um todo tem aparecido um recentemente interesse sobre os seus principais constituintes ativos isolados. Os monoterpenos são os componentes químicos mais presentes nos óleos essenciais, representam 80% dos constituintes. (MACHADO; FERNANDES JUNIOR, 2011).

O óleo essencial do orégano é bem conhecido por sua atividade antimicrobiana e apresentam um teor elevado de monoterpenos (como γ -terpineno e p-cimeno) e compostos oxigenados (timol e carvacrol) (CRISTANI et al., 2007). Em um estudo realizado por Cristani *et al*, 2007, verificou que os monoterpenos, γ -terpineno, p-cimeno, timol e carvacrol agem modulando as atividades de vários canais iônicos, um importante papel em numerosos estados patológicos.

Uma característica que pode indicar a boa atividade antimicrobiana dos monoterpenos é a sua natureza lipofílica, com a capacidade de desestabilizar a membrana citoplasmática microbiana, que assim, perde a sua alta impermeabilidade para prótons e íons maiores. Com a

perturbação da integridade da membrana suas funções são comprometidos (CRISTANI et al., 2007).

Um estudo avaliou a atividade antiparasitária *in vitro* dos monoterpenos geraniol e citronelol sobre as formas epimastigotas e promastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*, bem como verificou sua citotoxicidade em células de mamíferos, o estudo mostrou que apenas o citronelol apresentou uma atividade moderada antipromastigota e baixo potencial antiparasitário contra *T. cruzi* e em relação à citotoxicidade em células de mamíferos, ambos os monoterpenos revelaram significativo potencial citotóxico (CARNEIRO et al., 2015).

Em outro estudo foi avaliada a atividade antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia gracilis Schauer* e dos seus componentes majoritários isolados (timol, p-cimeno, γ -terpineno, e mirceno) em ensaio *in vitro* com células HEpG2 mostrou que estes eram capazes de induzir a inibição da divisão celular em G1 e a apoptose dependente de caspases nessas células (FERRAZ et al., 2013).

Uma propriedade importante dos compostos bioativos é a proteger do estresse oxidativo, isto é, possuem capacidade antioxidante. Esta capacidade pode ajudar a prevenir doença cardiovascular ou câncer, pelo envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) por inibir o estresse oxidativo. A reação das ERO com biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA pode levar ao aumento do risco de doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose e doenças degenerativas. Conseqüentemente, a inativação das ERO por antioxidantes podem ser uma estratégia promissora preventiva (GRASSMANN, 2005).

Na literatura há estudos utilizando extratos, substâncias ativas isoladas provenientes de plantas para avaliar a atividade cardiovascular.

A planta *Lippia alba* é uma planta nativa do Brasil, conhecida popularmente como erva-cidreira. Pela medicina popular suas folhas são utilizadas em forma de chá para tratamento da hipertensão arterial (ALBUQUERQUE et al., 2007). Após estudo fitoquímico relatou a presença de compostos voláteis, principalmente monoterpenos como: citral, linalool, β -cariofileno, limoneno, carvona e miceno, e vários compostos como alcaloides, taninos e flavanóides (GAZOLA et al., 2004).

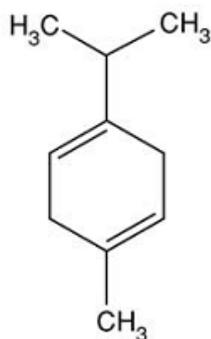
Um efeito hipotensor foi obtido com o α -terpineol. Este foi aplicado com dose 5mg/kg por via endovenosa em ratos (SAITO et al., 1996). Posteriormente, usando o leito arterial mesentérico de rato observou-se a participação da NOSintase, indicando um possível papel do NO no vasorelaxamento (MAGALHÃES et al., 2008).

No óleo essencial de *Nigella sativa* estão presentes o α -pineno e p-cimeno. Em estudo utilizando o óleo essencial em ratos e cobaias foi verificado sua atividade hipotensora e bradicardia (EL TAHIR et al., 1993). Este efeito foi provavelmente devido à inibição do centro vasomotor com a consequente diminuição do fluxo simpático, levando a diminuição da pressão sanguínea arterial e o ritmo cardíaco (EL TAHIR, K.; AL-AJMI; AL-BEKAIRI, 2003).

O γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4) (Figura 1) é um monoterpene distribuído em diversas espécies de plantas farmacologicamente ativas, por exemplo, em óleos essenciais da *Protium icariba*, *Thymus vulgaris*, *Marchand*, *Citrus deliciosa*, *Origanum onites*, *Origanum hirtum*, *Satureja thymbra* entre outras. O γ -terpineno possui uma insaturação na sua estrutura de cadeia cíclica no qual confere a característica lipofílica o que permite uma fácil penetração através das membranas biológicas, refletindo em uma boa atividade antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória (GEDARA, 2008; PASSOS; LOPES; DE SOUSA; et al., 2015; PIARU et al., 2012). Em testes de toxicidade aguda, o γ -terpineno mostrou uma DL50 em ratos de 3,65 g/kg e a DL50 dérmica aguda em coelhos excedeu 5g/kg (PASSOS; LOPES; ARAÚJO; et al., 2015).

O γ -terpineno mostrou-se ser um antioxidante importante. Um composto antioxidante de lipoproteínas de baixa densidade, principal envolvida na aterosclerose, essa atividade pode contribuir na prevenção de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral (CHOI et al., 2000).

FIGURA 1: Fórmula estrutural do γ -terpineno.



FONTE: AUTOR

3.4 NANOTECNOLOGIA, NANOPARTÍCULAS, MÉTODOS DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

A nanotecnologia tornou-se uma importante área intensamente estudada nos últimos tempos. Nas últimas décadas, numerosos nanocarreadores foram pesquisados pela utilização como agentes terapêuticos, tanto em aplicações acadêmicas e industriais. Estes nanocarreadores incluem lipossomas, conjugados terapêuticos de polímeros, micelas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas e nanoesferas. Estes nanocarreadores poliméricos tem grande potencial para aplicações biomédicas devido ao seu *design* biomolecular e pequeno tamanho (ACHARYA; SAHOO, 2011).

As nanopartículas poliméricas são partículas coloidais sólidas constituídos por substâncias macromoleculares que variam em tamanho de 10-1000 nm. O termo nanopartícula é um nome utilizado para designar as nanoesferas e as nanocápsulas por ambas terem um tipo de matriz de estrutura. Nas nanoesferas os fármacos podem ser adsorvidos pela superfície da esfera ou encapsulados dentro da partícula. Já as nanocápsulas são sistemas vesiculares, em que o fármaco está dentro de uma cavidade que consiste num núcleo oleoso ou aquoso interior rodeado por uma membrana polimérica. As substâncias ativas são normalmente dissolvidas no núcleo interno, mas também podem ser adsorvidos na superfície da cápsula (ALLEMANN; GURNY; DOELKER, 1993).

O uso de nanocápsulas é relatado para proteção de diferentes sistemas para aplicações farmacêuticas ou cosméticas, especialmente para substâncias termosensíveis ou que são sensíveis à oxidação em presença de água e que degradam por variação de pH ou por efeito de luz ultravioleta, garantido pelo isolamento do núcleo rodeada por um invólucro polimérico (KÜLKAMP et al., 2009; SHARIFIMEHR et al., 2015).

Nanopartículas poliméricas são preparadas a partir de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis e têm sido estudados extensivamente como portadores de partículas nas áreas médica e farmacêutica. As nanopartículas poliméricas biodegradáveis têm uma vantagem sobre os lipossomas, através da sua maior estabilidade e da sua capacidade única para criar uma liberação prolongada desencadeada por mudança nas condições do ambiente, como alteração de pH e temperatura. Nanopartículas poliméricas atraíram considerável atenção como veículos segmentados de entrega de fármacos devido à sua biocompatibilidade, estabilidade física, proteção de fármacos lábeis da degradação e liberação controlada (MUTHU; SINGH, 2009)

Há uma variedade de materiais utilizados para a preparação das nanopartículas, as biodegradáveis como: PLGA poli-(ácido láctico-co-glicólico) e não biodegradável como: quitosana e alginato de sódio (ALI et al., 2014). Entre os veículos poliméricos o poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) tem um grande potencial em aplicações na terapia medicamentosa, como é sabido, este polímero pode ser facilmente hidrolisado em monómeros individuais (ácido láctico ou ácido glicólico), os quais são eliminados do corpo através de vias metabólicas normais (BANDERAS et al., 2012).

Fármacos hidrófobos são geralmente encapsulados em polímeros biodegradáveis, usando diversos métodos. Um método ideal confere nanopartículas com as seguintes características: tamanho de 100-1000 nm, distribuição de tamanho homogênea, capacidade para alta incorporação de fármacos, teor de fármaco controlado no momento da liberação, não tóxico e relativamente fácil de produzir (BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007)

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (exemplo: cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-formado, tais como poli(ácido láctico) (PLA), o co-polímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -capro-lactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A nanoprecipitação é um dos métodos mais utilizados. É também conhecido como o método de deslocamento de solvente. Ele baseia-se na deposição interfacial de um polímero após o deslocamento de um solvente semipolar, miscível com água, a partir de uma solução lipofílica. A rápida difusão dos solventes para a fase aquosa resulta em diminuição da tensão interfacial entre as duas fases, o que aumenta a área de superfície e conduz à formação de pequenas gotas de solvente orgânico, mesmo sem qualquer agitação mecânica (FESSI et al., 1989). Além disso, este método proporciona alta eficiência de encapsulação (EE) para fármacos que apresentem baixa solubilidade em água (ACHARYA; SAHOO, 2011).

A técnica de coacervação pode ser simples ou complexo, se um ou dois polímeros são utilizados, respectivamente. É geralmente definida como a separação de duas fases líquidas de uma solução coloidal. Uma fase rica em polímero (fase coacervata) e a outra fase que não contém polímero (solução de equilíbrio). Em caso de coacervação simples existe apenas um polímero enquanto que a coacervação complexa envolve a interação de dois polímeros de cargas opostas (KAUSHIK et al., 2014)

Na emulsificação com evaporação do solvente envolve a preparação de uma fase orgânica consistindo de polímero (PLGA ou PLA) e da droga dissolvido em diclorometano. Esta fase orgânica é adicionada a uma fase aquosa contendo um tensoativo (PVA – Álcool polivinil) para formar uma emulsão. Esta emulsão é quebrada em nanogotículas por aplicação de energia externa (através de um homogeneizador ou um sonicador) e estas nanogotículas formam as nanopartículas depois da evaporação do solvente orgânico altamente volátil. O solvente é evaporado enquanto agitação magnética a 300 Rpm sob condições atmosféricas durante 4 h, deixando para trás uma suspensão coloidal de nanopartículas de PLGA em água (BUDHIAN et al., 2007).

Independentemente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio resultando na formação de precipitados. Os problemas de estabilidade limitada podem ser minimizados através da secagem das suspensões. A liofilização tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais, realiza-se empregando um crioprotetor ou lioprotetor, geralmente um carboidrato, para evitar a agregação das partículas durante o congelamento das suspensões. Utiliza-se também o método de secagem por aspersão para a obtenção de pós nebulizados contendo nanopartículas poliméricas, utilizando como adjuvante o dióxido de silício (Aerosil 200®), esse método pode produzir uma grande quantidade de material. Os produtos secos podem ser utilizados na obtenção de formas farmacêuticas sólidas, tais como cápsulas e comprimidos, o que é interessante sob o ponto de vista tecnológico e industrial (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho de partícula, a distribuição de massa molar do polímero, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento. O conjunto de informações obtidas pela caracterização destes sistemas pode conduzir à modificação das formulações e conduzir para uma estabilidade maior dos nanossistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Dentre as vantagens da aplicação das nanopartículas consiste na capacidade para superar os problemas da baixa solubilidade e uma fraca biodisponibilidade. Por exemplo, o imunossupressor Sirolimus é insolúvel em água e foi reformulado em uma forma de dosagem sólida, utilizando tecnologia NanoCrystal®, onde o tamanho de partícula foi reduzido para a ordem de nanômetros. A reformulação do Sirolimus melhorou os parâmetros farmacocinéticos consideravelmente. Além disso, a nova formulação de comprimido

melhorou a estabilidade de armazenamento, palatabilidade e facilidade de administração (ZOLNIK; SADRIEH, 2009).

Dessa forma a nanotecnologia é uma das áreas mais promissoras da pesquisa na ciência moderna. O uso da nanotecnologia pode oferecer uma maneira de desenvolver novas formulações e sistemas capazes de melhorar a eficiência de fármacos. O encapsulamento em nanoformulações poliméricas veio ser uma importante alternativa para fármacos de baixa solubilidade, de baixa estabilidade etc. Além disso, o sistema de entrega de fármacos pode ser personalizado para obter um resultado desejado, quanto à taxa de liberação do fármaco, o sítio de ação e tempo de circulação no organismo. O presente trabalho considera o desenvolvimento de um sistema manométrico de um monoterpeneo (γ -terpineno) a fim de avaliar sua atividade sobre o sistema cardiovascular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 3, p. 170-183, 2011.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

ALDRED, E. M. **Pharmacology: a handbook for complementary healthcare professionals**. Churchill-Livingston, 2009. ISBN 0443068984.

ALI, M. et al. Therapeutic efficacy of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles encapsulated ivermectin (nano-ivermectin) against brugian filariasis in experimental rodent model. **Parasitol Res**, v. 113, n. 2, p. 681-91, Feb 2014.

ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 4/10/ 2015.

BANDERAS, L. M. et al. Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 5793-806, 2012.

BOSCARDIN, P. M. D. Avaliação anti-inflamatória e citotóxica do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. 2012.

BRUM, L. S. et al. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. **Neurochemical Research**, v. 26, n. 3, p. 191-194, 2001.

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. **Int J Pharm**, v. 336, n. 2, p. 367-75, May 24 2007.

CARNEIRO, J. N. P. et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA, LEISHMANICIDA E CITOTÓXICA DO GERANIOL E CITRONELAL. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 2, p. 29-36, 2015.

CHOI, H.-S. et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, 2000.

CLARKE, S. **Essential chemistry for aromatherapy**. Elsevier Health Sciences, 2009. ISBN 0443104034.

CRISTANI, M. et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 15, p. 6300-8, Jul 25 2007.

EL-GOGARY, R. I. et al. Polyethylene glycol conjugated polymeric nanocapsules for targeted delivery of quercetin to folate-expressing cancer cells in vitro and in vivo. **ACS Nano**, v. 8, n. 2, p. 1384-401, Feb 25 2014.

EL TAHIR et al. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 24, n. 5, p. 1123-1131, 1993.

EL TAHIR, K.; AL-AJMI, M.; AL-BEKAIRI, A. SOME CARDIOVASCULAR EFFECTS OF THE DETHYMOQUINONATED NIGELLA SATIVA VOLATILE OIL AND ITS MAJOR COMPONENTS α -PINENE AND p-CYMENE IN RATS. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 11, n. 3, 2003.

FEITOSA-FILHO, G. S. et al. Emergências hipertensivas. **Rev. bras. ter. intensiva**, v. 20, n. 3, p. 305-12, 2008.

FERRAZ, R. P. et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-21, May 15 2013.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International journal of pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIGUEIREDO, A.; BARROSO, J.; PEDRO, L. Potencialidades e aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. **Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa-Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal**, 2007.

FONSECA, F. A. et al. Hipertensão e dislipidemias. **Revista Brasileira Hipertensão**, v. 9, p. 268-272, 2002.

GAZOLA, R. et al. Lippia alba, Melissa officinalis and Cymbopogon citratus: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 5, p. 477-480, 2004.

GEDARA, S. R. Terpenoid content of the leaves of Thymus algeriensis Boiss. **Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 2, p. 133-143, 2008.

GIELEN, S.; LANDMESSER, U. The Year in Cardiology 2013: cardiovascular disease prevention. **European heart journal**, p. eht551, 2014.

GRASSMANN, J. Terpenoids as plant antioxidants. **Vitamins & Hormones**, v. 72, p. 505-535, 2005.

GUEDES, D. et al. Muscarinic agonist properties involved in the hypotensive and vasorelaxant responses of rotundifolone in rats. **Planta medica**, v. 68, n. 8, p. 700-704, 2002.

HAMID, A.; AIYELAAGBE, O.; USMAN, L. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. **Int J Cur Res**, v. 33, p. 086-098, 2011.

JUERGENS, U. et al. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v. 97, n. 3, p. 250-256, 2003.

KAUSHIK, P. et al. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, 2014.

KÜLKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 2078, 2009.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MAGALHÃES, P. J. C. et al. Vasorelaxation induced by the essential oil of Croton nepetaefolius and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 169-177, 2008.

MAGYAR, J. et al. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. **European journal of pharmacology**, v. 487, n. 1, p. 29-36, 2004.

MANN, J. **Secondary metabolism**. Clarendon press Oxford, 1987.

MAYAUD, L. et al. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 3, p. 167-173, 2008.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.

MUTHU, M. S.; SINGH, S. Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. 2009.

NEVES, D. P. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 24, n. 3, p. 341-50, Jun 2010.

NÓBREGA, R. D. A.; MOTTA, S. C.; LEITE, J. R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 2, n. 1, p. 3-6, 2003.

PASSOS, F. F. D. B. et al. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

PASSOS, F. F. D. B. et al. Prospecção científica e tecnológica: Monoterpeno gama terpineno e atividades farmacológicas. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2103-2112, 2015.

PIARU, S. P. et al. Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 593-597, 2012.

POURMAND, A. et al. Application of nanomedicine in emergency medicine; point-of-care testing and drug delivery in twenty-first century. **Daru**, v. 20, n. 26, p. 1-3, 2012.

REIS, M. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2007.

RODRIGUES, C. I. S. Tratamento das emergências hipertensivas. **Rev Bras Hipertens**, v. 9, n. 4, p. 353-8, 2002.

SAITO, K. et al. The biological properties of monoterpenes: hypotensive effects on rats and antifungal activities on plant pathogenic fungi of monoterpenes. **Journal of the Japan Wood Research Society (Japan)**, 1996.

SBC, S. B. D. C. V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, n. 3, p. e24-e79, 2007.

_____. Departamento de Hipertensão Arterial. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Rev bras hipertens**, v. 17, n. 1, p. 1-64, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHARIFIMEHR, M. R. et al. Preparation and spectral characterization of polymeric nanocapsules containing DR1 organic dye. **Optical Materials**, v. 45, p. 87-90, 7// 2015.

SOUSA, D. P. et al. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 3, p. 231-235, 2006.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Editora UFOP, 2011. ISBN 8528802701.

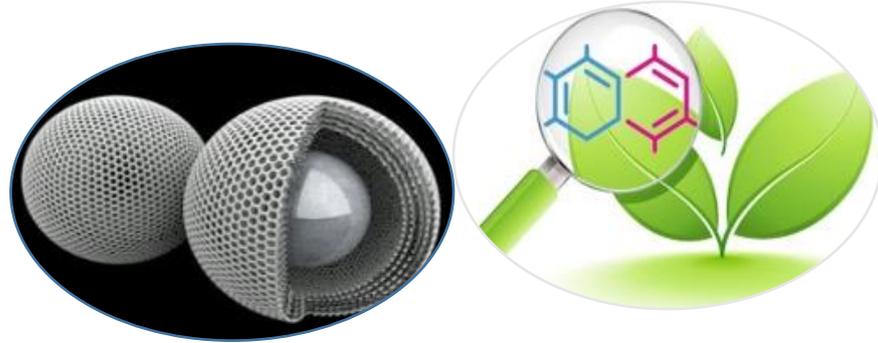
SZENTANDRÁSSY, N. et al. Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. **Life sciences**, v. 74, n. 7, p. 909-921, 2004.

TAVARES, I. **Propagação vegetativa, adubação orgânica e idades de colheita de quimiotipos de ervacidreira [Lippia alba (Mill.) NE Brown]**. 2009. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)–Universidade Federal do Tocantins, Gurupi. 2009. 84 f. Lippia alba: chemistry studies... Lippia alba: estudos químicos

TIWARI, B. K. et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, Jul 22 2009.

WHO, W. H. O. Preventing chronic diseases: a vital investment: overview. 2005.

ZOLNIK, B. S.; SADRIEH, N. Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 422-427, 6/21/ 2009.



CAPÍTULO 1

**EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS DA UTILIZAÇÃO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA OBTENÇÃO DE
NANOFORMULAÇÕES E PROSPECÇÃO
TECNOLÓGICA DAS APLICAÇÕES DO γ -
TERPINENO**

**EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS DA UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA
OBTENÇÃO DE NANOFORMULAÇÕES E PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DAS
APLICAÇÕES DO γ -TERPINENO.**

¹GOMES, K. K. L. B.*; ¹ROLIM, H. M. L.

1- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina-PI, Brasil *E-mail:
kassia_lbarros@hotmail.com

RESUMO

O seguinte estudo teve como objetivo realizar uma prospecção científica a fim de verificar as atualidades no desenvolvimento de nanoformulações através de artigos científicos utilizando óleos essenciais e uma prospecção tecnológica no intuito de buscar aplicações e atividades biológicas da substância γ -terpineno. Para a prospecção científica foi feita uma busca de artigos utilizando as palavras-chaves “*Essential oils and nanotechnology*” nas bases de dados eletrônicas BVS, *PubMed*, *SCOPUS* e *Web of Science*. Na prospecção tecnológica foi realizada uma busca de patentes depositados EPO, WIPO, USPTO e INPI. Foram utilizados como palavras-chave os termos “*Essencial oils*”, “*Essential oils and nanoparticles*”, “*gamma and terpinene*”, “*gamma and terpinene and cardiovascular*” e “*gamma and terpinene and nanoparticles*”. As palavras de busca foram: essential oils and nanotechnology. Ao fim da busca bibliográfica foram selecionados 39 artigos. A maior parte dos trabalhos é de autores vinculados a instituições localizadas no Brasil e Índia. Percebeu-se um recente interesse, abordando nanoformulações contendo óleos essenciais. As formulações mais pesquisadas foram as nanoemulsões, nanocápsulas e nanopartículas de prata. A finalidade de avaliar atividade antibacteriana foi a mais pesquisada. Na prospecção apenas 54 pedidos se referiam ao γ -terpineno. Não há aplicação na nanotecnologia, suas principais aplicações são para fins médicos, odontológicos e/ou higiene em uso convencional. Essa pesquisa corresponde ao primeiro estudo que se obteve nanocápsulas contendo γ -terpineno. Assim, o γ -terpineno, um monoterpeno de diversas atividades farmacológicas e aplicações pode ser uma possível fonte de estudo para a comunidade científica.

Palavras-chave: Nanotecnologia; atividades farmacológicas; γ -terpineno; antioxidante; cardiovascular

4.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de nanoformulações fitoquímicas representa um progresso significativo da abordagem científica na pesquisa biomédica. Estes nanocarreadores com alto teor de compostos ativos vegetal é altamente vantajosa, uma vez que podem complementar ou mesmo aumentar a atividade biológica do fármaco buscando uma eficiência máxima do tratamento e baixos efeitos secundários (LACATUSU et al., 2015).

Óleos essenciais são uma mistura de vários componentes que nas plantas estão envolvidos na defesa contra pragas, herbívoros, fungos e bactérias (HARKAT-MADOURI et al., 2015). Sabe-se que esses são fontes significativas de novas substâncias químicas que apresentam algum potencial efeito terapêutico. Frequentemente, esses componentes são extraídos de óleos essenciais de plantas e desempenham alguma atividade farmacológica (DAMASCENO et al., 2014).

Os OE possuem diversas atividades biológicas e a importância deles e de seus componentes depende principalmente de suas atividades antimicrobiana e antioxidante, além de suas propriedades sensoriais. Por isso, eles têm sido utilizados nos aditivos alimentares, na agropecuária em substituição dos antibióticos, como aromatizantes e ingredientes cosméticos. Mais recentemente, os óleos essenciais estão ganhando ainda mais importância como fonte de novos antibióticos ou adjuvantes para combater a resistência bacteriana (SANTOS, T. G. et al., 2013)

O γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4), um monoterpene constituinte dos óleos essenciais de inúmeras plantas aromáticas como, *Thymus vulgaris*, *Protium icicariba*, *Citrus deliciosa*, *Origanum onites*, *Origanum hirtum*, *Satureja thymbra* entre outras (DAMASCENO et al., 2014; PASSOS et al., 2015) .

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar com diversas aplicações no campo da eletrônica, medicina, engenharia e materiais. A nanomedicina é uma importante aplicação da nanotecnologia que utiliza sistemas de distribuição de fármacos, agentes de imagem ou dispositivos em nanoescala para tratar ou diagnosticar doenças complexas. Estes sistemas em nanoescala que transportam fármacos incluem: lipossomas, dendrímeros, nanocristais, nanopartículas poliméricas, micelas, nanopartículas de ouro, nanopartículas multifuncionais, dentre outras (ZOLNIK; SADRIEH, 2009).

O encapsulamento de OEs assegura a proteção do óleo (susceptível à degradação) e a liberação controlada, isto levou ao desenvolvimento de inúmeras novas formulações com

diversas aplicações. Os transportadores mais comumente preparadas são partículas de polímero, lipossomas e nanopartículas de lípidos sólidas (ASBAHANI et al., 2015).

A atividade antioxidante em geral está relacionada diretamente com o efeito cardioprotetor, pela redução do estresse oxidativo, diminuição da peroxidação lipídica e supressão das respostas pró-inflamatórias (ZIAEE et al., 2015). A limitação no uso de antioxidantes sintéticos pela toxicidade inerente levou ao aumento de estudos sobre o potencial antioxidante de óleos essenciais que apontaram estes como antioxidantes e conservantes naturais na indústria farmacêutica e de processamento de alimentos (HARKAT-MADOURI et al., 2015).

A partir disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção científica a fim de verificar as atualidades na produção científica de nanoformulações a partir de óleos essenciais publicada nos últimos dez anos com base nos critérios delimitados e realizar uma prospecção tecnológica, fazendo uma busca nos pedidos de patente em nível nacional e internacional, a fim de buscar aplicações da substância γ -terpineno e verificar uma possível atividade cardiovascular e antioxidante e aplicação na nanotecnologia.

4.2 METODOLOGIA

A realização da prospecção científica ocorreu através da busca de artigos originais e obtidos na íntegra. Foi feita a seleção das palavras de busca. Em seguida, foram analisados os artigos nas bases de dados eletrônicas Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), *PubMed*, *SCOPUS* e *Web of Science*. Por ter o objetivo de verificar as atualidades na área foram considerados os artigos publicados nos últimos dez anos (2005 a 2015). Utilizando como critério de inclusão artigos originais publicados em inglês, com resumo e texto completo e que retratem a relação entre óleos essenciais e a nanotecnologia. Os critérios para exclusão foram: artigos que não apresentaram nenhuma relação entre óleos essenciais e a nanotecnologia, artigos publicados a mais de dez anos, artigos que apresentaram duplicidade, além dos que não foram obtidos na íntegra ou que eram de revisão de literatura e de origem não experimental. As palavras de busca utilizadas foram “ *essential oils and nanotechnology*” e “óleos essenciais e nanotecnologia”, os resultados foram analisados de acordo com a distribuição geográfica dos estudos, distribuição anual das publicações, nanoformulações envolvidas e a finalidade de obtenção das nanoformulações.

A prospecção tecnológica foi realizada com base nos pedidos de patentes depositados no Escritório Europeu de Patentes (European Patent Office – EPO), na Organização Mundial

de Propriedade Intelectual (World Intellectual Property Organization -WIPO), no Escritório Americano de Patentes e Marca Registrada (United States Patent and Trademark Office-36 USPTO) e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. A pesquisa foi realizada em setembro de 2015 e foram utilizados como palavras-chave os termos “*Essencial oils*” ou óleos essenciais, “*Essential oils and nanoparticles*” ou “óleos essenciais e nanopartículas”, “*gamma and terpinene*” ou “gama e terpineno” “*gamma and terpinene and cardiovascular*” ou “gama e terpineno e cardiovascular” e “*gamma and terpinene and nanoparticles*” ou “gama e terpineno e nanopartículas”. Os termos em inglês foram utilizados para as bases internacionais, enquanto que os termos em português para a busca de documentos em base nacional, sendo considerados válidos os documentos que apresentassem esses termos no título e/ou resumo. Foram analisados todos os pedidos de patente existentes até setembro de 2015.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao fim da busca bibliográfica foram encontrados 111 artigos nas bases de dados analisadas, porém apenas 39 atenderam os objetivos e os critérios de inclusão adotados por essa revisão (Tabela1). Os artigos selecionados foram divididos por tópicos para discussão, de acordo com a aplicação destinada das formulações.

TABELA 1. Artigos encontrados e selecionados de acordo com as bases eletrônicas e as palavras-chave utilizadas.

TOTAL	BASES DE DADOS			
	BVS	SCOPUS	PUBMED	WEB OF SCIENCE
Artigos	14	42	24	34
Selecionados	4	12	12	11

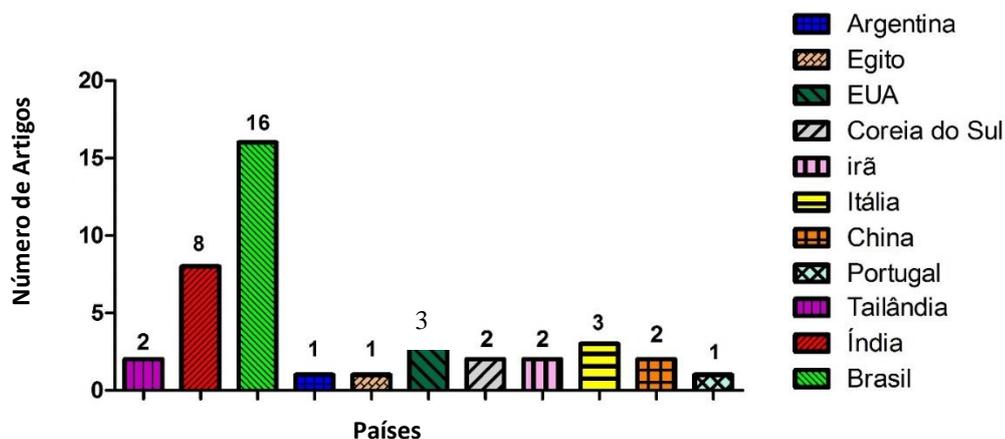
Fonte: Autor

A análise dos artigos incluídos mostrou que a maior quantidade de trabalhos é de autores vinculados a instituições localizadas no Brasil e Índia (Gráfico1). Esses dois países correspondem a 58,5% da nacionalidade de todos os estudos. A grande maioria dos trabalhos de origem brasileira (16 artigos) representa um vasto interesse das instituições desse país em busca de fontes alternativas para tratamento de doenças negligenciadas como dengue (DUARTE et al., 2015) e tripanossomíase (DO CARMO et al., 2015). No Brasil há uma grande diversidade, por exemplo o cerrado brasileiro é um dos maiores biomas do país, perde

apenas para a Floresta Amazônica e é a mais rica savana tropical do mundo, com mais de 12.000 plantas com flores catalogadas o que estimula a prospecção de compostos químicos para pesquisa científica e valor econômico para a medicina (RIBEIRO et al., 2016). Estudos de nanotecnologia no Brasil vem aumentando pelo incentivo de instituições governamentais do país e já foram criadas quatro redes de pesquisa em Nanociência e Nanotecnologia, nas seguintes áreas: materiais nanoestruturados, interfaces e nanotecnologia molecular, nanobiotecnologia e nanodispositivos semicondutores. Esta tecnologia, representa potencialmente um enorme mercado mundial, sendo que os países que mais investem em nanotecnologia são os Estados Unidos da América, Europa e Japão, entretanto países como a Rússia, China, Índia e Brasil têm feito investimentos significativos no setor nos últimos anos (CARELLI HERMES; HAIDAMUS DE OLIVEIRA BASTOS, 2014)

A Índia é um país com grande interesse pela fitoterapia, explicada pela prática da medicina ayurvédica que corresponde a uma das práticas mais antigas do mundo. Essa medicina inclui dieta e fitoterapia e enfatiza o uso do corpo, da mente e o espírito no tratamento de doenças (FERNÁNDEZ et al., 2015). Iniciativas na área da nanotecnologia começaram muito mais tarde que em outros países e também o financiamento foi muito menor. O governo indiano colocou a nanotecnologia como uma área prioritária apenas em 2001 com o lançamento de um programa de incentivo. Entretanto, tem feito progressos significativos de grande impacto na pesquisa científica e já é o sexto país mais ativo publicar neste campo com aumento constante da produção publicação (BHATTACHARYA; SHILPA; BHATI, 2012).

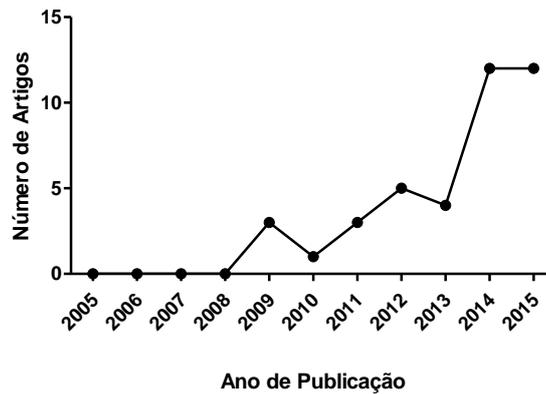
GRÁFICO 1- Número de artigos com as respectivas nacionalidade das instituições vinculadas aos autores



FONTE: Autor

Percebeu-se que entre 2005 e 2008 não existiu estudos e a partir de 2009 cresceu o interesse em pesquisar as nanoformulações contendo óleos essenciais (Gráfico 2). Verifica-se um crescimento ao longo desses cinco anos, principalmente entre 2014 e 2015, mostrando o quão emergente é o crescimento de pesquisas no tema.

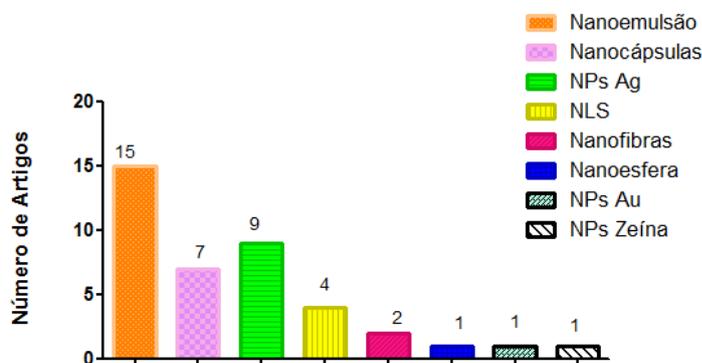
GRÁFICO 2 - Distribuição anual do número de artigos publicados.



FONTE: Autor

Os estudos na sua maioria utilizaram óleos essenciais para o desenvolvimento das formulações. Dos quarenta artigos selecionados apenas quatro utilizavam compostos isolados de óleos essenciais. As formulações mais obtidas foram as nanoemulsões, nanocápsulas e nanopartículas de prata (Gráfico 3). Foi possível contatar que na maior parte dos estudos as nanoformulações foram obtidas com a finalidade de avaliar atividade antibacteriana. Uma importante finalidade foi de obter novas formulações para futuras pesquisas e aplicações (Gráfico 4). Isso demonstra o crescente interesse pela área da nanotecnologia e pelas potenciais aplicações dos óleos essenciais.

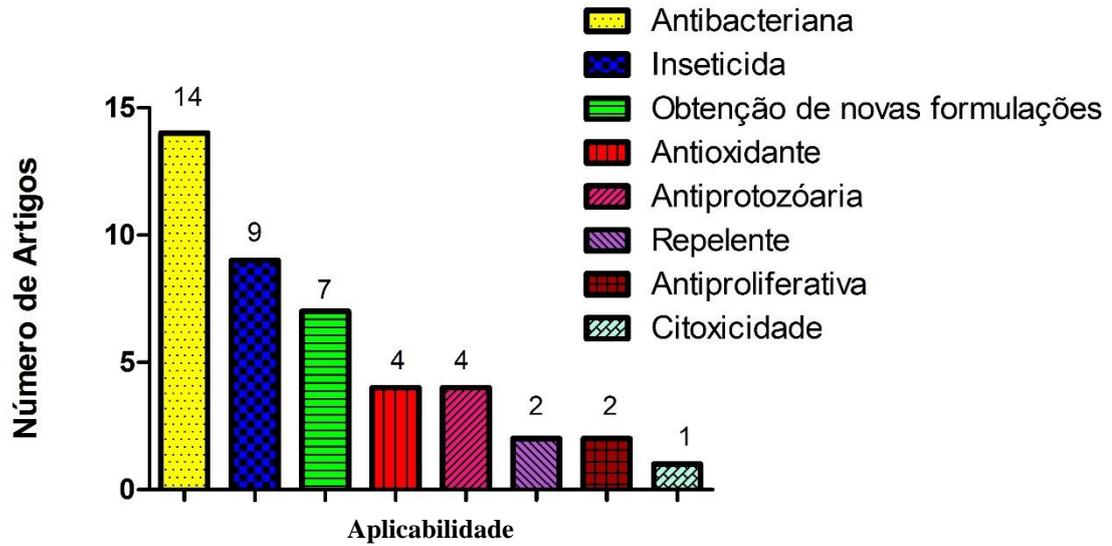
GRÁFICO 3 - Nanoformulações desenvolvidas nos artigos publicados.



Legenda: NPs: nanopartículas; Ag: prata; Au: ouro; NLS: nanopartículas lipídicas sólidas.

FONTE: Autor

GRÁFICO 4. Finalidades das formulações obtidas nos artigos publicados.



FONTE: Autor

Todos os dados da análise dos artigos podem ser vistos na **Tabela 2**, esta apresenta uma caracterização dos artigos selecionados de acordo com os respectivos autores, anos de publicação, substâncias encapsuladas, nanoformulação, método de obtenção (quando disponível) e a finalidade do estudo.

TABELA 2: Caracterização dos artigos selecionados no estudo.

	AUTOR E ANO	PAÍS	ÓLEO ESSENCIAL	NANOFOR- MULAÇÃO	MÉTODO DE OBTENÇÃO	FINALIDADE
1.	(NUCHUCHUA et al., 2009)	Tailândia	Citronela (<i>C. nardus</i>), manjerição peludo (<i>Ocimum americanum</i>), e vetiver (<i>Vetiveria zizanioides</i>)	Nanoemulsão	Emulsificação de alta energia	Atividade repelente contra <i>Aedes aegypti</i>
2.	(JAYASEELAN et al., 2011)	Índia	Óleo essencial da folha de <i>T. Cordifolia</i> .	Nanopartículas de prata		Atividade pediculocidal e larvicida dos vetores do mosquito malária e filariose.
3.	(DIAS et al., 2012)	Brasil	Óleo essencial Copaifera multijuga Hayne (componente majoritário β -cariofileno)	Nanoemulsão	Homogeneização de alta pressão	Otimização e validação de um método SPME-GC para a análise de β -cariofileno em nanoemulsões
4.	(VIJAYARAGHAVAN et al., 2012)	Índia	Óleo essencial de <i>Trachyspermum ammi</i> (γ -terpineno, timol e p-cimeno) e <i>Somniferum Papaver</i> (morfina e codeína)	Nanopartículas de Prata		Desenvolvimento de Rotas de Biossíntese das nanopartículas
5.	(CHRISTOFOLI, MARCELA; COSTA; BICALHO; DE CÁSSIA DOMINGUES; et al., 2015)	Brasil	Óleos essenciais das folhas de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Nanoesferas	Nanoprecipitação do polímero pré-formado	Ação inseticida contra <i>B. Tabaci</i>
6.	(CARMO et al., 2015)	Brasil	Óleo essencial de <i>A. satureioides</i>	Nanocápsulas	Nanoprecipitação do polímero	Ação antiprotozoária (<i>Trypanosoma</i>)

7.	(SAGAVE, L. et al., 2015b)	Brasil	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> e composto majoritário terpinen-4-ol	Nanocápsulas e Nanoemulsões	pré-formado Nanoprecipitação do polímero pré-formado e Emulsificação espontânea	evansi) Atividade antibacteriana contra isolados de <i>R. equi</i>
8.	(WERDIN GONZÁLEZ et al., 2014)	Argentina	Óleo essencial de gerânio e bergamota	Nanocápsulas		Atividade inseticida contra <i>R. dominica</i> e <i>T. Castaneum</i>
9.	(BALASUBRAMANIAN; KODAM, 2014)	Índia	Óleo essencial de lavanda	Nanofibras		Atividade antibacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>
10.	(BALDISSERA et al., 2014)	Brasil	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	Nanocápsulas		Atividade antiprotozoária (<i>Trypanosoma brucei brucei</i>)
11.	(ABDEL-AZIZ et al., 2014)	Egito	Óleo essencial de <i>Chenopodium murale</i>	Nanopartículas de parta		Atividade antioxidante e antibacteriana
12.	(BALDISSERA et al., 2013)	Brasil	óleos essenciais de andiroba (Carapa guaianensis) e aroeira (Schinus molle)	Nanoemulsões	Emulsificação espontânea	Atividade antiprotozoária (<i>Trypanosoma brucei brucei</i>)
13.	(SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2012)	EUA	Timol	Nanocápsulas		Atividade antimicrobiana contra <i>Escherichia coli</i> O157: H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>
14.	(MISHRA et al., 2012)	Índia	Óleo essencial de <i>Hippophae rhamnoides</i> , sementes (Vitis)	Nanopartículas Lipídicas Sólidas	Emulsificação o/a	Tratamento da Acne vulgaris

			venifera) e extrato de <i>Calendula officinalis</i> .			
15.	(SINGHAL et al., 2011)	Índia e Coréia do Sul	Óleo essencial Ocimum sanctum	Nanopartículas de prata		Atividade antibacteriana (<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>)
16.	(PAZINATO et al., 2014)	Brasil	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	Nanopartículas Lipídicas Sólidas		Atividade inseticida contra <i>Rhipicephalus microplus</i>
17.	(MOGHIMIPOUR; RAMEZANI; HANDALI, 2013)	Irã	Óleo essencial de <i>Z. multiflora</i>	Nanopartículas Lipídicas Sólidas		Obtenção de um nanocarreador
18.	(GOMES et al., 2013)	Brasil	Óleo essencial de <i>Drimys angustifolia</i> Miers e <i>D. brasiliensis</i> Miers (“casca-de-anta”)	Nanoemulsão	Homogeneização de alta pressão	Citotoxicidade <i>in vitro</i> sobre a U-138 MG (glioblastoma humano) e T24 (carcinoma da bexiga humana)
19.	(DONSI et al., 2011)	Itália	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> e d-limoneno	Nanoemulsão	Homogeneização de alta pressão	Atividade antibacteriana <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . Aplicação alimentar.
20.	(NATRAJAN et al., 2015)	Índia	Óleo essencial de <i>Curcuma longa</i> e capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Nanocápsulas de quitosana-alginato	Gelificação iônica	Atividade antiproliferativa
21.	(WU; LUO; WANG, 2012)	EUA	Timol e carvacrol.	Nanopartículas de zeína	Dispersão líquido-líquido	Atividade antioxidante e antibacteriana (<i>E. Coli</i>)
22.	(MUNIYAPPAN;	Índia	Óleo essencial de	Nanopartículas		Atividade

	NAGARAJAN, 2014)		<i>Curcuma pseudomontana</i>	as de ouro		antioxidante
23.	(DUARTE et al., 2015)	Brasil	Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Nanoemulsão	Método de baixa energia	Atividade larvicida <i>Aedes aegypti</i>
24.	(ZHAO et al., 2010)	China	Óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i>	Nanoemulsão		Obtenção do sistema nanocarreador e estudos de pre-formulação
25.	(SANTOS, R. C. V. et al., 2014)	Brasil	Óleo essencial da árvore do chá TTO (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	Nanopartículas Lipídicas Sólidas		Atividade antibacteriana (<i>Paenibacillus</i> sp) e estudo de toxicidade em <i>Apis mellifera</i> .
26.	(DIAS et al., 2014)	Brasil	Óleo essencial de copaíba (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne)	Nanoemulsões	Homogeneização de alta pressão e emulsificação espontânea	Obtenção do sistema nanocarreador e estudos de pre-formulação.
27.	(SAKULKU et al., 2009)	Tailândia	Óleo essencial de citronela <i>Cymbopogon nardus</i>	Nanoemulsão	Homogeneização de alta pressão	Atividade repelente.
28.	(SATHISHKUMAR et al., 2009)	Coréia	Óleo essencial de <i>Cinnamon zeylanicum</i>	Nanopartículas de prata		Atividade antibacteriana (<i>E. Coli</i>)
29.	(MURUGAN; SAMIDOSS; et al., 2015)	Itália	Extrato de <i>Ulva lactuca</i>	Nanopartículas de prata		Atividade contra larvas e pupas do vetor da malária <i>Anopheles stephensi</i> e atividade contra <i>Plasmodium falciparum</i> .
30.	(MURUGAN; LABEEBA; et al., 2015)	Itália	Extrato de <i>Aristolochia</i>	Nanopartículas de prata		Atividade contra larvas e pupas do

						vetor da malária <i>Anopheles stephensi</i>
31.	(MARYAM; SHAKERI; KIANI, 2015)	Irã	Nanopartículas de albumina sérica humana carregados de carvacrol. (HSA carvacrol)	Nanopartículas	Dessolvatação e emulsão/dessolvatação	Atividade contra câncer de estômago.
32.	(PEREIRA et al., 2015)	Portugal	Extrato metanólico de <i>L. stoechas</i> ssp. <i>luisieri</i> e <i>L. pedunculata</i>	Nanocápsulas de PLGA	Emulsificação espontânea	Atividade antioxidante
33.	(CHRISTOFOLI, M.; COSTA; BICALHO; DOMINGUES; et al., 2015)	Brasil	Óleos essenciais de folhas <i>Rhoifolium zanthoxylum</i>	Nanoesferas PCL	Nanoprecipitação do polímero pré-formado	avaliar seu efeito inseticida em populações de <i>Bemisia tabaci</i>
34.	(VAUCHER et al., 2015)	Brasil	óleos de andiroba e copaíba	Nanoemulsões	Homogeneização de alta pressão	contra espécies <i>Paenibacillus larvae</i> (doença de loque americana)
35.	(RODRIGUES et al., 2014)	Brasil	Óleo de Copaíba (<i>Copaifera duckei</i>)	Nanoemulsão	Homogeneização de alta pressão	Avaliar o potencial de ação inseticida contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> .
36.	(HU et al., 2014)	China	Evodiamine (EVO) e óleo <i>Brucea javanica</i>	Nanoemulsão		Desenvolvimento de nanoemulsão e caracterização físico-química.
37.	(MORSY et al., 2014)	EUA	Óleos essenciais de orégano (<i>O. minutiflorum</i>) e alecrim (<i>R. officinalis</i>)	Nanopartículas em biofilmes		Atividade antibacteriana contra patógenos alimentares
38.	(BALASUBRAMANIAN; KODAM, 2014)	Índia	Óleo de <i>Lavandula angustifolia</i>	Nanofibras de poliácridonitrilo		Atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> e <i>K.</i>

						<i>pneumoniae</i>
39.	(SALVIA-TRUJILLO et al., 2013)	Espanha	Óleo essencial <i>Cymbopogon citratus</i>	Nanoemulsão de Alginato	Homogenização de alta pressão	Desenvolvimento de nanoemulsão e caracterização físico-química.

As nanopartículas de prata (NPSAG) tem as propriedades de elevada área superficial, tamanho muito pequeno (<20 nm) e de alta dispersão. A prata é um metal bactericida seguro e eficaz, porque não é tóxico para células de animais, enquanto é altamente tóxico para as bactérias (ABDEL-AZIZ et al., 2014). As nanopartículas têm sido utilizados para direcionar agentes antimicrobianos para o local da infecção, a fim de que doses do fármaco possam ser administrado no local da infecção, superando assim a resistência e com menos efeitos adversos sobre o paciente (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

Em um estudo foram sintetizadas NPSAG utilizando extrato derivados de folhas de *Murale chenopodium* compostas principalmente de α -terpineno, (Z) e cis-Ascaridole. A quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais foi maior na nanoformulação de prata quando comparado com o extrato da planta livre. A formulação de NPSAG mostrou ter atividade antioxidante e atividade antimicrobiana superior quando comparada a formulação com o extrato da folha de *Murale chenopodium* (ABDEL-AZIZ et al., 2014). Neste estudo concluiu que o óleo essencial da folha *C. murale* pode ser usado efetivamente na produção de nanopartículas de prata para aplicação comercial com potencial antioxidante e antimicrobianos.

Melaleuca alternifolia, também conhecida como "árvore do chá", é uma planta nativa da Austrália, e o seu óleo essencial possui comprovada ação antibacteriana, antifúngica e antiviral. Na composição do óleo estão presentes monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois correspondentes. Estratégias visando aperfeiçoar as características físico-químicas de substâncias bioativas envolvem, também, inovações tecnológicas, como a nanotecnologia (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; SAGAVE, L et al., 2015a)

Sagave et al, 2015 utilizou *Melaleuca alternifolia* nas seguintes formulações: óleo livre, nanocápsula, nanoemulsão e a combinação de óleo livre com nanocápsula e com nanoemulsão, além de seu composto majoritário, terpinen-4-ol, a fim de verificar a atividade antimicrobiana frente a isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens. Verificou-se baixo potencial para atividade antibacteriana de *M. alternifolia* na formulação de óleo livre. Todavia, essa atividade foi potencializada quando se incorporou o óleo essencial às nanoformulações.

Nanofibras poliméricas foram desenvolvidas utilizando óleo essencial de lavanda. A atividade antibacteriana foi avaliada por testar o material contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. As nanofibras exibiram eficaz atividade bactericida. A libertação *in vitro* do fármaco foi avaliada e verificou uma atividade antibacteriana duradoura. Dessa forma, esse estudo propôs um nanomaterial antibacteriano aplicável em vários campos como indústria

farmacêutica, indústria têxtil e aplicações no tratamento de água, mostrando a versatilidade da ciência nanotecnológica (BALASUBRAMANIAN; KODAM, 2014).

A nanotecnologia tem sido considerada uma área promissora aos pesticidas ecológicos, incluindo aqueles com produtos naturais incorporados como ingredientes ativos. O óleo de copaíba extraído de espécies do gênero *Copaifera* sp. muito difundida no Brasil pelas regiões norte e nordeste e várias propriedades biológicas têm sido atribuídas a copaíba, incluindo atividade antinoceptiva, anti-inflamatória e leishmanicida. Em um estudo obteve-se uma série de nanoemulsões de óleo em água contendo o óleo de copaíba. Um deles foi considerado um agente eficaz contra o *A. aegypti*. E pode ser usado como um potencial larvicida (RODRIGUES et al., 2014).

Há uma grande procura por inseticidas para serem usados na agricultura que não cause danos ao meio ambiente e que não sejam resistentes às pragas. Os esforços de investigação intensiva têm se dedicado à busca de compostos naturais, como os óleos essenciais, com ação inseticida. Entretanto, a maioria deles são conhecidos por serem biologicamente instáveis, podem facilmente sofrer degradação e são fracamente solúveis em água, o que torna o estudo de suas atividades biológicas e aplicação em culturas uma tarefa muito difícil. Assim, o nanoencapsulação de óleos essenciais com ação inseticida seria otimizar o sistema de controle de pragas pela liberação gradual do princípio ativo, reduzindo a necessidade de altas doses conseqüentemente a toxicidade e efeitos indesejáveis em organismos não-alvo e oferecer proteção contra a degradação ambiental (SHERRY et al., 2013).

Alguns estudos foram identificados com essa finalidade, como o caso em que óleos essenciais de *Zanthoxylum rhoifolium* foram encapsulados na tentativa de desenvolver um inseticida eficiente contra populações de *Tabaci b.* menos agressivo ao meio ambiente. Os resultados apresentados forneceram evidências convincentes de que nanoesferas com óleos essenciais de *Z. rhoifolium* otimizaram o sistema de controle contra a *B. tabaci*, oferecendo melhor proteção contra os processos de degradação e oxidação destes óleos essenciais. Melhorou a solubilidade aquosa o que foi associado com a redução do número de aplicações necessárias e a concentração de doses aplicadas, conseqüentemente o impacto ambiental e o potencial inseticida deste óleo essencial melhorou em comparação com a forma em livre favorecendo assim estudos para suas aplicações no campo.

Os estudos de pré-formulação podem fornecer informações sobre potenciais incompatibilidades físicas ou químicas entre o fármaco e adjuvantes. Estudos de pré-formulação

poderiam propiciar uma maior compreensão das características da formulação e permitir vislumbrar alternativas para melhorar a estabilidade das nanoformulações, conseqüentemente sua ação terapêutica.

Com o objetivo de produzir uma nanoformulação com óleo essencial de copaíba estável e eficiente foi desenvolvido um estudo de pré-formulação utilizando um método de planejamento fatorial. Com variação nos parâmetros como: o núcleo oleoso, surfactantes na composição de propriedades físico-químicas de nanoemulsões e método de obtenção. A formulação foi produzida e caracterizada, assim manteve-se as propriedades ao longo do período de avaliação (DIAS et al., 2014) para aplicação em estudos farmacológicos futuros.

Da mesma forma, na produção de nanoemulsão do óleo essencial de *Açafrão Zedoári* (*Curcuma zedoaria seco*), foi desenvolvido um diagrama de fases para identificar as regiões eficientes auto-emulsificação. Alterou a carga oleosa da formulação, a concentração de surfactantes, afim de modular o tamanho da gotícula, através do aumento do tempo de emulsificação, ou do aumento da concentração de co-tensioativo (ZHAO et al., 2010). Os estudos de pré-formulação foram finalizados com o estudo de biodisponibilidade oral relativa *in vivo*.

Desta forma, é possível inferir por meio da análise dos artigos selecionados as diversas as atividades farmacológicas propostas pelos óleos essenciais, principalmente as atividades antibacterianas e inseticidas (Tabela 2). É importante ressaltar que atualmente o número de trabalhos publicados em periódicos internacionais envolvendo óleos essenciais em nanoformulações está em constante ascensão. A aplicação da nanotecnologia está sendo uma forte estratégia para contornar os problemas de solubilidade e instabilidade dos óleos essenciais

Prospecção Tecnológica

A Prospecção Tecnológica é de fundamental importância e constitui uma ferramenta básica para orientar os esforços aplicados no desenvolvimento de novas tecnologias, pois são a base para ampliar a capacidade de antecipação e estimulam a organização dos sistemas de inovação, não somente no âmbito empresarial, mas, também, no meio acadêmico. Como a informação tecnológica é um dos requisitos indispensáveis para a realização de estudos de prospecção, ela deve ser obtida através de fontes confiáveis e contínuas, como as encontradas nos bancos de dados de patentes (AMPARO; RIBEIRO; GUARIEIRO, 2012)

A prospecção tecnológica tem como principal objetivo identificar as áreas de pesquisa estratégica e as tecnologias genéricas emergentes que tem a maior propensão de gerar maiores benefícios econômicos e sociais. E que seja capaz de identificar oportunidades e necessidades mais relevantes para pesquisas futuras, estabelecer prioridades, avaliar possíveis impactos e subsidiar o processo de tomada de decisões em ciência, pesquisa e inovação (TEIXEIRA, 2013).

Em primeiro lugar, foi avaliada a quantidade de patentes existentes em cada base de dados, segundo os descritores citados (tabela 3). Foram encontradas um total de 3990 patentes: WIPO (3354), EPO (182), USPTO (309) e INPI (145).

Na pesquisa efetuada, foram encontrados muitos documentos envolvendo os termos “*essential oils*” e óleos essenciais com maior destaque na Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO). Entretanto, quando confrontados os termos “*essential oils and nanoparticles*” ou “óleos essenciais e nanopartículas” observou-se que o número de pedidos de depósito de patentes é bruscamente reduzido. O mesmo acontece quando se utiliza o termo “*gamma and terpinene*” ou gama e terpineno e em seguida busca-se por atividade biológicas “*gamma-terpinene and cardiovascular*” “gama-terpineno e cardiovascular” e “*gamma-terpinene and nanoparticles*” e “gama-terpineno e nanopartículas”. Quando restringe o termo de busca da substância estudada (γ -terpineno) com a área de aplicação (nanotecnologia) não é verificado nenhum pedido de depósito de patente.

Tabela 3: **Número de depósitos de patentes por base de dados envolvendo os diferentes termos utilizados.**

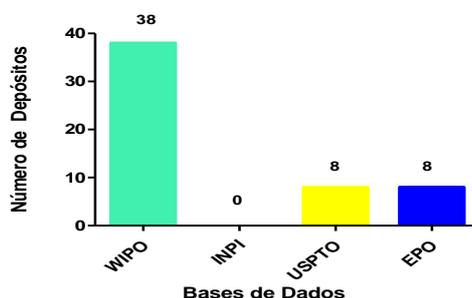
TERMOS DE BUSCA	BASES DE DADOS			
	INPI	WIPO	EPO	USPTO
“Essential oils” ou “óleos essenciais”	145	3305	173	301
“ <i>Essential oils and nanoparticles</i> ” ou “óleos essenciais e nanopartículas”	0	9	1	0
“ <i>gamma and terpinene</i> ” ou “gama e terpineno”	0	38	8	8
“ <i>Gamma and terpinene and cardiovascular</i> ” ou “gama e terpineno e cardiovascular”	0	1	0	0
“ <i>Gamma e terpinene and antioxidant</i> ” ou “gama e terpineno e antioxidante”	0	1	0	0
“ <i>Gamma and terpinene and nanoparticles</i> ” ou “gama e terpineno e nanopartículas”	0	0	0	0

Fonte: Autor

É válido destacar que os óleos essenciais possuem composição química complexa, podem acumular mono e sesqui-terpenos assim como fenilpropanóides, muitas vezes composta de mais de cem compostos diferentes, desta forma podem ter múltiplas atividades biológicas devido a diversidade de seus componentes (ASBAHANI et al., 2015). Ao analisar os resultados de pedidos de patentes encontrados observa-se que estudos utilizando o óleo essencial são superiores em número quando comparado ao estudo de substâncias isoladas de óleos essenciais, como é o caso do monoterpeneo γ -terpineno. É possível afirmar através dos pedidos de patentes identificados que estudos envolvendo nanopartículas de óleos essenciais, foram identificados em discreto número na WIPO (9) e EPO (1). Quando restringe o monoterpeneo γ -terpineno, composto isolado presente em vários óleos essenciais, em aplicação na nanotecnologia não foi encontrado pedidos de depósito de patente em nenhuma base. Apontando como uma área nova de pesquisa e carente de inovação. Foi identificado na WIPO um pedido de patente quando relacionou o γ -terpineno com as atividades biológicas pesquisadas (cardiovascular e antioxidante).

O foco da prospecção foi verificar os depósitos de patentes do monoterpeneo γ -terpineno, suas possíveis áreas de aplicações, atividades biológicas e seu uso na escala nanométrica. Com isso, todos os gráficos foram obtidos de acordo com o somatório da quantidade encontrada dos depósitos obtidos quando se pesquisou “*gamma and terpinene*” ou “gama e terpineno”, já que as demais palavras apareceram poucos resultados (“Gamma and terpinene and cardiovascular” ou “gama e terpineno e cardiovascular” “gamma e terpinene and antioxidant” ou “gama e terpineno e antioxidante” “gamma and terpinene and nanoparticles” ou “gama e terpineno e nanopartículas”).

GRÁFICO 5 - Total de depósitos de patentes pesquisados nas bases do WIPO, INPI, EPO e USPTO.

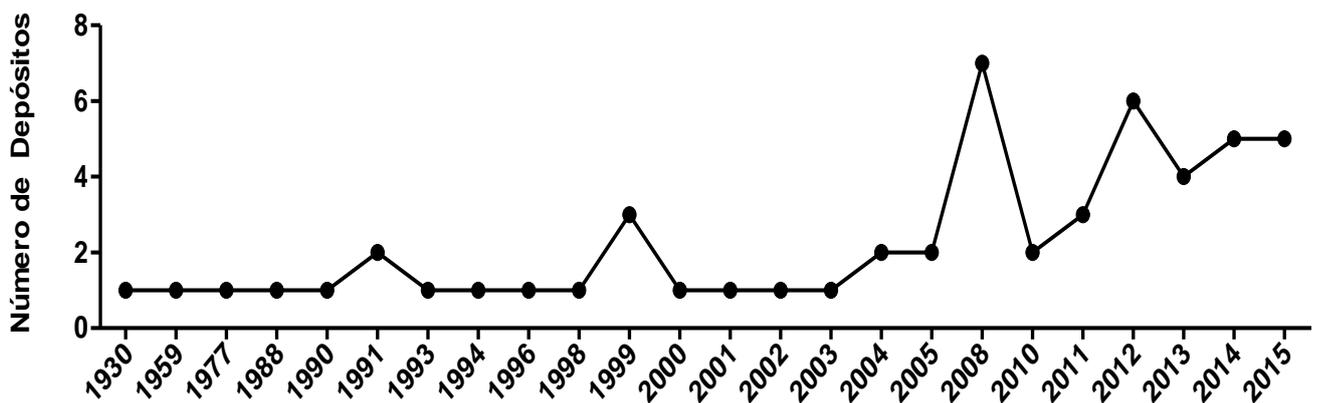


Fonte: Autor

A maior proporção encontrada no WIPO (Gráfico 5) pode ser justificada pelo fato de que o WIPO administra os depósitos de patentes através do TCP (Tratado de Cooperação de Patentes). O

TCP é formado por 148 países, então, mediante um pedido de patente no TCP, os candidatos podem procurar simultaneamente a proteção de uma invenção em todos os países envolvidos no tratado. Os demais escritórios tratam das patentes localizadas nos Estados Unidos (USPTO), Europa (EPO) e Brasil (INPI) (HASENCLEVER et al., 2010). Apesar do Brasil ter demonstrado um grande potencial para desenvolvimento na área, por ser detentor de imensa biodiversidade e recursos minerais abundantes, possuir uma indústria química razoavelmente diversificada, o Brasil ainda é carente de detenção patentes; essa carência pode ser explicada pelas atividades de pesquisas científicas e tecnológicas se restringirem ao meio acadêmico e pela falta articulação entre os agentes dos sistemas de inovação. Faltam políticas públicas e incentivo financeiro (VIEIRA; OHAYON, 2008).

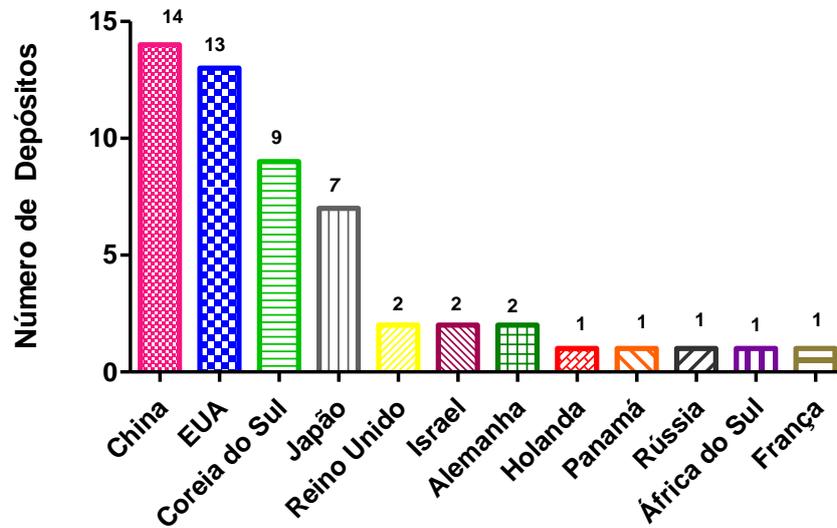
GRÁFICO 6 – Distribuição do número de pedidos de depósitos patentários por ano.



Fonte: Autor

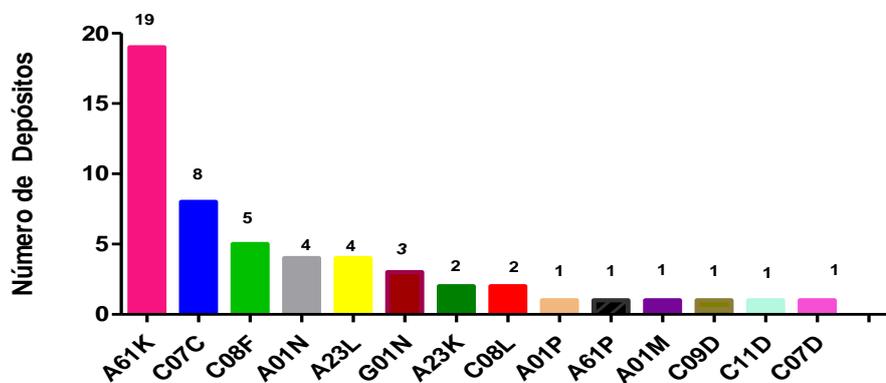
Ao agrupar os depósitos de patentes em um arranjo temporal é possível perceber que há um crescimento na última década do número de patentes (Gráfico 6). O ano de 2008 obteve um destaque no cenário mundial em número de depósitos mostrando um interesse crescente dos inventores por este monoterpreno. Porém, o processo de proteção tecnológica em diversos setores de aplicação industrial do γ -terpineno ainda é discreto.

A maioria dos depósitos de patentes é de origem asiática, a maior parte deles correspondem a quatro países, sendo quatorze depósitos de origem chinesa, treze norte-americanos, nove sul-coreanos, sete japoneses. São países com certa tradição na proteção patentária de suas pesquisas.

GRÁFICO 7: Representação do número de patentes depositadas por países.

Fonte: Autor

O código internacional de patentes consiste em um sistema hierárquico de símbolos e classifica patentes de invenção e de modelo de utilidade de acordo com as diferentes áreas tecnológicas a que pertencem. Essa classificação é adotada por mais de 100 países e coordenada pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual –OMPI. A classificação internacional de patentes possibilita facilitar a busca de um determinado tipo de tecnologia específica e o trânsito de documentos entre países, com isso podemos identificar as áreas em que o objeto de pesquisa em questão está sendo explorado.

GRÁFICO 8: Patentes depositadas nos bancos tecnológicos por código de classificação internacional.

Fonte: Autor

A classificação internacional de patentes dos 54 pedidos de depósitos encontrados nas bases utilizadas, mostraram que as principais aplicações do γ -terpineno foram nos códigos A61K, C07C e C08F (Gráfico 8). A classificação A61K obteve o maior número de patentes, está relacionada a aplicações para fins médicos, odontológicos e/ou higiene se refere a medicamentos ou outras composições biológicas. Demonstrando que o γ -terpineno apresenta diversas aplicações na indústria farmacêutica, na indústria de cosméticos por exemplo, como fragrâncias.

Para exemplificar a atividade terapêutica desse monoterpene, o depósito de patente de Hazan Zadik (nº de patente US20120213727) mostrou a polimerização de vários monoterpenos, incluindo o γ -terpineno, e uma dessas formas polimerizadas tem atividade na indução da diferenciação em células do epitélio pigmentado da retina. Foi também descoberto que as linhas celulares de melanoma e neuroblastoma foram induzidas a diferenciar-se, por conseguinte, reduzir o seu potencial maligno. Já a EP1569629 traz preparações tópicas de γ -terpineno com comprovada atividade anti-inflamatória do monoterpene.

Além dessa classificação também aparece a classe “C”, que representa aplicação química e metalúrgica, cujas subclasses patenteadas foram C07C, que se refere a química orgânica e síntese de compostos acíclicos ou carboxílicos na preparação de macromoléculas e a subclasse C08F que se referem com a síntese de compostos macromoleculares obtidos por reações compreendendo apenas ligações insaturadas carbono-carbono.

Os depósitos de patentes que se referem a atividade antioxidante e cardiovascular estão relacionados e referem-se a ensaios enzimáticos. O depósito KR1020020037434, código internacional de patente G01N confirma através de testes antioxidantes utilizando o radical DPPH que uma mistura contendo óleo essencial atua em alimentos sem modificar sabores de alimentos e mostrou um excelente efeito antioxidante. O depósito CN104705533, mostra a administração em porco de um aditivo de óleo vegetal contendo vários terpenos de propriedades antioxidantes, incluindo o γ -terpineno, com isso eles inibem o dano oxidativo do corpo do animal.

O Brasil vem investindo cada vez mais em nanotecnologia. A produção científica em Nanociência e Nanotecnologia (N&N) no Brasil desfruta de certo prestígio no cenário mundial, com a melhor infraestrutura da América Latina. Entretanto, quando se trata de produção de inovações percebe-se que o país precisa melhorar, um maior investimento que visem fortalecer o potencial inovador brasileiro (CARELLI HERMES; HAIDAMUS DE OLIVEIRA BASTOS, 2014).

Na prospecção científica não foi encontrado nenhum artigo que correlaciona a nanotecnologia com o γ -terpineno. Então, conseqüentemente foram protegidas pesquisas

relacionadas na área, como não foi encontrada na prospecção tecnologia, sendo uma opção para novos estudos a fim de fornecer futuramente novos produtos à sociedade e de novos conhecimentos à comunidade científica.

4 CONCLUSÃO

Foi visto que a produção científica de preparações nanofarmacêuticas com óleos essenciais nos últimos 10 anos tem sido crescente, apresentando resultados promissores referentes a otimização das atividades farmacológicas como antibacteriana, antioxidante, antiprotzoária e estudos de obtenção para novas preparações nanofarmacêuticas. Estes dados reforçam a hipótese da utilização da nanotecnologia como instrumento de enorme potencial para produção de novas alternativas terapêuticas para o tratamento e prevenção de diversas patologias e aplicações em diversas tecnologias.

Quando analisou a atividade patentária do monoterpeneo γ -terpineno foi observado que não há utilização da nanotecnologia. Pouco se tem de informação em relação as atividades cardiovascular e antioxidante do γ -terpineno, sendo suas principais aplicações com outros fins médicos, odontológicos e/ou higiene. E no Brasil é necessário estimular uma cultura de incentivo a proteção dos resultados de pesquisa por meio de patentes, este fato poderia estimular o meio acadêmico na tentativa de ampliar o crescimento econômico científico e tecnológico de um país com ênfase na descoberta de um maior número de moléculas derivadas de produtos naturais.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ, M. S. et al. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 356-363, 2014.

AMPARO, K. K. S.; RIBEIRO, M. D. C. O.; GUARIEIRO, L. L. N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 17, n. 4, p. 195-209, 2012.

ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220-243, 4/10/ 2015.

BALASUBRAMANIAN, K.; KODAM, K. M. Encapsulation of therapeutic lavender oil in an electrolyte assisted polyacrylonitrile nanofibres for antibacterial applications. **RSC Advances**, v. 4, n. 97, p. 54892-54901, 2014.

BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* in vitro and in vivo used mice as experimental model. **Experimental Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 21-27, 2014.

BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: In vitro tests. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 356-361, 2013.

BHATTACHARYA, S.; SHILPA; BHATI, M. China and India: The two new players in the nanotechnology race. **Scientometrics**, v. 93, n. 1, p. 59-87, Oct 2012.

CARELLI HERMES, E. G.; HAIDAMUS DE OLIVEIRA BASTOS, P. R. NANOTECNOLOGIA: PROGRESSO CIENTÍFICO, MATERIAL, GLOBAL E ÉTICO. **Persona y Bioética**, v. 18, n. 2, p. 107-118, 07 2014.

CARMO, G. M. et al. Effect of the treatment with *Achyrocline satureioides* (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 39-46, 2015.

CARSON, C.; HAMMER, K.; RILEY, T. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CHRISTOFOLI, M. et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 301-308, 8// 2015.

CHRISTOFOLI, M. et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 301-308, Aug 2015.

DAMASCENO, S. R. et al. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life sciences**, v. 94, n. 1, p. 58-66, 2014.

DIAS, D. D. O. et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79-84, 4/6/ 2012.

DIAS, D. D. O. et al. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 154-162, 8// 2014.

DO CARMO, G. M. et al. Effect of the treatment with *Achyrocline satureioides* (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 39-46, 2015.

DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1908-1914, 11// 2011.

DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 189-192, 3// 2015.

FERNÁNDEZ, S. et al. Brote de saturnismo asociado a un tratamiento basado en la medicina ayurvédica. **Medicina Clínica**, v. 144, n. 4, p. 166-169, 2015.

GOMES, M. R. F. et al. Citotoxic activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis* on human glioblastoma (U-138 MG) and human bladder carcinoma (T24) cell lines in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 259-267, 3// 2013.

HARKAT-MADOURI, L. et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 148-153, Dec 2015.

HASENCLEVER, L. et al. O instituto de patentes pipeline e o acesso a medicamentos: aspectos econômicos e jurídicos deletérios à economia da saúde. **Revista de direito sanitário**, v. 11, n. 2, p. 164-188, 2010.

HU, J. B. et al. Supermolecular evodiamine loaded water-in-oil nanoemulsions: Enhanced physicochemical and biological characteristics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 556-564, Oct 2014.

JAYASEELAN, C. et al. Synthesis of pediculocidal and larvicidal silver nanoparticles by leaf extract from heartleaf moonseed plant, *Tinospora cordifolia* Miers. **Parasitology research**, v. 109, n. 1, p. 185-194, 2011.

LACATUSU, I. et al. Lipid nanocarriers based on natural oils with high activity against oxygen free radicals and tumor cell proliferation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 88-94, 11/1/ 2015.

MARYAM, K.; SHAKERI, S.; KIANI, K. Preparation and in vitro investigation of antigastric cancer activities of carvacrol-loaded human serum albumin nanoparticles. **Iet Nanobiotechnology**, v. 9, n. 5, p. 294-299, Oct 2015.

MISHRA, P. et al. Compritol Solid Lipid Microparticles Gel Loaded with Herbal Extracts for Acne Treatment. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 414-421, 2012

MOGHIMIPOUR, E.; RAMEZANI, Z.; HANDALI, S. Solid lipid nanoparticles as a delivery system for *Zataria multiflora* essential oil: formulation and characterization. **Curr Drug Deliv**, v. 10, n. 2, p. 151-7, Apr 2013.

MORSY, M. K. et al. Incorporation of Essential Oils and Nanoparticles in Pullulan Films to Control Foodborne Pathogens on Meat and Poultry Products. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. M675-M684, Apr 2014.

- MUNIYAPPAN, N.; NAGARAJAN, N. S. Green synthesis of gold nanoparticles using *Curcuma pseudomontana* essential oil, its biological activity and cytotoxicity against human ductal breast carcinoma cells T47D. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 4, p. 2037-2044, 12// 2014.
- MURUGAN, K. et al. *Aristolochia indica* green-synthesized silver nanoparticles: A sustainable control tool against the malaria vector *Anopheles stephensi*? **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 127-135, Oct 2015.
- MURUGAN, K. et al. Seaweed-synthesized silver nanoparticles: an eco-friendly tool in the fight against *Plasmodium falciparum* and its vector *Anopheles stephensi*? **Parasitology Research**, v. 114, n. 11, p. 4087-4097, Nov 2015.
- NATRAJAN, D. et al. Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2015.
- NUCHUCHUA, O. et al. In vitro characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. **Aaps Pharmscitech**, v. 10, n. 4, p. 1234-1242, 2009.
- PASSOS, F. F. D. B. et al. Prospecção científica e tecnológica: Monoterpeno gama terpineno e atividades farmacológicas. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2103-2112, 2015.
- PAZINATO, R. et al. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Exp Appl Acarol**, v. 63, n. 1, p. 77-83, May 2014.
- PELGRIFT, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1803-1815, 11/30/ 2013.
- PEREIRA, F. et al. Production and characterization of nanoparticles containing methanol extracts of Portuguese Lavenders. **Measurement**, v. 74, p. 170-177, Oct 2015.
- RIBEIRO, P. H. S. et al. SEASONAL CHEMICAL COMPOSITIONS OF THE ESSENTIAL OILS OF TWO *Eugenia* SPECIES AND THEIR ACARICIDAL PROPERTIES. **Quimica Nova**, v. 39, n. 1, p. 38-43, Jan 2016.
- RODRIGUES, E. D. R. et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 6, p. 699-705, Nov-Dec 2014.
- SAGAVE, L. et al. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015a.
- SAGAVE, L. et al. *Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015b.

SAKULKU, U. et al. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1–2, p. 105-111, 5/8/ 2009.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Physicochemical Characterization of Lemongrass Essential Oil-Alginate Nanoemulsions: Effect of Ultrasound Processing Parameters. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 9, p. 2439-2446, Sep 2013.

SANTOS, R. C. V. et al. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 343-347, 9// 2014.

SANTOS, T. G. et al. Chemical Characterization of Essential Oils from *Drimys angustifolia* Miers (Winteraceae) and Antibacterial Activity of their Major Compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 164-+, Jan 2013.

SATHISHKUMAR, M. et al. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 332-338, 10/15/ 2009.

SHAH, B.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in model food systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8448-8453, 2012.

SHERRY, M. et al. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. **Journal of liposome research**, v. 23, n. 4, p. 268-275, 2013.

SINGHAL, G. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 7, p. 2981-2988, 2011.

TEIXEIRA, L. P. **Prospecção Tecnológica: importância, métodos e experiências da Embrapa Cerrados**: Planaltina, Distrito Federal: Embrapa Cerrados 2013.

VAUCHER, R. D. et al. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 205-210, Jun 2015.

VIEIRA, V. M. D. M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. **Revista Economia & Gestão**, v. 6, n. 13, 2008.

VIJAYARAGHAVAN, K. et al. One step green synthesis of silver nano/microparticles using extracts of *Trachyspermum ammi* and *Papaver somniferum*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 114-117, 6/1/ 2012.

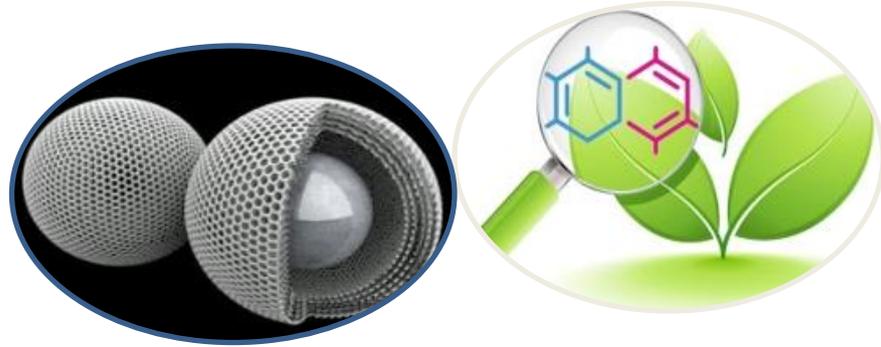
WERDIN GONZÁLEZ, J. O. et al. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties. **Chemosphere**, v. 100, p. 130-138, 4// 2014.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 10// 2012.

ZHAO, Y. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1–2, p. 170-177, 1/4/ 2010.

ZIAEE, M. et al. Cardioprotective Effects of Essential Oil of *Lavandula angustifolia* on Isoproterenol-induced Acute Myocardial Infarction in Rat. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 1, p. 279-289, Win 2015.

ZOLNIK, B. S.; SADRIEH, N. Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 422-427, 6/21/ 2009.



CAPÍTULO 2

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE
PLGA CONTENDO γ -TERPINENO**

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE PLGA CONTENDO γ -TERPINENO

GOMES, K. K. L. B.¹; CIRIACO, S. L.; OLIVEIRA, P. A.²; CARVALHO, A. L. M.;
MAGALHÃES, N. S. S.³; ROLIM, H.M.L.¹

1- Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos de Liberação Modificada – NANOSFAR. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina-PI, Brasil *E-mail: kassia_lbarros@hotmail.com

2 – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

3 – Laboratório de Sistema de Liberação Controlada de Fármacos e Vacinas - SLC-NF Universidade Federal do Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO: As nanocápsulas poliméricas (NCs) têm por vantagem transportar uma carga elevada de moléculas em um núcleo oleoso e garantir estabilidade físico-química e proteção contra a degradação enzimática devido à presença da parede polimérica. O estudo teve como objetivo encapsular o γ -terpineno (NC-GT), um monoterpene lipofílico de potencial atividade farmacológica em nanocápsulas de PLGA e caracterizar esse sistema a fim de determinar e selecionar uma formulação estável para ser testada em modelo de atividade cardiovascular por via intravenosa utilizando *Rattus norvegicus*. As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. No aspecto microscópico a formulação mostrou-se estável apresentando tamanho de partícula $173,43 \pm 4,5$ nm e índice de polidispersão $0,197 \pm 0,03$ nm, Potencial Zeta $-16,33$ mV e pH $7,6 \pm 0,01$. Essas características apontam uma população monodispersa, de carga negativa e uma formulação que pode ser aplicada por via intravenosa. O tamanho das partículas das NC produzidas foi significativamente afetado pela concentração do γ -terpineno, isso é comprovado quando se analisa a média dos grupos de diferentes concentrações pelo teste ANOVA one-way ($p < 0,05$). Quando se utiliza o teste de T-Student comparando os grupos de diferentes concentrações com as NC vazias verifica-se também diferença significativa, apontando o aumento do tamanho médio das partículas com o aumento da concentração do princípio ativo. Obteve-se o teor pela espectroscopia derivativa na primeira ordem (UV-vis-ED-1ªOrdem) em 259,8 nm e a taxa de encapsulação através da técnica ultrafiltração utilizando unidades Ultrafree para centrifugação. O teor de γ -terpineno foi de 109% e a taxa de encapsulação foi de 97%. Estes dados atendem aos parâmetros exigidos pela resolução 899/2003 da ANVISA. Dessa forma, apresenta resultados promissores que ampliam as perspectivas para a realização dos testes *in vivo*, com intuito de verificar a influência da do γ -terpineno nanoencapsulado sobre o sistema cardiovascular.

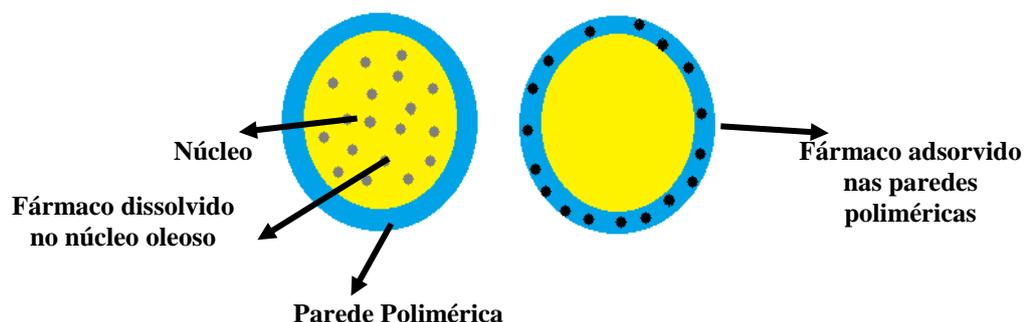
PALAVRAS-CHAVE: óleos essenciais; γ -terpineno; nanopartículas poliméricas; nanocápsulas.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve expansão da nanotecnologia não só nas áreas que envolvem sistemas eletrônicos, mas também na área farmacêutica, trazendo uma nova perspectiva em saúde e medicina. Há um grande interesse em utilizar as propriedades físico-químicas únicas de nanopartículas em sistemas de distribuição de fármacos para o transporte e direcionamento para compartimentos específicos, normalmente inacessíveis para alguns produtos farmacêuticos, como no tratamento de vários tipos de câncer, bem como o sistema nervoso central (SNC) (KNUDSEN et al., 2015)

Vários sistemas de liberação de fármacos são constantemente desenvolvidos. As nanopartículas são nanocarreadores de grande aplicação e possuem tamanho entre 1-1000 nm (1 μ m). As nanopartículas referem-se a dois tipos de estruturas diferentes: as nanoesferas e nanocápsulas, nas quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (BARBOSA; MAGALHÃES, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012a). Nas nanoesferas o fármaco encontra-se disperso ou solubilizado na matriz polimérica, obtendo-se um sistema homogêneo, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado (Figura 1). As nanocápsulas são um sistema vesicular de diâmetro inferior a 1 μ m, são organizadas como um núcleo lipídico, contendo uma dispersão de um lipídio sólido, em geral um tensoativo de baixo equilíbrio lipófilo-hidrófilo (EHL) em um lipídio líquido, envolto por uma parede polimérica constituída por um polímero (JÄGER et al., 2009).

FIGURA 1: Representação esquemática nanocápsulas poliméricas



FONTE: AUTOR

As nanocápsulas são potenciais carreadores de fármacos, pois confere uma adequada proteção ao princípio ativo frente à degradação no meio biológico, permite a veiculação de moléculas hidrofóbicas, apresentam maior estabilidade quando em contato com os fluidos biológicos e é possível obter propriedades desejadas a fim de modificar e direcionar a liberação de fármacos (BARBOSA; MAGALHÃES, 2011). As nanocápsulas são carreadores

de escolha para a administração intravenosa de fármacos altamente lipofílicos, pois são constituídas por polímeros estáveis, com baixa toxicidade e degradação no organismo (MISRA; SAHOO, 2010).

A capacidade de degradação no organismo deve-se as propriedades do polímero escolhido. Estes podem ser naturais ou sintéticos. Os mais utilizados são os sintéticos, como o PLGA (Copolímero de ácido lático e glicólico). Este requer um menor tempo para sua completa degradação, implicando menor probabilidade de reações adversas além de ser versátil, biocompatível e boa viabilidade comercial (MOTTA; DUEK, 2006).

Os óleos essenciais (OE) são substâncias aromáticas produzidas como metabólitos secundários de algumas plantas. Os OE são substâncias de grande interesse devido às diversas propriedades apresentadas por muitos deles, tais como ação antimicrobiana, antioxidante, ação farmacológica e contra o câncer (MARINI, 2014).

O γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4) é um monoterpene componente de vários óleos distribuído em diversas plantas com atividade biológicas como: antimicrobiana e citotóxica (GEDARA, 2008; PIARU et al., 2012), antioxidante de lipoproteínas de baixa densidade e potencial proteção contra doenças crônicas e cardiovasculares, como a aterosclerose (CHOI et al., 2000). É uma substância considerada segura após testes de toxicidade aguda oral (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2010; PASSOS; LOPES; DE SOUSA; et al., 2015; VARDAR-UNLU et al., 2003). O γ -terpineno mostrou ser um fármaco promissor analgésico, tendo em consideração a combinação de eficácia e segurança, após apresentar atividade de antinociceção pronunciada quando avaliada em modelos de nociceção induzida quimicamente em ratos. Além disso, γ -terpineno tem efeito antinociceptivo quando administrado no nervoso central (intracerebroventricular e intratecal) e vias periféricas, e esta ação ocorre possivelmente com envolvimento do sistema opióide através de canais K^+ sensíveis ao ATP e sistema colinérgico (PASSOS; LOPES; ARAÚJO; et al., 2015).

Os OE são hidrofóbicos, possuem baixa estabilidade por serem voláteis à temperatura ambiente, facilmente degradável dependendo das condições de luz e temperatura o que tem dificultado e limitado a sua aplicação (WU; LUO; WANG, 2012). Neste estudo, foi utilizado o polímero biodegradável PLGA para formar nanocápsulas contendo o γ -terpineno (NC-GT). Dessa forma, procurou-se obter uma formulação estável, que fosse capaz potencializar as propriedades bioativas do monoterpene.

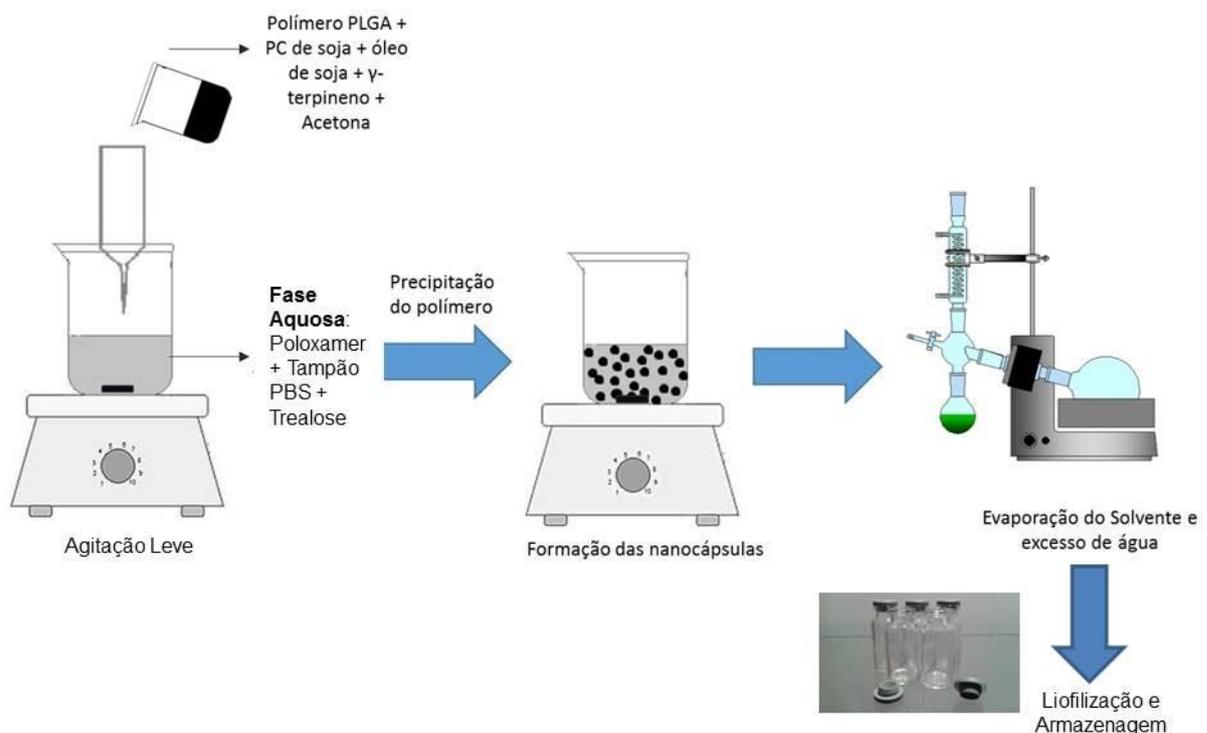
2 MATERIAIS E MÉTODOS

γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4) é líquido incolor a amarelo fraco de aroma forte, volátil, baixa solubilidade em água (5%) e teor de 97% (Sigma-Aldrich®), Poloxamer 407, Trealose e óleo de soja foram obtidos da Sigma-Aldrich®, Copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) da Lactel®, Fosfatidilcolina de soja (PC de soja) (Epikuron® 200), acetona e metanol (Merck®), Tampão PBS pH 7,4.

2.1 Preparação das Nanocápsulas

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Uma mistura orgânica constituída pelo polímero PLGA 50:50 (0,150 mg), fosfatidilcolina de soja (0,150mg), óleo de soja (0,100mg) e γ -terpineno (nas concentrações de 1; 1,5; 2; 5; 6; 10 mg/mL) solubilizados em acetona (15ml) e introduzida lentamente na fase aquosa constituída de Tampão Fosfato pH 7,4 (30ml) e poloxamer (0,150 mg) sob agitação moderada. A suspensão foi rotaevaporada para eliminação dos solventes até obtenção de um volume final de 10 ml (Figura 2). Nanocápsulas vazias foram preparadas seguindo o mesmo método, sem a incorporação da substância ativa (NC-Vazia).

FIGURA 2 – Esquemática do método de deposição interfacial de polímero pré-formado.



2.2 Caracterização das formulações

Após a preparação, os nanossistemas NC-GT e NC-Vazio foram caracterizados. Os parâmetros avaliados foram: aspecto macroscópico, pH, tamanho das partículas (TP), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ).

O pH das nanocápsulas foi aferido utilizando um medidor de pH digital (bioblock científico 99.622, Prolabo, Paris, França) a temperatura ambiente. O tamanho de partículas e índice de polidispersão das nanocápsulas foram determinados através da espectroscopia de correlação de fótons (analisador de partícula Beckman Coulter Delsa TM Nano S). Nesta análise 300µL da suspensão de nanocápsulas foi diluída em 1,7 mL de água ultra-pura. O potencial zeta das nanocápsulas, que corresponde à carga de superfície das vesículas, foi determinado diluindo 50 µL da suspensão em 5 mL de água ultra-pura e lendo a solução resultante em aparelho Zetatrac NC-148 (Microtrac). Para monitoramento das formulações ao longo do tempo, a estabilidade em longo prazo foi iniciada 24h após preparadas e ao longo de do tempo ate aparecimento de sinais de desestabilização. Os parâmetros avaliados foram: aspecto, coloração, separação de fases, variação do pH, tamanho das partículas e índice de polidispersão (PDI) das formulações em suspensão (MORENO et al., 2014). De acordo com o resultado das análises foi selecionada a formulação que apresentou melhor perfil e foi submetida aos testes de teor e taxa de encapsulação.

2.3 Determinação do teor de γ -terpineno nas nanocápsulas

Para a determinação do γ -terpineno na nanocápsula foi utilizada a técnica de espectroscopia derivativa na primeira ordem (UV-vis-ED-1ªOrdem) em 259,8 nm, utilizando o espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu). Todas as varreduras espectrofotométricas foram realizadas na faixa de 200 a 400 nm, com cubeta de quartzo de 1 cm.

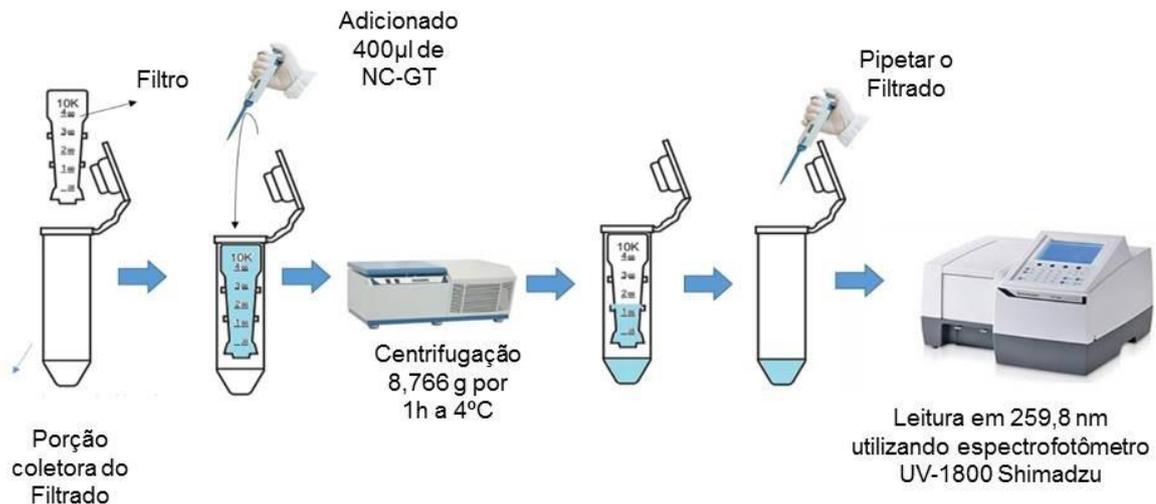
Para a quantificação do fármaco foi construída uma curva de calibração, a partir de soluções-mãe de 4000 µg.mL⁻¹ (solução metanólica), com cinco pontos de concentração (800, 1.600, 2.400, 3.200, 4.000 µg.mL⁻¹), diluídos a partir da solução-mãe com o mesmo solvente. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de correlação (r), adotando $r > 0,99$ como valor mínimo para aceitação. Para a quantificação das amostras de nanocápsulas contendo o γ -terpineno utilizou-se diluições em triplicata na concentração teórica de 1560 µg.mL⁻¹ e posteriormente calculado o teor em porcentagem.

2.4 Eficiência da encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada após a aplicação da técnica ultrafiltração usando unidades Ultrafree (Millipore, USA) com centrifugação (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japan) a 8,776 g por 1 h a 4°C (MORENO et al., 2014). A concentração de princípio ativo encapsulado foi determinada usando a técnica de espectroscopia derivativa na primeira ordem (UV-vis-ED-1ªOrdem) em 259,8 nm, no qual a taxa de encapsulação foi calculada em relação ao conteúdo inicial dosado nas formulações (Figura 3) de acordo com a equação 1.

$$\text{Equação 1: } \% \text{ de } \gamma\text{-terpineno encapsulado} = \frac{\text{Teor total} - \text{Teor do ultrafiltrado} \times 100}{\text{Teor Total}}$$

FIGURA 3 – Método para obtenção da taxa de eficiência de encapsulação



Fonte: Autor

2.5 Análises estatísticas

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste t-Student. Os dados foram analisados utilizando o Software GraphPadPrism (versão 5.0) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, com o objetivo de contornar as limitações do fármaco foram desenvolvidas várias formulações, diferenciando-se apenas na concentração do fármaco nas

nanocápsulas (1; 1,5; 2; 5; 6 e 10 mg/ml). As formulações foram analisadas e foi selecionada a formulação que pode incorporar a maior quantidade de princípio ativo mantendo a estabilidade (6mg/ml).

Após 24 horas de formuladas as preparações foram observadas quanto ao seu aspecto físico. Elas apresentaram um reflexo azulado típico das nanocápsulas e não apresentavam indício de separação de fases.

O processo de obtenção das nanopartículas também é um fator importante, pois pode afetar a eficiência, segurança, disponibilidade e biodistribuição final do nanocarreador (FORNAGUERA et al., 2015). Quanto ao método de obtenção utilizou a técnica de nanoprecipitação do polímero. A técnica consiste na mistura de uma fase orgânica contendo um solvente orgânico, óleo (óleo de soja), surfactante lipofílico e *polímeros* e uma fase aquosa (contendo surfactante hidrofílico). Após a mistura das duas fases, o polímero precipita na interface pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para a formação de nanogotas. Notou-se, imediatamente, o surgimento de uma suspensão leitosa, opalescente azulada, devido à formação das nanocápsulas. Em seguida, o solvente e parte da água são removido através da evaporação de sob pressão reduzida e a suspensão torna-se concentrada (FESSI et al., 1989).

As características das nanocápsulas são influenciadas pela natureza e concentração de seus componentes.

Os tensoativos são componentes fundamentais na preparação das nanopartículas para evitar a agregação das partículas durante a estocagem, sendo que a combinação de um tensoativo com elevado Equilíbrio Hidrófilo-lipófilo (EHL), no caso o poloxamer, com um de baixo EHL, como a fosfatidilcolina fornece formulações mais estáveis. Tensoativos hidrofílicos ou polares possuem um valor de EHL elevado, enquanto os valores baixos indicam características lipofílicas ou apolares. Justificando assim a presença do Poloxamer na fase aquosa e a Fosfatidilcolina de soja na fase orgânica (FALQUEIRO et al., 2012).

Os fosfolipídeos como a Fosfatidilcolina possuem grande eficiência em manter a estabilidade da emulsão, pois estabilizam a fase oleosa da emulsão óleo/água formada na primeira etapa de preparação, reduzindo a energia de superfície na interface e, devido à grande afinidade pela fase oleosa e aquosa, dispõe-se na interface juntamente com o poloxamer utilizado como agente estabilizante que é capaz de proporcionar aumento na viscosidade da fase externa aquosa aumentando a estabilidade da dispersão coloidal (FALQUEIRO et al., 2012). O Poloxamer revestindo a superfície das partículas de modo uniforme prolonga a cadeia de polímero para meio circundante fornecendo assim, um

impedimento estérico entre as partículas, evitando, assim, a agregação das partículas (KITTHEERANUN et al., 2015).

O polímero utilizado, PLGA, requer um menor tempo para sua completa degradação, implicando menor probabilidade de reações adversas, geradas muitas vezes pelos fragmentos cristalinos liberados por polímeros, cujo tempo de degradação seja excessivamente longo. Isso ocorre, pois, sua cadeia polimérica existe o ácido glicólico, que possui um impedimento menor, comparado a outros polímeros, ao ataque das moléculas de H₂O (MOTA; DUEK, 2006). Os copolímeros de PLGA (polímero escolhido para a formulação) têm sido intensamente aplicados como sistemas de entrega potencial devido às suas características desejáveis, como um bom comportamento mecânico, não-toxicidade e degradação controlada (OTHMAN; VLADISAVLJEVIĆ; NAGY, 2015).

Para a escolha do óleo utilizado deve ser levada em consideração, tais como ausência de toxicidade, elevada estabilidade físico-química, incapacidade de solubilizar o polímero e alta afinidade pelo fármaco (BOUCHEMAL et al., 2004). O óleo selecionado deverá ser um solvente adequado para o princípio ativo, de modo a prevenir a sua difusão e cristalização na fase externa aquosa, durante a preparação das nanocápsulas (FU et al., 2010). Os princípios ativos hidrossolúveis sofrem difusão para a fase aquosa, originando nanocápsulas com eficiência de encapsulação muito reduzidas. Quanto maior for a quantidade de princípio ativo dissolvida na solução oleosa, maior será a capacidade de carga das nanocápsulas (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012b) . O γ -terpineno consiste em um líquido oleoso e foi solubilizado no óleo de soja.

A acetona é o solvente orgânico normalmente utilizado, devido às suas propriedades solubilizantes e ao fato de ser facilmente removida de soluções saturadas de eletrólitos (SOUTO et al., 2012b).

A fim de verificar sinais visíveis de instabilidade nas formulações, amostras das preparações foram observadas em microscópio óptico (objetivas de 10 e 40x) e não apresentaram gotas de lipídios ou precipitação de polímero e princípio ativo, com exceção da formulação com maior quantidade de princípio ativo. Considerando que nanocápsulas de núcleo lipídico podem apresentar uma tendência para a sedimentação, cremação, floculação ou coalescência, o acompanhamento da estabilidade física é um parâmetro importante que deve ser analisada (CORADINI et al., 2014) e o monitoramento mesmo que por microscopia óptica revela o perfil de estabilidade por observação dos parâmetros citados. Segue na tabela 1, os parâmetros de caracterização das nanocápsulas selecionadas para estudo.

TABELA 1: Características das nanopartículas formuladas.

Parâmetro	NC-GT 6mg/ml	NC-Vazia
TP	173,43 ±4,5 nm	137,43 ±1,01 nm
PDI	0,197 ± 0,03 nm	0,220 ± 0,02 nm
pH	7,6 ± 0,01	6,81 ± 0,02
Potencial Zeta	- 16, 33 mV	- 9,07 mV

LEGENDA: NC: nanocápsula; TP: Tamanho de Partícula (nm), PDI: Índice de Polidispersão (nm), pH: Potencial de Hidrogênio,.

FONTE: AUTOR

O tamanho e a polidispersão de nanopartículas lipídicas podem ser afetados por diversos parâmetros como: a constituição da formulação (tipo de lipídio, tipo de ativo, tipo de surfactante, entre outros), o método e as condições de preparo (temperatura, agitação, pressão, entre outros) e armazenamento (MARCATO, 2008).

A técnica que visualiza o tamanho das partículas e o índice de polidispersão baseia-se na determinação das flutuações na intensidade da luz espalhada pelas partículas, em função do tempo. Essa técnica permite a determinação da distribuição do diâmetro das partículas e não apenas um valor médio de diâmetro. Além do diâmetro médio das nanoestruturas, fornece através de cálculo, o índice de polidispersão (PDI) das formulações. O PDI é utilizado para determinar a distribuição de tamanho das partículas nas amostras. Formulações com valores de PDI menores ou iguais a 0,3 apresentam-se monodispersas, ou seja, uniformes (FALQUEIRO et al., 2012).

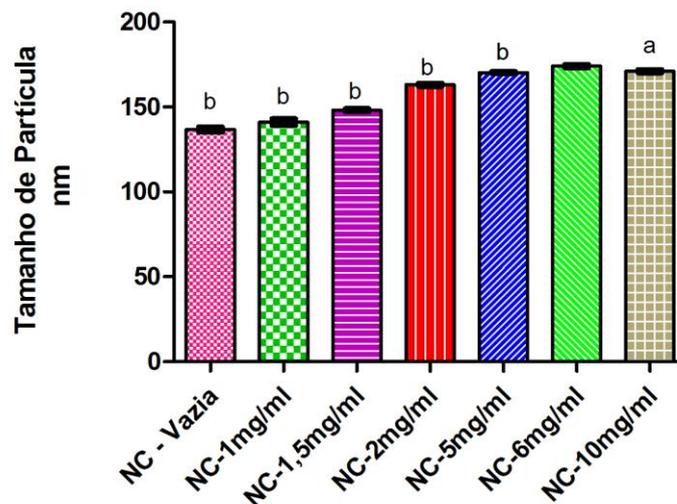
Através da determinação do tamanho das nanoestruturas é possível acompanhar a estabilidade das formulações e a tendência das partículas presentes na suspensão coloidal de se agregarem e de sedimentarem. É uma importante determinação, uma vez que o tamanho das partículas representa um aspecto essencial na sua biodistribuição e depuração sanguínea, visto que partículas acima de 300 nm são mais facilmente reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear e retirada mais brevemente de circulação (OWENS; PEPPAS, 2006).

As formulações obtidas tiveram um excelente tamanho de partícula com pequeno PDI (Tabela 1): 173,43 ±4,5 para NC-GT 6mg/ml e 137,43±1,01 para a NC-vazia, apontando uma formulação com características que podem ser utilizadas para uma administração intravenosa. A presença do surfactante (Poloxamer) tem levado a partículas menores, com um PDI satisfatório e isto pode ser atribuído ao fato de que o surfactante garante um bom processo de emulsificação e, por conseguinte, leva à formação de partículas menores com uma distribuição de tamanho uniforme (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Alguns trabalhos encontrados na literatura, BARRETO, 2012; SAGAVE et al., 2015; SOUZA et al., 2015, apresentaram tamanhos de partículas semelhantes ao encontrado nesse estudo, em condições semelhantes, com o mesmo método de obtenção com um óleo essencial ou fármacos oleosos.

Ao mencionar que a concentração do princípio ativo encapsulada pode alterar significativamente tamanho das partículas, foi feito um estudo comparativo entre as formulações previamente testadas para que apenas uma fosse selecionada. O tamanho das partículas das NC produzidas foi significativamente afetado pela concentração do γ -terpineno, comprovada pelo teste ANOVA one-way ($p < 0,05$). Quando se utiliza o teste de T-Student a NC-vazia é significativamente diferente de todos os grupos. Ao comparar pelo mesmo teste a formulação selecionada para estudos (6mg/ml) com as demais formulações apenas a de 10 mg/mL não apresentou diferença significativa entre os tamanhos das partículas (Gráfico 1). Acredita-se que houve uma saturação da NC, no qual a NC-10 mg/ml não foi capaz de incorporar todo óleo utilizado para preparação da formulação surgindo gotículas do fármaco em suspensão. Quanto ao PDI todas as formulações apresentaram-se monodispersas.

GRÁFICO 1 – Variação do tamanho de partícula em nanocápsulas de diferentes concentrações do γ -terpineno. Os valores são expressos por média \pm EPM analisadas por One-way ANOVA seguida de Teste t de Student pareado $p < 0,05$ para todos os grupos.



FONTE: Autor

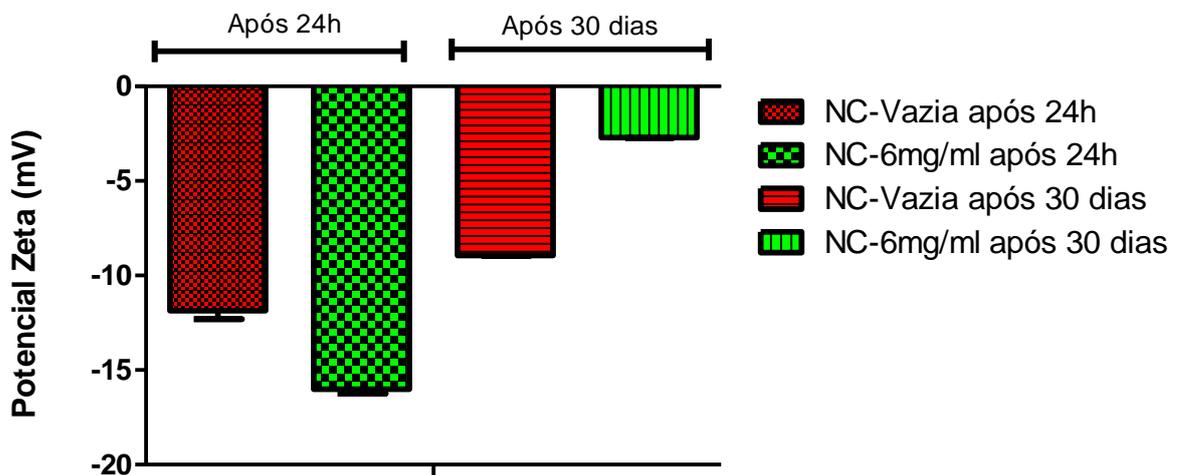
LEGENDA: NC: Nanocápsula, NC-GT: Nanocapsula γ -terpineno . **a** - Não há diferença significativa em relação a NC-6mg/ml ($p < 0,05$). **b** - Há diferença significativa em relação a NC-6mg/ml.

Para avaliar a influência do fármaco na superfície das partículas realiza-se o potencial zeta. A intensidade da carga pode ser determinada pela medida da mobilidade eletroforética

das partículas em um campo elétrico aplicado gerado pelas mudanças dos grupos funcionais ou da adsorção de substâncias iônicas no meio de dispersão. A determinação do potencial zeta pode ser uma maneira efetiva de controlar o comportamento das partículas, já que indica uma mudança na superfície das partículas e a força de repulsão entre as partículas. Quando o potencial zeta é inferior a +30mV e superior a - 30mV, a atração excede a repulsão e a dispersão tem mais chances de flocular, portanto, nanopartículas com potencial zeta de aproximadamente $\pm 30\text{mV}$ são mais estáveis em suspensão (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012).

A carga do potencial pode ser positiva ou negativa, dependendo do polímero e do material utilizado para modificação da sua superfície. Influenciam fortemente no potencial os fosfolipídeos, os poloxameres e os polímeros, visto que, estão envolvidos no envoltório adsorvidos a ele. Os fosfolipídeos e polímeros são responsáveis por conferir carga negativa e os poloxamer um surfactante não-iônico tende a reduzir, em valor absoluto, o potencial (SOUTO et al., 2012b).

GRÁFICO 2 – Influência do γ -terpineno e do tempo sobre o Potencial Zeta. Os valores são expressos por média \pm EPM analisadas por One-way ANOVA seguida de Teste t de Student pareado $p < 0,05$ para todos os grupos.



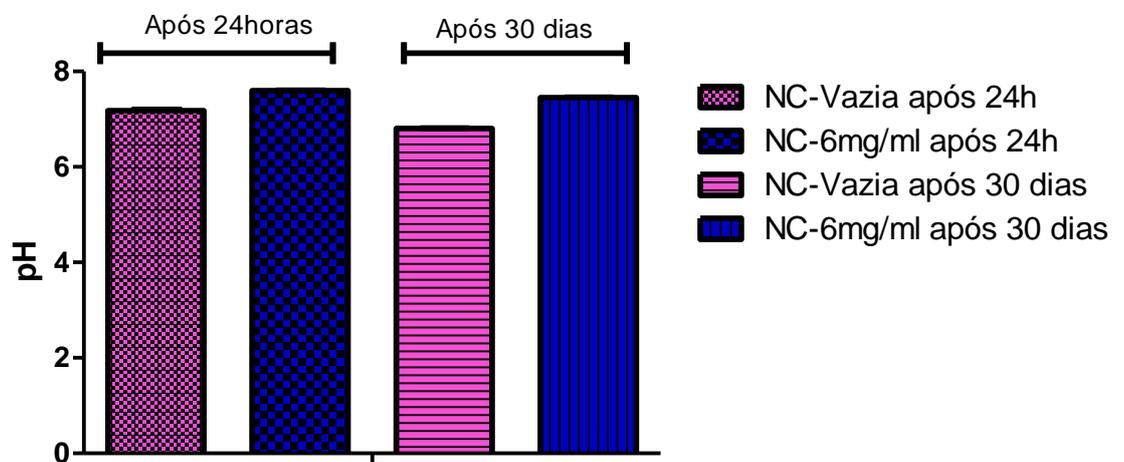
LEGENDA: NC: Nanocápsula, NC-GT: Nanocapsula γ -terpineno.

De acordo com os resultados do potencial Zeta há diferença estatística quando se compara a formulações NC-vazia e a NC-GT 6 mg/mL, mostrando que o γ -terpineno exerce influência sobre o potencial. Assim como há diferença estatística entre os resultados de 24

horas e 30 dias após a manipulação, percebe-se a queda em módulo do potencial zeta, refletindo na queda da estabilidade e separação de fases pela coalescência das gotículas da emulsão, ocasionada pela queda da repulsão entre as partículas. A adsorção de moléculas ativas às superfícies das nanopartículas, a presença de tensoativos adsorvidos, estabilidade química do polímero utilizado na sua obtenção dentre outros podem influenciar na estabilidade das emulsões (FALQUEIRO et al., 2012).

O monitoramento do pH das formulações em função do tempo pode indicar a degradação do polímero, que pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise de algum componente da formulação. Em relação ao pH houve diferença significativa entre as formulações NC-vazia e a NC-GT 6mg/ml. Mostrando que o fármaco na formulação exerce influência sobre o pH.. Também há diferença significativa na variação do pH após 30 dias da obtenção da formulação (Gráfico 3).

GRÁFICO 3 – Influência do γ -terpineno e do tempo sobre o pH sobre a NC-vazia e a NC-GT 6mg/ml. Os valores são expressos por média \pm EPM analisadas por One-way ANOVA seguida de Teste t de Student pareado $p < 0,05$ para todos os grupos.



LEGENDA: NC: Nanocápsula, NC-GT: Nanocapsula γ -terpineno

Não houve variação significativa na formulação selecionada de caracterização de tamanho de partícula nem no PDI ao analisar pelo teste ANOVA one-way os resultados. Dessa forma a população de nanopartículas manteve-se monodispersa ($PDI < 0,3$). Não houve também variação de pH nesse intervalo de tempo.

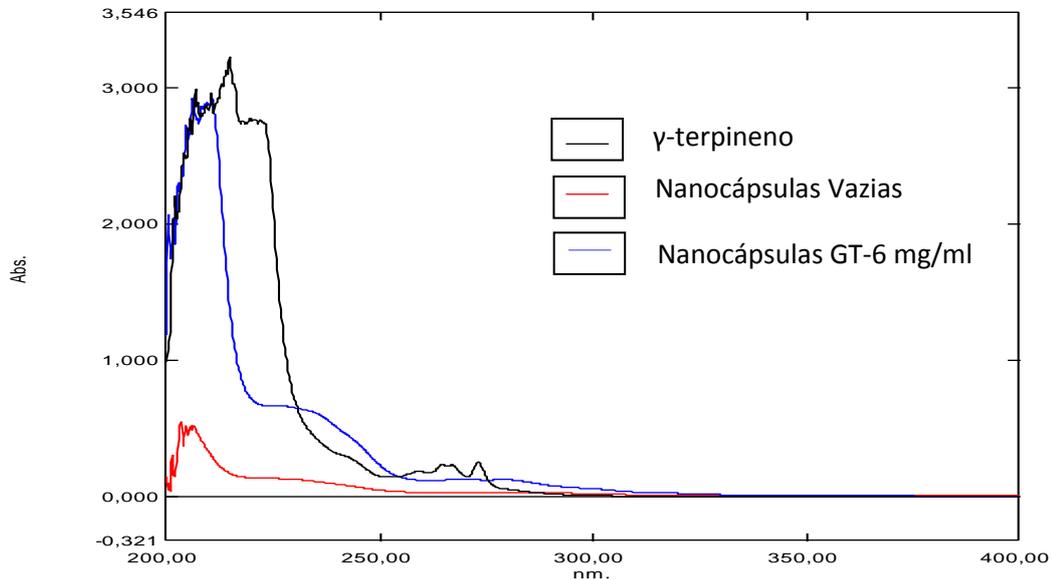
Ao final dos 30 dias em que a formulação de NC-GT 6 mg/mL foi acompanhada, observou-se que a formulação apresentava separação de fases gerada pela perda de estabilidade, provavelmente decorrente da diminuição do potencial Zeta e variação do pH.

Os problemas com a estabilidade das suspensões foram solucionados com a liofilização das formulações, que passaram a ser armazenadas na forma de pó e ressuspensos com tampão fosfato pH 7,4 somente no momento da administração. A liofilização é utilizada para a desidratação de sistemas coloidais, consiste, empregando-se um crioprotetor, um carboidrato, no caso a trealose na concentração de 10% no total da formulação, a fim de evitar a agregação das partículas durante o congelamento das suspensões.

Para provar que houve a formação dos nanossistemas com fármaco incorporado foi preciso procurar técnicas que possam avaliar de forma quali/quantitativamente a presença do destes sistemas nano em suspensão. O pico máximo de absorção do γ -terpineno sofre interferência de outros compostos presentes na nanocápsula, devido à composição química das nanocápsulas, formadas por lipídeos, como o óleo de soja e a fosfatidilcolina de soja, conforme o Gráfico 4. A sobreposição das bandas de transição eletrônica da espectrofotometria convencional na região do ultravioleta reduz de forma significativa o uso desta ferramenta na análise de associação de fármacos sem a prévia separação dos constituintes. Portanto, impossibilitou sua quantificação pela espectroscopia Uv-vis por ordem zero. Uma alternativa para contornar o problema da sobreposição de espectros é a espectrofotometria derivada (ED). É um método que não requer a separação prévia dos componentes, é acessível à maioria dos laboratórios e é menos dispendiosa se comparada ao método por cromatografia líquida de alta eficiência (DONATO et al., 2010).

Na sobreposição de espectros de derivadas dos componentes de uma mistura, puderam-se individualizar melhor os constituintes e até eliminar a interferência entre excipientes e princípios ativos. Com as varreduras abaixo pode perceber-se que a NC-vazia interfere na absorção do γ -terpineno, conforme sinalizado no Gráfico 4, necessitando de uma metodologia que possibilite a quantificação do composto, sem prévia separação da formulação (PASCHOAL et al., 2003).

GRÁFICO 4- Varreduras em espectrofotômetro Uv-vis do γ -terpineno, NC-vazia e NC-GT 6mg/mL.



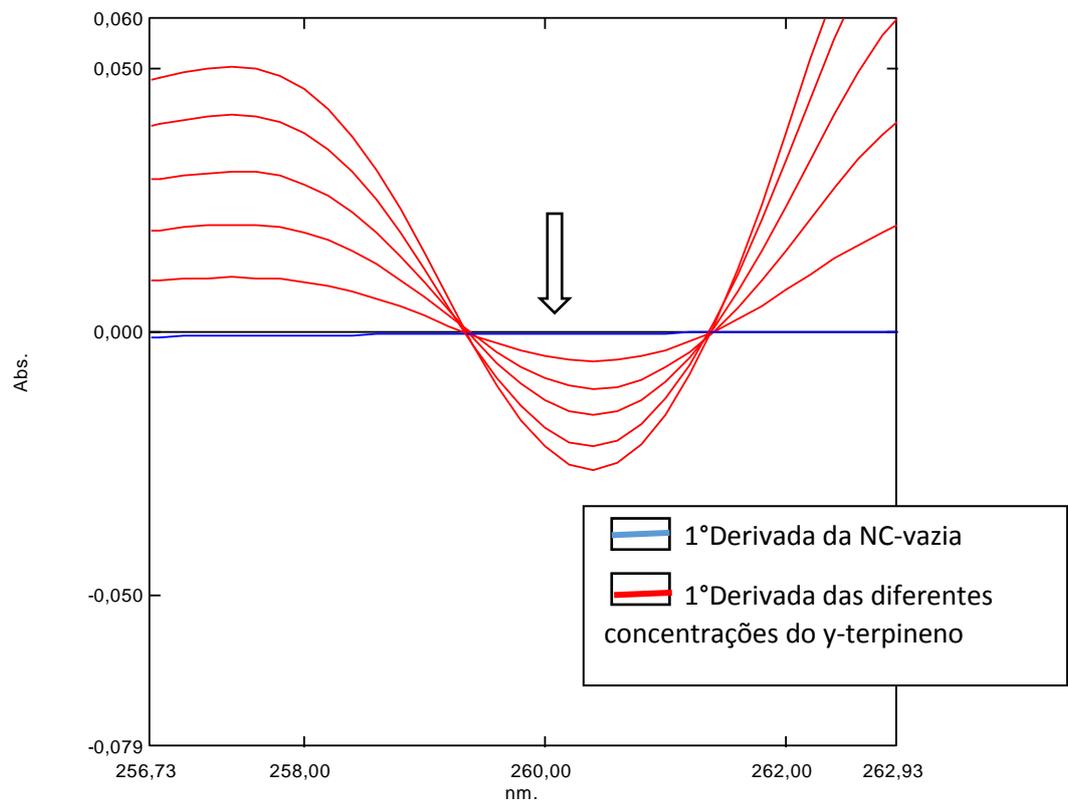
FONTE: Autor

A espectrofotometria derivada consiste na transformação do espectro normal por derivação. Os espectros derivados são obtidos utilizando apenas as informações contidas no espectro clássico ou de ordem zero. A técnica individualiza os constituintes pelo aumento do número de bandas de absorção, permitindo a eliminação de bandas largas e melhorando a detectabilidade das pequenas características espectrais (DONATO et al., 2010).

Existem diversas técnicas ou métodos de derivadas, entretanto a técnica do ponto de anulação ou zero crossing é a técnica mais utilizada para a quantificação de misturas binárias de fármacos com sobreposição de espectros. Essa técnica mede o valor absoluto da amplitude de absorção de um componente da mistura no comprimento de onda do ponto de anulação do outro componente, diminuindo o erro sistemático quando comparado à determinação gráfica. Nessa técnica o ponto de anulação a leitura da amplitude do analito é efetuada no comprimento de onda em que os interferentes apresentam absorvância zero ou não significativa. Apresenta como desvantagem a necessidade de efetuar a leitura da absorvância em comprimentos de onda, muitas vezes críticos, causando considerável perda da sensibilidade e precisão do método. É a técnica de escolha, salvo quando houver perda de sensibilidade ou exatidão nos resultados (EL-SAYED; EL-SALEM, 2005). Esse foi o método escolhido no estudo.

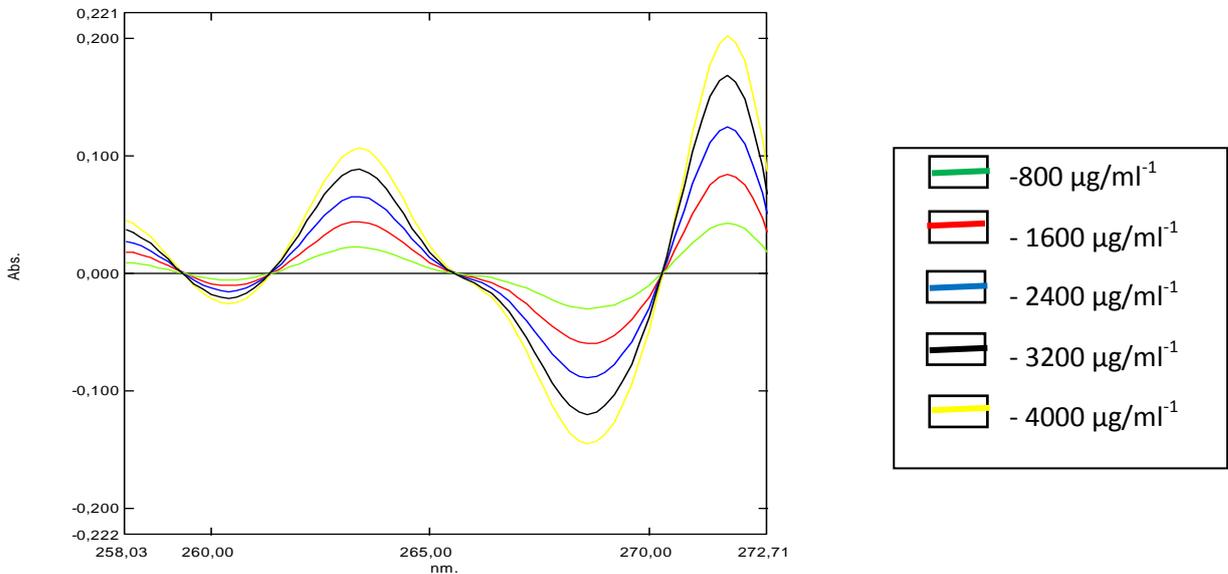
A primeira derivada é a razão entre a variação da absorvância (dA) versus variação do comprimento de onda ($d\lambda$). Assim, plotando-se $dA/d\lambda$ versus λ obtém-se o espectro de absorção de primeira derivada onde a anulação ocorre no ponto referente ao comprimento de onda máximo do espectro de absorção de ordem zero (Gráfico 5). É negativo onde a absorção decresce e positivo onde a absorção aumenta (DONATO et al., 2010).

GRÁFICO 5 – Espectroscopia Derivada mostrando o Ponto de anulação (Zero-crossing) escolhido (259,8nm).



Os espectros da varredura na ordem zero do γ -terpineno foram analisados na primeira derivada pelo método zero-crossing no qual verifica nos pontos de anulação da interferência (indicado pela seta), o comprimento de onda escolhido foi 259,8nm, foram utilizadas concentrações crescentes, conforme Gráfico 6, a fim de obter-se a curva de calibração.

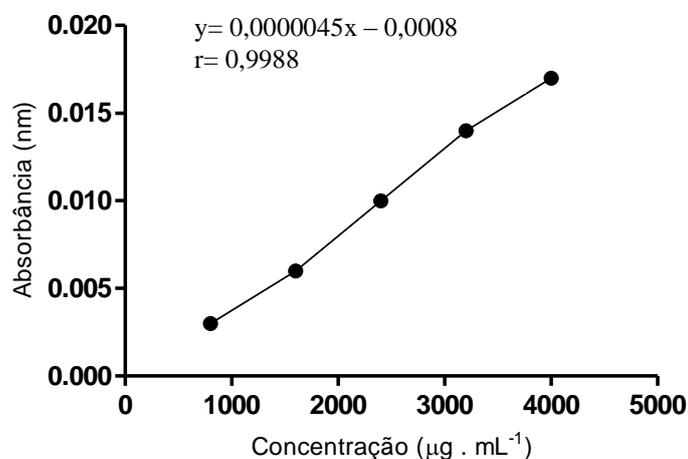
GRÁFICO 6 - Espectro de varredura do γ -terpineno em concentrações na 1ª derivada ($\gamma = 259,8\text{nm}$)



FONTE: AUTOR

A curva de calibração corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. É necessário elaborar uma curva de calibração para cada analito que se deseja analisar. Para selecionar uma curva de calibração esta deve possuir um coeficiente de correlação mínimo de (r) 0,99 (BRASIL, 2003). Neste estudo, essa solicitação foi cumprida, conforme gráfico 7.

GRÁFICO 7- Curva analítica do γ -terpineno (259,8 nm) na 1ª Derivada.



FONTE: AUTOR

A eficiência de encapsulação é um importante parâmetro a ser avaliado durante a caracterização das nanocápsulas, uma alta taxa de encapsulação é altamente desejável, já que garante que o princípio ativo estará protegido no interior da nanopartícula e disponível para atingir o local de ação desejado. O tamanho reduzido das nanopartículas dificulta a determinação da quantidade de fármaco complexada a elas, uma vez que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada. Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a centrifugação. A concentração total de fármaco, por sua vez, é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. Por conseguinte, a concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre (MORENO et al., 2014; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000).

Para avaliar a recuperação e eficiência do método utiliza-se a comparação entre a concentração teórica para o analito adicionado na amostra representando 100% com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente (concentração prática). De acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA existem limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos, na determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas é de 80% a 120% da concentração teórica do teste (BRASIL, 2003). Dessa forma, o resultado do teor obtido de $109\% \pm 0,0$ na formulação teste NC-GT 6mg/ml está dentro da faixa estabelecida pela resolução.

No presente trabalho a eficiência de encapsulação foi calculada através da técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, de acordo com a equação 1. A eficiência de encapsulação encontrada foi de $97,5\% \pm 0,0001$ o que indica uma excelente capacidade do sistema em incorporar o γ -terpineno.

Quando se utiliza a técnica de precipitação do polímero pré-formado são obtidas nanocápsulas com alta capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos de um modo efetivo e reprodutível, devido a sua cavidade central oleosa. A incorporação de fármacos lipofílicos em nanocápsulas tem demonstrado ser altamente dependente do grau de lipofilia do fármaco e de sua afinidade pelo óleo (no caso, óleo de soja) empregado na preparação das nanocápsulas, além do pH do meio (CAUCHETIER et al., 2003). O resultado de eficiência de encapsulação da formulação obtida tornar-se expressivo quando comparado, por exemplo, com o resultado do estudo que obteve nanocápsulas do óleo essencial de *Zanthoxylum*

rhoifolium pelo método de nanoprecipitação, no qual obteve uma eficiência de encapsulação de 96%; (CHRISTOFOLI et al., 2015).

4 CONCLUSÃO

A formulação apresentada neste estudo demonstrou ter características favoráveis como: tamanho de partícula, carga de superfície, elevado teor e eficiência de incorporação do γ -terpineno em nanossistemas poliméricos do tipo nanocápsulas. Dessa forma, estes nanossistemas apresentaram resultados promissores com perspectivas para a realização dos testes *in vivo* para verificar a influência do monoterpene nanoencapsulado sobre modelos experimentais de sistema cardiovascular.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. **Phytother Res**, v. 24, n. 5, p. 673-9, May 2010.

BARBOSA, I. A.; MAGALHÃES, S. S. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas furtivas contendo beta-lapachona para a terapia do câncer/Islene de Araújo Barbosa. 2011.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International journal of pharmaceutics**, v. 280, n. 1, p. 241-251, 2004.

BRASIL. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - Seção 1. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003.

CAUCHETIER, E. et al. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **International journal of pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 273-281, 2003.

CHOI, H.-S. et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, 2000.

CHRISTOFOLI, M. et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 301-308, 8// 2015.

DONATO, E. et al. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 125-130, 2010.

FALQUEIRO, A. et al. In vitro cytotoxicity of Selol-loaded magnetic nanocapsules against neoplastic cell lines under AC magnetic field activation. **Journal of Applied Physics**, v. 111, n. 7, p. 07B335, 2012.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International journal of pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FORNAGUERA, C. et al. PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood–brain barrier. **Journal of Controlled Release**, v. 211, p. 134-143, 8/10/ 2015.

FU, J. et al. High entrapment efficiency of chitosan/poly(lactic acid)/tripolyphosphate nanosized microcapsules for rapamycin by an emulsion-evaporation approach. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 725-728, 2010.

GEDARA, S. R. Terpenoid content of the leaves of *Thymus algeriensis* Boiss. **Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 2, p. 133-143, 2008.

GEISER, M. et al. Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease. **Part Fibre Toxicol**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2013.

KNUDSEN, K. B. et al. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 2, p. 467-477, 2// 2015.

MARCATO, P. Preparation, characterization and application in drugs and cosmetics of solid lipid nanoparticles. **Rev Eletron Farm**, v. 6, p. 1-37, 2008.

MARINI, V. G. **Nanoparticulas de zeina: preparação, caracterização e desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de terpinen-4-ol**. 2014. Universidade Federal de Santa Catarina

MISRA, R.; SAHOO, S. K. Intracellular trafficking of nuclear localization signal conjugated nanoparticles for cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 152-163, 2010.

MORA-HUERTAS, C.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MORENO, L. C. G. E. A. I. et al. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 64-68, 2014.

MOTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Sıntese, Caracterização e Degradação "in vitro" do Poli (L-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

MOTTA, A.; DUEK, E. Sıntese, caracterização e degradação" in vitro" do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v. 11, n. 3, p. 340-350, 2006.

OTHMAN, R.; VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; NAGY, Z. K. Preparation of biodegradable polymeric nanoparticles for pharmaceutical applications using glass capillary microfluidics. **Chemical Engineering Science**, v. 137, p. 119-130, 12/1/ 2015.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

PASCHOAL, L. R. et al. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2003.

PASSOS, F. F. D. B. et al. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

PASSOS, F. F. D. B. et al. Prospecção científica e tecnológica: Monoterpeno gama terpineno e atividades farmacológicas. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2103-2112, 2015.

PIARU, S. P. et al. Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 593-597, 2012.

SANTOS-MAGALHÃES, N. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International journal of pharmaceutics**, v. 208, n. 1, p. 71-80, 2000.

SCHOLES, S. et al. Enteric neuropathy in horses with grass sickness. **The Veterinary Record**, v. 132, n. 26, p. 647-651, 1993.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 854-867, 2012.

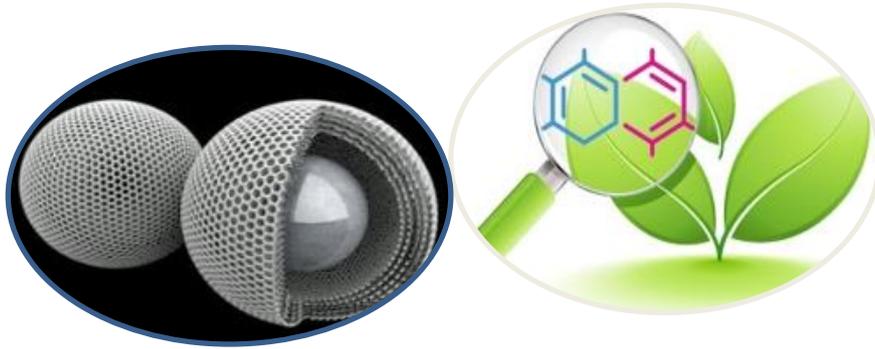
SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros-Parte I. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 96-100, 2012a.

_____. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados-Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012b.

VARDAR-UNLU, G. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 1, p. 63-7, Jan 1 2003.

VARMA, J. N. et al. Formulation and Characterization of Pyrazinamide Polymeric Nanoparticles for Pulmonary Tuberculosis: Efficiency for Alveolar Macrophage Targeting. **Indian J Pharm Sci**, v. 77, n. 3, p. 258-66, May-Jun 2015.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 10// 2012.



CAPÍTULO 3

**POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO
COMPLEXO NC-GT COMO AGENTE
HIPOTENSOR EM RATOS NORMOTENSOS**

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE NANOCÁPSULAS DE γ -TERPINENO COMO AGENTE HIPOTENSOR EM RATOS NORMOTENSOS

¹GOMES, K. K. L. B.*; ²MENDES, M. B.; ²OLIVEIRA, A. P.; ¹ROLIM, H. M. L.

1- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil. *E-mail: kassia_lbarros@hotmail.com

2- Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença multifatorial caracterizada pelos níveis altos sustentados da pressão arterial. Atualmente vários componentes de óleos essenciais, como os monoterpenos, são estudados por suas atividades no sistema cardiovascular. O γ -terpineno (GT) (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4) é um monoterpeno presente em diversos óleos essenciais, como, *Thymus vulgaris*, *Protium icicariba*, *Citrus deliciosa*, *Origanum onites*., entre outras. Apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória descrita na literatura, entretanto por ser muito lipofílico e instável há uma limitação na sua aplicação terapêutica. Desta forma, em um primeiro momento foi obtida uma formulação nanoencapsulada do γ -terpineno (NC-GT) com o objetivo de avaliar a atividade sobre o sistema cardiovascular em ratos normotensos não anestesiados. Para tanto, a atividade hipotensora foi investigada através da medida direta da pressão sanguínea em ratos *Wistar* (230 ± 30 g) após administração intravenosa de Nitroprussiato de sódio (NPS), NC-vazia, GT e NC-GT (1,5, 3 e 4,5 mg/kg para os dois últimos). Observou-se que o GT não mostrou ação hipotensora doses administradas ($-0,88 \pm 1,9$; $-0,29 \pm 4,1$; $-2,35 \pm 1,2$, mmHg, respectivamente), a NC-GT promoveu um efeito hipotensor nas três doses ($-13,72 \pm 2,7$; $-20,54 \pm 2,37$; $-29,89 \pm 3,2$ mmHg, respectivamente) e o controle positivo NPS ($-29,23 \pm 9,1$). Não houve alteração na frequência cardíaca após administração do GT ($4,9 \pm 3$; $7,9 \pm 3,1$; $5,11 \pm 1,2$, respectivamente), a NC-GT promoveu uma elevação da frequência cardíaca apenas na maior dose testada ($-9,3 \pm 2,5$; $-13,81 \pm 3,1$; $-18,5 \pm 2,2$ mmHg, respectivamente), enquanto que o NPS promoveu uma taquicardia ($34,85 \pm 11$). A nanocápsula polimérica foi determinante para que o γ -terpineno chegasse ao sítio de ação, mostrando ser um nanocarreador vantajoso e promissor. Portanto a NC-GT apresenta potencial farmacológico para aplicação no tratamento da hipertensão arterial.

Palavras-chaves: Nanocápsulas; Cardiovascular; γ -terpineno; hipotensão.

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença multifatorial caracterizada pelos níveis altos sustentados da pressão arterial, associada a várias alterações funcionais dos órgãos com aumentado risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (ALWAN, 2011). É uma das principais causas da diminuição da qualidade de vida e da esperança de vida e leva a altos custos socioeconômicos, afetando diretamente os indivíduos, as famílias, o sistema de saúde e a economia (MALTA et al., 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 25% da população mundial tem pressão arterial elevada, e prevêem crescimento de 60% no número de casos desta doença em 2025. No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 30% das mortes com causas conhecidas, assim como a maior causa de internação no Sistema Único de Saúde (SUS) (MALTA et al., 2016).

Atualmente há vários fármacos no mercado para controle da hipertensão arterial de diferentes mecanismos de ação como: betabloqueadores, inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina, bloqueadores dos canais de Ca^{2+} , antagonistas dos receptores de Angiotensina II, entretanto estas classes de medicamentos possuem significativos efeitos colaterais, como depressão do sistema nervoso central (betabloqueador), hipertensão de rebote em caso de retirada abrupta do medicamento (agonista α -adrenérgico), dentre outras que podem levar abandono do tratamento e até o aumento dos custos com despesas hospitalares (FRAGA, 2013), por isso, é frequentemente alvo nos estudos de desenvolvimento de novos fármacos, nos quais são utilizados modelos experimentais em animais que apresentam alterações fisiológicas semelhantes às aquelas encontradas em humanos.

Há um grande interesse na pesquisa de novos produtos bioativos para encontrar alternativas ao tratamento de hipertensão. Estudos experimentais e clínicos indicam que produtos naturais possuem um importante papel no desenvolvimento de novos fármacos e sugerem que metabólitos secundários obtidos de plantas apresentam um desempenho em melhorar a função dos vasos sanguíneos e, portanto, proteger o sistema vascular (RIBEIRO, THAÍS PÔRTO, 2012).

Sobre os efeitos farmacológicos apresentados pelos terpenos destacam-se as atividades sobre sistema cardiovascular. Vários estudos relatam o potencial de terpenos em ensaios farmacológicos no qual agem na diminuição da frequência cardíaca, como vasorelaxante e atividade hipotensiva (BARCELOS et al., 2010; BASTOS et al., 2010; PEIXOTO-NEVES et al., 2010; RIBEIRO, THAÍS PÔRTO, 2012).

O γ -terpineno (GT) é um monoterpeneo que mostrou ser um fármaco promissor analgésico, tendo em consideração a combinação de eficácia e segurança, após apresentar atividade antinoceptiva pronunciada quando avaliada em modelos de nocicepção induzida quimicamente em ratos (PASSOS et al., 2015). Existem registros que o γ -terpineno apresenta atividade antimicrobiana e citotóxica (GEDARA, 2008; PIARU et al., 2012) e uma importante atividade antioxidante de lipoproteínas de baixa densidade (CHOI et al., 2000). Mostrou nos testes de toxicidade aguda uma DL50 em ratos de 3,65 g/kg (PASSOS et al., 2015). Demonstrando ser um composto natural seguro.

Apesar de demonstrar boas atividades farmacológicas, a aplicação do γ -terpineno livre apresenta algumas limitações, como a baixa solubilidade em água, baixa estabilidade, volatilidade e fácil degradação (WU; LUO; WANG, 2012). Esses fatos justificam a busca por técnicas que protejam a substância ativa. A agregação de tecnologias como a nanotecnologia, pode constituir uma alternativa viável para minimizar essas características desfavoráveis dos terpenos visando seu emprego terapêutico.

O grupo de estudo realizou estudos *in vivo* avaliando a atividade do γ -terpineno por via oral no qual apresentou uma insignificante atividade. Desta forma, em um primeiro momento o grupo de estudo obteve uma formulação nanoencapsulada do γ -terpineno (NC-GT) com o objetivo de avaliar a atividade do nanoencapsulado sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4) 97%, Poloxamer 407, Trealose e óleo de soja foram obtidos da Sigma-Aldrich®, Copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) da Lactel®, Fosfatidilcolina de soja (PC de soja) (Epikuron® 200), acetona e metanol (Merck®), Tampão PBS pH 7,4.

2.1 Preparação das Nanocápsulas

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Uma mistura orgânica constituída pelo polímero PLGA, fosfatidilcolina de soja, óleo de soja e γ -terpineno na concentração de 6 mg/mL, todos solubilizados em acetona, foi introduzida lentamente na fase aquosa constituída de tampão fosfato pH 7,4 e poloxamer sob agitação moderada. A suspensão foi rotaevaporada para eliminação dos solventes e obtenção do volume de 10 mL. Nanocápsulas vazias, para serem usadas como controle negativo, foram preparadas seguindo o mesmo método, sem a

incorporação da substância ativa. Após a obtenção, as formulações passaram por testes de caracterização que consistem em: avaliação do tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, teor e taxa de encapsulação.

2.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com aproximadamente 3 meses de vida, pesando 230 ± 30 g. Os animais foram mantidos em gaiolas e separados por grupo experimental, cada grupo composto por cinco animais. A temperatura ambiente do biotério (Bioterio Setorial do NPPM / UFPI) foi mantida entre 22 e 24 °C, com luz controlada em ciclo de claro-escuro de 12 em 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Este estudo transcorreu sob a orientação da médica veterinária Profa. Janylla Mirck Guerra de Oliveira (CRMV-PI 1048) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí sob o parecer 069/14.

2.3 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais após a realização dos protocolos experimentais, transcorreu conforme o exigido pela Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, a qual dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Para a eutanásia, foi administrado sobre dose de 75 mg/kg Tiopental Sódico por via intraperitoneal.

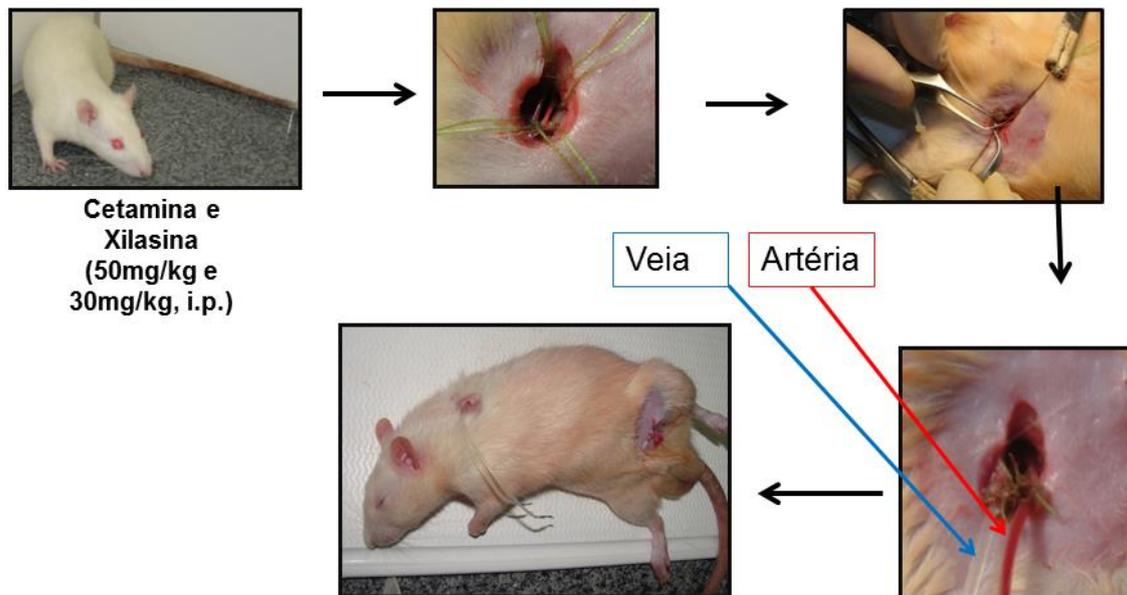
2.4 Efeito hipotensor das nanocápsulas contendo γ -terpineno (NC-GT)

Medida da pressão arterial média após administração intravenosa da NC-GT

Após anestesia com cetamina e xilazina (50 mg/kg e 30 mg/kg i.p, respectivamente), realizou-se canulação das artéria e veia femurais utilizando cateteres de polietileno, sendo um segmento de PE-10 (4 cm - diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (20 cm -diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), em seguida à inserção e fixação, os catéteres foram encapsulados por via subcutânea e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (scapulae) e foram mantidos com solução salina heparinizada (100 U/mL) imediatamente após a colocação e antes do registro do sinal da PA (Figura 1) (OLIVEIRA; MEDEIROS; MUKHERJEE, 1996). A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram medidas 24 horas após recuperação da anestesia, conectando o catéter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID, Gould, Cleveland, OH, EUA) e acoplado a um sistema de aquisição de dados (AECAD 04H, AQCAD 2.3.9, AVS Projetos, São Paulo, SP,

Brasil) (Figura 2). Para cada ciclo cardíaco, o software fornece dados de pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca).

FIGURA 1 – Protocolo de medida direta da pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.



Fonte: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular – UFPI.

Após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, administrou-se nitroprussiato de sódio (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por via intravenosa (i.v.), a fim de verificar-se a eficiência da canulação.

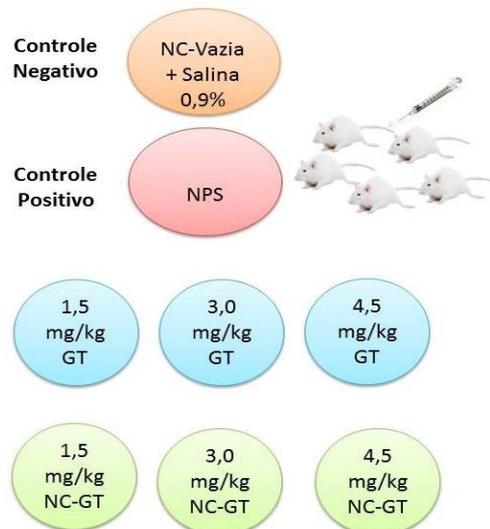
Após nova estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, foi administrado a NC-vazia, o controle negativo. Após 30 minutos o γ -terpineno foi administrado por via intravenosa nas doses de 1,5, 3,0 e 4,5 mg/kg (n = 5), com intervalos de tempo suficiente (± 30 min) para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. A administração da NC-GT seguiu a mesma metodologia (Figura 3).

FIGURA 2 - Aparato para registro de pressão arterial média após administração intravenosa da NC-Vazia, GT e NC-GT em ratos normotensos não anestesiados.



Fonte: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular – UFPI.

FIGURA 3 – Esquema mostrando os grupos e doses utilizadas nesse estudo.



Fonte: Autor. **Legenda:** NPS: Nitroprussiato de sódio, NC: nanocápsula, NC-GT: nanocápsula de γ -terpineno.

Para o registro correto dos efeitos observados sobre a PAM e FC, foram computados os valores da linha de base e os valores imediatamente após a administração das substâncias. As variações de PAM (Δ PAM) e FC (Δ FC) foram expressas como diferença da pressão arterial média final (PAMf) ou frequência cardíaca final (FCf) menos a pressão arterial média inicial (PAMi) ou frequência cardíaca inicial (FCi): Δ PAM= PAMf –PAMi / Δ FC=FCf–FCi.

2.5 Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados como MÉDIA \pm EPM entre PAM, PAS ou FC medidas após e antes os tratamentos. Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste t-Student. Os dados foram analisados utilizando o Software GraphPadPrism (versão 5.0) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

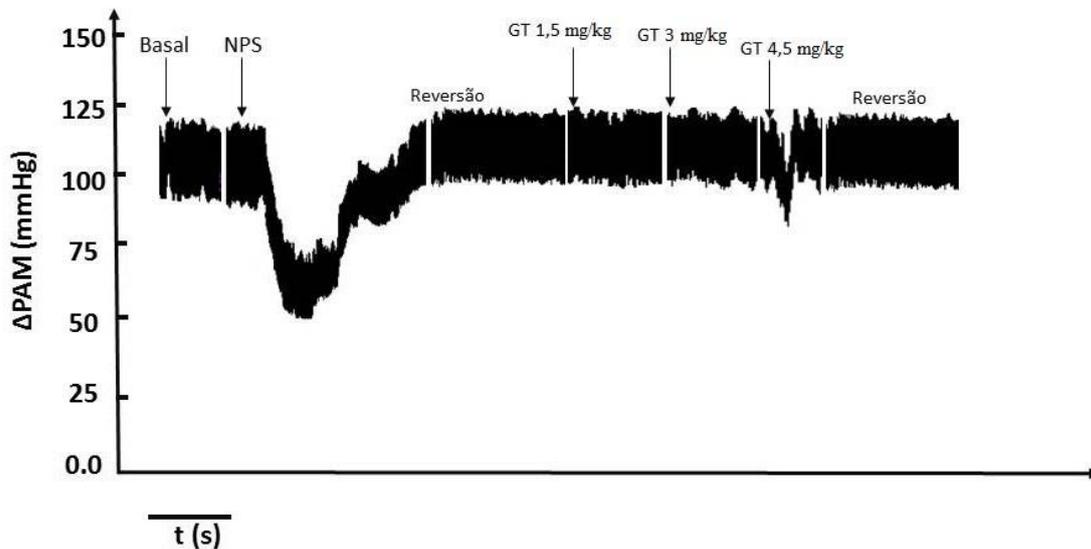
Efeito hipotensor da NC-GT em ratos normotensos não anestesiados

A procura por novas alternativas de fármacos que atuam sobre a pressão arterial é frequente. Um estudo revelou que o tratamento crônico com óleo essencial de *A. zerumbet* foi capaz reduzir a PAM e a hipertrofia cardíaca, no modelo de hipertensão experimental provavelmente pela presença dos componentes terpinen-4-ol e 1,8-cineol, o que poderia determinar melhoria da hemodinâmica cardiovascular dos animais (BARCELOS et al., 2010)

Em outro estudo verificou-se que os efeitos cardiovasculares induzidos pelo citrônolol utilizando anéis intactos de artéria mesentérica pré-contráido de ratos. O citrônolol inibiu as contrações induzidas pela fenilefrina 10 mM ou cafeína 20 mM. Os resultados deste estudo sugerem que citrônolol reduz a pressão arterial por um efeito direto sobre o músculo liso vascular levando a vasodilatação (BASTOS et al., 2010).

A metodologia utilizada nesse estudo foi à administração intravenosa de NC-Vazia, GT e NC-GT em ratos normotensos não anestesiados. A utilização de ratos não-anestesiados se dá pois, a anestesia pode influenciar nos sistemas de regulação da pressão arterial, alterando assim as respostas autonômicas (RIBEIRO, THAÍS PÔRTO, 2012).

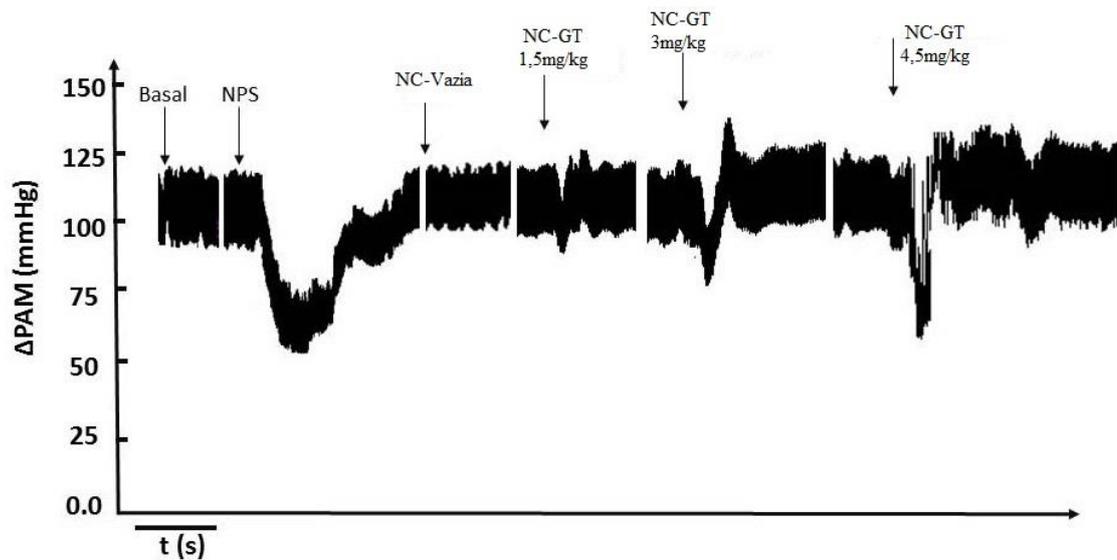
FIGURA 4: Registro original mostrando o efeito do GT sobre a PA de ratos normotensos



Fonte: Autor

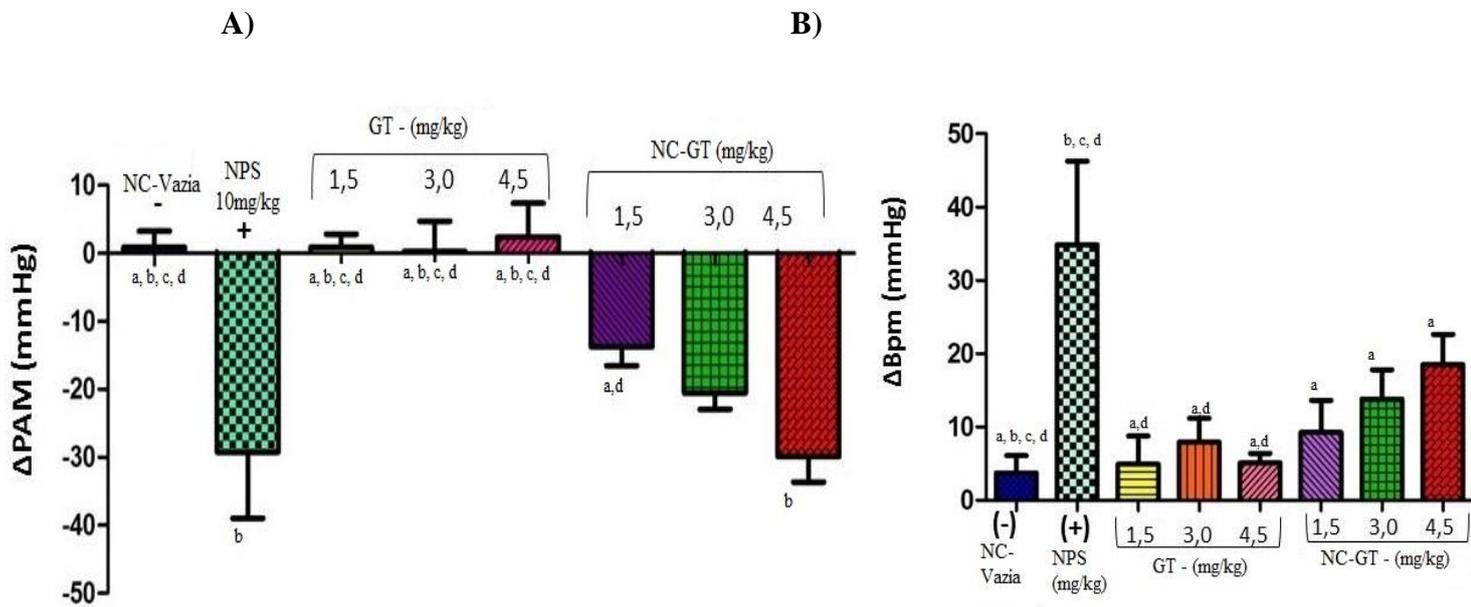
O registro original mostra a administração de doses do GT e observa-se uma discreta resposta do GT (Figura 4) quando comparada a resposta do NPS, enquanto que a NC-GT (Figura 5, Gráfico 1) mostra uma resposta hipotensora acentuada.

FIGURA 5: Registros originais mostrando o efeito do NC-GT sobre a PA de ratos normotensos.



Fonte: Autor

GRÁFICO 1 - Efeito da administração IV do GT ou da NC-GT sobre a Pressão Arterial Média (A) e Frequência Cardíaca (B). Os valores são expressos por média \pm EPM. Teste t de Student pareado $p < 0,05$ para todos os grupos.



Fonte: Autor

Legenda: IV: intravenosa; NC: nanocápsula; NPS: nitroprussiato de sódio; GT: γ -terpineno; NC-GT: nanocápsula de γ -terpineno. a) Quando comparado com o grupo tratado com NPS; b) Quando comparado com o grupo tratado com NC-GT 1,5mg/kg; c) quando comparado com o grupo tratado NC-GT 3 mg/kg; d) Quando comparado com o grupo tratado NC-GT 4,5 mg/kg.

A PAM basal consistia em $108,8 \pm 5$ mmHg, após administração do controle negativo NC-Vazia houve uma discreta variação da PAM $-0,86 \pm 0,4$ mmHg. Já, o GT nas doses estabelecidas reduziu a PAM para: $-0,88 \pm 1,9$; $-0,29 \pm 4,1$; $-2,35 \pm 1,2$ mmHg, respectivamente. Enquanto que após a administração da NC-GT a redução de $-13,72 \pm 2,7$; $-20,54 \pm 2,37$ e $-29,89 \pm 3,2$ mmHg, respectivamente. O controle positivo Nitroprussiato de sódio reduziu $-29,23 \pm 9,1$ mmHg. Não houve alteração na frequência cardíaca após administração da NC-vazia ($3,1 \pm 1,3$), também não houve após administrar GT ($4,9 \pm 3$; $7,9 \pm 3,1$; $5,11 \pm 1,2$ respectivamente) e a NC-GT promoveu uma elevação da frequência apenas na maior dose testada ($-9,3 \pm 2,5$; $-13,81 \pm 3,1$; $-18,5 \pm 2,2$ mmHg, respectivamente) com o NPS houve uma taquicardia ($34,85 \pm 11$).

Ao analisar o gráfico da Δ PAM (Gráfico1-a) nota-se que quando se trata da NC-vazia esta não é diferente significativamente das doses de GT. Enquanto que há diferença

significativa da NC-Vazia com o NPS e as doses da NC-GT. Isto é, o GT livre administrado por via IV (1,5 mg/kg, 3 mg/kg e 4,5mg/kg) não apresentou atividade sobre a pressão arterial média dos animais, assim como as nanocápsulas vazias utilizadas como controle positivo. Enquanto que o NPS e as doses de NC-GT demonstraram alguma atividade sobre a pressão arterial.

Não há diferença significativa entre as doses NC-GT 3mg/kg e 4,5mg/kg. Também não há diferença significativa entre o grupo controle NPS e as NC-GT 3 mg/kg e 4,5 mg/kg. Fato que demonstra a boa resposta das formas encapsuladas do monoterpeno, demonstrando que elas são responsáveis por proteger o γ -terpineno e responsáveis diretos pela atividade do γ -terpineno sobre a pressão média arterial dos animais.

Ao analisar o gráfico da Δ Bpm (Gráfico1-b), observa-se que a NC-vazia só é significativamente diferente do NPS e NC-GT 4,5mg/kg. Quanto aos grupos de doses de GT são diferentes significativamente apenas da formulação NC-GT 4,5 mg/kg. Esses resultados demonstraram que a substância livre não tem ação sobre a frequência cardíaca dos animais e na encapsulação do GT o aumento da frequência cardíaca é dependente da dose. Essa taquicardia reflexa observada ao administrar por via iv as doses de NC-GT é observada em menor intensidade que quando comparada ao NPS. Uma vantagem para a formulação encapsulada, pois apresenta atividade sobre a pressão arterial média sem causar taquicardia.

O NPS é significativamente diferente de todos os grupos, quando se refere ao Gráfico 1-b. Este foi escolhido como controle positivo, uma vez que o nitroprussiato de sódio é um vasodilatador de ação imediata e curta duração, cuja molécula ao interagir com grupos sulfidril das hemácias e da parede vascular, libera íons cianetos e grupo óxido nítrico, agindo este último como vasodilatador direto, provocando hipotensão e taquicardia reflexa, assim pode-se verificar imediatamente o sucesso da canulação (CASTRO et al., 2011).

A encapsulação dos óleos essenciais em matrizes poliméricas visa melhorar a bioisponibilidade, melhorando a solubilidade no meio. Sabe-se que uma vantagem destes sistemas poliméricos para liberação controlada de fármacos consiste no fato de que, no processo de complexação fármaco-polímero, o fármaco preserva sua atividade farmacológica. Assim sendo, a parte ativa da molécula não é alterada quimicamente. Portanto, o uso destes carreadores como injetáveis coloidais proporciona uma liberação sítio específica, aumentando a penetração intracelular e protegendo o fármaco da degradação.

No estudo, parte-se de uma molécula que na forma livre quando administrada por via IV não apresenta atividade sobre o sistema cardiovascular e quando é complexada na nanocápsula e administrada nas mesmas condições apresenta uma excelente atividade. Esse

comportamento pode ser explicado pelas características físico químicas do γ -terpineno, por ser altamente lipofílico tem dificuldade de solubilizar-se nos fluidos corpóreos e tem sua absorção prejudicada, além do composto ser fotossensível podendo ser facilmente degradado.

Outro fato que justifica o efeito promovido pela NC-GT, pode ser explicado pelas características da nanocápsula. Com seu núcleo oleoso, é capaz de carrear fármacos altamente lipofílicos, enquanto seu involucro polimérico é capaz de conferir proteção ao fármaco, dando maior estabilidade por ter característica hidrofílica é responsável por melhorar a solubilidade do composto. Além do mais, confinar o fármaco dentro de uma cavidade central e evita o efeito de explosão, pois o fármaco não está em contato direto com tecidos, além de que o fármaco poder ser protegido de degradação durante o armazenamento e após administração, conferindo maior estabilidade a preparação (BLOUZA et al., 2006).

Assim como o estudo realizado, outros estudos também obtiveram sucesso na associação de óleos essenciais e nanotecnologia. Em um estudo utilizando o óleo essencial de *M. Alternifolia* verificou que possui baixa atividade quando livre. Porém, quando associado aos nanocarreadores, sua atividade antimicrobiana foi potencializada, mostrando atividade bacteriostática frente aos isolados de *R. equi* (SAGAVE et al., 2015).

Outro exemplo é o óleo essencial das folhas de *C. Densiflorus*, em sua forma nanoemulsionada possui um alto potencial antibiótico, sendo, portanto, uma possibilidade real de aplicação deste produto para o tratamento de doenças ocasionadas pelas bactérias *E. Coli*, *P. aeruginosa* e *S. Aureus* e pelo fungo *C. albicans* (SEIBERT, 2015).

Um estudo identificou que o monoterpeneo α -terpineol submetido aos mesmos testes realizados nessa pesquisa foi capaz de induz hipotensão e taquicardia em ratos normotensos não-anestesiados. E esta hipotensão parece estar envolvida com a via L-arginina-NO-GMPc (RIBEIRO, THAÍS P et al., 2010). O Linalol é um álcool monoterpeneo e constituinte de várias plantas que foi avaliado pelos efeitos cardiovasculares induzidos em ratos normotensos, também mostrou hipotensão induzida associada com taquicardia, provavelmente devido a um efeito directo sobre o músculo liso vascular que conduz à vasodilatação (ANJOS et al., 2013). O monoterpeneo carvacrol, também foi submetido a estudos *in vivo* e foi demonstrado que este tem efeito hipotensivo seguido de bradicardia, provavelmente por conta de uma vasodilatação periférica que envolve, pelo menos, a inibição do influxo de Ca^{2+} através de canais Cav e Trp (DANTAS et al., 2015).

Pelos trabalhos vistos na literatura podemos verificar que os resultados encontrados nesse estudo são similares aos vistos em outras publicações. É possível supor os mecanismos responsáveis pelos efeitos do γ -terpineno. As perspectivas são: identificar os mecanismos de

ação, os sistemas responsáveis pela atividade e realizar testes para avaliar a toxicidade aguda e crônica das partículas.

4 CONCLUSÃO

A administração de NC-GT em ratos *Wistar* promoveu hipotensão pronunciada nas doses de 1,5, 3 e 4,5 mg/Kg, via IV, o efeito hipotensor foi seguido de taquicardia. Não houve efeito na forma livre. Dessa forma, NC-GT apresenta potencial farmacológico para o desenvolvimento de compostos naturais associados à nanotecnologia com aplicação no tratamento da hipertensão arterial. A nanocápsula polimérica foi determinante para que o γ -terpineno chegasse ao sítio de ação, mostrando ser um nanocarreador vantajoso e promissor.

5 REFERÊNCIAS

ALWAN, A. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. World Health Organization, 2011. ISBN 9241564229.

ANJOS, P. J. et al. Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 68, n. 5-6, p. 181-190, 2013.

BARCELOS, F. et al. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2010.

BASTOS, J. F. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331-337, 2010.

BLOUZA, I. L. et al. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International journal of pharmaceutics**, v. 325, n. 1, p. 124-131, 2006.

CASTRO, P. F. et al. A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 5, p. 370-377, 2011.

CHOI, H.-S. et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, 2000.

DANTAS, B. P. V. et al. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. **Vascular pharmacology**, v. 67, p. 48-58, 2015.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International journal of pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FRAGA, B. P. Obtenção e avaliação farmacológica de complexos de inclusão (geraniol em beta-ciclodextrina) sobre o sistema cardiovascular de ratos. 2013.

GEDARA, S. R. Terpenoid content of the leaves of *Thymus algeriensis* Boiss. **Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 2, p. 133-143, 2008.

MALTA, D. C. et al. Prevalence of high blood pressure measured in the Brazilian population, National Health Survey, 2013. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 134, n. 2, p. 163-170, 2016.

OLIVEIRA, E.; MEDEIROS, I.; MUKHERJEE, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. **Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 45-49, 1996.

PASSOS, F. F. D. B. et al. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341-350, 2010.

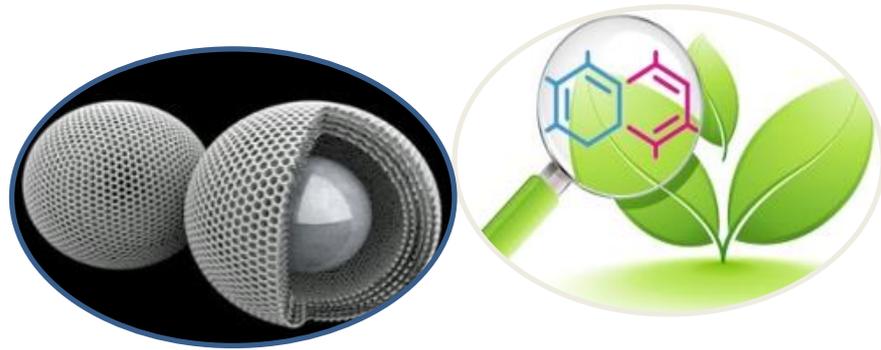
PIARU, S. P. et al. Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 593-597, 2012.

RIBEIRO, T. P. Mecanismos de sinalização endotelial envolvidos na atividade cardiovascular do α -terpineol. 2012.

RIBEIRO, T. P. et al. Unravelling the cardiovascular effects induced by α -terpineol: A role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 811-816, 2010.

SAGAVE, L. et al. *Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015.

SEIBERT, J. B. Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: avaliação da sazonalidade e atividades biológicas. 2015.



CAPÍTULO 4

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE IN VITRO DO γ -TERPINENO na
FORMA LIVRE E NANOENCAPSULADA (NC-
GT)**

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE NANOCÁPSULAS DE γ -TERPINENO

GOMES, K. K. L. B.¹; SILVA, A. X. L.¹; MEDEIROS, M. G. F.²; OLIVEIRA, A. P.³; ROLIM, H. M. L.¹.

1- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

2- Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

3- Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

*E-mail: kassia_lbarros@hotmail.com

RESUMO: As espécies reativas são átomos, moléculas, ou íons derivados do oxigênio e nitrogênio, que em sua grande maioria possuem alta reatividade. O estresse oxidativo é resultante de um desequilíbrio entre a formação de antioxidantes e de radicais livres produzidos pelo organismo, ocasionando danos ao DNA e proteínas, juntamente com a peroxidação de lipídeos. Essas mudanças podem ser responsáveis por diversas doenças crônicas, envelhecimento precoce, etc. Os óleos essenciais são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância e podem ser obtidos em diversas partes das plantas. A atividade antioxidante dos óleos voláteis tem sido bastante estudada. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do monoterpeneo γ -terpineno (GT) e da sua forma encapsulada (NC-GT) via inibição dos radicais: nitrito, formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácidosulfônico (ABTS•+). Foram utilizadas concentrações definidas do GT e NC-GT e do Trolox como padrão antioxidante. O método ABTS•+baseou-se na reação direta do radical sintético com os compostos testes. O óxido nítrico foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio. A capacidade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica foi baseada no método de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico. De acordo com os resultados obtidos dos testes antioxidantes *in vitro*, tanto o GT livre quanto a sua forma nanoencapsulada NC-GT foram efetivos em inibir a formação de radicais livres. Ambas exibiram significativo potencial antioxidante frente à peroxidação lipídica por TBARS, frente ao radical nitrito e ao radical sintético ABTS. De acordo com o cálculo de suas concentrações efetivas medianas (CE₅₀) é possível observar que a forma nanotecnológica exibiu um maior potencial antioxidante em relação à sua forma isolada, um resultado promissor no que se refere à nanotecnologia aplicada em produtos de origem natural.

Palavras-Chave: γ -terpineno; nanocápsulas; antioxidante; *in vitro*

1 INTRODUÇÃO

No desempenho das funções biológicas relevantes, a geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico. Nas várias reações bioquímicas os radicais agem como mediadores na transferência de elétrons e sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de energia, por meio da cadeia transportadora de elétrons. A molécula de O₂ além de atuar comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial pode originar espécies químicas capazes de reagir com as demais biomoléculas, principalmente proteínas e fosfolípidos. Essas substâncias originadas a partir do oxigênio são chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROS) e compõem, junto das espécies reativas de nitrogênio (ERN), o grande grupo dos radicais livres. Cerca de 95 a 98% do oxigênio consumido durante a respiração celular é para a produção de energia, o restante (2 a 5% do oxigênio metabolizado), produz EROS. A produção excessiva pode conduzir a danos oxidativo prejudicando o metabolismo intracelular (BOKHARI et al., 2013; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; SHAMI; MOREIRA, 2004).

O desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes leva ao processo de instalação do estresse oxidativo, pelo excesso da produção de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. O organismo tem um mecanismo de defesa contra os radicais e tem o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (BARBOSA et al., 2010). A cronicidade do estresse oxidativo tem implicações relevantes sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, como a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004)

O sistema de defesa antioxidante tem como função inibir ou reduzir danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicais. Esse sistema é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem enzimática (as enzimas glutathione peroxidase (GPx), catalase e superóxido dismutase (SOD) ou não enzimáticas que relaciona-se com um grupo de antioxidantes que podem ser congregados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutathione, da ubiquinona e do ácido úrico ou de origem dietética (vitaminas (tocoferóis e ascorbato), carotenoides, compostos fenólicos, quelantes e produtos sintéticos). Enquanto as enzimas impedem a produção de radicais livres, os antioxidantes não enzimáticos bloqueiam e previnem o estresse oxidativo ao sequestrar espécies reativas (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Dessa forma, os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, possam atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não radicais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (BARBOSA et al., 2010).

Os óleos essenciais são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância e podem ser obtidos em diversas partes das plantas. A atividade antioxidante dos óleos voláteis tem sido bastante estudada (ABDEL-AZIZ et al., 2014; MORAIS et al., 2006; MUNIYAPPAN; NAGARAJAN, 2014; PEREIRA et al., 2015; WU; LUO; WANG, 2012). Monoterpenos e diterpenos são os principais componentes de óleos essenciais, nas plantas atuam protegendo contra herbívoros e nos seres humanos, exercem variados papéis na promoção da saúde (GRASSMANN, 2005).

A nanotecnologia traz novas alternativas para o tratamento de doenças. Sistemas de liberação de fármacos baseados na nanotecnologia podem proteger os compostos antioxidantes da degradação, melhorar as suas propriedades físico-químicas e por sua vez a sua biodisponibilidade (DU et al., 2014). (CARMO et al., 2015; CHRISTOFOLI et al., 2015; NATRAJAN et al., 2015; SAGAVE et al., 2015).

O γ -terpineno é um monoterpreno presente em óleos essenciais de várias espécies, como *Thymus vulgaris* (GONZALEZ et al., 2016), é conhecido por ser um antioxidante eficiente não fenólico capaz de inibir a oxidação do LDL. Um estudo afirma que a suplementação de γ -terpineno em gêneros alimentícios e bebidas podem desempenhar um papel importante na prevenção da oxidação do LDL, conseqüentemente da aterosclerose (TAKAHASHI et al., 2003).

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade de nanocápsulas de γ -terpineno (NC-GT) comparando com a do composto livre a fim de verificar se houve melhoria na estabilidade dos compostos ativos e atividade antioxidante no intuito de proporcionar uma melhor eficiência.

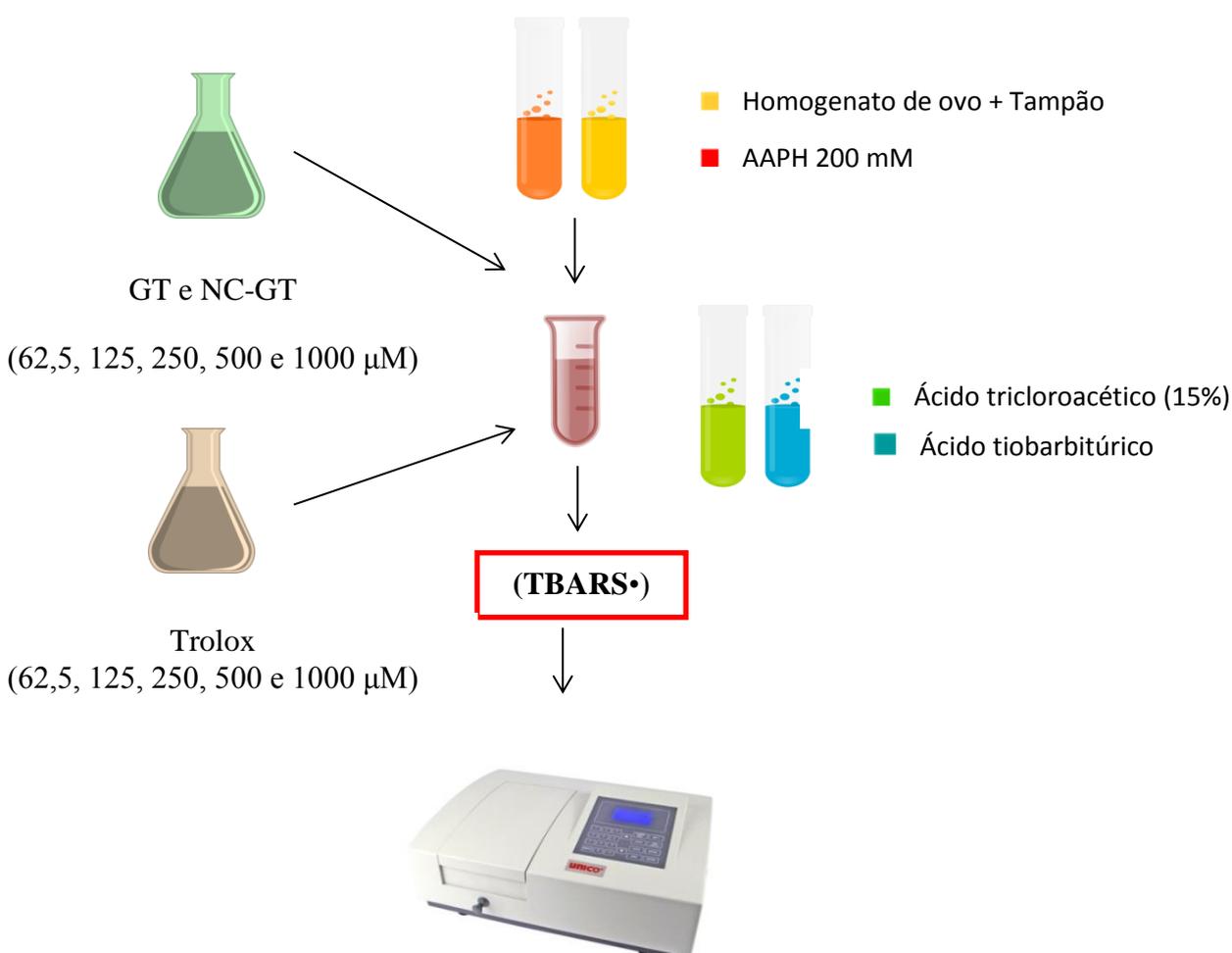
2 METODOLOGIA

2.1 Capacidade antioxidante contra a peroxidação lipídica (TBARS).

Para a determinação da capacidade antioxidante do γ -terpineno na inibição da peroxidação lipídica, foi utilizado o método TBARS (substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico). Preparou-se uma solução estoque do γ -terpineno livre (GT), γ -terpineno

nanoencapsulado (NC-GT) e do padrão antioxidante Trolox, diluídos em solução salina 0,9%+Tween 0,05%. Em seguida por diluições seriadas, foram obtidas soluções com concentrações de 62,5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM e 1000 μM . O homogenato da gema de ovo (1% w/v) em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,4) é utilizado como substrato rico em lipídios. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropinamida 200 mM), Ácido tricloroacético (15%) e ácido tiobarbitúrico (0,6%). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos como percentagem de TBARS formadas a partir do AAPH (controle induzido) (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; GUIMARÃES et al., 2010).

FIGURA 1: Esquema representativo da avaliação da capacidade antioxidante do GT e de NC-GT pelo método TBARS•.



Fonte:(ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990)

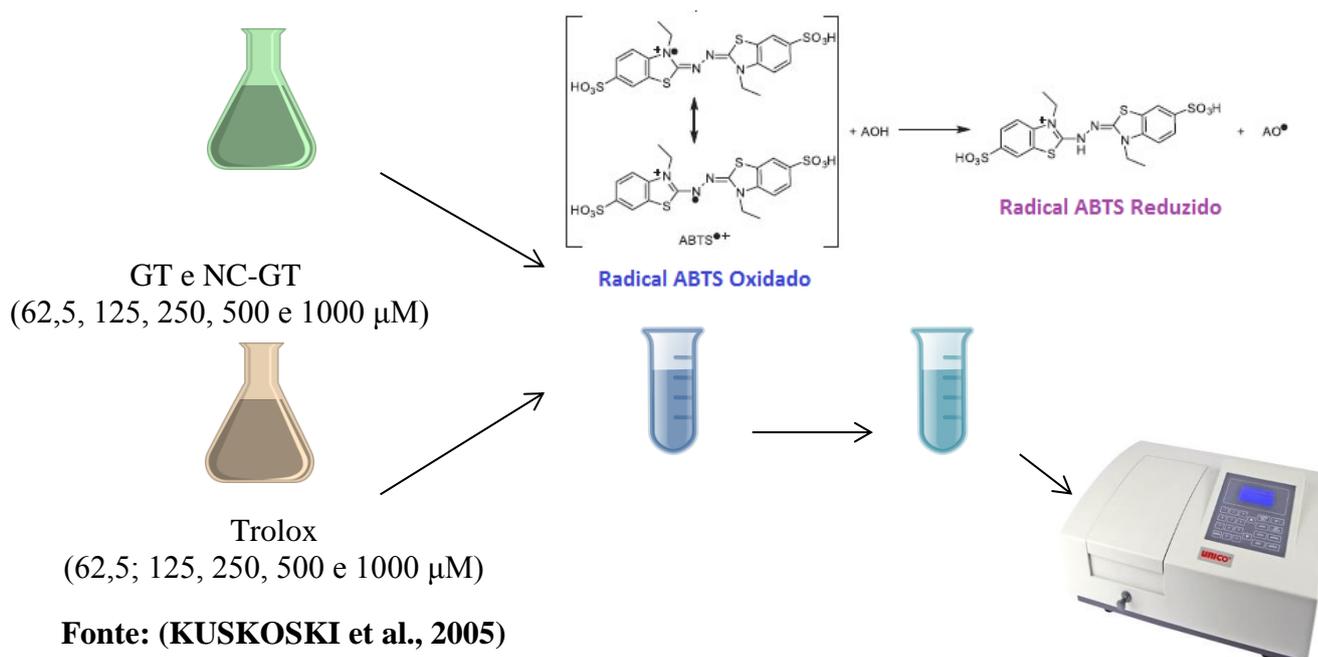
2.2 Capacidade antioxidante contra o radical ABTS•+ (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico).

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS•+, formou-se o cátion radical ABTS•+ a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS•+ com 88 µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de ABTS•+ foi diluída em etanol até obter uma solução com absorvância de 1,00 a 734 nm. Na ausência de luz foi transferida uma alíquota de 200 µL de várias concentrações do GT, NC-GT e do padrão antioxidante Trolox para tubos de ensaio contendo 1960 µL do radical ABTS•+. A leitura da absorvância a temperatura ambiente foi realizado no tempo de 6 minutos em um espectrofotômetro a 734 nm e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da absorvância da solução de ABTS•+ pela seguinte equação:

$$\text{Equação: \% inibição do radical ABTS}\bullet+ = (A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100 / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} é a absorvância inicial da solução etanólica de ABTS•+ e A_{mistura reacional} é a absorvância da mistura reacional contendo o radical ABTS•+ e as concentrações dos compostos (KUSKOSKI et al., 2005; ROGINSKY; LISSI, 2005)

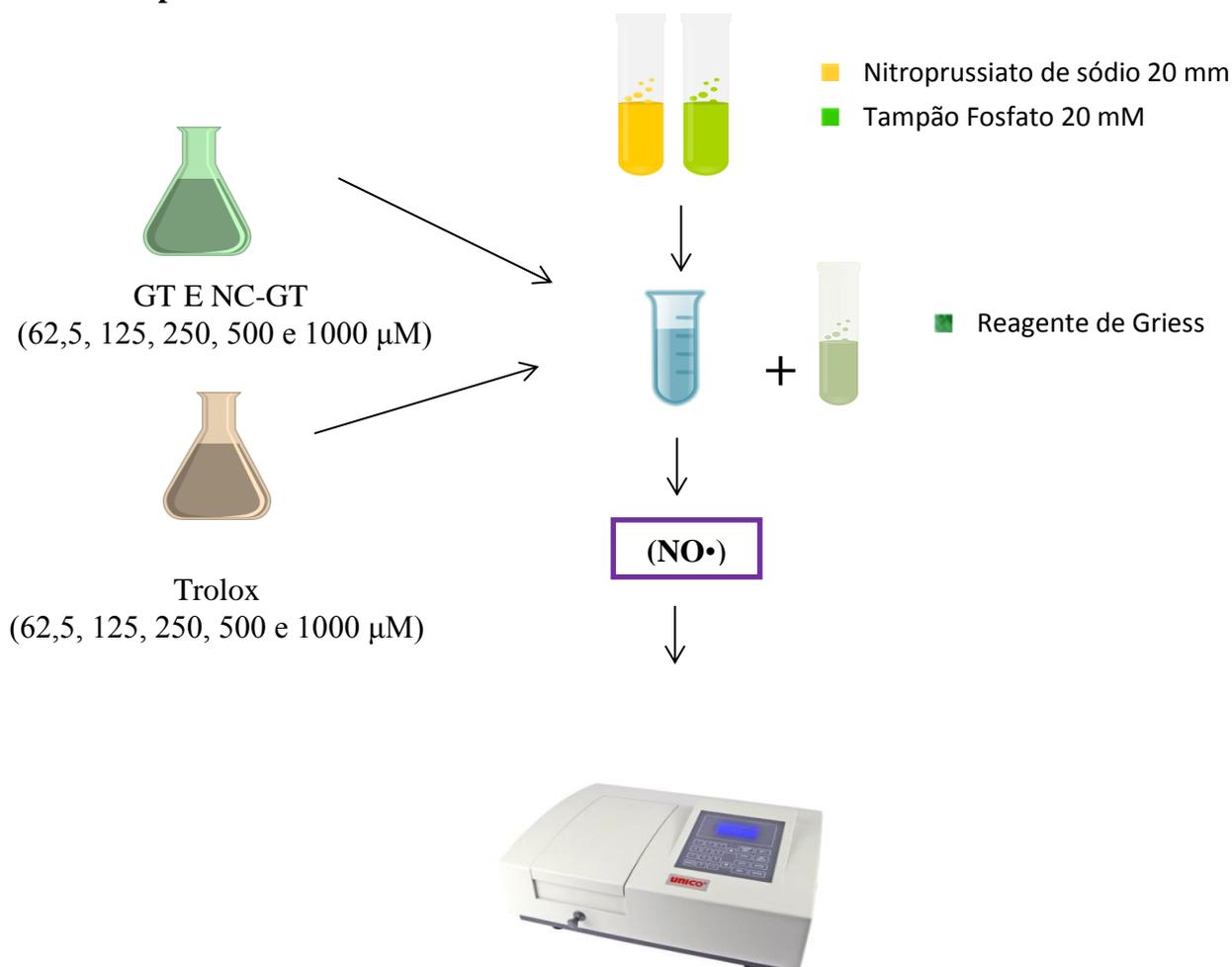
FIGURA 2 - Esquema representativo Avaliação da capacidade antioxidante do GT E NC-GT pelo método ABTS•



2.3 Capacidade antioxidante contra o radical nítrico (NO•)

Nesta avaliação, o óxido nítrico foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Uma vez gerado, o óxido nítrico interage com oxigênio para produzir íons nitrito, os quais foram medidos pela reação de Griess. A mistura da reação (1 mL) contendo 10 mM de NPS em tampão fosfato e várias concentrações do GT, NC-GT e do padrão antioxidante Trolox foram incubadas a 37°C por 1 hora. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro e os resultados foram expressos como porcentagem de nitrito formado pelo meio reacional (BASU; HAZRA, 2006).

FIGURA 3. Esquema representativo da avaliação da capacidade antioxidante do GT e NC-GT pelo método do radical NO•



Fonte: (BASU; HAZRA, 2006)

3 RESULTADOS

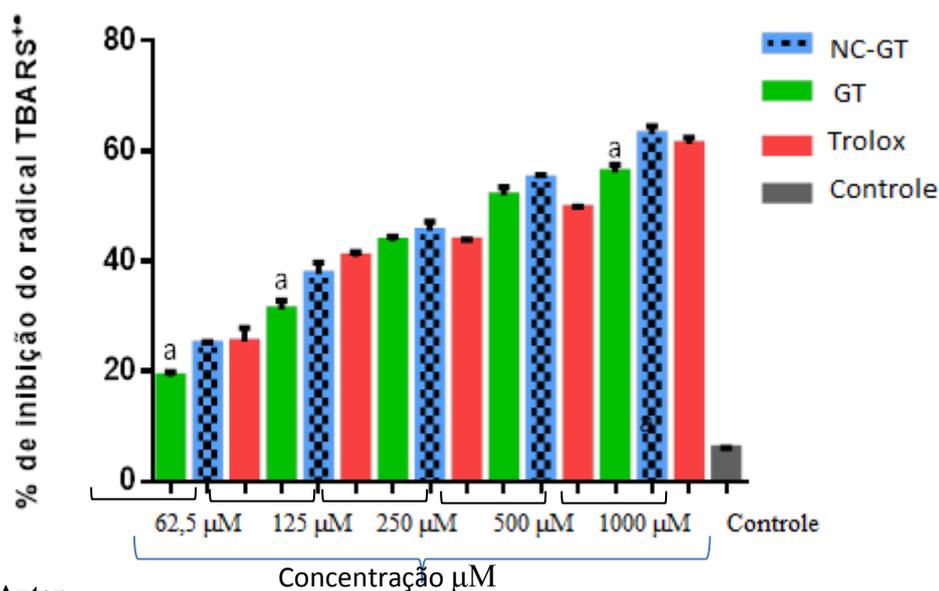
3.1 Potencial antioxidante frente às formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico.

As diferentes concentrações do GT e NC-GT exibiram atividade antioxidante dose-dependente, frente às formas reativas ao TBARS quando comparadas ao padrão antioxidante Trolox e em relação ao controle negativo. O GT nas concentrações de 62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M e 1000 μ M inibiu a peroxidação lipídica (TBARS) em $19,02 \pm 0,51\%$, $31,25 \pm 0,92\%$, $43,61 \pm 0,51\%$, $52,00 \pm 0,82\%$, e $56,19 \pm 0,78\%$ respectivamente. O NC-GT nas concentrações de 62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M e 1000 μ M inibiu a peroxidação lipídica em $24,98 \pm 0,16\%$, $37,65 \pm 1,22\%$, $45,49 \pm 0,97\%$, $55,02 \pm 0,35\%$, e $63,10 \pm 0,86\%$ respectivamente.

O Trolox, usado como padrão antioxidante, nas concentrações de 62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M e 1000 μ M inibiu a peroxidação lipídica em $25,37 \pm 1,45\%$, $40,86 \pm 0,44\%$, $43,76 \pm 0,12\%$, $49,69 \pm 0,17\%$ e $61,29 \pm 0,65\%$ respectivamente. De acordo com percentuais de inibição, o γ -terpineno livre e nanoencapsulado foram estatisticamente ($p < 0,05$) tão efetivos quanto o Trolox em reduzir a peroxidação lipídica.

Os resultados mostram que o GT reduziu significativamente as porcentagens de formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico e a NC-GT potencializou, sendo mais eficiente que o padrão Trolox uma vez que se necessita de uma menor concentração efetiva para se obter 50% da atividade (mas, sem diferença significativa entre ambos).

GRÁFICO 1 - Efeitos do GT e NC-GT na redução da peroxidação lipídica em decorrência das formas associadas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS•).



FONTE: Autor

Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$, experimentos em triplicata. ^a $p < 0,05$ concentrações-teste (GT e NC-GT) versus Trolox (ANOVA e Tukey multiple comparisons como *post hoc* teste).

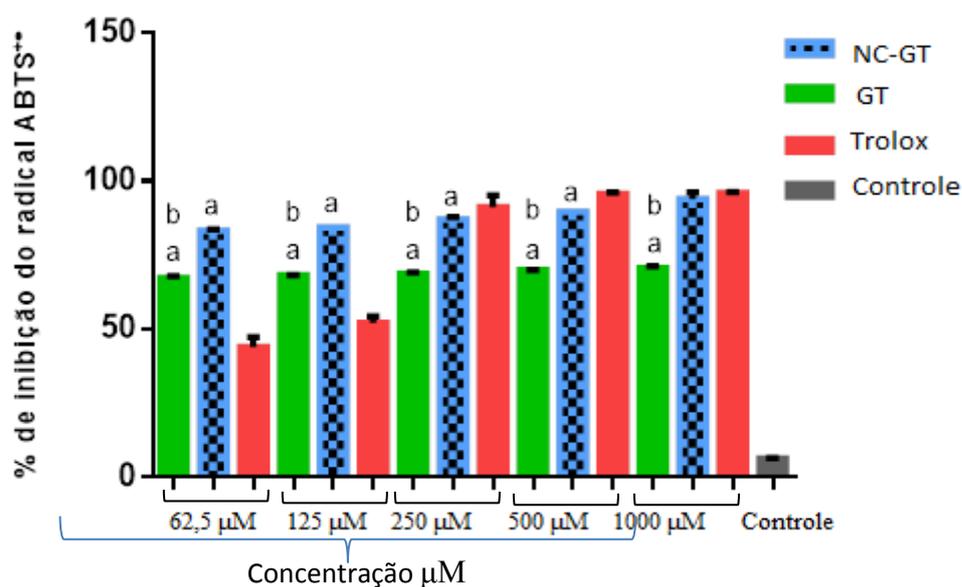
As concentrações efetivas medianas (CE_{50}) obtidas foram: NC-GT; $CE_{50} = 357,5 \mu\text{M}$ > Trolox; $CE_{50} = 415,6 \mu\text{M}$ > GT; $CE_{50} = 504,8 \mu\text{M}$); pelas CE_{50} obtidas, observa-se que a forma NC-GT apresenta uma atividade antioxidante frente à peroxidação lipídica superior à sua forma livre e ao padrão antioxidante.

3.2 ABTS

O GT nas concentrações de $62,5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ e $1000 \mu\text{M}$ inibiu o radical ABTS, reduzindo seus níveis em $67,27 \pm 0,39\%$, $68,13 \pm 0,03\%$, $68,66 \pm 0,30\%$, $70,03 \pm 0,03\%$, e $70,73 \pm 0,33\%$ respectivamente. O NC-GT nas concentrações de $62,5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ e $1000 \mu\text{M}$ produziu a remoção do radical ABTS em $73,13 \pm 0,30\%$, $84,03 \pm 0,0\%$, $87,09 \pm 0,46\%$, $89,69 \pm 0,03\%$ e $93,91 \pm 1,35\%$ respectivamente. O Trolox, usado como padrão antioxidante, nas concentrações de $62,5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ e $1000 \mu\text{M}$ inibiu o radical ABTS reduzindo seus níveis em $43,98 \pm 1,93\%$, $52,23 \pm 1,16\%$, $91,15 \pm 2,32\%$, $95,75 \pm 0,26\%$ e $96,07 \pm 0,14\%$ respectivamente.

É importante frisar que nas menores concentrações testadas ($62,5$ e $125 \mu\text{M}$) o GT e NC-GT foram estatisticamente mais eficientes que o Trolox; também constatou que a forma NC-GT elevou o potencial antioxidante da molécula, quando comparada com sua forma livre, sendo estatisticamente tão eficiente quanto o próprio padrão Trolox em reduzir o radical ABTS ($p < 0,05$).

GRÁFICO 2. Efeitos do γ -terpineno (G) livre e nanoencapsulado (NG) na redução do radical ABTS•.



FONTE: Autor

Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$, experimentos em triplicata. ^a $p < 0,05$ concentrações-teste (GT e NC-GT) *versus* Trolox (ANOVA e *Tukey multiple comparisons* como *post hoc* teste) e ^b $p < 0,05$ GT livre *versus* NC-GT

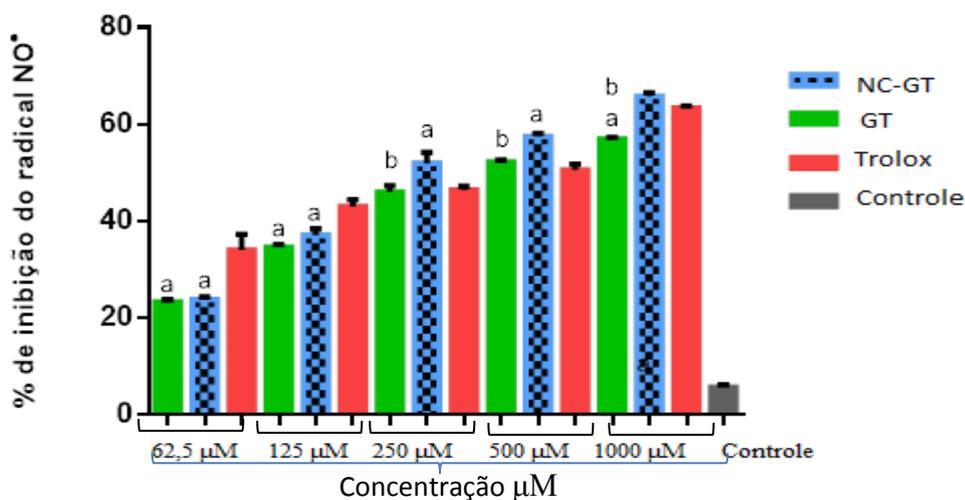
Comparando os valores de CE_{50} observa-se que o potencial antioxidante do GT e NC-GT frente a este radical é alto, quando comparado ao Trolox (NC-GT, $CE_{50} = 106,9 \mu\text{M} >$ Trolox, $CE_{50} = 186,9 \mu\text{M} >$ GT; $CE_{50} = 269 \mu\text{M}$). É válido ressaltar que há uma diferença entre as CE_{50} do GT, onde a nanoencapsulação deste monoterpene aumentou a atividade antioxidante em 2,52 vezes quando comparado à sua forma livre.

3.3 Capacidade antioxidante contra o radical nitrito (NO*).

O GT nas concentrações de $62,5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ e $1000 \mu\text{M}$ inibiu a formação do radical nitrito em $26,30 \pm 0,25\%$, $34,66 \pm 0,33\%$, $46,04 \pm 0,77\%$, $52,22 \pm 0,22\%$, e $57,04 \pm 0,18\%$ respectivamente. O NC-GT nas concentrações de $62,5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ e $1000 \mu\text{M}$ inibiu a formação do radical nitrito em $23,81 \pm 0,31\%$, $37,07 \pm 0,80\%$, $51,96 \pm 0,30\%$, $57,52 \pm 0,37\%$, e $65,85 \pm 0,41\%$ respectivamente.

O Trolox, usado como padrão antioxidante, nas concentrações de $62,5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ e $1000 \mu\text{M}$ inibiu a formação do radical nitrito em $34,07 \pm 1,88\%$, $43,04 \pm 0,79\%$, $46,45 \pm 0,45\%$, $50,56 \pm 0,72\%$ e $63,37 \pm 0,26\%$ respectivamente. É importante ressaltar que nas concentrações de $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ e $1000 \mu\text{M}$ o GT foi estatisticamente tão efetivo quanto o trolox em reduzir a formação do radical nitrito, e especialmente o NC-GT, que neste teste estatisticamente superior ao trolox na maior concentração.

GRÁFICO 3 - Efeitos do GT e NC-GT na inibição da formação do radical nitrito (NO*).



FONTE: Autor

Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$, experimentos em triplicata. O Trolox foi usado como padrão antioxidante. ^a $p < 0,05$ concentrações-teste (G e NC-GT) *versus* Trolox (ANOVA e *Tukey multiple comparisons* como *post hoc* teste) e ^b $p < 0,05$ GT *versus* NC-GT

As concentrações efetivas medianas (CE_{50}) obtidas foram: NC-GT: $CE_{50} = 298,5 \mu\text{M}$ > Trolox; $CE_{50} = 372,5 \mu\text{M}$ > GT; $CE_{50} = 456,7 \mu\text{M}$; portanto, pelas CE_{50} obtidas, observa-se que a forma NC-GT apresenta uma atividade antioxidante frente ao radical nitrito superior à sua forma livre e ao padrão antioxidante.

4 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, aromáticos, caracterizados por um forte odor e geralmente com uma densidade mais baixa que a da água. Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes). Os óleos essenciais representam apenas uma pequena fração da composição da planta, no entanto, lhe conferem as características pelas quais as plantas aromáticas são utilizadas pelas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (RUBIOLO et al., 2010).

Os terpenos são principalmente hidrocarbonetos na natureza e o seu bloco de construção isopreno é uma unidade de cinco carbonos (2-metil-1,4-butadieno). A estrutura da maioria dos terpenos consiste na condensação de unidades de isopreno e são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno com uma fórmula molecular de $(C_5H_8)_n$ (n = número de unidades de isopreno). Consequentemente, há monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, e tetraterpenos com dois, três, quatro, seis e oito unidades de isopreno respectivamente. A maioria dos monoterpenos têm estruturas altamente voláteis e lipofílicas que conferem elevada penetração de membrana. Eles são líquidos incolores que são quimicamente reativos e têm odores aromáticos característicos. Este grupo de compostos possui diversas estruturas de base variável e também exibem estereoisomerismo. Além disso, há uma vasta gama de derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos) que podem ser derivadas (OZ et al., 2015).

A atividade antioxidante de óleos essenciais é uma importante propriedade biológica de grande interesse, pois podem preservar alimentos contra os efeitos tóxicos dos oxidantes e, além disso, os óleos essenciais são capazes de eliminar radicais livres podendo assim desempenhar um papel importante na prevenção de doenças, como, disfunções neurológicas, câncer, doenças cardíacas e declínio do sistema imunológico. Evidência crescente sugere que estas doenças podem ser resultados de danos celulares causados pelos radicais livres (KAMATOU; VILJOEN, 2010).

A atividade antioxidante *in vitro* é baseada em ensaios químicos que avaliam a capacidade de uma substância isolada de produtos naturais ou de fontes sintéticas em reduzir a concentração de radicais livres em um meio reacional específico (HALLIWELL, 2011).

As EROs são produtos instáveis, decorrentes da redução tetravalente sofrida pela molécula de oxigênio,ceptor final de elétrons, durante a produção de energia na etapa de fosforilação oxidativa. Há dois grupos que as EROs são distribuídas: os radicalares: hidroxila (HO^\cdot), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxila (ROO^\cdot) e alcoxila (RO^\cdot); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as espécies reativas de nitrogênio (ERN) incluem-se o óxido nítrico (NO^\cdot), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Alguns podem ser altamente reativos no organismo atacando apenas lipídios, outros são reativos com esses e com proteínas e DNA (FRANÇA et al., 2013; SILVA; FERRARI, 2011).

Os métodos diretos são baseados em estudar o efeito de um produto testado contendo antioxidantes sobre a degradação oxidativa de um sistema de teste. O substrato de oxidação pode ser lipídeos individuais, misturas de lipídeos (óleos), proteínas, DNA, plasma sanguíneo, LDL e membranas biológicas. O método indireto estuda a capacidade do antioxidante para eliminar alguns radicais livres, que não está associada com a real degradação oxidativa (OLIVEIRA, 2015).

A peroxidação lipídica promove alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos. Além disso, tem sido observada perda da seletividade na troca iônica, com liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (BEZERRA et al., 2004). O malondialdeído (MDA) é um biomarcador, produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosahexaenóico (GROTTO et al., 2007).

Um método amplamente utilizado consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando como produto um cromógeno de cor rosa fluorescente capaz de ser detectado através de leitura espectrofotométrica e cuja absorção ocorre em λ de 532 nm. É denominado teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances* – TBARS) (FRANÇA et al., 2013; GROTTO et al., 2007). O TBARS é representativo de uma fase tardia da oxidação de lípidios, quando o substrato da oxidação foi submetido a transformação substancial (PAPASTERGIADIS et al., 2012).

No teste, o malonaldeído é liberado da oxidação dos lipídeos provenientes da gema do ovo e este dá prosseguimento à reação.

O γ -terpineno está presente em vários óleos essenciais é conhecido por ser um eficiente antioxidante não fenólico capaz de inibir a oxidação do LDL. Um estudo afirma que a suplementação de γ -terpineno em gêneros alimentícios e bebidas podem desempenhar um papel importante na prevenção da oxidação do LDL, conseqüentemente da aterosclerose (TAKAHASHI et al., 2003).

Os antioxidantes são tradicionalmente compostos por fenol e compostos relacionados com a amina, em que o átomo de hidrogênio no -OH e -NH são captados por radicais (FOTI, 2007), por isso a atividade antioxidante da ligação C-H atrai muita atenção (LEGAULT; PICHETTE, 2007). Um estudo destacou essa importante descoberta, pois, o γ -terpineno é prontamente peroxidável, mesmo na ausência de radicais -OH e -NH, já que muito raramente os hidrocarbonetos são facilmente peroxidáveis (RUBERTO; BARATTA, 2000).

Um estudo comparou dois isômeros: o α -terpineno e o γ -terpinene. A base desse estudo foi avaliar a atividade desses compostos frente à oxidação de linoleato de metila (LH), DNA e eritrócitos induzida por AAPH. Ao comparar a atividade antioxidante ambos mostraram um efeito protetor semelhante sobre a oxidação do DNA induzida por AAPH, sobre hemólise dos eritrócitos e a capacidade de proteger contra a peroxidação de LH induzida por AAPH γ -terpineno foi superior em relação ao α -terpineo. A diferença entre a estrutura destes dois isômeros é que γ -terpineno é um ciclo-hexadieno não conjugado e o α -terpineno possui duplas conjugadas. Pode-se deduzir que as duplas não conjugadas favoreceram a capacidade antioxidante mais do que um dieno conjugado. A ligação carbono-hidrogênio do γ -terpineno e seu grupo metílico (ligação alílica), vizinhos à dupla ligação provavelmente facilita a abstração do hidrogênio alílico (LI; LIU, 2009).

O método do sequestro do radical $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise. Esse teste mede à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais ABTS, pois reflete a capacidade relativa de uma amostra antioxidante de doar átomos de hidrogênio ou elétron para eliminar o cátion radical $ABTS^{\bullet+}$. Ele é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas. Por meio da adição do persulfato de potássio, ocorre a formação do radical $ABTS^{\bullet+}$, que apresenta cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do $ABTS^{\bullet+}$ a ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional (KUSKOSKI et al., 2005; ROGINSKY; LISSI, 2005). Avaliação antioxidante do GT pelo método de eliminação do cátion radical

ABTS•+ foi relatado pela primeira vez neste trabalho, apesar de avaliações antioxidantes anteriores já terem sido realizadas sobre este composto.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula pequena, relativamente instável. É um radical livre que, dependendo da sua quantidade pode ter efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo, nas situações de estresse oxidativo, há a geração de intermediários reativos, como o radical nitrito (NO₂•) que é altamente citotóxico e pode propagar lesões teciduais. Por exemplo, o NO produzido pela e-NOS-constitutiva induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O²⁻ disponível e, conseqüentemente, a produção de ONOO-. O NO também induz a síntese de ferritina, que se liga a íons ferro livres e previne a geração de O²⁻. Por outro lado, na presença da placa aterosclerótica, os macrófagos ativados produzem O²⁻, expressam NOS-induzível e produzem NO. Desta forma, são produzidos ONOO- e OH- comprometendo, ainda mais, a integridade tissular, favorecendo a ativação da coagulação e contribuindo para a obstrução da luz vascular (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

O método proposto para determinar a ação sequestradora do íon NO₂• é baseado na decomposição do Nitroprussiato de sódio em NO, e este ao reagir com O² produz os nitritos que são quantificados espectrofotometricamente pela reação com Reagente de Griess (sulfanilamida + cloridrato de N-(naftil)etilenodiamina,) dando origem a um diazo composto de coloração intensa vermelha (CAROCHO; FERREIRA, 2013). No teste, observou-se que a forma NC-GT apresenta uma atividade antioxidante frente ao radical nitrito superior à sua forma livre e ao padrão antioxidante.

Uma classe de ativos que podem ser encapsulados são os compostos extraídos de vegetais. Os extratos vegetais são fontes promissoras de substâncias bioativas, porém em seu estado bruto podem ter a atividade antioxidante comprometida em razão de sua instabilidade físico-química. Neste contexto, a nanotecnologia pode ser utilizada para a estabilização de diferentes compostos, aumentando também a estabilidade dos produtos finais. Adicionalmente, a nanoencapsulação de compostos antioxidantes pode aumentar a sua atividade antioxidante e prolongar a liberação dos mesmos, aumentando assim a sua eficácia (DAUDT et al., 2013).

Quanto à atividade potencializada da NC-GT em relação ao GT em todos os testes pode ser explicar pela característica do complexo, as nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso. Esse invólucro polimérico protege o princípio ativo da exposição precoce a fatores que poderiam degradar e ate mesmo

inativar a substância. Dessa forma o estudo mostra que as nanocápsulas foram capazes de controlar e manter a liberação do GT no local e momento adequado.

Assim como os resultados obtidos nesse estudo, há resultados similares encontrados na literatura. Um estudo demonstrou que o desenvolvimento de nanocápsulas e nanoemulsões de rutina proporcionaram um aumento da fotoestabilidade da rutina e um prolongamento da atividade antioxidante *in vitro*. A presença da rutina em nanocápsulas conduziu a uma taxa de liberação mais lenta e a uma atividade antioxidante prolongada contra os radicais OH fortemente reativas em comparação com as nanoemulsões de rutina. Os resultados mostraram que esses sistemas nanoestruturados são uma alternativa potencial para a preparação de sistemas de entrega de rutina para tratar diferentes doenças relacionadas com o stress oxidativo, incluindo processos de envelhecimento causados pela ação dos radicais livres (ALMEIDA et al., 2010).

O resveratrol e curcumina são antioxidantes naturais e têm sido utilizados na prevenção e no tratamento de diversas doenças associadas com o stress oxidativo. Com o objetivo de melhorar os efeitos antioxidantes do resveratrol e curcumina, foram desenvolvidas nanocápsulas contendo a combinação de ambos os polifenóis. A nanoencapsulação aumentou a fotoestabilidade do resveratrol e curcumina. A atividade antioxidante dos polifenóis contra os radicais HO foi potencializada pela nanoencapsulação e após a co-encapsulação pode observar um melhor efeito, resposta de um provável sinergismo. Além disso, nanocápsulas exibiram perfil de liberação controlada, para ambos os polifenóis. Com isso a co-encapsulação o resveratrol e curcumina mostrou ser uma alternativa promissora para melhorar o desempenho de medicamentos utilizados para prevenir e tratar doenças associadas com o stress oxidativo (CORADINI et al., 2014).

Ainda são escassos os estudos com este terpeno em modelos antioxidantes *in vitro*. Dessa forma, é importante caracterizar e expandir as informações sobre o potencial antioxidante do γ -terpineno e da expandir testes para caracterizar o mecanismo pelo qual as formas encapsuladas atuam.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos dos testes antioxidantes *in vitro*, tanto o monoterpeno γ -terpineno (GT) livre quanto a sua forma nanoencapsulada (NC-GT) foram efetivos em inibir a formação de radicais livres; ambas exibiram significativo potencial antioxidante frente à peroxidação lipídica por formas reativas associadas ao ácido

tiobarbitúrico (TBARS), frente ao radical nitrito e ao radical sintético ABTS. De acordo com o cálculo de suas concentrações efetivas medianas (CE_{50}) e de acordo com as análises estatística é possível mencionar que a forma nanotecnológica exibiu um maior potencial antioxidante em relação à sua forma isolada, um resultado promissor no que se refere à nanotecnologia aplicada em produtos de origem natural, demonstrando que a nanocápsula tem papel determinante para o efeito antioxidante da molécula em estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ, M. S. et al. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 356-363, 2014.

ALMEIDA, J. S. et al. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale research letters**, v. 5, n. 10, p. 1603, 2010.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy research**, v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.

BEZERRA, F. J. L. et al. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 5, p. 640-649, 2004.

BOKHARI, J. et al. Evaluation of diverse antioxidant activities of *Galium aparine*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 102, p. 24-29, 2013.

CARMO, G. M. et al. Effect of the treatment with *Achyrocline satureioides* (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 39-46, 2015.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CHRISTOFOLI, M. et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 301-308, 8// 2015.

CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 178-185, 2014.

DAUDT, R. M. et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 28-31, 2013.

DU, L. et al. Nanocarrier: a potential tool for future antioxidant therapy. **Free radical research**, v. 48, n. 9, p. 1061-1069, 2014.

DUSSE, L.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 435-50, 2003.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FOTI, M. C. Antioxidant properties of phenols. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1673-1685, 2007.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE jornal português de gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

GONZALEZ, S. B. et al. Variabilidad química del “tomillo silvestre”(Acantholippia seriphoides, Verbenaceae) en la meseta Patagónica. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 15, n. 1, 2016.

GRASSMANN, J. Terpenoids as plant antioxidants. **Vitamins & Hormones**, v. 72, p. 505-535, 2005.

GROTTO, D. et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 2, p. 619-624, 2007.

GUIMARÃES, A. G. et al. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants–quo vadis? **Trends in pharmacological sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015. ISBN 0198717482.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

KAMATOU, G. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1643-1647, 2007.

LI, G.-X.; LIU, Z.-Q. Unusual antioxidant behavior of α - and γ -terpinene in protecting methyl linoleate, DNA, and erythrocyte. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3943-3948, 2009.

MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907, 2006.

MUNIYAPPAN, N.; NAGARAJAN, N. S. Green synthesis of gold nanoparticles using *Curcuma pseudomontana* essential oil, its biological activity and cytotoxicity against human ductal breast carcinoma cells T47D. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 4, p. 2037-2044, 12// 2014.

NATRAJAN, D. et al. Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2015.

OLIVEIRA, G. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OZ, M. et al. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. **Pharmacology & therapeutics**, v. 152, p. 83-97, 2015.

PAPASTERGIADIS, A. et al. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 38, p. 9589-9594, 2012.

PEREIRA, F. et al. Production and characterization of nanoparticles containing methanol extracts of Portuguese Lavenders. **Measurement**, v. 74, p. 170-177, Oct 2015.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000.

RUBIOLO, P. et al. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 5, p. 282-290, 2010.

SAGAVE, L. et al. *Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015.

SHAMI, N.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.

SILVA, W. J. M. D.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, p. 441-451, 2011.

TAKAHASHI, Y. et al. Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein in vitro. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 195-197, 2003.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 10// 2012.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- Existe pouca literatura sobre funções biológicas do γ -terpineno e nenhuma sobre o γ -terpineno encapsulado, conseqüentemente, poucos depósitos de patentes;
- Obteve-se uma formulação características favoráveis como: tamanho de partícula, carga de superfície, elevado teor e eficiência de incorporação do γ -terpineno em nanossistemas poliméricos do tipo nanocápsulas.
- O γ -terpineno administrado por via iv em *Rattus norvegicus* não apresentou atividade cardiovascular, enquanto que a sua forma nanoencapsula promoveu hipotensão pronunciada. Portanto, a nanocápsula polimérica mostrou ser um nanocarreador vantajoso para ultrapassar os problemas apresentados.
- Quanto à atividade antioxidante *in vitro* frente TBARS, nitrito e ABTS tanto o γ -terpineno quanto a sua forma nanoencapsulada (NG) foram efetivos em inibir a formação de radicais livres; de acordo com o cálculo de suas concentrações efetivas medianas (CE₅₀) concluiu-se que a forma nanotecnológica exibiu um maior potencial antioxidante em relação à sua forma isolada.
- Pode-se associar a atividade antioxidante e a atividade cardiovascular das NC-GT como promessa no tratamento de doenças cardiovasculares.

Os presentes resultados enriquecem a literatura sobre este monoterpene e sua forma nanoencapsulada e trazem perspectivas para a realização de novos testes que permitam o uso do NC-GT como fito medicamento ou produto biotecnológico. São perspectivas futuras do trabalho: solicitar pedido de patente junto ao INPI, identificar os mecanismos de ação e os sistemas responsáveis pela atividade. Assim, como testes para avaliar a toxicidade aguda e crônica das partículas. E prosseguir com a bioprospecção frente a outros protocolos experimentais *in vitro* e *in vivo* (determinação da atividade antioxidante *in vivo*).

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

- **APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

1 – Desenvolvimento de lipossomas com γ -terpineno e ação cardiovascular em *Rattus norvegicus* – III Workshop de Projetos e Dissertações – Universidade Federal do Piauí – 2014.

2 – Nanotecnologia em ciências da saúde no Brasil: uma prospecção científica e tecnológica – II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas – 2015.

3 – Obtenção de nanocápsulas de γ -terpineno para avaliação da atividade antimicrobiana. IV Workshop de Projetos e Dissertações – Universidade Federal do Piauí – 2015.

- **PRÊMIOS**

1 – Menção honrosa: 1º lugar na apresentação de trabalhos categoria banner no IV Workshop de Projetos e Dissertações – Universidade Federal do Piauí – 2015.

ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 24 de Outubro de 2014.

Ilma.

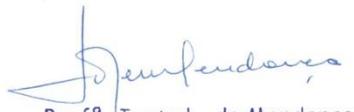
Profa. Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA.
Departamento: Biofísica e Fisiologia- CCS/UFPI.

Senhora Pesquisadora,

Em reunião na presente data (24 de Outubro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **069/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do efeito de produtos naturais e sintéticos bioativos sobre o sistema cardiovascular em ratos. Abordagem in vivo e in vitro**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Novembro/2014 à Outubro/2017, e serão usados 210 Ratos heterogênicos (machos e fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Profª. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora