



**RENORBIO**

Rede Nordeste de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ponto Focal Piauí - Universidade Federal do Piauí

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÃO A PARTIR DO  
MONOTERPENO MIRTENOL E APLICAÇÃO PRÉ-CLÍNICA EM MODELOS  
DE INFLAMAÇÃO**

**BRUNO DA SILVA GOMES**

**TERESINA**

**2018**

**BRUNO DA SILVA GOMES**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÃO A PARTIR DO  
MONOTERPENO MIRTENOL E APLICAÇÃO PRÉ-CLÍNICA EM MODELOS  
DE INFLAMAÇÃO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO – Ponto Focal UFPI, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Meneses Oliveira

Teresina – PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Divisão de Processos Técnicos

G633d Gomes, Bruno da Silva.

Desenvolvimento de nanoformulação a partir do monoterpeno mirtenol e aplicação pré-clínica em modelos de inflamação. / Bruno da Silva Gomes. – 2018.  
124 f.

Teses (Doutorado) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Teresina, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira.

1. Anti-inflamatório. 2. Monoterpeno. I. Título.

CDD 615.75

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNO:** BRUNO DA SILVA GOMES

**TÍTULO DO PROJETO:** "Desenvolvimento de Nanoformulação a partir do monoterpeno Mirtenol e aplicação pré-clínica em modelos de inflamação."

**PROFESSORA ORIENTADORA:** Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses de Oliveira

<b>BANCA EXAMINADORA:</b>	<b>CONCEITO</b>	<b>ASSINATURA</b>
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros – UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Luciano Augusto de Araújo Ribeiro - UNIVASF (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 26 de novembro de 2018.

**HORÁRIO:** 14h30

**LOCAL:** Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM/CCS/UFPI)

Consagre ao Senhor tudo o que você faz,  
e os seus planos serão bem-sucedidos.

Provérbios 16

## AGRADECIMENTOS

Apesar de todas as dificuldades, em nenhum momento me senti sozinho ou desamparado. Por esse motivo, inicio meus agradecimentos louvando à **Deus** por tornar possível esse sonho. Agradeço também à **Nossa Senhora** por toda proteção e auxílio durante esta jornada;

Agradeço à minha grande colaboradora na vida, minha esposa **Thereza Crystina**. Sem seu apoio, compreensão, incentivo e amor nada seria possível. Obrigado por fazer minha vida mais leve, bonita e abençoada;

Agradeço à minha família, em especial meus pais Inocêncio e Lúcia e minha irmã Larissa, pela torcida e carinho que sempre tiveram por mim;

Agradeço ao meu avô Tomé que, aos seus 95 anos, continua a torcer pelo seu “Bruneco”. Agradeço também aos meus avôs que intercedem por mim do céu;

Agradeço à minha família do Maranhão que, mesmo distante, sempre me incentivaram;

Agradeço a todos os amigos de infância, da época do colégio, do curso de Biologia, do mestrado, da Igreja, da Comunidade Shalom e do trabalho por servirem de inspiração e acrescentarem muito em minha vida;

Quero agradecer de forma especial a todos do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da UFPI, minha segunda casa durante os últimos nove anos.

Muito obrigado a todos os professores e alunos desta casa. Por meio de vocês pude crescer como pessoa e profissional.

Agradeço de forma muito especial à **Profª Drª Rita de Cássia Meneses Oliveira**, por ter sido, desde o início da caminhada científica, uma grande mãe;

Agradeço ao Prof. **Dr. Francisco de Assis Oliveira** pelo auxílio, força, puxões de orelha, por todo conhecimento adquirido durante todos esses anos e por servir de inspiração como docente e pesquisador;

Agradeço a todos que compõem o Laboratório de Farmacologia da Inflamação, em especial ao Benedito, Valmor, Antônio Carlos, Rodrigo, Stella, Diana, Sara, Lucas e demais colaboradores;

À todos os companheiros nucleares, em especial Pedro Simão, Carlos Filho, Flávia Franceli, Michél Mualém, Celiane Alves, Lúcio Filho, Ana Flávia Seraine e Daniel Arcanjo

À grande amiga e colaboradora Alyne Rodrigues por toda ajuda durante os experimentos;

À turma de doutorado em Biotecnologia 2014.1;

Aos professores Drº Damião Pergentino, Drº Roberto César, Drº José Roberto Leite, Drº João Paulo pela colaboração no trabalho;

À todos os colaboradores do NPPM por tão valioso trabalho;

À coordenação do RENORBIO;

À CAPES;

À Universidade Federal do Piauí.

GOMES, S.B. **Desenvolvimento de nanoformulação a partir do monoterpeno mirtenol e aplicação pré-clínica em modelos de inflamação**. 2018, 124p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal UFPI. Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira.

## RESUMO

A inflamação é um processo fisiológico em resposta a uma agressão cujo papel é restaurar a homeostase do tecido vivo, mas a inflamação descontrolada ou não resolvida pode causar danos teciduais e contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias crônicas, como artrite. A literatura reporta o efeito anti-inflamatório de monoterpenos oriundos de óleos essenciais. O mirtenol (2-Pinen-10-ol; Pin-2-eno-10-ol; 6,6-Dimetilbicyclo (3.1.1) hept-2-eno-2-metanol) é um monoterpeno extraído do óleo essencial de plantas aromáticas com atividades farmacológicas comprovadas, como ansiolítica, gastroprotetora e anti-inflamatória aguda. O presente estudo investigou a atividade anti-inflamatória do mirtenol e da nanoformulação desenvolvida a partir deste monoterpeno. A atividade anti-inflamatória do mirtenol livre foi avaliada quanto a migração de leucócitos e liberação de radicais livres. A nanoformulação foi obtida pelo protocolo de Temperatura de Inversão de Fases e, em seguida, determinou-se o tamanho da nanopartícula, índice de polidispersão e potencial hidrogeniônico. A citotoxicidade da nanoformulação foi avaliada por meio do teste de viabilidade celular em macrófagos murinos, assim como a toxicidade oral aguda. Para a investigação dos efeitos anti-inflamatórios e estudo dos mecanismos de ação, foram realizados os testes de edema de pata induzido por carragenina, peritonite induzida por carragenina, contagem total e diferencial de leucócitos, níveis de mieloperoxidase, citocinas, malondialdeído, glutationa, no exsudato peritoneal e, por fim edema articular e incapacitação articular induzidas por Adjuvante Completo de Freund's, em ratos. A nanoformulação do mirtenol foi obtida nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg e suas partículas apresentam tamanhos em escala nanométrica menores que 40 nm e baixo índice de polidispersão, indicativos de boa estabilidade da emulsão. Os resultados mostraram que o mirtenol reduziu a migração de leucócitos para o foco inflamatório e modulou o estresse oxidativo. Os testes de viabilidade em macrófagos indicaram baixa citotoxicidade da nanoformulação do mirtenol e não foi evidenciado toxicidade oral aguda. O pré-tratamento dos animais com a nanoformulação do mirtenol reduziu de forma significativa o edema de pata induzido por carragenina, apresentando resultados superiores aos dos animais pré-tratados com o mirtenol. Somado a isso, a nanoformulação reduziu a contagem de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos, além de reduzir os níveis de mieloperoxidase e citocinas pró-inflamatórias, mas não os níveis de malondialdeído; houve diferença estatisticamente significativa em relação aos níveis de glutationa quando comparados ao grupo controle. A nanoformulação também foi eficaz na redução do edema articular e do tempo de elevação da pata em modelo de artrite crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund's. Através desses resultados, pode-se concluir que a nanoformulação do mirtenol apresenta potencial efeito anti-inflamatório em modelos agudo e crônico. Os ensaios preliminares mostram que o mirtenol possui efeito anti-inflamatório pela modulação de migração e adesão leucocitária e a preparação da nanoemulsão do mirtenol também possui atividade anti-inflamatória.

**Palavras-chave:** Nanoformulação; monoterpeno; artrite

GOMES, S.B. **Development of nanoformulation from monoterpene mirtenol and preclinical application in chronic inflammation models.** 2018, 124p. Thesis, PhD Program in Biotechnology, RENORBIO, Focal Point UFPI. Doctoral supervisor: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira.

### ABSTRACT

Inflammation is a physiological process in response to an aggression whose role is to restore homeostasis of living tissue, but uncontrolled or unresolved inflammation can cause tissue damage and contribute to the pathogenesis of chronic inflammatory diseases such as arthritis. The literature reports the anti-inflammatory effect of monoterpenes from essential oils. (2-Pinen-10-ol; Pin-2-ene-10-ol; 6,6-Dimethylbicyclo (3.1.1) hept-2-ene-2-methanol) is a monoterpene extracted from plant essential oil with proven pharmacological activities such as anxiolytic, gastroprotective and acute anti-inflammatory. The present study investigated the anti-inflammatory activity of mirtenol and nanoformulation developed from this monoterpene. The anti-inflammatory activity of free mirtenol was evaluated for leukocyte migration and free radical release. The nanoformulation was obtained by the protocol of Phase Inversion Temperature and then the nanoparticle size, polydispersity index and hydrogenation potential were determined. The cytotoxicity of nanoformulation was evaluated by the cell viability test in murine macrophages, as well as acute oral toxicity. Carrageenan-induced paw edema, carrageenan-induced peritonitis, total and differential leukocyte counts, myeloperoxidase levels, cytokines, malondialdehyde, glutathione, and the like were investigated for the anti-inflammatory effects and study of the mechanisms of action. peritoneal exudate and, finally, joint edema and articular incapacitation induced by Freund's Complete Adjuvant in rats. The nanoformulation of mirtenol was obtained at the doses of 12.5, 25 and 50 mg / kg and its particles have sizes at nanometer scale smaller than 40 nm and low index of polydispersion, indicative of good emulsion stability. The results showed that mirtenol reduced the migration of leukocytes to the inflammatory focus and modulated the oxidative stress. Macrophages viability tests indicated low cytotoxicity of mirtenol nanoformulation and no acute oral toxicity was evidenced. Pretreatment of the animals with the nanoformulation of mirtenol significantly reduced carrageenan-induced paw edema, presenting better results than the animals pretreated with mirtenol. In addition, nanoformulation reduced total leukocyte, monocyte and neutrophil counts, and reduced levels of myeloperoxidase and proinflammatory cytokines, but not malondialdehyde levels; there was a statistically significant difference in relation to glutathione levels when compared to the control group. Nanoforming was also effective in reducing joint edema and paw elevation time in the chronic arthritis model induced by Freund's Complete Adjuvant. Through these results, it can be concluded that the nanoformulation of mirtenol presents potential anti-inflammatory effect in acute and chronic models. Preliminary tests show that mirtenol has an anti-inflammatory effect through the modulation of leukocyte adhesion and migration, and the preparation of mirtazolan nanoemulsion also has anti-inflammatory activity.

Keywords: Nanoformulation; monoterpene; arthritis



## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
A/O	Água em óleo
AA	Ácido araquidônico
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
AR	Artrite reumatoide
CAT	Catalase
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica média
COX	Cicloxygenase
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz (Dynamic Light Scattering)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ditio-nitrobenzoico
EPM	Erro padrão da média
ROS	Espécies reativas do oxigênio
g	Gramas
GO	Glutathione oxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GSSG	Glutathione disulfeto
H & E	Hematoxilina e eosina
HMGB1	Proteínas de alta mobilidade do grupo B1
i.ar	Intra-articular
IL	Interleucina
M	Molar
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos do tipo 1
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo

NADPH	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato
NFM	Nanoformulação do mirtenol
nm	Nanômetro
ON	Óxido nítrico
O/A	Óleo em água
OMS	Organização mundial de saúde
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
PDI	Índice de polidispersão
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
PIT	Temperatura de inversão de fases
PMN	Polimorfonuclear
s.c.	Subcutânea
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TEP	Tempo de elevação da pata
TLR	Receptores Toll-Like
TX	Tromboxano
v.o.	Via oral

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Capítulo I

Figura 1- Desenvolvimento do processo inflamatório	21
Figura 2: Estrutura química do (-)-mirtenol.	27

### Capítulo II

Figura 1- Estrutura química do (-)-mirtenol	45
Figura 2- Efeito do mirtenol, veículo, indometacina e dexametasona sobre o edema e incapacitação articular induzido por ACF em ratas.	47
Figura 3- Potencial antioxidante do mirtenol, veículo e dexametasona na produção de nitrito e SOD no plasma.	49
Figura 4- O mirtenol controla a migração de neutrófilos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	51
Tabela 1- O mirtenol não prejudica a atividade exploratória animal	50

### Capítulo III

Figura 1 – Curva de calibração	70
Figura 2 – Imagem do Espalhamento de Luz Dinâmico para NFM nas doses de 12,5 mg/kg (A), 25 mg/kg (B) e 50 mg/kg (C).	71
Figura 3 – Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas da NFM	73
Figura 4 – PDI das nanopartículas da NFM	73
Figura 5: Imagens de AFM de nanoemulsão formulada (NFM)	74
Figura 6 – Carga das partículas da NFM	75
Tabela 1. Taxa de encapsulação da nanoemulsão do mirtenol	70

### Capítulo IV

Figura 1 - Efeito citotóxico da NFM sobre macrófagos peritoneais murinos.	95
Figura 2 - Efeito da NFM, veículo e indometacina sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.	96

Figura 3 - Efeito da NFM, veículo e Indometacina no número total de leucócitos em peritonite induzida por carragenina em camundongos.	98
Figura 4 - Efeito da NFM, veículo e Indometacina no número de neutrófilos em peritonite induzida por carragenina em camundongos.	99
Figura 5 - Efeito da NFM, veículo e Indometacina no número de monócitos em peritonite induzida por carragenina em camundongos.	99
Figura 6 - Efeito da NFM, veículo e Indometacina na atividade da MPO em peritonite induzida por carragenina em camundongos.	100
Figura 7: Efeito da NFM, veículo e Indometacina nos níveis de IL-6 e IL-8 em peritonite induzida por carragenina em camundongos.	101
Figura 8: Efeito da NFM, veículo e Indometacina nos níveis de MDA em peritonite induzida por carragenina em camundongos.	102
Figura 9: Efeito da NFM, veículo e Indometacina nos níveis de GSH em peritonite induzida por carragenina em camundongos.	103
Figura 10: Efeito da NFM, veículo, indometacina sobre o edema articular induzido por ACF	104
Figura 11: Efeito da NFM, veículo, indometacina sobre a incapacitação articular induzida por ACF	106
Tabela 1: Efeito da NFM, veículo e indometacina sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.	97
Tabela 2: Efeito da NFM, veículo, indometacina sobre o edema articular induzido por ACF	105

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivo Geral:</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos:</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA CIENTÍFICA</b>	<b>18</b>
<b>1 Inflamação</b>	<b>18</b>
<b>2 Inflamação crônica</b>	<b>22</b>
<b>3 Tratamentos farmacológicos da inflamação</b>	<b>23</b>
<b>4 Plantas medicinais</b>	<b>25</b>
<b>5 Mirtenol</b>	<b>26</b>
<b>6 Nanotecnologia</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>30</b>
<b>Capítulo II: O efeito anti-inflamatório do monoterpeno mirtenol é dependente da modulação da migração de neutrófilos e do estresse oxidativo.</b>	<b>40</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>40</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Animais</b>	<b>41</b>
<b>2.2. Produtos Químicos e reagentes</b>	<b>42</b>
<b>2.3. Avaliação de toxicidade</b>	<b>42</b>
<b>2.4. Monoartrite crônica induzida por ACF em ratos</b>	<b>42</b>
<b>2.5. Avaliação do edema inflamatório em monoartrite crônica induzida por ACF</b>	<b>43</b>
<b>2.6. Avaliação da incapacitação articular induzida por ACF</b>	<b>43</b>
<b>2.7. Concentração de superóxido dismutase (SOD) em ratos</b>	<b>43</b>

<b>2.8. Concentração plasmática de nitrito na monoartrite induzida por ACF</b>	<b>44</b>
<b>2.9. Avaliação de Mirtenol na atividade motora espontânea em camundongos</b>	<b>44</b>
<b>2.10 Isolamento de neutrófilos humanos</b>	<b>44</b>
<b>2.11 Ensaio de migração na câmara de Boyden</b>	<b>45</b>
<b>2.12. Medição em tempo real do rolamento e adesão de leucócitos por microscopia intravital</b>	<b>45</b>
<b>2.13 Análise estatística</b>	<b>46</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Mirtenol previne edema e incapacitação articular em monoartrite crônica associada à ACF</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Mirtenol mostra diminuição dos níveis de nitrito e SOD</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Mirtenol não prejudica a atividade locomotora espontânea de ratos</b>	<b>50</b>
<b>3.4. Mirtenol inibe a migração de neutrófilos</b>	<b>50</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo III: Obtenção e caracterização da nanoformulação do mirtenol</b>	<b>65</b>
<b>RESUMO</b>	<b>65</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>65</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>68</b>
<b>2.1 Drogas e reagentes</b>	<b>68</b>
<b>2.2 Avaliação da toxicidade oral</b>	<b>68</b>
<b>2.3 Síntese da nanoformulação do mirtenol</b>	<b>68</b>
2.3.1 Taxa de encapsulação de Mirtenol	68
2.3.2 Tamanho e distribuição das partículas	69
2.3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)	69
2.3.4 Determinação do pH da nanoformulação	69

2.3.5 Medida do Potencial Zeta	69
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>70</b>
<b>3.1 Obtenção da nanoformulação do mirtenol</b>	<b>70</b>
<b>3.2 Caracterização da nanoformulação</b>	<b>72</b>
3.2.1 Taxa de encapsulação do mirtenol	70
3.2.2 Tamanho e distribuição das partículas	71
3.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)	73
3.2.4 Determinação do pH da nanoformulação	74
3.2.5 Medida do Potencial Zeta	74
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>78</b>
<b>Capítulo IV: Atividade anti-inflamatória da nanoformulação do monoterpeno mirtenol</b>	<b>86</b>
<b>RESUMO:</b>	<b>86</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>86</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>89</b>
<b>2.1 Drogas e reagentes</b>	<b>89</b>
<b>2.2 Animais</b>	<b>89</b>
<b>2.3 Ensaios Farmacológicos</b>	<b>90</b>
2.3.1 Efeito da NFM diante da citotoxicidade sobre macrófagos	90
2.3.2 Toxicidade oral aguda de NFM	90
2.3.3 Efeito da nanoformulação do mirtenol (NFM) sobre o edema de pata induzido por carragenina	91
2.3.4 Peritonite induzida por carragenina	91
2.3.4.1 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	91

2.3.4.2 Dosagem das interleucinas 6 (IL-6) e 8 (IL-8)	92
2.3.4.3 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA)	92
2.3.4.4 Análise das concentrações de glutathiona (GSH)	92
2.3.5 Efeito da NFM sobre a monoartrite crônica induzida por adjuvante completo de Freund (ACF) em ratas	93
2.3.6 Efeito da NFM sobre o edema inflamatório na monoartrite crônica induzida por ACF	93
2.3.7 Avaliação da NFM sobre a incapacitação articular induzida por ACF em ratas	93
<b>2.4 Análise estatística</b>	<b>94</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>94</b>
<b>3.1 Efeito do mirtenol e da NFM diante da citotoxicidade sobre macrófagos</b>	<b>94</b>
<b>3.2 Toxicidade oral aguda de NFM</b>	<b>95</b>
<b>3.3 Efeito da nanoformulação do mirtenol (NFM) sobre o edema de pata induzido por carragenina</b>	<b>95</b>
<b>3.4 Efeito da NFM no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos.</b>	<b>98</b>
<b>3.5 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)</b>	<b>99</b>
<b>3.6 Dosagem das interleucinas 6 (IL-6) e 8 (IL-8)</b>	<b>100</b>
<b>3.7 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA)</b>	<b>102</b>
<b>3.8 Análise das concentrações de glutathiona (GSH)</b>	<b>102</b>
<b>3.9 Efeito da NFM sobre o edema inflamatório na monoartrite crônica induzida por ACF</b>	<b>103</b>
<b>3.10 Avaliação do mirtenol sobre a incapacitação articular induzida por ACF em ratas</b>	<b>106</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>107</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>115</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são uma valiosa fonte de compostos que, inclusive, compõem medicamentos administrados atualmente, mostrando que os produtos naturais desempenham um papel vital na cura de doenças (LIN, HSU e LIN, 2014). Uma das principais vantagens do uso de produtos naturais a partir de extratos vegetais é seu baixo custo, sem necessidade de síntese química. Esse modo de produção pode levar a tratamentos menos dispendiosos, disponíveis para populações de países de baixa renda (YOUSAF et al., 2018).

É possível encontrar na literatura trabalhos que mostram efeitos de substâncias isoladas de vegetais com boa atividade anti-inflamatória. Estes constituintes podem ser encontrados nos óleos essenciais, muito comuns em plantas (WERZ et al., 2007). Os óleos essenciais são caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas; fisicamente, em sua maioria, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Os terpenóides são os constituintes mais abundantes dos óleos essenciais estão presentes quer como hemiterpenos, monoterpenos, ou sesquiterpenos e como os seus derivados. Os monoterpenos são os constituintes mais representativos dos óleos essenciais, constituindo 90% dos mesmos e permitindo uma grande variedade de estruturas, além de possuírem atividades farmacológicas descritas, como analgésica, anti-inflamatória, antidepressiva e anticonvulsivante dentre outras (TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007; BAKKALI, et. al. 2008).

O (-)-mirtenol é um monoterpeno, álcool bicíclico presente nos óleos essenciais de numerosas espécies de plantas medicinais, incluindo as das famílias Crassulaceae (*Rhodiola rosea* L.), Paeoniaceae (*Paeonia lactiflora* Pall.) (NGAN et al., 2012), Cyperaceae (*Cyperus rotundus* L.) e Myrtaceae (*Myrtus communis* L. e *Eucalyptus citriodora* Hook.). Na medicina popular, óleos das plantas contendo mirtenol são usados tradicionalmente para aliviar sintomas de ansiedade, dores gastrintestinais, infecção e inflamação (BHATIA et al., 2008; LAWAL e OYEDEJI, 2009; EVSTATIEVA et al., 2010; PREVIEIRO et al, 2010; CANO-RAMÍREZ et al.,2012).

Devido sua implicação em quase todas as doenças humanas e animais, a inflamação se tornou o foco de pesquisas científicas em quase todo o mundo e, além disso, os efeitos adversos dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) exigiu a procura de novos fármacos com efeitos colaterais mínimos. O mirtenol torna-se um aliado em

potencial, visto que este monoterpene encontra-se na composição de óleos essenciais de diversas plantas que já tiveram atividade anti-inflamatória comprovada (SILVA et al., 2014).

Hoje em dia, os recentes desenvolvimentos alcançados pela nanotecnologia estão sendo considerados em várias áreas de pesquisa, uma vez que a manipulação da matéria em escala nanométrica oferece inúmeras oportunidades. Com o crescente avanço da nanotecnologia em aplicações biomédicas, o uso de nanomateriais como biomateriais tem recebido atenção considerável em ambos os desenvolvimentos fundamentais e tecnológicos devido à sua alta superfície em relação ao volume e às suas interações com a matéria biológica serem qualitativamente diferentes dos que ocorrem entre os objetos macro-escala (BAWARSKI, et al., 2008; SAUNDERS et al., 2009; SAHOO, 2003; WILKINSON, 2003). Assim, os nanomateriais já são ferramentas atraentes em uma variedade de aplicações biológicas e médicas (SPERLING, et al., 2008).

A literatura mostra que as nanopartículas, devido ao seu tamanho podem atingir a superfície de alvos intra-articulares. Outros nanossistemas como nanoprodrogas polímero, micelas, nanocápsulas e nanopartículas de sílica também foram desenvolvidos para a terapia da artrite. Estes estudos demonstraram que as abordagens nanomedicinais podem proporcionar uma eficácia e reduzir os efeitos colaterais e alcançar de forma seletiva os sítios de destino, enquanto diminui a liberação da droga em tecidos normais ou órgãos em doenças como artrite (BERNARDI et al, 2009; LEE et al, 2009; SIMOVIC et al, 2010; ZHANG et al, 2006, 2007, 2008; CHE et al, 2012).

Estudos preliminares com o monoterpene mirtenol mostraram bons resultados na supressão da inflamação aguda (SILVA et al., 2014). Considerando esses efeitos e as vantagens das nanoemulsões e que a estrutura da substância em análise se assemelha à do monoterpene com atividade anti-inflamatória comprovada, a justificativa desta proposta se baseia na obtenção de maiores informações sobre as propriedades farmacológicas do mirtenol e de uma nanoformulação feita a partir do mirtenol, visando principalmente a utilização de modelos experimentais de inflamação aguda e crônica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Investigar o potencial anti-inflamatório do mirtenol livre da nanoformulação do mirtenol (NFM) em modelos de inflamação aguda e crônica

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- Investigar a ação do mirtenol livre em modelos de inflamação e incapacitação articular;
- Avaliar os mecanismos de ação do mirtenol livre em modelos de inflamação aguda e crônica;
- Obter uma nanoformulação a partir do monoterpene mirtenol;
- Definir as principais características da NFM;
- Averiguar os principais mecanismos de ação da NFM em modelos de inflamação;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório crônico da NFM em modelo de artrite crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF) em ratas;
- Estudar o efeito da NFM sobre a incapacitação articular induzida por Adjuvante de Freund em ratas;

## CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA CIENTÍFICA

### 1 Inflamação

A inflamação é um processo em resposta a infecção, lesão ou irritação que tem como papel principal restaurar a homeostase do tecido vivo. No entanto, a inflamação descontrolada ou não resolvida pode causar danos teciduais e contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias e auto-imunes crônicas, como artrite (SOUSA et al, 2013; WANG et al., 2013; DEVI et al., 2015).

As referências sobre inflamação remontam do primeiro século D.C quando Cornelius Celsus descreveu os quatro sinais cardinais da inflamação: *rubor et tumor cum calore et dolore* (vermelhidão e edema com calor e dor) (MEDZHITOV, 2010). O quinto sinal clínico, que é a perda da função (*functio laesa*), só foi descrito por Virchow no final do século XVIII (ZHOU et al., 2007). Os sinais cardinais da inflamação são resultado da vasodilatação (calor e rubor), do acúmulo de leucócitos e do extravasamento de fluido intersticial (tumor ou edema), ocorre também a estimulação das terminações nervosas por mediadores (dor) e por último sobrevém a inibição do reflexo muscular e rompimento da estrutura do tecido (perda da função) (ALLER et al., 2006).

A inflamação é um fenômeno complexo que envolve o recrutamento de células imunes em resposta a estímulos nocivos como medida de proteção pelo organismo. O processo de recrutamento é alcançado por uma ampla variedade de citocinas liberadas por células imunes residentes que podem ser pró ou anti-inflamatórias. A inflamação começa como uma resposta aguda voltada para a depuração de estímulos, bem como mediadores, em um esforço para restaurar a função normal. Os mediadores inflamatórios envolvidos em uma resposta aguda são frequentemente de curta duração, levando à resolução da inflamação quando os estímulos são eliminados (COTRAN et al., 2015). Como tal, a inflamação é central para uma variedade de manifestações patológicas que resultam em uma coleção de processos biológicos complexos e não lineares envolvidos na resposta de um organismo a estímulos (VODOVOTZ et al., 2010). O gerenciamento desses processos com drogas anti-inflamatórias é uma parte importante da prática médica (ANDA-JÁUREGUI et al, 2018).

Para que haja uma resposta inflamatória é necessária a liberação de ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolipídios de membrana por meio da enzima fosfolipase A2 que pode ser ativada por diversos estímulos (KUMMER; COELHO, 2004). O ácido araquidônico é o principal precursor na biossíntese de eicosanoides (ZARGHI; ARFAEI, 2011; GEORGE et al., 2014; MEIRER et al., 2014). As cicloxigenases convertem o ácido araquidônico em prostaglandina H2 (PGH2) que, por sua vez, é transformada em uma série de produtos finais

como prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (PELLETIER et al., 2003). As lipoxigenases catalisam a formação de ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos do ácido araquidônico (5-HPETE), levando à formação de leucotrienos e outros compostos biologicamente ativos (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

O processo inflamatório pode ser mediado por efetores celulares (macrófagos, neutrófilos, linfócitos) e químicos (citocinas, quimiocinas, prostanóides, lipoxinas, óxido nítrico) que somam-se a fim de eliminar o agente agressor (WHITE, 1999). Neste sentido, observa-se que há participação de uma fase celular, caracterizada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), padrões moleculares associados ao dano (DAMP) e recrutamento celular, e uma fase vascular, formadora de edema e ruborização (COLGAN; CAMPBELL; KOMINSKY, 2016). A indução do processo inflamatório pelos PAMPs está relacionada à resposta imune inata e consequente inflamação em resposta a lesão de origem biológica; já os DAMPs consistem em moléculas próprias do tecido e que, no geral, têm sua existência restrita ao meio intracelular mas que são liberadas mediante lesão física ou química como ácidos nucleicos e determinadas proteínas como o HMGB1 (proteínas de alta mobilidade do grupo B1) (BROGGI; GRANUCCI, 2015).

O reconhecimento inicial de um antígeno no processo inflamatório é mediado por macrófagos e mastócitos residuais de tecido, levando à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanóides e produtos de cascatas proteolíticas (Figura 1). O efeito principal e mais imediato desses mediadores é provocar um exsudato inflamatório localmente: as proteínas plasmáticas e os leucócitos (principalmente os neutrófilos) que normalmente são restritos aos vasos sanguíneos agora obtêm acesso, através das vênulas pós-capilares, aos tecidos extravasculares no local de infecção ou lesão (MEDZHITOV, 2008).

Os eventos vasculares da resposta inflamatória envolvem circulação, infiltração inflamatória e recrutamento de células imunitárias inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos) e constitutivas de tecidos vasculares (de músculo liso, células endoteliais e fibroblastos). Esta interação celular produz mediadores inflamatórios tais como as citocinas, por exemplo, interleucinas e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$ , bem conhecidos por ativar a produção de prostaglandinas E2 (PGE2) (BISHOP-BAILEY; MITCHELL; WARNER, 2006).

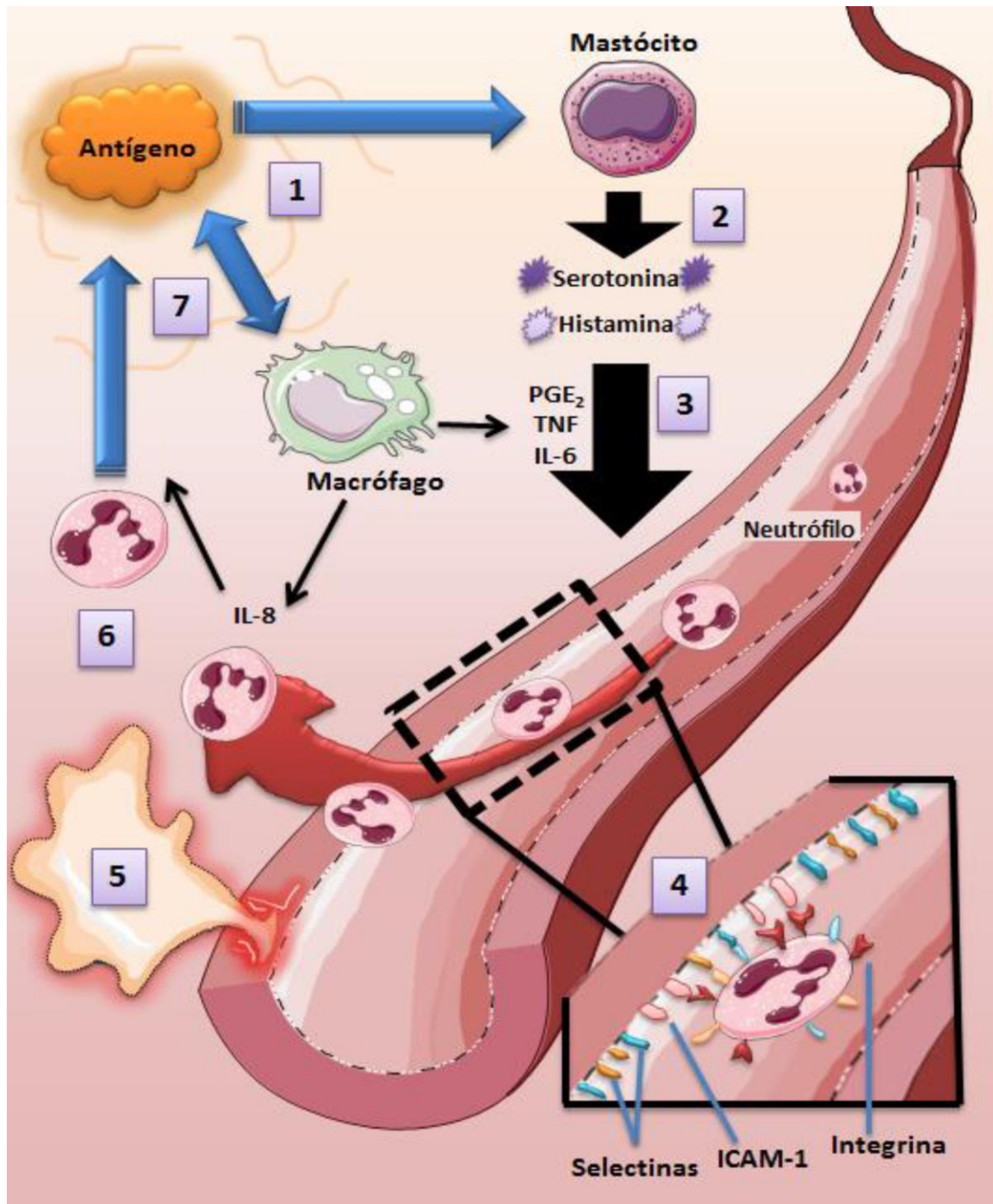
O endotélio ativado dos vasos sanguíneos permite o extravasamento seletivo de neutrófilos enquanto evita a saída de eritrócitos. Quando atingem o local do tecido aflito, os

neutrófilos tornam-se ativados, seja por contato direto com agentes patogênicos ou através das ações das citocinas segregadas por células residentes nos tecidos (MEDZHITOV, 2008).

Os neutrófilos tentam eliminar os agentes invasores liberando os teores tóxicos de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio e espécies reativas do nitrogênio. Esses efetores altamente tóxicos não discriminam entre alvos microbianos e hospedeiros, provocando dano colateral aos tecidos (NATHAN, 2002; NATHAN, 2006).

Quando, no entanto, por motivos constitucionais e ambientais tais como macrófagos ineficientes, produção inadequada de mediadores inflamatórios, resposta inflamatória subnormal ou excessiva ou persistência do estímulo lesivo, ocorre uma falha da resolução do processo inflamatório, inicia-se a fase crônica da inflamação; assim a transição da inflamação aguda para a crônica ocorre quando não há uma resolução da resposta inflamatória aguda devido à persistência do agente nocivo ou há alguma interferência com o processo normal da cicatrização originando um quadro de inflamação crônica (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006; LAWRENCE; GILROY, 2007; NATHAN; DING, 2010).

Figura 1- Desenvolvimento do processo inflamatório



(1) Ativação dos mastócitos e macrófagos pelo antígeno; (2) Degranulação e liberação de mediadores pré-formados; (3) Atuação da histamina, serotonina, prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL-6) sobre o endotélio; (4) Rolamento, adesão e migração de leucócitos para o tecido inflamado a partir das integrinas, selectinas e seus ligantes; (5) Edema tecidual devido o extravasamento de proteínas e líquidos plasmáticos; (6) Quimiotaxia de neutrófilos induzida pela IL-8 dos macrófagos e mastócitos; (7) Liberação do conteúdo dos grânulos dos neutrófilos, seguida de fagocitação.

(LIMA-FILHO, 2017)

## 2 Inflamação crônica

A inflamação crônica desempenha um papel central na patogênese de vários distúrbios, como artrite reumatoide, câncer, diabetes, obesidade, complicações cardiovasculares etc., seu impacto e papel na patogênese podem variar de doença para doença (KOTAS; MEDZHITOV, 2015). A consequência deste evento inflamatório é o aumento da produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias e a alteração sistema imune adaptativo, que impulsiona mudanças fisiopatológicas em órgãos e tecidos, o que, por sua vez, acelera os resultados adversos da saúde e o status de doenças crônicas (WALSTON; HOPKINS, 2017). A inflamação crônica surge devido a falhas na resolução do processo inflamatório agudo (MURAKAMI; HIRANO, 2012). Uma vez que a resposta inflamatória aguda não consegue eliminar o patógeno, o processo inflamatório persiste, adquirindo novas características, no qual o infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos e, no caso de infecção, também por células T. Se o efeito combinado dessas células ainda é insuficiente, ocorre um estado inflamatório crônico, envolvendo a formação de granulomas e tecidos linfoides terciários (KUMAR et al, 2003; DRAYTON et al, 2006).

A mudança no perfil celular parece estar diretamente relacionada à produção de interleucina 6 (IL-6). Alguns estudos mostram que a IL-6 e IL-8 estimulam em células endoteliais a produção da proteína quimioatraente de monócitos do tipo 1 (MCP-1) e a expressão de moléculas de adesão. Sabe-se ainda que a exposição de neutrófilos também contribui para a liberação de MCP-1 e isso favorece a quimiotaxia e migração de células mononucleadas principalmente monócitos (GABAY, 2006). A partir de então, os monócitos são responsáveis pela produção do fator pró-mitogênico M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) que induz sua diferenciação em macrófagos, induzindo assim a proliferação celular (LIBBY, 2007). Nesse processo, ocorre também o remodelamento da matriz extracelular mediada principalmente por fibroblastos, morte ou proliferação celular caracterizada ora por regiões de tecido evanescente ora necrótico, e angiogênese culminando com a diminuição da função do tecido (FERRERO-MILLANI et al, 2006).

A falha nos processos de resolução da inflamação e início do reparo tecidual propiciam o aumento da lesão tecidual pela formação de tecido de granulação e acúmulo de células com capacidade secretória (enzimas e radicais livres), que por sua vez retroalimentam positivamente a inflamação local (NATHAN; DING, 2010).



A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica, crônica, auto-imune que prejudica as articulações periféricas, os ligamentos e os tendões, levando à deformidade e destruição das articulações, bem como a deficiência física (KUMAR et al, 2016).

Além da destruição das articulações, a artrite reumatoide pode levar à dor crônica e perda de função (SCOTT; WOLFE, 2010). Embora a dor induzida pela AR exija um impacto significativo na sociedade em termos de qualidade de vida e incapacidades funcionais, os mecanismos subjacentes à dor artrítica não são completamente compreendidos.

Uma das principais razões pelas quais o tratamento da dor artrítica continua a ser um problema de saúde é que os analgésicos atuais estão altamente associados a efeitos indesejáveis graves, que são parcialmente derivados do uso a longo prazo e administração sistêmica (TRAGULPIANKIT et al, 2012; CHOY et al, 2005).

### **3 Tratamentos farmacológicos da inflamação**

A terapia medicamentosa é o regime mais importante e eficaz para promover o alívio da dor, reestabelecer o aumento da função do tecido afetado e inibir a inflamação em doenças inflamatórias agudas ou crônicas, como artrite, sendo clinicamente tratadas, em especial, por anti-inflamatórios esteroides, como a dexametasona, ou não esteroides (AINEs), como o ibuprofeno (ABRAMSON; YAZICI, 2006; GERWIN et al., 2006; STEINMEYER; KONTTINEN, 2006; GUO et al., 2012).

Essas classes de fármacos têm sido utilizadas com sucesso para alívio da dor, inflamação e febre por milhões de pacientes ao redor do mundo (VONKEMAN; VAN DE LAR, 2010). Os AINEs e corticosteroides são utilizados para tratar distúrbios inflamatórios, entretanto, a utilização desses fármacos causa uma série de efeitos indesejáveis tais como úlceras gástricas, dispepsia, sangramentos gastrintestinais e complicações cardiovasculares (GILROY et al, 2004; GAUTAM; JACHAK, 2009; DINARELLO, 2010).

Os AINEs estão entre os medicamentos mais frequentemente prescritos, devido à sua elevada eficácia no tratamento da dor, febre, inflamação e doenças reumáticas (BLANDIZZI et al., 2009). O seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (AA) por meio da inibição da atividade da cicloxigenase-1 e 2 (COX-1 e -2). A COX-1 está presente e expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, ao passo que a expressão de COX-2 é geralmente transiente e pode ser rapidamente induzida por citocinas, lipopolissacarídeo (LPS), acetato miristato de forbol (PMA), ou fatores de crescimento (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000; TANABE; TOHNAI, 2002).

A inibição da COX e conseqüente diminuição da concentração de prostaglandinas (PGs) culminam com o aumento da susceptibilidade à lesão do trato gastrointestinal (VAN SCHOOR, 2014). Essas lesões vão desde os sintomas dispépticos, erosões gastrointestinais e úlcera péptica, a complicações mais graves, tais como hemorragia ou perfuração evidente (BLANDIZZI et al., 2009).

Além disso, doses terapêuticas de AINEs, não lesivas em indivíduos saudáveis, causam alterações sobre o fluxo sanguíneo e função renal de pacientes com insuficiência renal, idosos e crianças. Além disso, com o uso crônico e desregulado do mesmo, pode haver progressão da injúria renal para nefropatia analgésica e formação de úlceras gástricas (WITACENIS et al., 2014).

A ocorrência dos efeitos adversos provocados pelo uso dos AINES fez com que ao longo dos anos muitas pesquisas buscassem novos fármacos com boa ação anti-inflamatória e efeitos adversos reduzidos, e com isso, a partir de 1950 foram desenvolvidos os primeiros fármacos não salicilato, como a fenilbutazona e a indometacina (MONTEIRO et al., 2008).

Outra classe de anti-inflamatórios são os corticosteroides, de anti-inflamatórios esteroidais, utilizados para a redução da inflamação associadas a diversas patologias, tais como doenças reumáticas, alérgicas e autoimunes (SCHAFER-KORTING, 2005), doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, como por exemplo a doença de Crohn ou colite ulcerativa. O principal mecanismo desta terapia consiste na regulação negativa da expressão de múltiplas citocinas e quimiocinas, diminuição da expressão de moléculas de adesão e a diminuição da expressão de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (FIOCCH, 2002; ROGLER, 2010). Estes fármacos não estão desprovidos de efeitos adversos severos, cujo mais comum está a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), reduzindo a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), através de retroalimentação negativa, que, por sua vez, conduz a uma secreção de cortisol reduzida pela glândula suprarrenal, osteoporose, alterações na densidade mineral óssea; retardo do crescimento em crianças, catarata e glaucoma ou ainda lesões gástricas e toxicidade renal grave (BARNES; PEDERSEN, 1993, SINGH et al., 2016).

Para superar os problemas relacionados com a toxicidade digestiva induzida pelos anti-inflamatórios não seletivos para as isoformas da enzima COX, diferentes estratégias terapêuticas podem ser consideradas atualmente, incluindo a co-administração de medicamentos dotados de atividade protetora sobre o trato gastrointestinal superior, tais como os inibidores da bomba de prótons, ou a prescrição dos coxibes, inibidores seletivos de COX-2 (celecoxib e etoricoxib) (BLANDIZZI et al., 2009).

Os coxibes representaram a primeira classe de AINEs desenvolvidos com base em estudos racionais a fim de diminuir os efeitos gastrintestinais provocados por fármacos com maior afinidade à COX-1 (PATRONO; ROCCA, 2009). Seu lançamento no mercado em meados da década de 1990 trouxe euforia à comunidade médica devido à sua maior afinidade à COX-2 e consequente menor toxicidade gastrintestinal (JONES et al, 2008). A descoberta dos efeitos tóxicos cardiovasculares incluindo infarto agudo do miocárdio e alterações trombóticas culminaram com a retirada do mercado do rofecoxibe (WARNER; MITCHELL, 2008). A inibição da COX-2 favorece os eventos pro-trombóticos pelo desequilíbrio entre as concentrações de prostaciclina e tromboxanos, resultando na diminuição da concentração de prostaciclina preferencialmente produzidas pela COX-2 (ZARRAGA; SCHWARS, 2007; PATRONO; ROCCA, 2009).

Devido a grande quantidade de efeitos adversos causados por estas classes de fármacos anti-inflamatórios, a procura por drogas com atividade terapêutica e com baixa toxicidade e efeitos adversos faz-se necessária. Devido ao uso popular e riqueza de substâncias químicas com atividade biológica, as plantas medicinais e o acervo etnofarmacológico são as fontes de pesquisa mais comuns (MISHRA; TIWARI, 2011).

#### **4 Plantas medicinais**

As plantas medicinais são uma fonte vital de novos produtos químicos com potenciais efeitos curativos. No entanto, na maioria dos casos, a origem e o mecanismo dos efeitos terapêuticos são desconhecidos. Como 80% das pessoas do mundo vivem em países em desenvolvimento, nos quais as drogas sintéticas são muito caras ou mesmo inacessíveis, a busca por plantas medicinais úteis tornou-se bastante relevante (ZAREI et al., 2017).

Boa parte deste conhecimento adveio do empirismo, da simples observação da natureza, da formulação de hipóteses: prova deste fato é que gorilas, chimpanzés, macacos e humanos utilizam-se das mesmas plantas medicinais para tratar distúrbios semelhantes (HALBERSTEIN, 2005).

O uso mais amplo de plantas medicinais auxiliou na descoberta de suas propriedades terapêuticas. Existe uma gama de estrutura química e atividades biológicas, embora os constituintes químicos ainda não tenham sido completamente descritos (SILVA, 2010). Devido a plantas medicinais que possuem muitos componentes bioativos, eles têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento e síntese de fármacos (por exemplo, aspirina) (AWAAD; AL-JABER, 2010; HASSAN, 2013).

A medicina tradicional, com a utilização de plantas medicinais, desempenhou um papel fundamental nos sistemas de saúde. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população nos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para os cuidados primários de saúde, pois são considerados seguros e acessíveis (BHATIA, 2014). Nesse contexto, produtos naturais com atividade anti-inflamatória são utilizados como remédios populares em condições como febre, dor, enxaqueca e artrite (YUAN et al, 2006). Composto por importantes classes de substâncias com atividades anti-inflamatória e antioxidante, os óleos essenciais, figuram entre as fontes mais comuns de pesquisa de agentes dessa natureza (SOUSA, 2011).

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias como terpenos, fenilpropanóis e flavonoides em diferentes concentrações (SÁ et al, 2014). Um óleo essencial pode conter de 20 a 100 diferentes metabólitos secundários e sua atividade biológica pode ser determinada pelo constituinte majoritário ou por ações sinérgicas entre seus constituintes (TUREK; STINTZING, 2012). Aleloquímicos ou constituintes bioativos também são produzidos pelas plantas como produtos finais, subprodutos e como metabólitos liberados a partir de plantas. A maioria deles são compostos aromáticos (terpenóides, esteróides, alcalóides e cianetos orgânicos) e os óleos essenciais (GAHUKAR, 2012). Várias dessas substâncias com atividade anti-inflamatória têm sido identificadas em óleos essenciais destacando-se os terpenóides (OKOLI; AKAH; NWAFOR, 2003; YUAN et al, 2006).

Os monoterpenos são os constituintes mais representativos dos óleos essenciais, constituindo 90 % dos mesmos e permitindo uma grande variedade de estruturas (PROVENZA; VILLALBA, 2010). Essas substâncias possuem várias atividades farmacológicas descritas, como analgésica, anti-inflamatória, antidepressiva e anticonvulsivante, dentre outras (TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007; BAKKALI, et. al. 2008).

Dentre as substâncias aromáticas presentes em óleos essenciais, destaca-se o monoterpeno oxigenado mirtenol.

## 5 Mirtenol

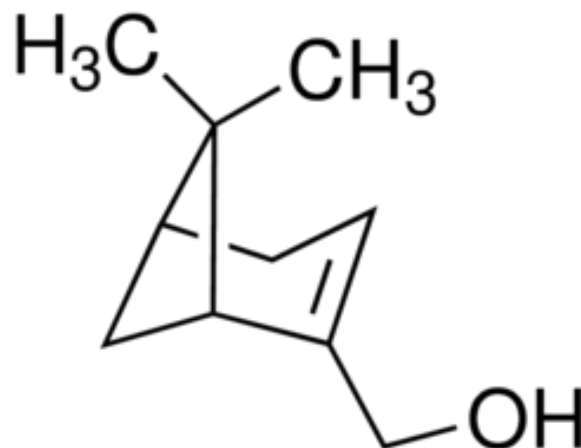
O Mirtenol (Fig. 2) é um monoterpeno de álcool com odor agradável. Este monoterpeno é encontrado em óleos essenciais de várias plantas medicinais, como *Rhodiola rosea* L., *Paeonia lactiflora* Pall, *Cyperus rotundus*. L., *Tanacetum vulgare* L., *Myrtus communis* L. e *Eucalyptus citriodora* Hook, cujo extrato bruto mostra potencial anti-inflamatório (MOCKUTE; JUDZENTIENE, 2003; NGAN et al, 2012).

Os extratos de plantas que contêm mirtenol são utilizados em medicina popular para tratamento de sintomas de ansiedade, dor gastrointestinal, inflamação e infecção (BHATIA et al 2014; CANO-RAMIREZ et al, 2012; LAWAL; OYEDEJI, 2009)

A literatura também relata efeitos cardioprotetor, modulador do receptor GABA<sub>A</sub> no sistema nervoso central, gastroprotetor, anti-inflamatórios e antinociceptivos agudos do mirtenol (SILVA et al, 2014; VIANA et al., 2016; BRITTO et al., 2018; MILANOS et al., 2018) De acordo com esse estudo, sugere-se que mirtenol module a inflamação aguda através da inibição da liberação de citocinas e migração de neutrófilos (SILVA et al, 2014). Além disso, o efeito ansiolítico e os efeitos antiproliferativos em células cancerosas humanas também são relatados (YAMAMOTO et al, 2008; MOREIRA et al, 2014).

Atualmente, é possível encontrar na literatura trabalhos que investigam a atividade anti-inflamatória de nanoformulações de óleos essenciais que possuem monoterpenos com estruturas semelhantes à do mirtenol (BORGES et al., 2017). Isso se deve ao fato de que as nanopartículas podem ser boas transportadoras devido à sua capacidade de se ligar a produtos fitoquímicos (BARIK; SAHU E SWAIN, 2008).

Figura 2: Estrutura química do (-)-mirtenol: 2-Pinen-10-ol; Pin-2-eno-10-ol; 6,6-Dimetilbicyclo (3.1.1) hept-2-eno-2-metanol



## 6 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ampla área de pesquisa interdisciplinar que vem crescendo rapidamente em todo o mundo na última década. Os nanomateriais e sua utilização se espalharam em áreas de pesquisa como química, física, biologia, ciência dos materiais e até mesmo na medicina (SCARFATO et al, 2007).

A aplicação da nanotecnologia na entrega de fármacos é amplamente esperada mudar o panorama das indústrias farmacêuticas e de biotecnologia futuramente (GREF et al., 1994). Usando a nanotecnologia, pode ser possível alcançar melhor entrega de drogas solúveis em água, favorecer a entrega direcionada de fármacos de um modo específico para células ou tecidos, a transcitose de drogas através de barreiras epiteliais e endoteliais estreitas, a entrega de grandes fármacos macromoleculares a locais de ação intracelulares, o co-fornecimento de dois ou mais fármacos ou modalidade terapêutica para terapia combinada, a visualização de locais de entrega de drogas combinando agentes terapêuticos com modalidades de imagem e a leitura em tempo real sobre a eficácia *in vivo* de um agente terapêutico. Estas são apenas algumas das muitas razões convincentes de que a nanotecnologia é uma grande promessa para a entrega de medicamentos (FAROKHZAD; LANGER, 2009).

As nanopartículas adicionadas a produtos naturais formam nanoformulações, que podem superar as desvantagens das emulsões convencionais. As nanoformulações podem ser capazes de proteger os monoterpenos da degradação, aumentar sua biodisponibilidade e criar uma alta concentração local de substâncias químicas bioativas nas células-alvo (BARIK; SAHU E SWAIN, 2008).

As nanoemulsões são definidas como sistemas de dois líquidos imiscíveis termodinamicamente estáveis e isotopicamente translúcidos (óleo e água), estáveis devido a presença de um componente tensoativo (DAMASCENO et al., 2011). Essas características fazem deles um bom sistema transportador de substâncias bioativas, pois aumentam a eficiência e reduzem sua toxicidade, já que uma parcela de compostos voláteis é utilizada, além de proporcionar uma barreira física e química que protege as moléculas da degradação ambiental e reduz efeitos colaterais em mamíferos (DAMASCENO, 2010; FERRARI, 2005).

As nanoformulações, assim como as emulsões convencionais, podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), sendo sistemas termodinamicamente instáveis, e que, portanto, não podem ser formadas espontaneamente, necessitando de adição de energia para que tal processo ocorra. Tal energia pode ser proveniente de dispositivos mecânicos, como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e homogeneizadores ultrassônicos; ou ainda, podem ser produzidas pela alteração da energia química dos componentes, por meio de

métodos de baixa energia, como por exemplo, emulsificação espontânea ou métodos por inversão de fase (MCCLEMENTS, 2012; SOLANS et al., 2005).

Nanoformulações são considerados sistemas cineticamente estáveis em comparação com as emulsões convencionais devido ao seu menor tamanho de gotícula. Esses sistemas podem promover a liberação de fármacos modificados, aumento da distribuição gastrointestinal (KOROLEVA; YURTOV, 2012), proteção contra fármacos e contra degradação química e enzimática (ALMEIDA et al, 2009). Estas formulações apresentam um tamanho de gota de menos de 100 nm que os faz resistir contra processos de agregação ou de cremes (EE et al, 2008; SHAKEEL et al, 2008).

Além disso, os fenômenos de instabilidade como sedimentação, floculação e coalescência também são evitados devido à proteção eletrostática ou estereotônica dada pelos surfactantes em sua superfície (SOLANS et al, 2005; TADROS et al, 2004). A escolha do óleo que compõe a fase oleosa é extremamente importante porque suas propriedades podem afetar algumas das características da nanoemulsão, como o tamanho das gotículas (BOUCHEMAL et al, 2004).

## REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S; YAZICI, Y. Drug delivery in degenerative joint disease: where we are and where to go? **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.58, p.125–127, 2006.
- ALLER, M. A. J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225 – 234, 2006.
- ALMEIDA, J.S.; JEZUR, L.; FONTANA, M.C.; PAESE, K.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization, **Latin American Journal of Pharmacy**., v.28, p.165–172, 2009.
- ANDA-JÁUREGUI, G.; GUO, K.; MCGREGOR, B.A.; HUR, J. Exploration of the Anti-Inflammatory Drug Space Through Network Pharmacology: Applications for Drug Repurposing. **Frontiers in Physiology**., v.01, 2018
- AWAAD, A.S.; AL-JABER, N.A. Antioxidant natural plant, **RPMP Ethnomedicine Source & Mech.**, v.27, p.1-35, 2010.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR. M. Biological effects of essential oils A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p.446 475, 2008.
- BARIK T, SAHU B, SWAIN V. Nanosilica—from medicine to pest control. **Parasitology Research**. v.103, p.253–258, 2008.
- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.413–420, 2008.
- BAWARSKI, W.E.; CHIDLOWSKY, E.; BHARALI, D.J. ;MOUSA, S.A. Emerging nanopharmaceuticals, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v.4, p.273–282, 2008
- BHATIA, H; SHARMA, Y.P.; MANHAS, R.K.; KUMAR, K. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India. **Journal of Ethnopharmacology**. v.151, p.1005–1018, 2014.
- BHATIA, S. P., MCGINTY, D., LETIZIA, C. S., API, A. M. Fragrance Material Review on Myrtenol. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.237-340, 2008.
- BLANDIZZI, C.; TUCCORI, M.; COLUCCI, R.; FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; GHISU, N.; DEL TACCA, M. Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. **Pharmacological Research**. v.59, p.90-100, 2009.



- BORGES, R.S.; LIMA, E.S.; KEITA, H.; FERREIRA, I.M.; FERNANDES, C.P.; CRUZ, R.A.S. DUARTE, J.L. • VELAZQUEZ-MOYADO, J. ORTIZ, B.L.S.; CASTRO, A.N.; FERREIRA, J.V.; HAGE-MELIM, L.I.S.6,7 • CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, 2017.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation, **International Journal of Pharmacology**, v.280, p.241–251, 2004.
- BRITTO, R.M.; SILVA-NETO, J.A. ; MESQUITA, T.R.R.; VASCONCELOS, C.M.L. ; ALMEIDA, G.K.M. ; JESUS, I.C.G. ; SANTOS, P.H. ; SOUZA, D.S. ; SANTOS, M. R.; SÁ, L.A. ; SANTOS, F.S.M. ; PEREIRA-FILHO, R.N. ; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. ; GUATIMOSIM, S. ; LAUTON-SANTOS, S. Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. **Food and chemical toxicology**, v. 111, p. 557-566, 2018.
- BROGGI, A.; GRANUCCI, F. Microbe- and danger-induced inflammation. **Molecular Immunology**, vol. 63, p. 127–133, 2015.
- CANO-RAMÍREZ, C.; ARMENDÁRIZ-TOLEDANO, F.; JORGE E. MACÍAS-SÁMANO, J.E.; SULLIVAN, B. T.; ZÚÑIGA, G. Electrophysiological and behavioral responses of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* to volatiles from host pines and conspecifics. **Journal of Chemical Ecology**, v.38, p.512–524, 2012.
- CHOY, E.H.; SMITH, C.; DORE, C.J.; SCOTT, D.L. A meta-analysis of the efficacy and toxicity of combining disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis based on patient withdrawal, **Rheumatology (Oxford)**, v.44, p.1414–1421, 2005.
- COLGAN, S. P.; CAMPBELL, E. L.; KOMINSKY, D. J. Hypoxia and Mucosal Inflammation. **Annual Review of Pathology**, v. 11, p. 77-100, 2016.
- CONTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBBINS. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- DAMASCENO, B.P.G.L., DOMINICI, V.A., URBANO, I.A., SILVA, J.A., ARAÚJO, I.B., SANTOSMAGALHÃES, N.S., SILVA, A.K.A., MEDEIROS, A.C., OLIVEIRA, A.G., EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, p.9–18, 2011.
- DEVI, K. P., MALAR, D. S., NABAVI, S. F., SUREDA, A., XIAO, J., AND NABAVI, S. M.. Kaempferol and inflammation: from chemistry to medicine. **Pharmacology Research**. 99:1–10, 2015.

- DRAYTON, D. L.; LIAO, S.; MOUNZER; R. H.; RUDDLE, N. H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. **Nature Immunology**, v.7, p.344–353, 2006.
- EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p.308–323, 2007.
- EE, S.L.; DUAN, X.; LIEW, J. Droplet size and stability of nanoemulsions produced by the temperature phase inversion method. **Journal of Chemical & Engineering**, v.140, p.626–631, 2008.
- EVSTATIEVA, L.; TODOROVA, M.; ANTONOVA, D.; STANEVA, J. Chemical composition of the essential oils of *Rhodiola rosea* L. of three different origins. **Pharmacognosy Magazine**, v.6, n.24, p.256-258, 2010.
- FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. **American Chemical Society**, v.3 , n.1, 2009.
- FERRARI, M. Nanovector therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology** ., v.11, p.41–44, 2005.
- FERRERO-MILLANI,L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, P. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. **Clinical and Experimental Immunology**, vol. 147, p. 227–235, 2006.
- FIOCCHI, C, Inflammatory bowel disease: dogmas and heresies. **Digestive Liver Disease**, v. 34, p.306–311, 2002.
- FREIRE M. O.; VAN DYKE, T.E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** 2000, v.63, n.1, p.149-164, 2013.
- GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 07, 2006.
- GAHUKAR, R. T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. **Crop Protection**. v.42, p.202-209, 2012.
- GEORGE, A.; CHINNAPPAN, S.; CHINTAMANENI, M.; KOTAK, V. C.; CHOUDHARY, Y.; KUEPER, T.; RADHAKRISHNAN, A. K. Anti-inflammatory effects of Polygonum minus (Huds) extract (Lineminus<sup>TM</sup>) in in-vitro enzyme assays and carrageenan induced paw edema. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p.1-7, 2014.
- GERWIN, N., HOPS, C., LUCKE, A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.58, p.226–242, 2006.
- GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. D. inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews**, vol. 03, n. 04, p. 401-416, 2004.

- GRAF, R.; MINAMITAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Biodegradable LongCirculating Polymeric Nanospheres. **Science**, v.263, p.1600–1603, 1994.
- HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals of Epidemiology**. v.15, p. 686–699, 2005.
- Hassan, B.A.R. Medicinal plants (importance and uses). **Pharmacology Analls Acta 2012**, 2013.
- JEONG, C.H.; HEO, H.J.; CHOI, S.G.; SHIM, K.H. Antioxidant and anticâncer properties of methanolic extracts from different parts of white, yellow, and red onion, **Food Science and Biotechnology**, v.18, p.108-112, 2009.
- KOROLEVA, M.Y.; YURTOV, E.V. Nanoemulsions: the properties, methods ofpreparation and promising applications, **Russian Chemical Reviews**, v.81, p.21–43, 2012.
- KOTAS, M.E., MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v.160, p.816–827, 2015
- KUMAR, V., COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. Basic Pathology, Saunders, 2003.
- KUMAR, V.; BHATT, P.C. ; RAHMAN, M.; PATEL, D.K.; SETHI, N.; KUMAR, A.; SACHAN, N.K.; KAITHWAS, F.A.; VERMA, A. Melastoma malabathricum Linn attenuates complete freund's adjuvant-induced chronic inflammation in Wistar rats via inflammation response, BMC Complement. **Altern. Med.**, v.16, p.510, 2016.
- KUMMER CL, COELHO TCRB. Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs: Current Issues. **Revista Brasileira Anesthesiologia**; v.52(4); p.498-512, 2004.
- LAWAL, O. A.; OYEDEJI, A. O. Chemical Composition of the Essential Oils of *Cyperus rotundus* L. from South Africa. **Molecules**, v.14, p.2909-2917, 2009.
- LAWRENCE T., GILROY D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution. **Internotional Journal Experimental Pathology**. v.88, p.85–94, 2007.
- LEE, I.; YANG, C.M. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 581–590, 2012.
- LIBBY, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 12, p. S140–S146, 2007.
- LIMA-FILHO, A.C.M. **Atividades anti-inflamatória e antioxidante do p-cumarato de etila em modelos de inflamação aguda**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Piauí, 2017.

- LIN, B.; ZHANG, H.; ZHAO, X.X.; RAHMAN, K.; WANG, Y.; MA, X.; ZHENG, C. ZHANG, Q.Y.; HAN, T.; QIN, L. Inhibitory effects of the root extract of *Litsea cubeba* (lour.) Pers. on adjuvant arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.147, p.327-334, 2013.
- LIN, L.T.; HSU, W.C.; LIN, C.C. Antiviral natural products and herbal medicines, **Journal of Traditional and Complementary Medicine** v.4, p.24–35, 2014.
- MAJNO, G.; JORIS, I. *Cells, Tissues and Disease*. Oxford Univ. Press, 2004.
- MCCLEMENTS, D.J. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: implications for emulsion-based delivery systems. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.17, p.1-30, 2012.
- MCCLEMENTS, D.J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.5, n.4, p.285-330, 2011.
- MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the Arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.114, p.83-91, 2014.
- MILANOS, S.; KUENZEL, K.; GILBERT, D.F.; JANZEN, D.; SASI, M.; BUETTNER, A.; FRIMURER, T.M.; VILLMANN, C. Structural changes at the myrtenol backbone reverse its positive allosteric potential into inhibitory GABA<sub>A</sub> receptor modulation. **Biol. Chem**, 2018.
- MISHRA BB1, TIWARI VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur J Med Chem**. 46(10):4769-807, 2011.
- MOCKUTE, D.; JUDZENTIENE, A. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania, **Biochem. Syst. Ecol.**, v.31, p.1033-1045, 2003.
- MONTEIRO, E. C. A., et al. Os anti-inflamatórios não esteroidais. **Temas Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.
- MOREIRA, M.R.; SALVADORI, M.G.S.; ALMEIDA, A.A.; SOUSA, D.P.; JORDAN, J ; SATYAL, P.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-) myrtenol: a monoterpene alcohol, **Neurosci. Lett.**, v.579, p.119-124, 2014.
- NATHAN, C. A. Ding, Nonresolving Inflammation. **Cell**. v140, p.871–882; 2010.
- OKOLI, C. O.; AKAH, P. A.; NWAFOR, S. V. Anti-inflammatory activity of plants. **Journal of Natural Remedies**, v. 3, p. 01 – 30, 2003.
- PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. **Pharmacological Research**, vol. 59, p. 285–289, 2009.

- PELLETIER, J. M.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; PELLETIER, J. P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatoid Diseases**, v.62, p.501-509, 2003.
- PREVIERO, C.A.; JÚNIOR-LIMA, B.C.; FLORENCIO, L.K.; SANTOS, D.L. **Receita de plantas com propriedades inseticidas no controle de pragas**.CEULP/ULBRA. Palmas, 32p., 2010.
- ROGLER, G. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p.157–165, 2010.
- SÁ, R. C. S, ANDRADE, L. N, OLIVEIRA, R. R. B., SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, vol. 19, p. 1459-1480, 2014.
- SAUNDERS, B.R.; LAAJAM, N.; DALY, E.; TEOU, S.; HU, X.; STEPTO, R. Microgels: from responsive polymer colloids to biomaterials. **Adv. Colloid Interface Sci.** v.147–148, p.251–262, 2009.
- SCARFATO, P.; AVALONE, E.; IANNELLI, P.; DE FEO, V.; ACIERNO, D. Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with antigerminative activity. **J Appl Polym Sci**, v.105, p.3568–3577, 2007.
- SCHAFER-KORTING, M., et al. Glucocorticoids for human skin: new aspects of the mechanism of action Skin **Pharmacology Physiology**, v.18 p.103–114, 2005.
- SCOTT, D.L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T.W. Rheumatoid arthritis. **Lancet** v.376, p.1094–1108, 2010.
- SHAKEEL, F.; BABOOTA, S; AHUJA, A. Skin permeation mechanism of aceclofenac using novel nanoemulsion formulation. *Die Pharm – Int J Pharm Sci*, v.63, p.580–584, 2008.
- SILVA, N.; FERNANDES-JÚNIOR A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity, **J. Venom. Animals Toxins Incl. Trop. Dis.**, v.16, p.402-413, 2010.
- SILVA, R.O.; SALVADORI, M.S.; SOUSA, F.B.M.; SANTOS, M.S.; CARVALHO, N.S.; SOUSA, D.P.; GOMES, B.S.; OLIVEIRA, F.A.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N.; MEDEIROS, J.V.R. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plantderived monoterpene alcohol, in mice, **Flavour Fragr. J.**, 2014.
- SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M., Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**. v.69, p.145–182, 2000.

- SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions, **Curr. Opin Colloid Interface Sci.**, v.10, p.102–110, 2005.
- SOUSA, D. P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. **Molecules**, vol. 16, p. 2233-2252, 2011.
- SOUSA, P.L.; ALESSANDRI, A.L.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**. v.13, p. 625-631, 2013.
- STEINMEYER, J., KONTTINEN, Y.T. Oral treatment options for degenerative joint disease—presence and future. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.58, p.168–211, 2006.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Adv. Colloid Interf. Sci.**, v.108, n.109, p.303-318, 2004.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, R.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions, **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.108, p.303–318, 2004.
- TRAGULPIANKIT, P.; CHULAVATNATOL, S.; RERKPATTANAPIPAT, T.; JANWITYANUJIT, S.; SOMJARIT, S.; SIRIKHEDGON, U. Adverse drug events in rheumatoid arthritis and osteoarthritis ambulatory patients, *Int. J. Rheum. Dis.*, v.15, p.315–321, 2012.
- TROMBETTA, D.; CASTELLI, F; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.T.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6 p.2474–2478, 2005.
- TROMBETTA, D.; CASTELLI, F; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.T.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6 p.2474–2478, 2005.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 12, p. 40-53, 2012.
- VAN SCHOOR, J. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal risk. Part 2. **South African Pharmacology Journal**, vol. 81, n. 02, p. 10-13, 2014.
- VIANA, A.F.S.C.; SILVA, F.V. ; FERNANDES, H.B. ; OLIVEIRA, I.S. ; BRAGA, M.A. ; NUNES, P.I.G. ; VIANA, D.A. ; SOUSA, D.P. ; RAO, V.S.; OLIVEIRA, R.C.M.; ALMEIDA, F.S. . Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1085-1092, 2016.

- VONKEMAN, H. E.; VAN DE LAAR, M. A. F. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Adverse effects and their prevention. **Seminar in Arthritis and Rheumatism**, vol. 39, p. 294-312, 2010.
- WALSTON, J.D.; HOPKINS, J. The fire of chronic inflammation in older adults: etiologies, consequences, and treatments. **Innovation in Aging**, v.1 p.961, 2017.
- WANG, B. S., HUANG, G. J., LU, Y. H., AND CHANG, L. W. Anti-inflammatory effects of an aqueous extract of Welsh onion green leaves in mice. **Food Chemistry**, v.138, p.751–756, 2013.
- WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet**, vol. 371, n. 01, p. 270–73, 2008.
- WERZ, O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. **Planta médica**, v. 73. p. 1331-1357, 2007.
- WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, vol. 103, n. 03, p. S378-S371, 1999.
- WITACENIS, A.; SEITO, L.N.; CHAGAS, A.S.; ALMEIDA, L.D.A.J.; LUCHINI, A.C.; RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARI, S.H.; Di Stasi, L.C. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v 21, p. 240–246, 2014.
- YAMAMOTO, Y.; HOSOKAWA, M.; KURIHARA, H.; MAOKA, T.; MIYASHITA, K. Synthesis of phosphatidylated-monoterpene alcohols catalyzed by phospholipase D and their antiproliferative effects on human cancer cells, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.18, v.4044-4046, 2008.
- YOUSAF, T.; RAFIQUE, S.; WAHID, F.; REHMAN, S.; NAZIR, A.; RAFIQUE, J.; ASLAM, K.; SHABIR, G. SHAH, S.M. Phytochemical profiling and antiviral activity of *Ajuga bracteosa*, *Ajuga parviflora*, *Berberis lycium* and *Citrus lemon* against Hepatitis C Virus. **Microbial Pathogenesis** v.118, p.154-158, 2018.
- YUAN, G; WAHLQVIST, M. L; HE, G; YANG, M; LI, D. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 15, p. 143-152, 2006.
- ZAREI, M.; S.S.M., SHAHIDI; FALLAHZADEH, A.R. Effects of *Sonchus asper* and apigenin-7-glucoside on nociceptive behaviors in mice. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v.5(4), p.217-227, 2017.
- ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: a review of their structure- activity relationships. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, n.4, p.655-683, 2011.

ZARRAGA, I. G. E.; SCHWARTZ. Coxibs and heart disease: What we have learned and what else we need to know. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 49, n. 01, p. 01-14, 2007.

ZHOU, H. Y.; SHIN, E.M.; GUO, L.Y.; ZOU, L.B.; XU, G.H.; LEE, S.H.; ZE, K.R.; KIM, E.K.; KANG; S.S. & KIM, Y.S. Anti-inflammatory activity of 21 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methykmelianodiol, novel compounds from Poncirus trifoliata Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v 572, 239-248, 2007.



## Capítulo II: O efeito anti-inflamatório do monoterpeno mirtenol é dependente da modulação da migração de neutrófilos e do estresse oxidativo.

Artigo publicado na revista *Chemico-Biological Interactions*, qualis B1 para Biotecnologia, em maio de 2017.

### 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica, crônica, inflamatória derivada do sistema imune, danifica as articulações periféricas, ligamentos e tendões, o que leva à deformidade articular e destruição, bem como incapacidade física (KUMAR et al., 2016). Atualmente, a terapia anti-inflamatória é feita com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), corticosteróides, agentes antirreumáticos modificadores da doença e anticorpos monoclonais (AALTONEN et al., 2012). Contudo, estas drogas são caras e estão associadas a efeitos colaterais gastrointestinais ou cardiovasculares (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). Assim, é necessário encontrar novos medicamentos para o tratamento da AR e outras doenças crônicas.

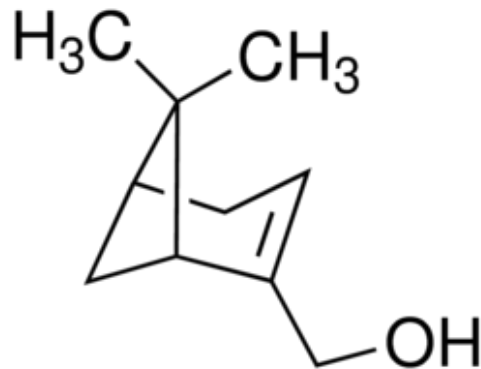
Plantas medicinais produtoras de óleos essenciais são uma fonte importante de compostos com potencial terapêutico para o manejo de várias doenças, incluindo distúrbios do sistema nervoso central, câncer, artrite e condições dolorosas (DUTRA et al., 2016). Óleos essenciais voláteis são produzidos por mais de 17.500 espécies de plantas aromáticas, tais como *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Zingiberaceae* e *Asteraceae* (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Componentes de óleos essenciais incluem dois grupos de origem biossintética. O grupo principal é composto por terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides) e terpenóides, outro grupo de componentes de óleos essenciais inclui os constituintes de baixo peso molecular, aromáticos e alifáticos (PAVELA, 2015). Monoterpenos, como o alfa e beta-pineno, timol, mentol, 1,8 cineol e mirtenol, são descritos como os constituintes mais significativos de óleos essenciais (aproximadamente 90% de todos os compostos) (PROVENZA; VILLALBA, 2010).

(-) - Mirtenol (Fig. 1) é um monoterpeno álcool bicíclico com odor agradável e comumente usado na produção de cosméticos. Este monoterpeno é encontrado em óleos essenciais de várias plantas medicinais, como *Rhodiola rosea* L., *Paeonia lactiflora* Pall,

*Cyperus rotundus* L. e *Tanacetum vulgare* L., cujo extrato bruto mostra potencial anti-inflamatório (NADKARNI, 1954; NGAN et al., 2012).

**Figura 1:** Estrutura química do (-)-mirtenol



Extratos vegetais contendo mirtenol são usados na medicina popular para tratamento de sintomas de ansiedade, dor gastrointestinal, inflamação e infecção (LAWAL; OYEDEJI, 2009; CANO-RAMÍREZ et al., 2012; BHATIA et al., 2014). A literatura também relata efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos agudo do mirtenol. De acordo com esse estudo, o mirtenol modula a inflamação através da inibição da liberação de citocinas e migração de neutrófilos (SILVA et al., 2014). Além disso, o efeito ansiolítico e ação antiproliferativa em células cancerígenas humanas também são relatados (YAMAMOTO et al., 2008; MOREIRA et al., 2014). Entretanto, o efeito de mirtenol em condições inflamatórias crônicas é desconhecido. Além disso, se a modulação da migração de neutrófilos pelo mirtenol ocorre por meio de mecanismos diretos e indiretos é um problema a ser debatido.

Então, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do mirtenol durante a artrite crônica em modelos animais e os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Ratos Wistar machos (180-230 g) foram obtidos junto ao biotério da Universidade Federal do Piauí e da Universidade Federal do Ceará e divididos em grupos experimentais (n = 6). Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ( $24 \pm 1$  °C) com acesso livre a comida e água, sob ciclos claro-escuro de 12 h, e foram privados de alimentos 12 h antes

dos experimentos. Seguindo os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados por uma overdose de pentobarbital sódico (100 mg/kg, i.p.) seguido de deslocamento cervical. O Comitê de Ética local para Experimentação Animal aprovou todo o protocolo que segue as diretrizes do NIH para cuidados e uso de animais de laboratório (CEEA-PI No.008/12). Nós também usamos neutrófilos humanos para estudo *in vitro* de quimiotaxia. Isolamento de neutrófilos humanos de voluntários saudáveis estava de acordo com o Comitê de Ética Humana da Universidade Federal do Ceará (protocolo 543.774).

## 2.2. Produtos Químicos e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizados neste estudo:  $\lambda$ -carreginina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), dexametasona (Decadron®, São Paulo, SP, Brasil), Indometacina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), Tween 80 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), N-formilmetionina-leucil-fenilalanina (fMLP, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), Adjuvante Completo de Freund (SigmaAldrich, Saint Louis, MO, EUA), mirtenol (2-Pinen-10-ol; Pin-2-eno-10-ol; 6,6-dimetilbicyclo (3.1.1) hept-2-eno-2-metanol) cedido pelo professor Dr. Damiao Pergentino de Sousa, Departamento de Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal da Paraíba. Os reagentes químicos utilizados e outras soluções foram todos de grau analítico. O Mirtenol foi dissolvido em uma solução de 3% de tween 80 com solução salina (NaCl 0,9%). As concentrações da droga foram ajustadas para tratamento com um volume de 10 mL/kg.

## 2.3. Avaliação de toxicidade

As doses de mirtenol utilizadas nos protocolos experimentais foram selecionados com base na DL50 por via oral já descrita na literatura ratos sendo 2457 mg (em machos), 632 mg (fêmeas) e 1432 mg (machos e fêmeas pareadas) (BELSITO et al., 2008). As doses de mirtenol usadas foram 12,5; 25 e 50 mg/kg e o volume administrado variou de acordo com o peso dos animais na proporção de 1 mL de solução por 100 g de peso do animal (rato) ou 0,1 mL de solução para cada 10 g de peso do animal (camundongo).

## 2.4. Monoartrite crônica induzida por ACF em ratos

A monoartrite crônica foi induzida de acordo com o método proposto por Pearson (1956) com modificações. Os animais receberam uma injeção subcutânea de Adjuvante Completo de Freund, 50 mL, contendo 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* na base da cauda. Após 21 dias, os ratos foram divididos em 6 grupos (n = 6/grupo) e tratado oralmente com veículo (NaCl 0,9% com 3% Tween 80, 10 mL /kg), mirtenol (Mir 12,5; 25 ou 50 mg/kg),

indometacina (Ind, 10 mg/kg) ou dexametasona (Dex 0,4 mg/kg) seguida de injeção de ACF na articulação tíbio-társica direita. O dia da segunda dose de ACF foi considerado o dia inicial da artrite (D0).

### **2.5. Avaliação do edema inflamatório em monoartrite crônica induzida por ACF**

Os ratos foram avaliados imediatamente antes da injeção intra-articular de ACF (medida basal). A variação do edema foi determinada de 1h a 5h pós-injeção de ACF (protocolo de fase aguda) e também uma vez ao dia (D1), (D3), (D5) e (D7) (subagudo) e (D10) e (D14) (crônico). A artrite foi avaliada com o auxílio de um pletismometro (Insight™) para medir o volume da pata traseira direita (mL) subtraído pelo volume de medição basal. Todas as medições feitas pelo mesmo observador e em duplicata. Edema foi expresso em mililitros e calculado pela diferença dos valores de referência para as outras horas de observação (Tx-T0).

### **2.6. Avaliação da incapacitação articular induzida por ACF**

O teste de incapacitação articular foi realizado conforme descrito por Tonussi, e Ferreira (1992) e Vale et al. (2004). Neste teste, um dispositivo conectado a um computador mede o tempo que uma pata traseira específica não toca a superfície de um cilindro rotativo durante um período de um minuto (tempo de elevação da pata em segundos). O tempo de elevação da pata do animal normal (controle) é de aproximadamente 10 a 15 s. Em nosso experimento, a incapacitação articular foi quantificada como o aumento do tempo de elevação da pata após a injeção intra-articular de ACF (0,5 mg/mL, 50  $\mu$ L por articulação) na tíbio-társica direita, e o período durante o qual a pata traseira não tocou no cilindro rotativo foi interpretado como sendo proporcional à dor sentida pelo animal. Neste modelo, a incapacitação articular é usada como medida da hiperalgesia inflamatória articular. O tempo de elevação da pata foi medido antes (tempo de controle, T0) e 1, 2, 3, 4 e 5 h pós- injeção de ACF e também uma vez ao dia até o dia 14 após a administração de ACF.

### **2.7. Concentração de superóxido dismutase (SOD) em ratos**

Para determinar a atividade da superóxido dismutase foi usado o método descrito por Das, Samanta e Chainy (2000); em que 100  $\mu$ L de amostra de plasma é adicionado a 1110  $\mu$ L de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), 75  $\mu$ L de L-metionina (20 mM), 40  $\mu$ L Triton X-100 (1% v/v), 75  $\mu$ L de hidroxilamina cloridrato (10 mM) e 100  $\mu$ L de EDTA (50 mM), seguido por incubação em banho-maria a 37 ° C por 5 min. Então, 80  $\mu$ L riboflavina (50 mM) foi adicionada e as amostras foram expostas à luz por 10 min. No final, 100  $\mu$ L da amostra foi

adicionada aos 96 poços placa mais 100 µL de reagente de Griess, e após 10 min à temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida por espectrofotometria em Leitor de ELISA (BioTek EL800) usando um filtro de 550 nm (GREEN et al., 1992). A expressão da atividade é definida como a quantidade de superóxido dismutase (SOD) capaz de inibir a formação de nitrito em 50%. O cálculo é feito usando a seguinte fórmula:  $SOD: v_0 / v_1$ , onde  $v_0$  é o controle absorvância e  $v_1$  é a absorvância do teste. Neste método, 36 ng SOD inibe 50% da formação de nitrito.

## **2.8. Concentração plasmática de nitrito na monoartrite induzida por ACF**

Resumidamente, sangue de animais com monoartrite induzida por ACF (200 µL) foram coletadas da veia caudal e diluídas em água destilada (1: 4 v/v) para posterior desproteinização por adição de volume de 1/20 de uma solução de sulfato de zinco a uma concentração de 300 g/L uma concentração final de 15 g/L. Então, as amostras foram centrifugadas a 1000 g por 15 min em temperatura ambiente (MOSHAGE et al., 1995; OZKHAN et al., 2006). Para a determinação concentração de nitrito, 100 mL do sobrenadante incubado por 10 min em temperatura ambiente com 100 µL do reagente de Griess. A densidade óptica (absorvância) foi medida em uma placa de 96 poços e leitor (BioTek EL800, filtro de 550 nm). A curva de calibração consistiu de um padrão NaNO<sub>2</sub> (nitrito de sódio) a concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0 µMol diluído em água destilada (GREEN et al., 1992).

## **2.9. Avaliação de Mirtenol na atividade motora espontânea em camundongos**

Ratos foram observados para locomoção espontânea em campo aberto. Este teste foi realizado 45 minutos após a administração oral veículo (solução salina a 0,9%, 10 mL/kg), mirtenol (25 mg/kg) ou diazepam (4 mg/kg). Os animais foram individualmente trazidos para campo aberto para um tempo de adaptação de 1 min seguido de um período de 4 min de observação do número de campos explorados conforme descrito por Capaz et al. (1981).

## **2.10. Isolamento de neutrófilos humanos**

Sangue humano de voluntários saudáveis foi coletado por punção venosa em tubos Falcon de 15 mL heparinizados contendo gradiente Percoll de quatro camadas (72, 63, 54 e 45%, 2 mL cada). Após centrifugação a 650x g durante 30 min a 25° C, a camada inferior contendo neutrófilos foi coletado e lavado com solução salina de Hank balanceada (HBSS) por centrifugação a 450x g por 8 min a 25 C. O sedimento, eritrócito foi ressuspenso em RPMI 1640 contendo 0,1% de BSA. As contagens totais foram realizadas com Câmara Neubauer e contagens diferenciais de células foram realizadas lâminas de cytopspin. Preparação de

neutrófilos que eram 98% puros considerado ideais para uso no ensaio (SOUTO et al., 2011; ITAKURA; ASLAN; KUSANTO, 2013).

### **2.11. Ensaio de migração na câmara de Boyden**

O ensaio de quimiotaxia foi realizado em microcamara de 48 poços (Boyden Chamber, Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, EUA) como anteriormente descrito por Souto et al. (2011). Os neutrófilos humanos foram incubados com salina estéril ou mirtenol (10, 30, 100 ng/mL, diluído em solução salina estéril) por 30 min. Então, fMLP (agente quimiotático,  $10^{-7}$  M/poço) ou meio RPMI (controle de migração negativa) foram adicionados aos poços da câmara inferior, que foi posteriormente coberta por uma membrana de policarbonato (Neuro Probe, 5 mM poro). Na parte superior,  $5 \times 10^4$  neutrófilos foram adicionados e a câmara foi incubada por 1 hora a  $37^\circ \text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após a incubação, a membrana foi lavada em PBS, fixada em 80% de metanol e corada usando um sistema de coloração de Romanowsky (Dade Behring Inc., Newark, DE). O número de células contadas em cinco campos aleatórios por poço foi registrado usando microscopia de luz (aumento de 1000x) em triplicata. Os resultados são expressos como número de neutrófilos por campo.

### **2.12. Medição em tempo real do rolamento e adesão de leucócitos por microscopia intravital**

A microscopia intravital foi usada para estabelecer a extensão rolagem de leucócitos e adesão à microcirculação mesentérica, como descrito anteriormente por Gomes (2008). Os ratos foram tratados com veículo (0,9% NaCl + 3% Tween 80, vo), mirtenol (Mir, 25 mg / kg, vo) ou dexametasona (Dex, 1 mg / kg, vo) seguido de injeção intraperitoneal de carragenina a 1% (Cg, 500 mL/cavidade). Um grupo controle tratado com solução salina (10 mL / kg, vo) também foi incluído. Quatro horas após a injeção da carragenina, os ratos foram anestesiados com cetamina / xilazina (100/10 mg/kg, i.p., Uniao Qumica, Brasil). Após laparotomia, o tecido mesentérico foi exteriorizado e colocado em uma plataforma transiluminada de temperatura controlada ( $37^\circ \text{C}$ ) e observado por microscopia intravital. As imagens foram gravadas com uma ampliação de 200  $\mu\text{m}$ . A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com a solução de Ringer Locke aquecida ( $37^\circ \text{C}$ ), pH 7,2-7,4, contendo 1% de gelatina durante todo o procedimento. As vênulas de terceira ordem, definidas de acordo com sua ordem de ramificação localização dentro da rede microvascular, foram selecionadas para estudo. Esses vasos corresponderam a vênulas pós-capilares, com 12-18  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os leucócitos em rolamento foram definidos como células que se moviam ao longo de um segmento de 100  $\mu\text{m}$

de comprimento de uma corrente sanguínea venular a um ritmo lento o suficiente para ser individualmente visível. O número de leucócitos circulantes por 100  $\mu\text{m}$  de vênula foi determinado em intervalos de 10 min. Os leucócitos foram considerados aderentes ao sistema venular endotélio quando parado por um período superior a 30 s. o número de células aderentes por 100  $\text{mm}^2$  de vênula foi registrado. Células foram contadas nas imagens gravadas, usando cinco campos diferentes para cada animal para evitar a variabilidade da amostragem. Os dados foram então calculados para cada animal (BAEZ, 1969; RHODIN, 1986; STRONG et al., 1991).

### **2.13 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise ANOVA Two-way seguida do teste de Boferroni. usando o software GraphPad Prism® versão 5.0. Valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O nível de significância foi estabelecido com  $p < 0,05$ .

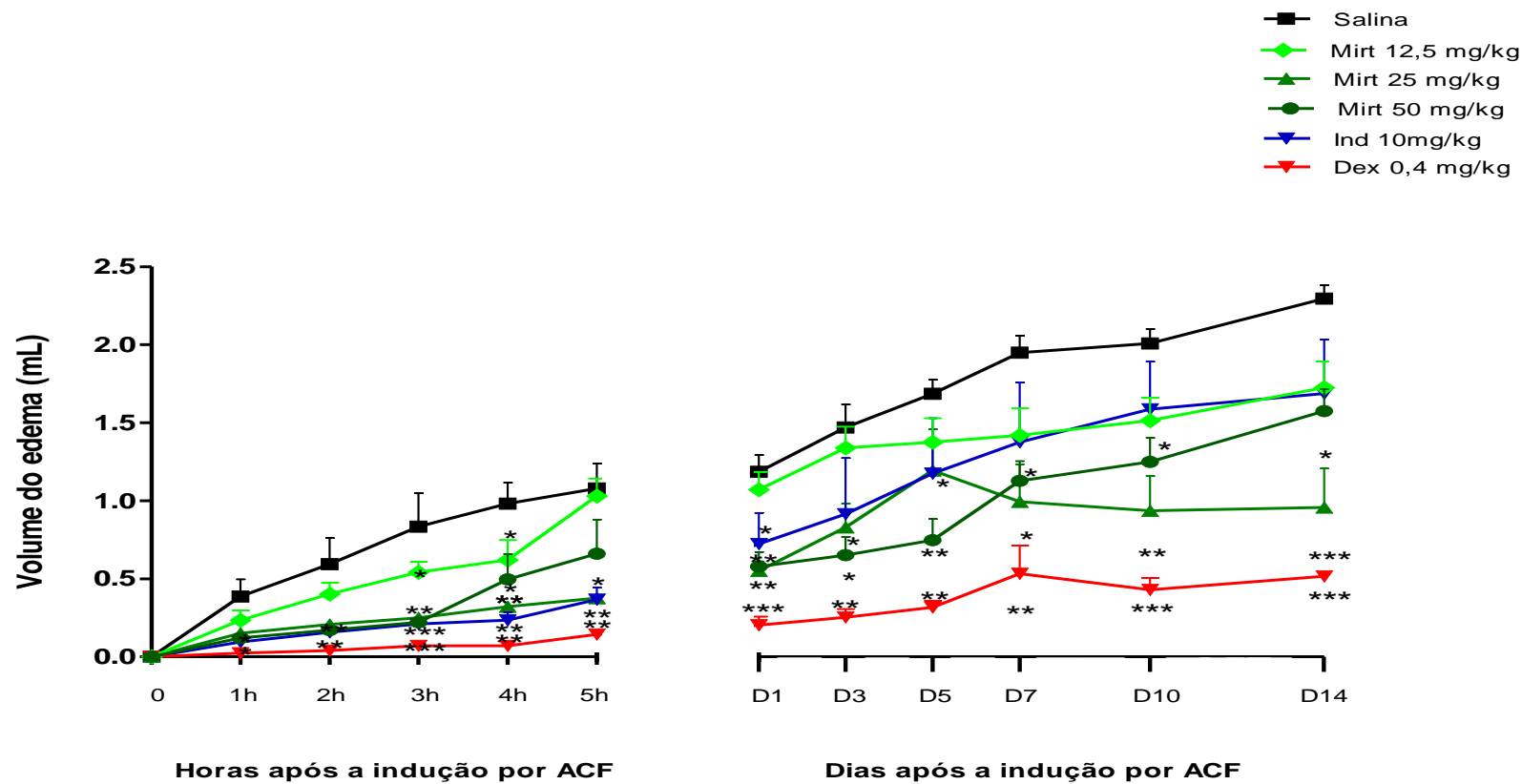
## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Mirtenol previne edema e incapacitação articular em monoartrite crônica associada à ACF**

A figura 2 mostra que o grupo veículo tratado com ACF apresentou um proeminente edema de pata dependente do tempo ( $2,30 \pm 0,08$  mL, conforme visto no dia 14, Figura 2A) e incapacitação articular progressiva ( $41,4 \pm 3,88$  s no dia 1 e  $50,0 \pm 2,64$  s no dia 14, Figura 2B). Além disso, animais tratados com mirtenol (nas doses de 25 e 50 mg / kg) apresentaram redução do edema induzido por ACF ( $0,25 \pm 0,03$  e  $0,22 \pm 0,02$  mm, respectivamente) e incapacitação ( $19,0 \pm 3,09$  s  $28,0 \pm 6,20$  s, respectivamente) conforme detectado na terceira hora versus o grupo veículo que recebeu ACF ( $P < 0,05$ , Fig. 2A e B). Tal efeito protetivo persistiu até o último tempo observado (dia 14, Fig. 2A e B). Da mesma forma, os controles positivos indometacina e dexametasona também reduziram o edema e a nocicepção observados ao longo do tempo em comparação com animais do grupo veículo que receberam ACF. Contudo, mirtenol na dose mais baixa (12,5 mg / kg) não protegeu os animais de edema ou incapacitação articular (Fig. 2A e B).

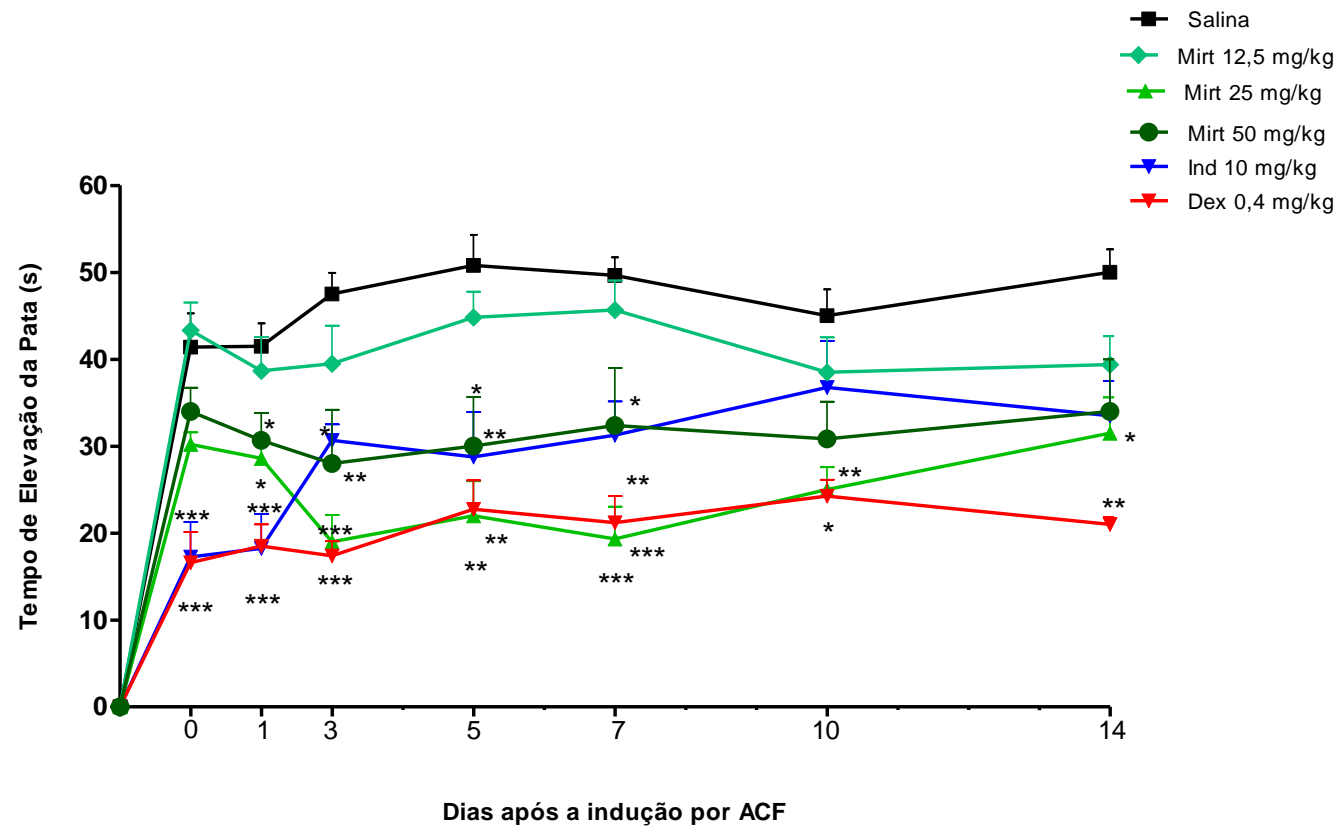
**Figura 2:** Efeito do mirtenol (Mirt 12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.), indometacina (Ind 10 mg/kg, v.o.) e dexametasona (Dex 0,4 mg/kg) sobre o edema (2-A) e incapacitação articular (2-B) induzido por ACF (50  $\mu$ L + 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, i.ar.) em ratas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 e \*\*\* $p$ <0,001 vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Student Newman Keuls).

A



B



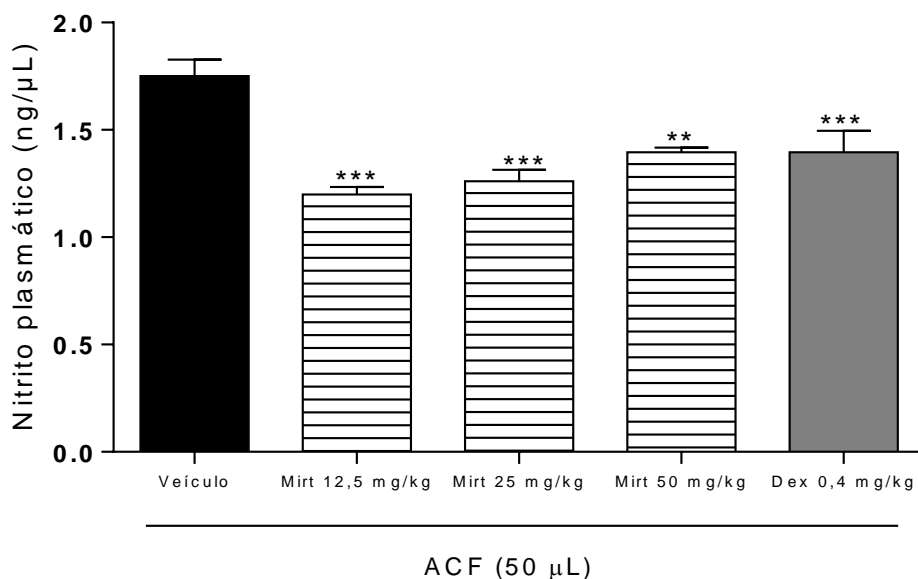


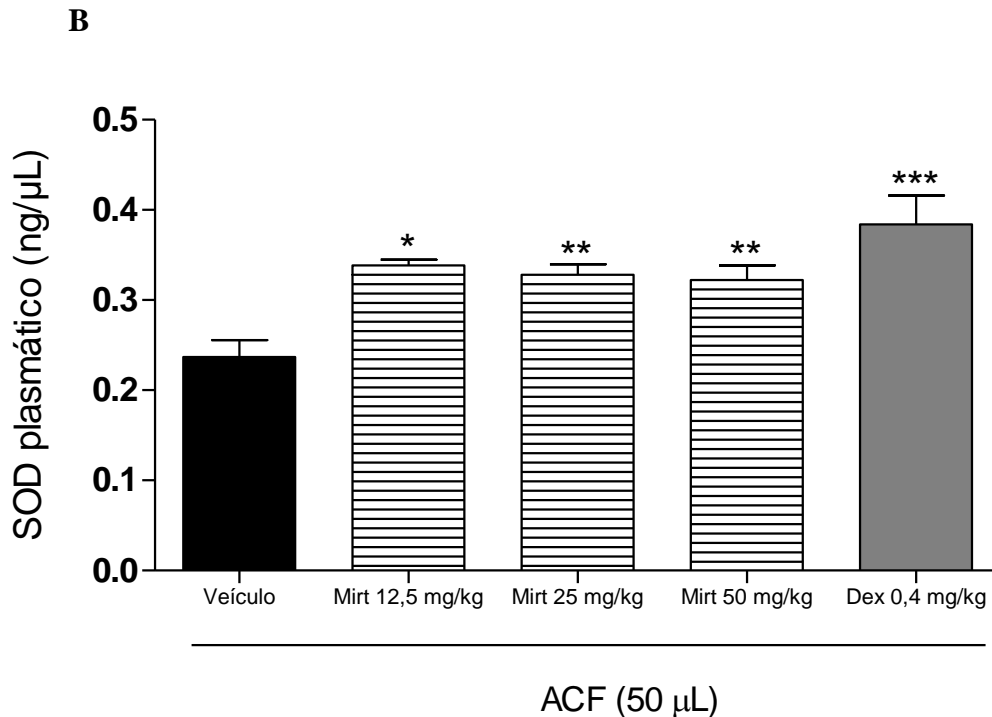
### 3.2 Mirtenol mostra diminuição dos níveis de nitrito e SOD

Como observado na Fig. 3A, grupos tratados com mirtenol (12,5, 25 e 50 mg / kg) apresentou uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) no nitrito ( $1,20 \pm 0,03$ ,  $1,26 \pm 0,05$ ,  $1,40 \pm 0,02$ , respectivamente) quando comparado ao grupo controle tratado com veículo e ACF ( $1,75 \pm 0,07$ ). O grupo tratado com dexametasona (0,4 mg/kg) também mostrou redução na concentração sanguínea de nitrito versus grupo ACF. Os níveis plasmáticos de SOD foram determinados como parâmetro antioxidante. Em relação aos níveis de SOD (Fig. 3B), todos os grupos tratados com mirtenol (12,5, 25 e 50 mg/kg) apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da produção de SOD ( $0,33 \pm 0,01$ ,  $0,32 \pm 0,01$  e  $0,32 \pm 0,01$ , respectivamente) em comparação com o grupo de controle que recebeu veículo e ACF ( $0,23 \pm 0,01$ ). Além disso, tratamento com dexametasona (0,4 mg/kg) também aumentou os níveis de SOD ( $0,38 \pm 0,03$ ) quando comparado Grupo ACF (Fig. 3B).

**Figura 3:** Potencial antioxidante do mirtenol (Mirt 12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e dexametasona (Dex 0,4 mg/kg) contra a produção de nitrito (3-A) e SOD (3-B) no plasma sanguíneo de ratas com monoartrite crônica induzida por ACF (50  $\mu$ L + 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, i.ar.). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Student Newman Keuls).

A





### 3.3 Mirtenol não prejudica a atividade locomotora espontânea de ratos

Conforme observado na Tabela 1, administração de mirtenol (25 mg/kg) não afetou a locomoção dos ratos ( $37,13 \pm 6,32$  campos explorados) em comparação com animais tratados com veículo ( $36,88 \pm 6,10$ ). No entanto, o diazepam (4 mg/kg) reduziu significativamente o número de quadros invadidos ( $2,75 \pm 1,30$ ) versus grupo de controle tratado com veículo (Tabela 1).

Tabela 1: O mirtenol não prejudica a atividade exploratória animal

Tratamento	Dose (mg/kg)	Número de campos explorados
Veículo	-	$36.9 \pm 6.1$
Mirtenol	25	$37.13 \pm 6.32$
Diazepan	4	$2.75 \pm 1.3$ ***

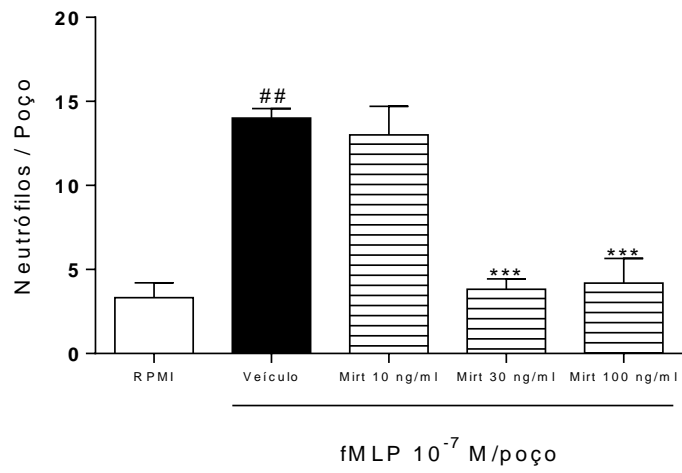
### 3.4 Mirtenol inibe a migração de neutrófilos

A migração de neutrófilos foi observada em condições *in vitro* (Fig. 4A) e *in vivo* (Fig. 4B e C). Como observado na Fig. 4A, a quimiotaxia de neutrófilos que foram incubados com

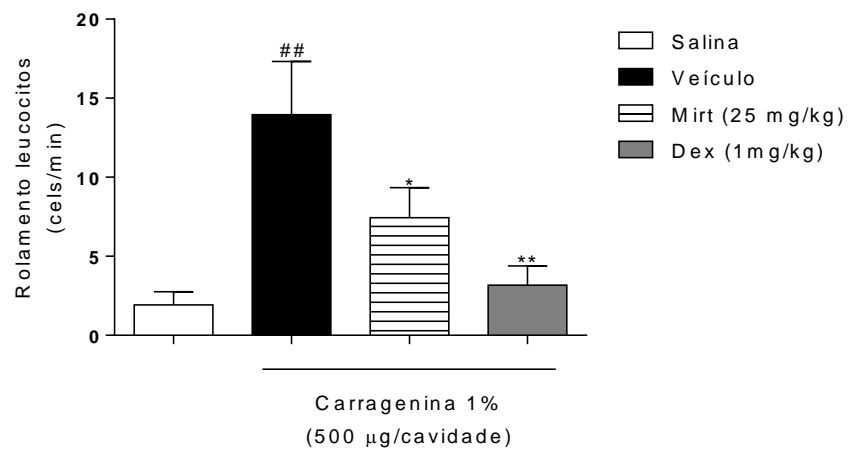
mirtenol (30 e 100 ng/mL) foi inibida pronunciadamente ( $3,83 \pm 0,60$  e  $4,20 \pm 1,46$ , respectivamente) quando comparados com os neutrófilos incubado apenas com veículo ( $14,00 \pm 0,57$ ) (Fig. 4A). RPMI, o veículo de fMLP, foi usado como um controle negativo de referência. Além disso, a medida em tempo real do rolamento de leucócitos Fig. 4B e adesão (Fig. 4C) na microcirculação mesentérica de ratos que a injeção intraperitoneal de carragenina resultou em um aumento no número de leucócitos rolantes e aderentes ( $13,96 \pm 3,37$  e  $1,60 \pm 0,59$ , respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal tratado com solução salina (células rolantes:  $1,93 \pm 0,86$  e células aderentes:  $0,02 \pm 0,02$ ,  $P < 0,05$ ). Além disso, o tratamento de animais com mirtenol (25 mg / kg) produziu uma redução no número de leucócitos rolantes e aderentes ( $7,44 \pm 1,89$  e  $0,20 \pm 0,05$ , respectivamente) versus grupo de veículo que receberam carragenina ( $P < 0,05$ ). Similarmente ao grupo mirtenol, os animais tratados com dexametasona (1 mg / kg) mostraram um número acentuado de diminuição de leucócitos rolantes e aderidos ( $3,18 \pm 1,21$  e  $0,25 \pm 0,13$ , respectivamente) versus grupo carragenina (Fig. 4A e B).

**Figura 4.** O mirtenol controla a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. Os neutrófilos humanos foram incubados com veículo (solução salina estéril, 1 mL) ou mirtenol (Mir, 10; 30 e 100 ng/mL) por 30 min. Então, a quimiotaxia de neutrófilos induzida por fMLP *in vitro* ( $10^{-7}$  M/poço) foi avaliada na câmara de Boyden (painel A). O meio RPMI foi adotado como controle quimiotático negativo. Em outro cenário experimental, os ratos foram tratados com veículo (NaCl a 0,9%, Tween 80 a 3%, po), mirtenol (Mir, 25 mg/kg, vo) ou dexametasona (Dex, 1 mg/kg, vo) seguido por injeção intraperitoneal de 1% de carragenina (Cg, 500 mL/cavidade) para medição em tempo real do rolamento de leucócitos (Painel B) e adesão (Painel C) na microcirculação de células mesentéricas. Ratos que receberam solução salina foram adotados como controle normal. As fotomicrografias de vídeo exibindo interação leucócito-endotélio são mostradas no Painel D, E e F. Painel D: grupo carragenina, mostrando rolamento de leucócitos significativamente aumentado no endotélio vascular Painel E: mirtenol (25 mg/kg, vo), mostrando redução significativa do rolamento de leucócitos na microvasculatura mesentérica. Painel F: grupo dexametasona. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM \*\*  $P < 0,001$  vs RPMI ou salina; \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  versus grupo Cg tratado com veículo; \*\*\*  $P < 0,001$  vs grupo fMLP tratado com veículo (one-way ANOVA e Newman Test Keuls).

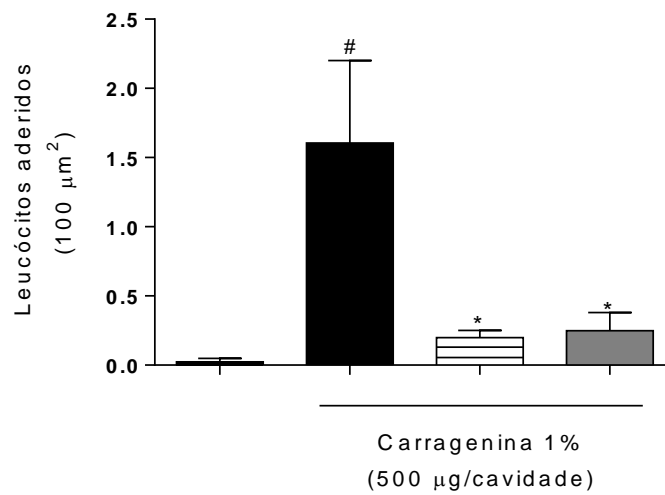
A

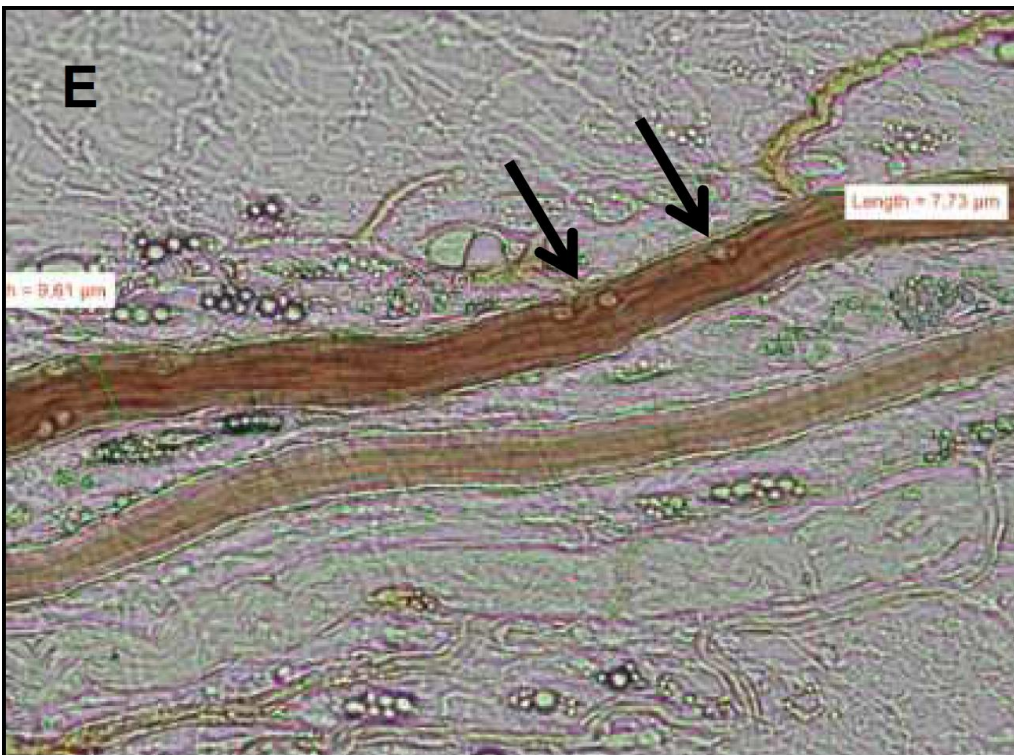
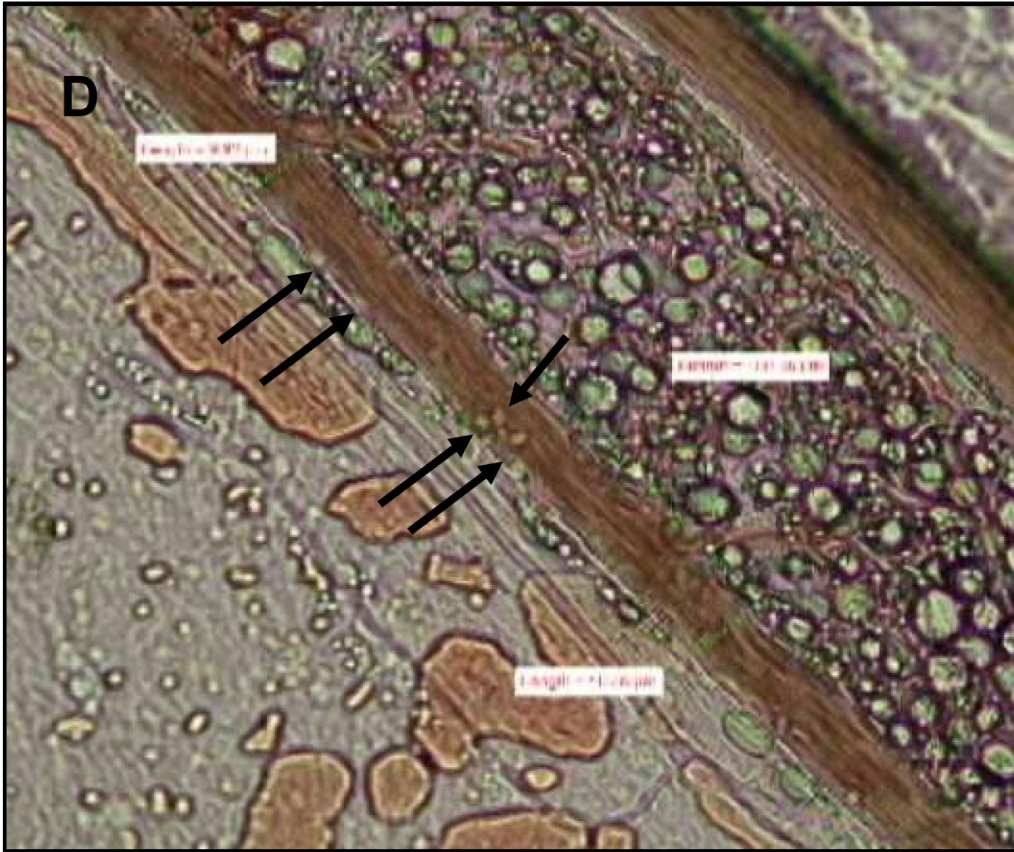


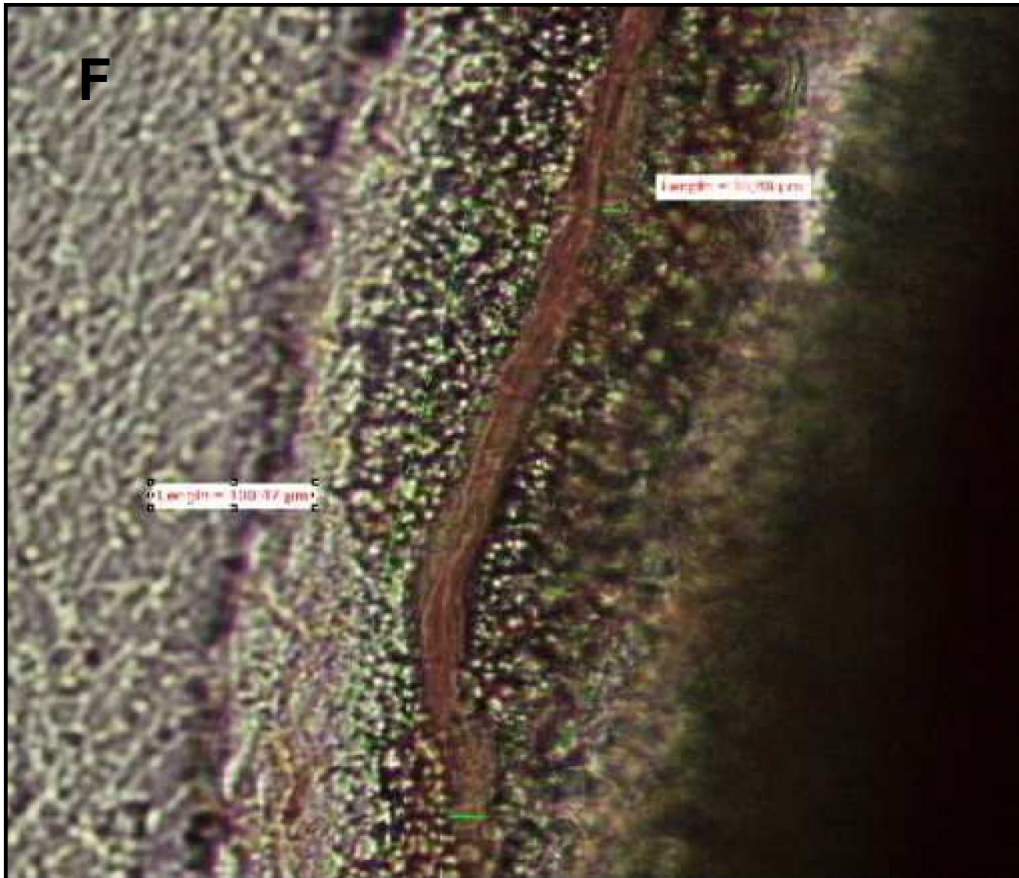
B



C







#### 4 DISCUSSÃO

A migração de neutrófilos para o foco inflamatório é um evento multifatorial que envolve várias etapas, como rolamento e adesão de neutrófilos às células endoteliais, seguida por quimiotaxia induzida por um de mediadores inflamatórios conhecidos como agentes quimiotáticos (SOUTO et al., 2011). O processo de quimiotaxia de leucócitos depende da liberação de fatores quimiotáticos no local da lesão, tal como um peptídeo fMLP produzido por bactérias que causam inflamação ou substâncias liberadas por células residentes, por exemplo, fragmentos do complemento e quimiocinas como o leucotrieno B4 (LTB4), capaz de estimular neutrófilos e monócitos em humanos e outras espécies animais (SUGAWARA et al., 1995; KATANAEV, 2001). Os dados obtidos do ensaio de quimiotaxia *in vitro* induzida por fMLP na câmara de Boyden revelaram que a incubação de neutrófilos humanos com mirtenol livre (30 e 100 ng/mL) inibiu, significativamente, a quimiotaxia destas células. A migração celular mediada por fatores quimiotáticos liberados no local da lesão é essencial para a iniciação e regulação da resposta inflamatória/imune (FINE et al., 2001). Seu recrutamento para locais de inflamação depende de fatores quimiotáticos produzidos no local (BRUNO et al., 2007). Portanto, os resultados obtidos no ensaio *in vitro* sugerem que a atividade anti-inflamatória do

mirtenol livre envolve inibição direta da quimiotaxia de neutrófilos humanos induzida por fMLP (SALTATICI et al., 2006).

Motivado pelos resultados obtidos no modelo de quimiotaxia *in vitro* (câmara de Boyden), investigamos o potencial efeito anti-inflamatório do mirtenol no modelo de adesão e suporte de leucócitos em tempo real, na microcirculação mesentérica de camundongos pela técnica de microscopia intravital em modelo de peritonite induzida por carragenina. Na resposta inflamatória, a migração de neutrófilos é um dos eventos mais importantes que ocorrem em nível microvascular, e estas foram as primeiras células a serem recrutadas para o local da infamação (CARLOS; HARLAN, 1994; PHILLIPSON; KUBES, 2011; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Nossos resultados demonstram que o mirtenol livre diminuiu a adesão de neutrófilos, como revelado pela microscopia intravital. Os resultados corroboram com a literatura, que mostra que o mirtenol livre foi capaz de reduzir o edema inflamatório, contagem total e diferencial de leucócitos, bem como atividade de mieloperoxidase (MPO) e os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no exsudato peritoneal de camundongos com peritonite induzida por carragenina (SMITH et al., 2014). A inflamação aguda induzida por carragenina é caracterizada por infiltração de fagócitos e a superprodução de radicais livres e a liberação de mediadores como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (HUANG et al., 2011), que promove a expressão de moléculas de adesão, migração de leucócitos, aumento da permeabilidade vascular e migração transendotelial (HALLEGUA; WEISMAN, 2002). O recrutamento de neutrófilos requer rolamento e adesão de células para a superfície luminal de endotélio vascular. O rolamento é mediado por selectinas e células de adesão firme que, por sua vez, levam a mudanças na morfologia dos neutrófilos resultando na transmigração através da barreira celular endotelial e extravasamento nos tecidos (WILLIAMS; AZCUTIA; NEWTON, 2011). É possível, portanto, sugerir que o mirtenol livre possa apresentar propriedades antiinflamatórias por inibição competitiva da selectina ou alterando o estado funcional das integrinas (ALENCAR et al., 1999; ASSREUY et al., 1999; BROWN; DRANSFIELD, 2008).

Estudos recentes com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., que possui o monoterpeno  $\beta$ -mirceno como constituinte principal apresenta atividade anti-inflamatória, além de inibir a adesão e rolamento de leucócitos microcirculação de camundongos (MELO et al., 2011). O  $\beta$ -mirceno e o mirtenol são monoterpenos insaturados (ARNO; LEIF, 2009). Assim, substâncias que inibem a migração de leucócitos podem fornecer meios para regular ou modular a inflamação e resposta imune e reduzir o dano tecidual (CARRASCO et al., 2009; HIROTA et al., 2010)



Os neutrófilos também desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de doenças crônicas doenças inflamatórias e auto-imunes, por infiltração tecidual e causando doenças como artrite reumatóide (CAIELLI; BANCHEREAU; PASCUAL, 2012). É bem conhecido que durante a cronificação da inflamação ocorre a substituição de células polimorfonucleares encontradas, principalmente, na inflamação aguda por células mononucleares gigantes, como fibroblastos, monócitos, linfócitos, macrófagos e plasmócitos (JANSSON; HENSON, 2012; TABAS; GLASS, 2013). Com base nos resultados, nós avaliamos os efeitos do mirtenol na inflamação crônica em modelo de artrite induzida por ACF em ratos. Entre vários modelos experimentais de artrite, a indução por adjuvante completo de Freund é um método que mimetiza o estado fisiopatológico, incluindo edema crônico devido ao acúmulo de células inflamatórias, erosão da cartilagem e destruição óssea, e é, portanto, amplamente usado para investigar a atividade de vários agentes anti-inflamatórios e antiartríticos (NADKARNI, 1954; SIGH; MAJUNDAR, 1996). Os dados apresentados mostraram a redução do edema nas articulações tíbio-társicas de animais tratados com mirtenol (25 e 50 mg/kg) em comparação com o grupo controle. Essa redução foi significativa nos 14 dias de observação. A artrite induzida por ACF tem uma fase primária e uma fase secundária de artrite crônica. Na fase primária ocorre a geração de prostaglandinas e na segunda fase há a geração de anticorpos (VISHWANATH et al., 2012).

Pearson (1956) padronizou um modelo experimental de artrite induzida por ACF reproduzindo sinais e sintomas semelhantes àqueles da doença em humanos, ou seja, uma poliartrite crônica e simétrica com destruição conjunta, deformidade e incapacidade articular (TAUROG; ARGENTIERI; MCREYNOLDS, 1988). Assim sendo, esse teste foi utilizado para avaliar o grau de incapacidade articular animais com artrite induzida por ACF. O mirtenol (25 mg/kg) reduziu o tempo de elevação da pata dos animais com artrite. Este resultado fornece evidências adicionais de que um dos possíveis mecanismos de ação da atividade anti-inflamatória do mirtenol é a atenuação do recrutamento de neutrófilos para o foco da inflamação, ou por inibir a produção de prostaglandinas na geração de anticorpos. Além disso, dados da literatura demonstram que leucócitos migram para a articulação de pacientes com artrite reumatoide, causando danos ao tecido sinovial, osso e cartilagem através do aumento das espécies reativas de oxigênio, proteases, citocinas e prostaglandinas (WRIGHT et al., 2010). Resultados semelhantes aos observados com produtos naturais como o Taraxasterol, um triterpeno pentacíclico, que é um dos principais constituintes ativos no gênero *Taraxacum* e em extratos de folhas de *Swertia chirayita* (Roxb. ex Fleming) H. Karst. (LAD; BHATNAGAR, 2016; WANG et al., 2016).

Como relatado na literatura, substâncias com atividade sedativa podem interferir na atividade locomotora (WATANABLE et al., 1999). No entanto, a dose de mirtenol usada no ensaio não alterou a atividade exploratória dos animais, indicando que uma possível ação sedativa do mirtenol não está envolvida no mecanismo proteção articular.

Devido à importância bem conhecida dos neutrófilos no processo inflamatório, pode-se sugerir que um dos possíveis mecanismos da atividade anti-inflamatória deste monoterpeno é a atenuação do recrutamento de neutrófilos para o foco da inflamação. Além disso, a migração de neutrófilos resulta em aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (BOGDAN, 2001).

Os radicais livres das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) também desempenham um papel fundamental no agravamento do processo inflamatório crônico, agindo direta ou indiretamente como agentes prejudiciais que induzem a transcrição de fatores pró-inflamatórios e pró-apoptóticos em todos os sistemas orgânicos (BARTOSZ, 2009; GRISHKO et al., 2009).

Espécies reativas de oxigênio induzem muitos problemas por causarem danos as membranas biológicas, atacando suas proteínas e induzindo oxidação destrutiva de lipídios de membrana, um processo conhecido como peroxidação (RANGAN; BULKLEY, 1993). Espécies reativas de nitrogênio, como o NO, também estão envolvidas no desenvolvimento da destruição articular em pacientes com artrite reumatoide (DEL-CARLO JR.; LOESER, 2002). Níveis elevados de EROs e ERNs foram relatados em pacientes com doença reumática (PAVELA, 2015). Assim, o dano oxidativo de órgãos vitais é considerado uma complicação secundária da artrite (SUNDARAM et al., 2014). A partir dessas informações, o próximo passo foi avaliar a atividade antioxidante de mirtenol em animais com artrite induzida por ACF a fim de elucidar a possível ação antioxidante do monoterpeno, quantificando os níveis de SOD *in vitro*.

A SOD é considerada uma das mais importantes defesas endógenas antioxidantes enzimáticas do organismo para combater a produção de radicais livres, o aumento de sua atividade sugere efeito antioxidante relacionado à modulação da atividade enzimática (ALMEIDA et al., 2014). Os ensaios experimentais demonstraram o efeito inibitório do mirtenol (12,5; 25 e 50 mg/kg) na produção *in vivo* de nitrito, além disso, aumentou significativamente a atividade da SOD. O Geraniol, um álcool monoterpeno, importante constituinte do óleo essencial de gengibre e limão, também mostrou atividade antioxidante semelhante ao mirtenol na produção de óxido nítrico, atividade de superóxido dismutase e níveis de EROs (KHAN et al., 2013). Estes resultados, portanto, sugerem que o mirtenol tem

um possível efeito antioxidante, reduzindo o nível de peroxidação lipídica e teor de nitrito, uma vez que foi capaz de reduzir a formação de espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, o mirtenol aumentou a atividade da superóxido dismutase, sugerindo que seu papel antioxidante pode ser devido à regulação destas enzimas.

A presença de NO foi indiretamente determinada pela dosagem de nitrito e atividade de SOD no sangue de animais tratados com myrtenol. NO é uma importante molécula de sinalização envolvida em muitos processos patológicos, incluindo a sinalização da dor e inflamação, desempenhando um papel importante em vários tipos de processos e, além disso, na inflamação, o óxido nítrico (NO) age como um mediador pró-inflamatório na patogênese de várias doenças, e é importante procurar novas formas seguras e drogas antioxidantes eficazes (LU; YEH; OHASHI, 2008; KAWANO et al., 2009).

Em resumo, estes resultados sugerem efeito anti-inflamatório crônico e agudo de mirtenol que pode ser devido à redução do influxo de leucócitos para o local da inflamação e redução de estresse oxidativo, especialmente a redução de NO e peroxidação lipídica, bem como, aumento de antioxidantes enzimáticos endógenos, como a SOD.

Neste contexto, os resultados obtidos com o mirtenol estendem as evidências já encontradas para a ação anti-inflamatória deste monoterpene. No entanto, estudos futuros serão necessários para descrever o perfil do mirtenol como um agente anti-inflamatório eficaz e com segurança em uso clínico.

## REFERÊNCIAS

AALTONEN, K.J.; VIRKKI, L.M.; MALMIVAARA, A.; KONTTINEN, Y.T.; NORDSTRÖM, D.C; BLOM M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. **Plos One**, v. 7, p. 1-14, 2012.

ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediat. Inflamm.**, v. 8, p. 107-113, 1999.

ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F; SILVA, O.A.; SOUSA, D.P.; FREITAS R.M. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. **Pharmacology Biochem. Behav.**, v. 118, p. 69-78, 2014.

ARNO, B.; LEIF J. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: a critical review. **Chem. Sus Chem.** v. 2; p. 1072-1095, 2009.

ASHLEY, N.T.; WEIL, Z.M.; NELSON R.J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** v. 43, p. 385-406, 2012.

ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, M.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose–mannose binding plant lectins. **J. Urol.**, v. 161, p. 1988-1993, 1999.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, p. 1303-1315, 2009.

BELSITO, P.D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H.; SIPES, I.G.; TAGAMI, H. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 1-71, 2008.

BHATIA, H.; SHARMA, Y.P.; MANHAS, R.K.; KUMAR K. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India. **J. Ethnopharmacol.**, v. 151, p. 1005-1018, 2014.

BOGDAN, C.. Nitric oxide and the immune response **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 907-916, 2001.

BROWN, S.B.; DRANSFIELD I. Electric field and inflammation: may the force be with you. **Sci. World J.**, v. 8, p. 1280-1294, 2008.

CAIELLI, S.; BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V. Neutrophils come of age in chronic inflammation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 24, p. 671-677, 2012.

CANO-RAMÍREZ, C.; ARMENDÁRIZ-TOLEDANO, F.; JORGE, E.; MACÍAS-SÁMANO, J.E.; SULLIVAN, B.T.; ZÚÑIGA G. Electrophysiological and behavioral responses of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* to volatiles from host pines and conspecifics. **J. Chem. Ecol.**, v. 38, p. 512-524, 2012.

CAPAZ, F.R.; VANCONCELLOS, L.E.; MORAES, S.; NETO J.P. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. **Arch. Int. de Pharmacodyn. de Ther.**, v. 251, p. 228-236, 1981.

CARRASCO, F.R.; SCHMIDT, G.; ROMERO, A.L.; SARTORETTO, J.L.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K. Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: evidence for humoral and cell-mediated responses. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 61, p. 961-967, 2009.

DAS, K.; SAMANTA, L.; CHAINY, G.B.D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 37, p. 201-204, 2000.

DEL-CARLO JR., M.; LOESER, R.F. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. **Arthritis & Rheumatol.**, v. 46, p. 394-403, 2002.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.; CALIXTO J.B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol. Res.**, v. 112, p. 4-29, 2016.

GOMES, R.P. Atividade física no tratamento da artrite induzida por adjuvante de Freund: efeitos na nocicepção, edema e migração celular. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano). Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis (SC). 2008.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRISHKO, V.I.; HO, R.; WILSON, G.L.; PEARSALL, A.W. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. **Osteoarthr. Cartil.**, v. 17, p. 107-113, 2009.

HIROTA, M. Post-mortem tissue-type plasminogen activator preserves graft function of hearts harvested from non-pre-treated non-heart-beating donors. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 29, 2010.

ITAKURA, A.; ASLAN, J.E.; KUSANTO B.T. p21-Activated kinase (PAK) regulates cytoskeletal reorganization and directional migration in human neutrophils. **PLoS One**, v. 8, p. 1-10, 2013.

JANSSON, J.W. HENSON P.M. Cellular regulation of the inflammatory response. *Toxicol. Pathol.*, v. 40, p. 166-173, 2012.

KAWANO, S. YAMANO, K. NAOÉ, M. MOMOSE, T. TERAOKA, K. NISHIKAWA S. Structural basis of yeast Tim40/Mia40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 106, p. 14403-14407, 2009.

KHAN, A.Q. KHAN, R. QAMAR, W. LATEEF, A. REHMAN, M.U. TAHIR, M. ALI, F. HAMIZA, O.O. HASAN, S.K. SULTANA. S. Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced oxidative stress and inflammation in mouse skin: possible role of p38 MAP Kinase and NF-Kb. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 94, p. 419-429, 2013.

KUMAR, V. BHATT, P.C. RAHMAN, M. PATEL, D.K. SETHI, N. KUMAR, A. SACHAN, N.K. KAITHWAS F.A., AL-ABBASI, A. VERMA. *Melastoma malabathricum* Linn attenuates complete Freund's adjuvant-induced chronic inflammation in Wistar rats via inflammation response. *BMC Complement. Altern. Med.*, v. 16, p. 510, 2016.

LAD, H.; BHATNAGAR, D. Amelioration of Oxidative and Inflammatory Changes by *Swertia Chirayita* Leaves in Experimental Arthritis *Inflammopharmacology*, v. 24 p. 363, 2016.

LAWAL, O. A.; OYEDEJI. A.O. Chemical composition of the essential oils of *Cyperus rotundus* L. from South Africa. *Molecules*, v.14, p. 2909-2917, 2009.

LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI. P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, v. 42, p. 145-151, 2008.

MELO, G.A.N.; GRESPAN, R.; FONSECA, J.P.; FARINHA, T.O.; SILVA, E.L.; ROMERO, A.L.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN. R.K.N. Inhibitory effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil on leukocyte migration in vivo and in vitro. *J. Nat. Med.*, v. 65, p. 241-246, 2011.

MOCKUTE, D.; JUDZENTIENE. A. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 31, p. 1033-1045; 2003.

MOREIRA, M.R.; SALVADORI, M.G.S.; ALMEIDA, A.A.; SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; SATYAL, P.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: a monoterpene alcohol. **Neurosci. Lett.**, v. 579, p. 119-124, 2014.

MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R.; JANSEN, P.L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clin. Chem.**, v. 41, p. 892-896, 1995.

NADKARNI, K.M. Indian Materia Medica. Part-I (3 ed.) p. 265 Vegetable Kingdom. 1954.

NGAN, L.T.; MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T.; AHN, Y.J. Growth-inhibiting, bactericidal, and urease inhibitory effects of *Paeonia lactiflora* root constituents and related compounds on antibiotic-susceptible and -resistant strains of *Helicobacter pylori*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 9062-9073, 2012.

OZKHAN, Y.; YARDYM-AKAYDYN, S.; SEPICI, A.; KESKI, E.; SEPICI, V.; SIMSEK, B. Oxidative status in rheumatoid arthritis. **Clin. Rheumatol.** p. 25, 2006.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Ind. Crops Prod.**, v. 76, p. 174-187, 2015.

PEARSON, C.M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 91, n. 1, p. 95-101, 1956.

PROVENZA, F.D.; VILLALBA, J.J. The role of natural plant products in modulate immune system: an adaptable approach for combating disease in grazing animals. **Small Rumin Res.**, v. 89, p. 131-139, 2010.

RANGAN, U.; BULKLEY, G.B. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. **Br. Med. Bull.**, v. 49, p. 700-718, 1993.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 57, p. 405-424, 2012.

SILVA, R.O.; SALVADORI, M.S.; SOUSA, F.B.M.; SANTOS, M.S.; CARVALHO, N.S.; SOUSA, D.P.; GOMES, B.S.; OLIVEIRA, F.A.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N.; MEDEIROS, J.V.R. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour Fragr. J.** 2014

SINGH, S.; MAJUMDAR, D.K. **Int. J. Pharmacol.**, 34 p. 218, 1996.

SUNDARAM, M.S.; HEMSHEKHAR, M.; THUSHARA, R.M.; SANTHOSH, M.S.; KUMAR, S.K.; PAUL, M.; DEVARAJA, S.; KEMPARAJU, K.; RANGAPPA, K.S.; GIRISH. K.S. Tamarind seed extract mitigates the liver oxidative stress in arthritic rats. **Food & Funct.**, v. 5, n.3, p. 587-597, 2014.

TABAS, I.; GLASS. C.K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. **Science**, v. 339, p. 166-172, 2013.

TAUROG, J.D.; ARGENTIERI, D.C.; MCREYNOLDS R.A. Adjuvant arthritis. **Methods Enzym.**, v. 162, p. 339, 1988.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA. S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48. p. 421-427, 1992,

VALE, M.L.; BENEVIDES, V.M.; SACHS, D.; BRITO, G.A.; DA ROCHA, F.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO. R.A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 143, n. 7, p. 833-844, 2004

VISHWANATH, M.; PATIL, K.; KANDHAREB, A.D.; BHISEA. S.D. Anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Xanthium srtumarium* L. ethanolic extract in Freund's complete adjuvant induced arthritis. **Biomed. Aging Pathol.**, v. 2, p. 6-15, 2012.

WANG, S.; WANG, Y.; LIU, X.; GUAN, L.; YU, L.; ZHANG. X. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of taraxasterol on adjuvant-induced arthritis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 187, p. 42-48, 2016.

WATANABLE, C.; SATOH, T.; TAHARA, E.; MURAKAMI, K.; HAYASHI, K.; HASE. K. Inhibitory mechanism of glycoprotein fraction derived from *Miscanthus sinensis* for the immediate phase response of an IgE mediated cutaneous reaction. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 22, p. 26-30, 1999.

WILLIAMS, M.R.; AZCUTIA, V.; NEWTON. G. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends Immunol.**, v. 32, p. 46-469, 2011.



WRIGHT, H.L.E.; MOOTS, R.J.E.; BUCKNALL, R.C.E.; EDWARDS, S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatol. Oxf.**, v. 49, p. 1618-1631, 2010.

YAMAMOTO, Y.; HOSOKAWA, M.; KURIHARA, H.; MAOKA, T.; MIYASHITA, K. Synthesis of phosphatidylated-monoterpene alcohols catalyzed by phospholipase D and their antiproliferative effects on human cancer cells. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 4044-4046, 2008.

### Capítulo III: Obtenção e caracterização da nanoformulação do mirtenol

#### RESUMO:

O mirtenol é um monoterpene extraído do óleo essencial de plantas aromáticas com várias atividades farmacológicas já comprovadas, como as espécies . No intuito de otimizar seus efeitos farmacológicos objetivou-se realizar a obtenção de uma nanoformulação a partir deste monoterpene. Para tanto, utilizou-se a metodologia de temperatura de inversão de fases (PIT), na qual obteve-se a nanoformulação do mirtenol nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg. A análise da encapsulação mostrou uma boa quantidade de mirtenol incorporado, principalmente na dose de 50 mg/kg (58,9% de mirtenol). A caracterização da nanoformulação mostrou que suas partículas apresentam tamanhos em escala nanométrica menores que 40 nm e baixo índice de polidispersão, indicativos de boa estabilidade da emulsão. Os ensaios preliminares mostram que a preparação da nanoemulsão do mirtenol pode ser introduzida como uma alternativa para aplicações pré-clínicas, com possível potencial anti-inflamatório. Dessa forma, protocolos específicos são necessários para evidenciar tal atividade.

#### 1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são misturas de constituintes voláteis de origem natural produzidos como metabólitos secundários de plantas aromáticas, com baixo peso molecular (até 500 Dáltons), caracterizados por forte aroma e obtidos por hidrodestilação ou a vapor, ou por processo mecânico ou destilação a seco (BAKKALI et al, 2008; TUREK; STINTZING, 2012). Apresentam-se no estado líquido com aspecto límpido e raramente colorido, são lipofílicos e com densidade, geralmente, menor que a água (BAKKALI et al, 2008). O método de extração e a parte da planta utilizada determinam os constituintes do óleo e conseqüentemente sua atividade biológica (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Os monoterpenos são os constituintes mais representativos dos óleos essenciais, correspondendo a 90% dos mesmos e permitindo uma grande variedade de estruturas (PROVENZA; VILLALBA, 2010). O mirtenol é um monoterpene encontrado em óleos essenciais de várias plantas medicinais, como *Rhodiola rosea* L., *Paeonia lactiflora* Pall, *Cyperus rotundus*. L. e *Tanacetum vulgare* L., cujo extrato bruto mostra potencial anti-inflamatório (MOCKUTE; JUDZENTIENE, 2003; NGAN et al, 2012). Os extratos de

plantas que contêm mirtenol são usados na medicina popular para tratamento de sintomas de ansiedade, dor gastrointestinal, inflamação e infecção (BHATIA et al, 2014; CANO-RAMÍREZ et al, 2012; LAWAL; OYEDEJI, 2008). A literatura também relata efeitos agudos anti-inflamatórios agudo e crônico e antinociceptivos do mirtenol (SILVA et al, 2014; GOMES et al, 2017).

Apesar dessas propriedades promissoras dos óleos essenciais e seus constituintes, problemas relacionados à volatilidade, baixa solubilidade em água e facilidade de oxidação precisam ser resolvidos (MORETTI et al., 2002). A nanoformulação dessas substâncias poderia resolver esses problemas protegendo-os da degradação e das perdas por evaporação, obtendo uma liberação controlada desses produtos e facilitando seu manuseio (MARTÍN et al., 2010).

A nanotecnologia é caracterizada por uma abordagem multidisciplinar e envolve a criação e utilização de diferentes proporções nanométricas de sistemas (DE VILLIERS et al. 2009).

Os nanotransportadores têm um tamanho pequeno (tipicamente 10 e 100 nm) e podem, além de melhorar a solubilização, serem usados para a entrega direcionada de drogas (LAMMERS et al, 2011; DEVADASU et al., 2013; SULTANA et al., 2013). Os nanotransportadores podem melhorar o tempo de circulação do agente terapêutico carregado e podem melhorar a seu acúmulo no sítio patológico, explorando o aumento do efeito de permeação e retenção do fármaco carregado (MAEDA, 20001; FANK; NAKAMURA; MAEDA, 2011; TORCHILIN, 2011). Durante as últimas décadas, vários tipos de nanocarreadores, tais como micelas poliméricas e nanopartículas, lipossomas, conjugados, transportadores peptídicos, etc., para liberação e direcionamento de drogas foram investigados e alguns sistemas alcançaram avaliações e aplicações clínicas. Muitos estudos mostraram ainda que os nanocarreadores são adequados para aumentar a biodisponibilidade e o direcionamento de fármacos (HRKACH et al., 2012).

Uma das abordagens promissoras para minimizar os efeitos adversos e aumentar a eficácia do ingrediente ativo farmacêutico é administrar a droga por meio de nanoformulações líquidas, nomeadamente nanoemulsões e emulsões múltiplas (SOLANS et al., 2003). As nanoformulações têm uma ampla variedade de aplicações, como na indústria de alimentos, cosméticos, pesticidas e medicamentos) (BARRADAS et al., 2018; CRUZ et al., 2018; PRAKASH et al, 2018; SONNEVILLE-AUBRUN; YUKUYAMA; PIZZINO, 2018;). Entre as nanoformulações, as nanoemulsões são

sistemas formados por dois líquidos imiscíveis e um ou mais líquidos estabilizadores, que permitem a formação de pequenas gotículas (MCCLEMENTS 2012).

As nanoemulsões consistem em uma dispersão de líquidos imiscíveis formando pequenas gotículas de emulsão, comumente gotículas de óleo em água (O/A), apresentando tamanhos inferiores a 300 nm (ANTON; VANDAMME, 2011). O tamanho em escalas nanométricas das nanoformulações torna a energia térmica das gotículas significativa quando comparada à energia gravitacional e, possivelmente, às forças coloidais atraentes, as tornando capazes de estabilizar gotículas de óleo contra mecanismos de instabilidade de sedimentação gravitacional e agregação de gotículas (MCCLEMENTS; RAO, 2011). A dimensão reduzida das gotículas também enfraquece a dispersão da luz visível e melhora a clareza óptica das emulsões, o que permite a utilização de nanoemulsões em produtos transparentes (MCCLEMENTS, 2011).

Além disso, as nanoformulações podem ser sistemas termodinamicamente instáveis, e que, portanto, não podem ser formadas espontaneamente e necessitam da adição de energia para que o processo ocorra. A energia pode ser proveniente de dispositivos mecânicos, como no caso dos métodos de alta energia, como por exemplo, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e homogeneizadores ultrassônicos; ou ainda, podem ser produzidas pela alteração da energia química dos componentes, por meio de métodos de baixa energia, como por exemplo, emulsificação espontânea ou métodos por inversão de fase (MCCLEMENTS, 2012; SOLANS et al., 2005). Altas concentrações de surfactantes de moléculas pequenas não iônicas sintéticas (SMS), como os surfactantes Tween® (RAO; MCCLEMENTS, 2011) e Span® (YU et al., 2012) são comumente usadas para formar nanoemulsões usando métodos de baixa energia que normalmente envolvem uma inversão de fase após mudanças na composição (PIC) (YU et al., 2012) ou temperatura (PIT) (RAO; MCCLEMENTS, 2010).

Assim, uma formulação de nanoemulsão com boa estabilidade pode ser útil no tratamento de diversas doenças, como inflamação e dor (TANG, 2012).

Desse modo, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma nanoformulação a partir do monoterpene mirtenol e avaliação de sua citotoxicidade.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Drogas e reagentes

Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%), foi adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha). O meio de cultura Schneider's, meio RPMI (Soro fetal bovino (SFB), MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio Bromo; A obtenção do monoterpene mirtenol foi realizada sob a responsabilidade do professor Dr. Damião Pergentino de Sousa, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba.

### 2.2 Obtenção da nanoformulação do mirtenol

O desenvolvimento da nanoformulação do mirtenol (NFM) foi realizado pelo método de temperatura de inversão de fase (*phase inversion temperature* – PIT), utilizando como tensoativo o *tween*® 80. Diferentes quantidades de mirtenol (1.0 e 3.5%) foram adicionadas à solução de surfactante e agitadas por 2 min. As misturas foram então homogeneizadas a 10.000 rpm durante 2 min utilizando um homogeneizador de alta velocidade Ultra-Turrax (IKA T25 digital, Staufen, Alemanha). A formulação foi aquecida a uma temperatura constante (21 e 98 °C) durante 0 e 3h em banho maria, seguido de resfriamento imediato em gelo/água com agitação manual (SHINODA; ARAI, 1964).

### 2.3 Caracterização da nanoformulação

#### 2.3.1 Taxa de encapsulação de Mirtenol

A concentração de mirtenol nos sistemas nanoestruturados foi determinada de acordo com Lu et al. (2014), com modificações. Brevemente, 300 µL da amostra foi dissolvida em 6 mL de água deionizada e em seguida 3 mL de hexano foram adicionados. A mistura foi agitada por 1 min e o mirtenol foi extraído com hexano sob aquecimento a 45 °C em banho-maria por 30 minutos. Após esse tempo, os tubos foram deixados em temperatura ambiente e o hexano foi separado da fase aquosa por centrifugação a 4000 rpm durante 20 min. A quantidade de mirtenol presente no hexano foi quantificada por meio da medição da absorbância a 243 nm por espectroscopia na região do UV-visível (UV-1800, Shimadzu), após confecção de curva de calibração ( $y = 0,0047x - 0,0084/R^2 = 0,9996$ ). A taxa de encapsulação foi calculada de acordo com a equação abaixo:

Taxa de encapsulação (%) = Quantidade de mirtenol encapsulado/Quantidade total de mirtenol adicionado

### 2.3.2 Tamanho e distribuição das partículas

O tamanho (nm) e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas (12,5 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg) foram determinados por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS) no equipamento Zetasizer Nano Series (modelo ZEN3690, Malvern Instruments, Reino Unido), determinando-se a mobilidade eletroforética das partículas, após diluição da NFM de 1:20 em água miliQ (LIANG et al., 2012), as medidas de tamanho e PDI foram repetidas 2 anos após a síntese para avaliação da estabilidade do sistema nanoestruturado.

### 2.3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise topográfica do NFM foi realizada utilizando um instrumento TT-AFM (AFM Workshop, EUA) em modo vibratório (tapping) com  $256 \times 256$  linhas. A nanoemulsão foi diluída em água ultrapura antes do estudo de AFM. Em seguida, 8 $\mu$ L de NFM diluídos foram depositados em mica limpa e secos a 50° C. Imagens representativas (Figura 1) foram examinadas usando *cantilevers* ACT-20 (AppNano - EUA) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 359 kHz. As imagens foram analisadas usando o *software* Gwyddion 2.47 e o tamanho médio foi calculado (média  $\pm$  DP).

### 2.3.4 Determinação do pH da nanoformulação

Os valores de pH foram determinados diretamente nas amostras usando um potenciômetro calibrado (HANNA<sup>®</sup> Instruments), à temperatura ambiente. As medidas foram realizadas em triplicata.

### 2.3.5 Medida do Potencial Zeta

O potencial zeta da NFM (12,5 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg) foi determinado utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano Series (modelo ZEN3690, Malvern Instruments, Reino Unido).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Obtenção da nanoformulação do mirtenol

A partir da solução do monoterpeno mirtenol, por meio do método de Temperatura de Inversão de Fases, obteve-se as nanoformulações do mirtenol (12,5, 25 e 50 mg/kg).

#### 3.2 Caracterização da nanoformulação

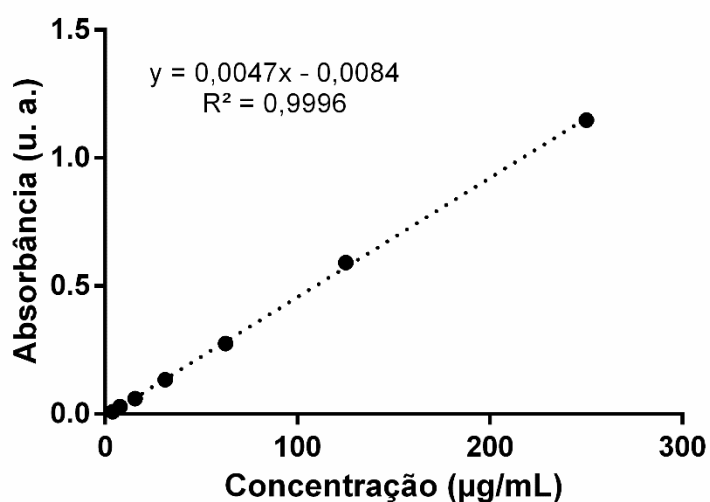
##### 3.2.1 Taxa de encapsulação do mirtenol

O cálculo da taxa de encapsulação da nanoformulação mostrou que a dose de 50 mg/kg possui 58,9% de mirtenol em sua composição, enquanto que as doses de 25 e 12,5 mg/kg possuem 13,7% e 24,1%, respectivamente, considerando os excipientes.

Tabela 1- Taxa de encapsulação da nanoemulsão do mirtenol

Nanoemulsão (mg/kg)	Taxa de encapsulação (%)
50	58,9
25	13,7
12,5	24,1

Figura 1 – Curva de calibração

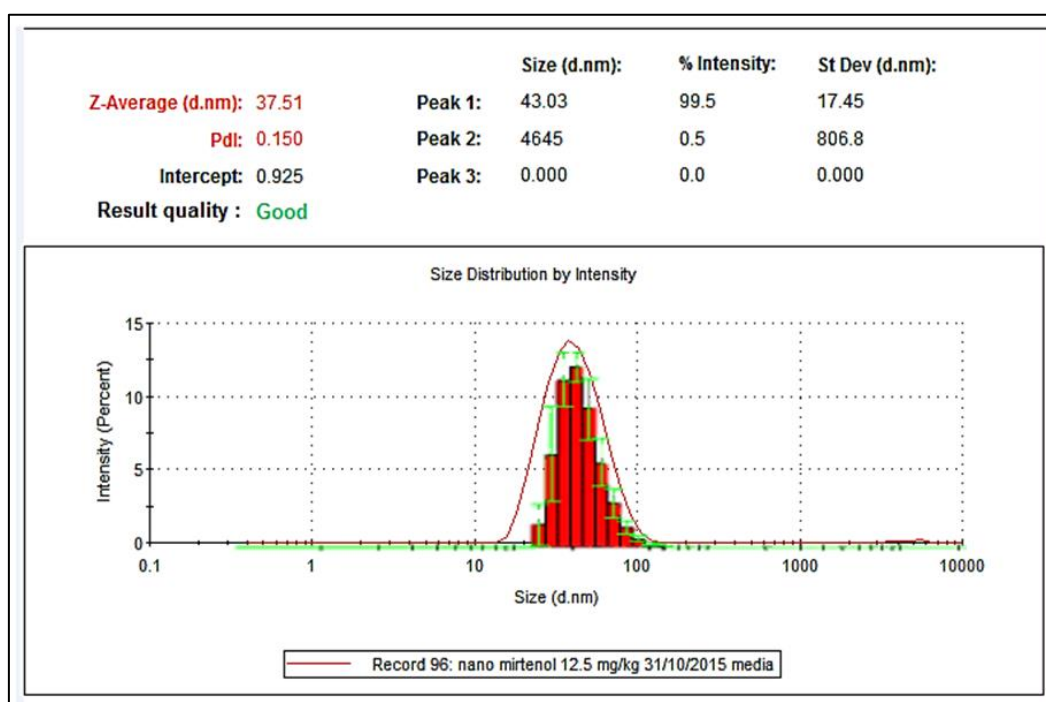


### 3.2.2 Tamanho e distribuição das partículas

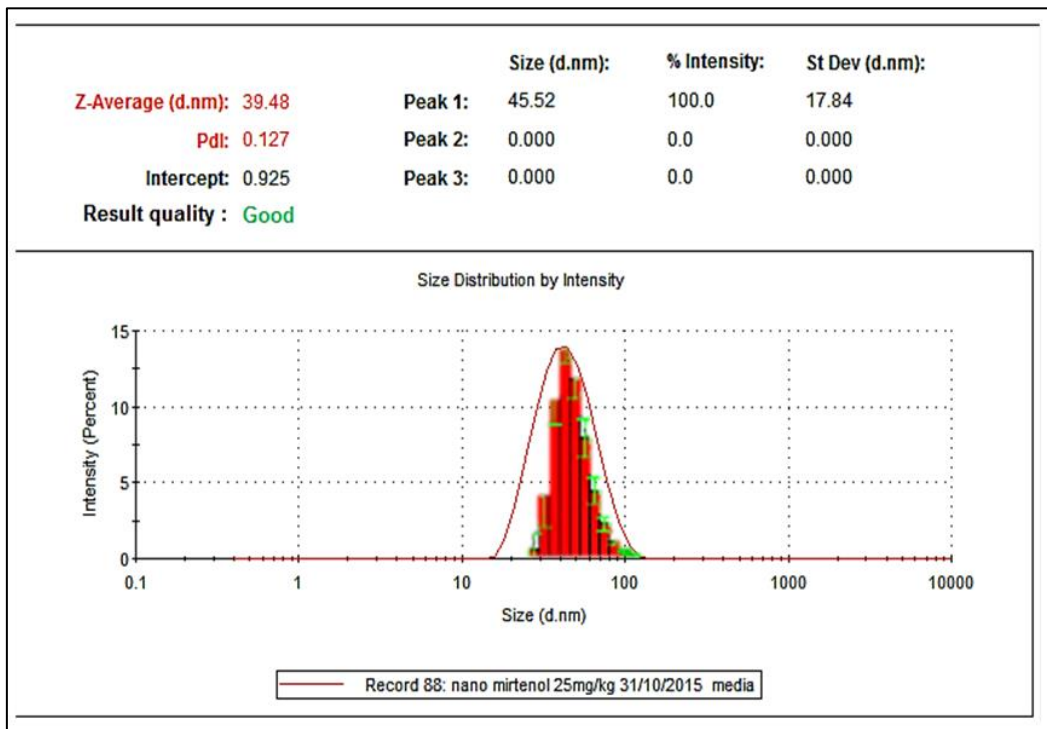
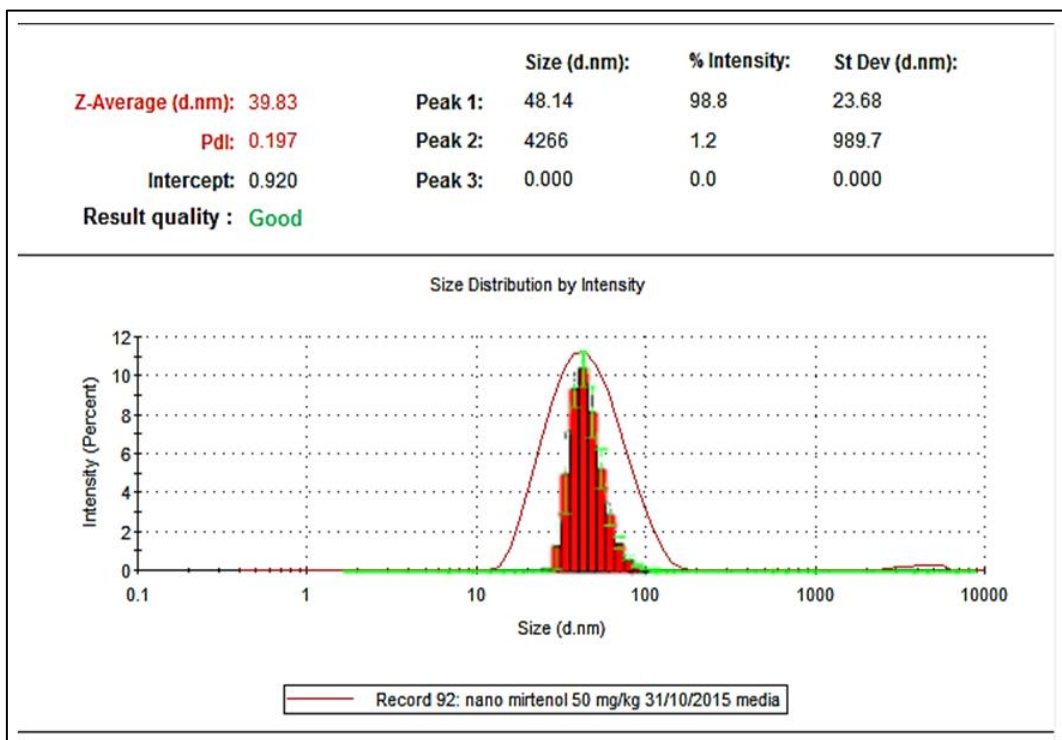
Conforme os resultados encontrados, para a nanoformulação do mirtenol o diâmetro hidrodinâmico das partículas foi igual a 37,51; 39,48 e 39,83 nm, o PDI ficou compreendido entre 0,150; 0,127 e 0,197 (**Figura 2**), Após 2 anos da síntese, o diâmetro hidrodinâmico foi: 41,51; 40,02 e 38,15 (**Figura 3**) e o PDI de 0,292; 0,159 e 0,137 (**Figura 4**) para as NFM de 12,5, 25 e 50 mg/kg, respectivamente.

**Figura 2** – Imagem do Espalhamento de Luz Dinâmico para NFM nas doses de 12,5 mg/kg (A), 25 mg/kg (B) e 50 mg/kg (C).

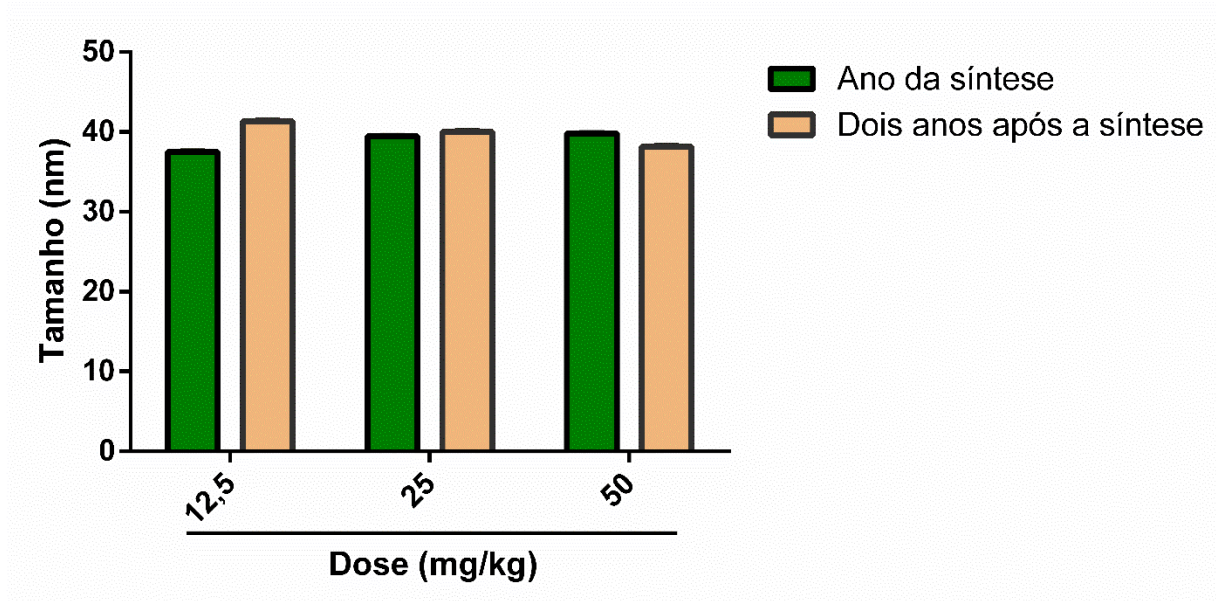
A



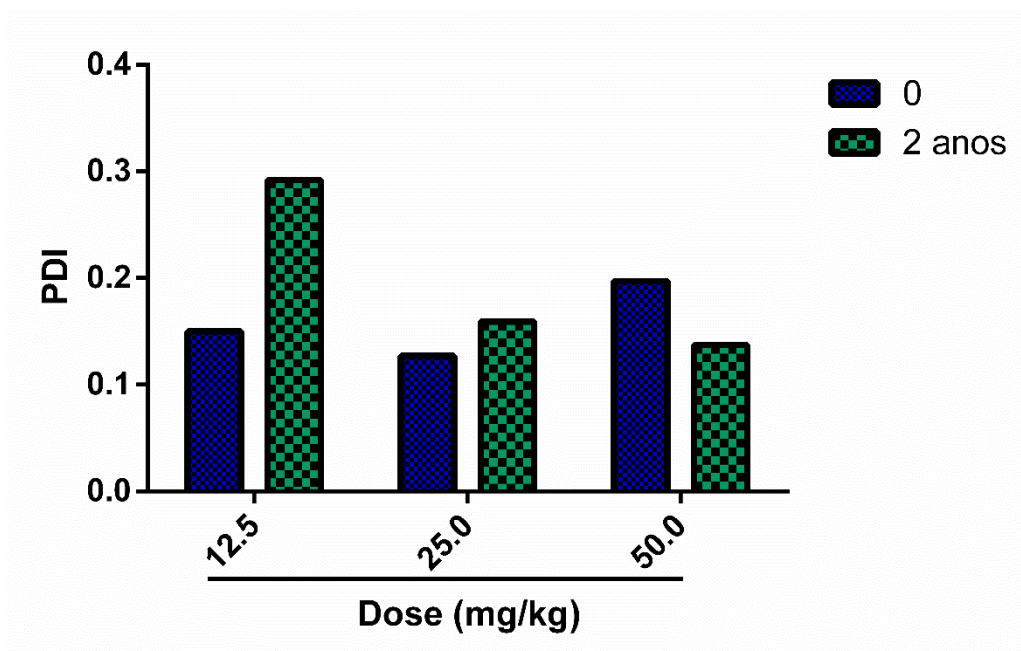


**B****C**

**Figura 3** – Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas da NFM nas doses de 12,5 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg, no tempo da síntese e 2 anos após a síntese.



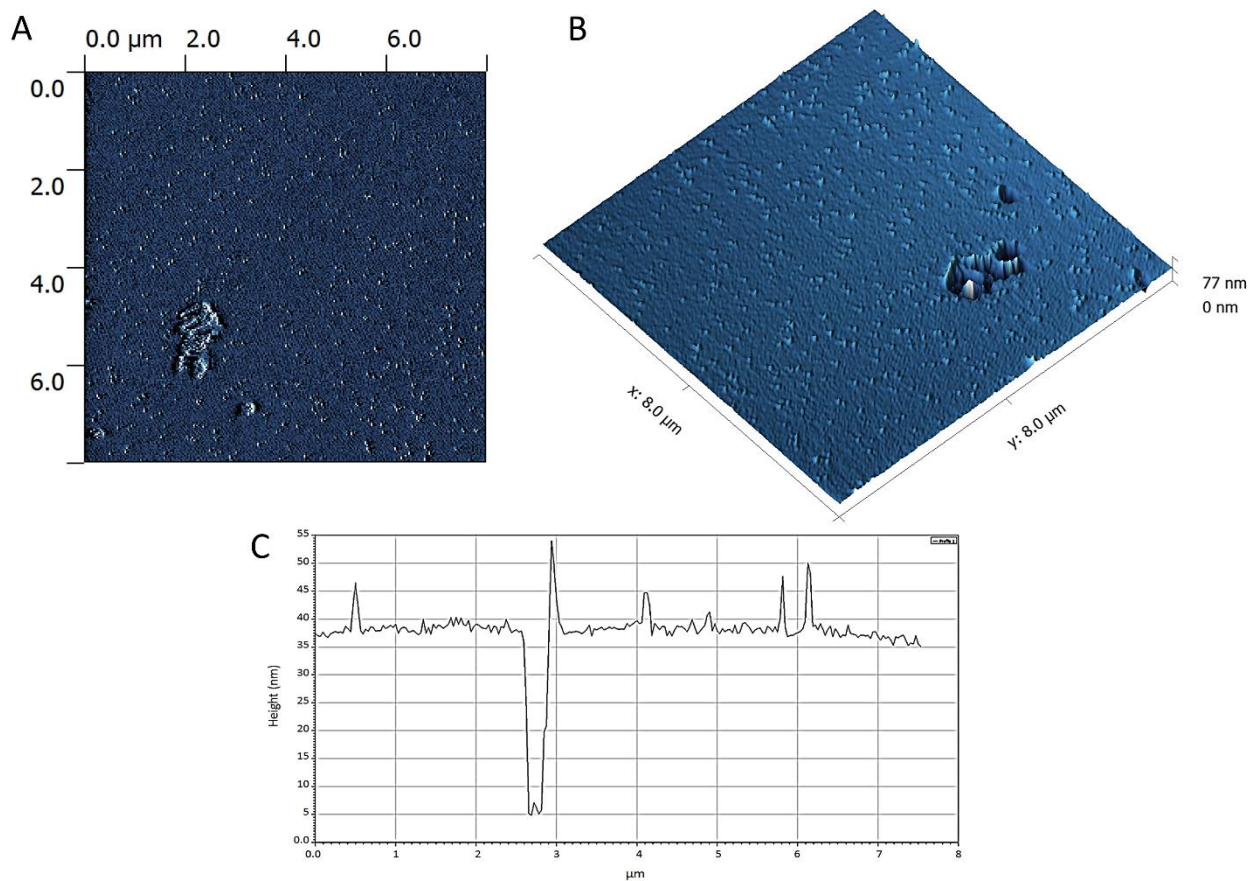
**Figura 4** – PDI das nanopartículas da NFM nas doses de 12,5 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg, no tempo 0 e 2 anos após a síntese.



### 3.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A imagem da AFM (**Figura 5**) é representativa da nanoemulsão analisada (NFM 50 mg / kg), na qual se pode observar a homogeneidade da amostra nanoestruturada, bem como o tamanho médio das nanopartículas que foi igual a  $33,88 \pm 6,14$  nm.

**Figura 5-** Imagens de AFM de nanoemulsão formulada (NFM) de  $8,0 \mu\text{m} \times 8,0 \mu\text{m}$ . (A) imagem topográfica; (B) imagem NFM em perspectiva 3D e (C) perfil de altura e comprimento de superfície das nanopartículas (linha branca).



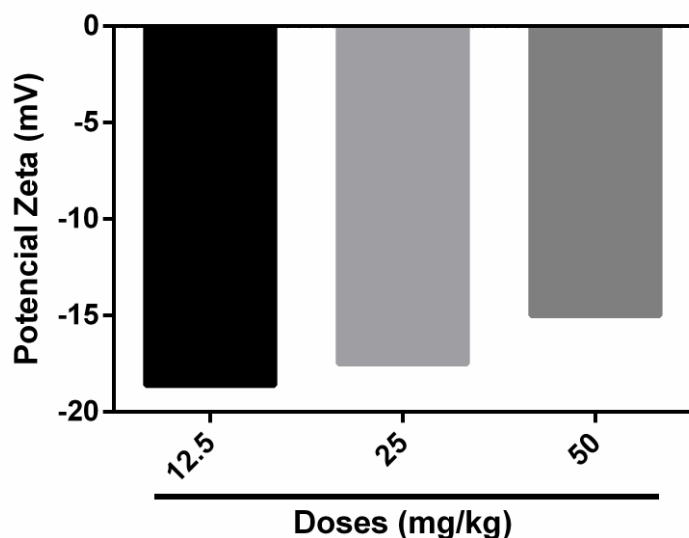
### 3.2.4 Determinação do pH da nanoformulação

Os valores de pH para as doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg correspondeu a 6,39, 6,45 e 6,71, respectivamente.

### 3.2.5 Medida do Potencial Zeta

O potencial Zeta foi -18,6; -17,5 e -15,0 para as doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg, respectivamente (**Figura 6**).

**Figura 6** – Carga das partículas da NFM nas doses de 12,5 mg/kg (A), 25 mg/kg (B) e 50 mg/kg (C).



#### 4 DISCUSSÃO

As nanopartículas despontam como excelentes alternativas farmacológicas, pois possuem vantagens potenciais em relação a outros tipos de sistemas de entrega coloidal, como alta clareza óptica, boa estabilidade física, biodisponibilidade aumentada e solubilidade em água melhorada (FANUN, 2009; FLANAGAN; SINGH, 2006; HUANG et al., 2010; LEE; MCCLEMENTS, 2010; WEISS et al., 2006). Além disso, as nanoemulsões de óleos essenciais poderiam aprimorar sua atividade biológica, aumentar sua solubilidade em água e melhorar sua estabilidade química (GAYSINSKY et al., 2008; MCCLEMENTS, 2011).

A literatura reporta a aplicação da nanotecnologia no desenvolvimento de várias formulações como as nanoformulações dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker, do óleo de tomilho, do óleo de laranja e dos monoterpenos D-limoneno e o eugenol (CHANG, et al, 2012; DANIELLI et al, 2013; ZAHI, et al 2014; ESMAELI et al, 2015; BORGES et al, 2017). As nanoemulsões de monoterpenos álcool, como o mirtenol também são descritas na literatura como, por exemplo, as nanoformulações do mentol, linalol e geraniol (PASCUAL-VILLALOBOS et al., 2017)

A obtenção da nanoformulação com o monoterpene mirtenol foi realizada por meio do método de Temperatura de Inversão de Fase. Este método, elaborado e descrito por Shinoda e Saito (1969), descreve que neste ensaio é possível forçar uma transição a partir de uma emulsão água/óleo (A/O) a baixas temperaturas para óleo/água (O/A) a temperaturas mais elevadas. O sistema atravessa um ponto zero e tensão superficial mínima, promovendo a formação de gotículas de óleo finamente dispersas. Acima da temperatura de inversão de fase, o tensoativo é totalmente solubilizado no óleo e, assim, a mistura sofre uma inversão de fase (ANTON; VANDAMME, 2009). Obteve-se as nanoformulações nas doses 12,5, 25 e 50 mg/kg.

A utilização do agente tensoativo visa manter uma dispersão uniforme de um líquido em outro, pois contribui para diminuir a tensão interfacial entre a fase aquosa e a oleosa. Após a homogeneização, a presença de uma camada de moléculas de tensoativos melhora a estabilidade em longo prazo das gotas de óleo através das interações repulsivas entre elas e garante um tamanho pequeno da gotícula (DAS et al., 2012; RAO; MCCLEMENTS, 2012; DEVARAJAN; RAVICHANDRAN, 2011; OLIVEIRA et al., 2004). A partir do monoterpene mirtenol, obteve-se a NFM nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg. As nanoformulações do mirtenol apresentaram um aspecto translúcido, opalescente e um reflexo ligeiramente azulado, que são características macroscópicas comuns neste tipo de formulação (BORGES et al, 2017).

Nos últimos anos, a tecnologia de nanoencapsulação de bioativos pouco solúveis em água tem atraído grande atenção na indústria farmacêutica (AUGUSTIN; HEMAR, 2009). A nanoencapsulação é geralmente empregada para melhorar a solubilidade, estabilidade e bioatividade de vários fitoquímicos solúveis em óleo devido ao seu pequeno tamanho de gotícula e alta estabilidade cinética (MCCLEMENTS, DECKER; WEISS, 2007). A NFM obteve bons resultados de encapsulação, semelhantes aos encontrados com a nanoformulação de *Rosmarinus officinalis* (BORGES et al., 2018).

Dentre as diferentes técnicas utilizadas para caracterização de sistemas nanoestruturados estão a determinação de valores de pH, índice polidispersão e tamanho das gotículas (KLANG et al., 2012; RIBEIRO et al., 2015). As nanoemulsões são caracterizadas pela sua estabilidade termodinâmica e tamanho compreendido entre 20 e 200 nm (OSTERTAG et al., 2012). A estabilidade de uma nanoformulação está relacionada não só ao tamanho de suas partículas, como também à distribuição das gotículas na formulação. Essa distribuição reflete a homogeneidade do sistema no qual os valores de polidispersão são expressos em uma escala de 0,0 a 1,0 sendo valores

inferiores a 0,2 indicativos de distribuição homogênea e maior estabilidade (KLANGE et al, 2012; TANG et al, 2011). Os resultados obtidos corroboram com a literatura, no qual obteve-se tamanhos de partículas entre 37,51; 39,48 e 39,83 nm para as três doses da NFM. Esses valores assemelham-se aos estudos de caracterização da nanoformulação do eugenol, monoterpene de estrutura semelhante à do mirtenol, cujo tamanho médio das partículas descrito de 24,4 nm. Além disso, as formulações mostraram baixo valor de PDI, entre 0,150; 0,127 e 0,197. Isto significa que estas formulações apresentaram um comportamento unimodal indicando uma estreita distribuição de tamanho das gotículas da formulação. Este comportamento acontece também pela mesma razão descrita na diminuição de tamanho (DAS, et al. 2012).

As abordagens por meio da microscopia de força atômica são ferramentas valiosas para comparar e complementar as informações obtidas pelas medições de DLS (TRUJILLO et al., 2013). Os resultados apresentados mostraram que o tamanho médio das nanopartículas foi  $33,88 \pm 6,14$  nm. Esse fato corrobora o baixo PDI mostrada na análise de DLS. A mesma metodologia foi empregada na análise de outras nanoformulações, como é o caso da nanoformulação do óleo essencial de *Azadirachta indica* A. Juss., que mostrou resultados semelhantes aos apresentados nesta pesquisa (ANJALI et al., 2012).

Outro dado importante para a estabilidade do sistema é um potencial Zeta  $\geq 30$  mV, em módulo, devido aos crescentes forças repulsivas entre as gotículas contra a floculação e coalescência comuns em nanoemulsões (HO; AHMAD, 1999; LI; LU, 2016). Apesar do potencial Zeta ser inferior a 30 mV (em módulo), a análise após dois anos de síntese mostra que o tamanho e o PDI foram pouco alterados, principalmente na dose de 25 e 50 mg/kg, aquelas que tem maior quantidade de mirtenol. Tais resultados mostram-se positivos quanto a estabilidade da nanoformulação e estão de acordo com Roland e Colaboradores (2003) em seus estudos de caracterização de nanoemulsões de óleo-em-água.

## 5 CONCLUSÃO

Por meio do método de Temperatura de Inversão de Fase (PIT) foi obtida a nanoformulação do mirtenol e sua caracterização apresentou boa quantidade do monoterpene na nanopartícula, tamanho de partícula e índice de polidispersão adequados às preparações nanométricas, indicando uma boa qualidade da formulação.

## REFERÊNCIAS

ANJALI,C.H.; SHARMA, Y.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion - a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. **Pest Management Science**,v.68, p.158–163, 2012.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**, 28, 978–985, 2011.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nanoemulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, 377, 142–147, 2009.

AUGUSTIN, M.; A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, v.38, p.902-912, 2009.

BAKKALI, F; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, p. 446–475, 2008.

BARRADAS, T.N.; SENNA, J.P.; CARDOSO, S.A.; SILVA, K.G.H.; MANSUR, C.R.E. Formulation characterization and in vitro drug release of hydrogel-thickened nanoemulsions for topical delivery of 8-methoxypsoralen. **Materials Science and Engineering: C**, v.92, p.245-253, 2018.

BHATIA, H.; SHARMA, Y.P; MANHAS, R.K.; KUMAR, K. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India, **Journal of Ethnopharmacology** v.151, p.1005-1018, 2014.

BORGES, R.S.; LIMA, E.S.;KEITA, H.;FERREIRA, I.M.; FERNANDES, C.P.; CRUZ, R.A.S. DUARTE, J.L. • VELAZQUEZ-MOYADO, J.ORTIZ, B.L.S.;CASTRO, A.N.; FERREIRA, J.V.; HAGE-MELIM, L.I.S.6,7 • CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, 2017.

BORGES, R.S.; KEITA, H. ORTIZ, B.L.S.; SAMPAIO, T.I.S.; FERREIRA, I.M; LIMA, E.S.; SILVA, M.J.A.; FERNANDES, C.P.; OLIVEIRA, A.E.M.F.M; CONCEIÇÃO, E.C.; RODRIGUES, A.B.L.; PEREIRA-FILHO, A.C.M.; CASTRO, A.N.;

CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in zebrafish studies. **Inflammopharmacology**. 2018

CANO-RAMÍREZ, C.; ARMENDARIZ-TOLEDANO, F.; JORGE, E. ; MACÍAS-SAMANO, J.E. ; SULLIVAN, B.T.; ZÚNIGA, G. Electrophysiological and behavioral responses of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* to volatiles from host pines and conspecifics. **Journal of Chemical Ecology**, v.38, p.512-524, 2012

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D.J. Physical Properties and Antimicrobial Efficacy of Thyme Oil Nanoemulsions: Influence of Ripening Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60, 12056–12063, 2012.

CRUZ, E.M.O; MENDONÇA, M.C.; BLANKA, A.F.; SAMPAIO, T.S.; PINTO, J.A.O; GAGLIARDI, P.R.; OLIVEIRA-JUNIOR, L.F.G.; LIMA, R.S.N.; NUNES, R.S.; WARWICK, D.R.N. *Lippia gracilis* Schauer essential oil nanoformulation prototype for the control of *Thielaviopsis paradoxa*. **Industrial Crops & Products**, v.117, p.245–251, 2018.

DANIELLI, L.J.; REIS, M.; BIANCHINI, M.; CAMARGO, G.S.; BORDIGNON, S.A.L.; GUERREIRO, I.K.; FUENTEFRIA, A.; APEL, M.A. Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. **Industrial Crops and Products**. 50 (2013) 23–28, 2013.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (CLNs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and CLNs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 139-151, 2012.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**. 89:271–277, 1986.

DEVADASU, V.; BHARDWAJ, V.; KUMAR, M. Can controversial nanotechnology promise drug delivery? **Chemical.**, v.113, p.1686-1735, 2013.

DEVARAJAN, V.; RAVICHANDRAN, V. Nanoemulsions: As modified drug delivery tool. **Pharmacie Globale (IJCP)**, 4, 01, 2011.



DE-VILLIERS, M.N.; ARAMWIT, P.; KWON, G.S. Nanotechnology in drug delivery. **Springer & AAPS Press**, p.663, 2009.

ESMAELI, F.; RAJABNEJHAD, S.; ALI REZA PARTOAZAR, A.R.; MEHR, S.E. FARIDI-MAJIDI, R.; SAHEBGHARANI, M.; SYEDMORADI, L.; RAJABNEJHAD, M.R.; AMANI, A. Anti-inflammatory effects of eugenol nanoemulsion as a topical delivery system. **Pharmaceutical Development and Technology**. 1-7, 2015.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, p.136-151, 2011.

FANUN, M. Properties of microemulsions based on mixed nonionic surfactants and mixed oils. **Journal of Molecular Liquids** 150 (1–3), 25–32. 2009

FLANAGAN, J., SINGH, H. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 46 (3), 221–237, 2006.

GAYSINSKY, S., DAVIDSON, P.M., MCCLEMENTS, D.J., WEISS, J., Formulation and characterization of phytophenol-carrying antimicrobial microemulsions. **Food Biophysics** 3 (1), 54–65, 2008.

GOMES, B.S.; SOUSA-NETO, B.P.S. ; LOPES, E.M. ; CUNHA, F.V.M. ; ARAÚJO, A.R. ; WANDERLEY, C.W.S. ; WONG, D.V.T. ; LIMA-JÚNIOR, R.C. P. ; RIBEIRO, R.A. ; SOUSA, D.P. ; VENES R.M.J. ; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, F. A. . Anti-inflammatory effect of the monoterpene myrtenol is dependent on the direct modulation of neutrophil migration and oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions** , v. 273, p. 73-81, 2017.

HO, C. C.; AHMAD, K. Electrokinetic behavior of palm oil emulsions in dilute electrolyte solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, 216(1), p.25e33, 1999.

Hrkach, J.; Von-Hoff, D.; Ali, M.M.; Andrianova, E.; Auer, J.; Campbell, T. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. **Science Translational Medicine**, v.4, p.1-11, 2012.

HUANG, Q.R., YU, H.L., RU, Q.M. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science** 75 (1), R50–R57, 2010

KLANGE, V. Eletronic microscopy of nanoemulsion: anessential tool for caracterizacion na stability assessment. **Micron**. v.43, p.85-103, 2012.

LAMMERS, T.; AIME, S.; HENNINK, W.E.; STORM, G.; KIESSLING, F. Theranostic nanomedicine. **Accounts Chem Res.**, v.44, p.1029-38, 2011.

LAWAL, O.A. ; OYEDEJI, A.O. Chemical composition of the essential oils of *Cyperus rotundus* L. from South Africa, **Molecules** v.14, p.2909-2917, 2009.

LEAL-CALDERON, F., THIVILLIERS F., SCHMITT V., Structured emulsion. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v.12, p.206-212, 2007.

LEE, S.J., MCCLEMENTS, D.J.Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/ evaporation approach. **Food Hydrocolloids** 24 (6–7), 560–569, 2010.

LI, P.-H.; LU, W.-C. Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. **Food Hydrocolloids**. v. 53, p.218-224, 2016.

LIANG, R., XU, S., SHOEMAKER, C. F., LI, Y., ZHONG, F., & HUANG, Q. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, 7548-7555, 2012.

LU, W.C.; CHIANG, B.H.; HUANG, D.W.; LI, P.H. Skin permeation of d-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.21 (2), p.826-832, 2014.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Advances in Enzyme Regulation**, v.41, p.189-207, 2001.

MALMONGE, S. M.; et al. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de poliHEMA: um estudo *in vitro*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 15, n. 1-2, p. 49-54, 1999.

MARTÍN, A.; VARONA, S.; NAVARRETE, A.; COCERO, M.J. Encapsulation and coprecipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oil. **Open Chem. Eng. J.**, v.4, p.31–41, 2010.

MBIANTCHA, M.; ALMAS, J.; SHABANA, S. U.; NIDA, D.; AISHA, F. Anti-arthritis property of crude extracts of *Piptadeniastrum africanum* (Mimosaceae) in complete

Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 17:111, 2017.

MCCLEMENTS D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v.8, p.1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v.72(8), p.109-124, 2007.

MCCLEMENTS, D.J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter** 7, 2297–2316, 2011.

MCCLEMENTS, D.J., Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**. v 7 (6), p.2297-2316, 2011

MCCLEMENTS, D.J., RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.51 (4), 285-330, 2011.

MOCKUTE, D.; JUDZENTIENE, A. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania, **Biochemical Systematics and Ecology** v.31 p.1033e1045, 2003.

MORETTI, M.D.L.; SANNA-PASSINO, G.; DEMONTIS, S.; BAZZONI, F. Essential oil formulation useful as a new tool for insect pest control. *APS Pharma. Sci. Tech.*, v.3, p.1–11, 2002.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application for proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**. 63:165:55, 1983.

NGAN, L.T.; MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T.; AHN, Y.J. Growth-inhibiting, bactericidal, and urease inhibitory effects of *Paeonia lactiflora* root constituents and related compounds on antibiotic-susceptible and -resistant strains of *Helicobacter pylori*, **J. Agric. Food Chem**. v.60 p.9062-9073, 2012.

NOGUEIRA, I.A.L.; LEAO, A.B.B.; VIEIRA, M.S.; BENFICA, P.L.; BOZINIS, M.C.V. Efeito Citotóxico do *Synadeniumumbellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4:p-50-53, 2007.

OLIVEIRA, A. G de.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, 27, 1, 131-138, 2004.

OSTERTAG, F; WEISS, J; MCCLEMENTS, D.J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal Colloid Interface Science*. 388:95–112, 2012.

PASCUAL-VILLALOBOSA, M.J.; CANTÓ-TEJEROA, M.; VALLEJO, R.; GUIRAOB, P.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; COCEROC, M.J. Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. **Industrial Crops & Products**, 2017.

PRAKASH, B.; KUJUR, A.; YADAV, A.; KUMAR, A.; SINGH, P.P.; DUBEY, N.K. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, 2018.

PROVENZA, F. D.; VILLALBA, J. J. The role of natural plant products in modulating the immune system: An adaptable approach for combating disease in grazing animals. **Small Rumin. Res.** 89:131–139, 2010.

RAO, J., MCCLEMENTS, D.J. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. **J. Agric. Food Chem**, v.59 (9), p.5026-5035, 2011

RAO, J., MCCLEMENTS, D.J. Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement. **J. Agric. Food Chem**, v.58 (11), p.7059-7066, 2010

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Lemon oil solubilization in mixed surfactante solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. **Food Hydrocolloids**, 26, 268-276, 2012.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, vol. 62, p.250–264, 2014.

RIBEIRO, B.D; BARRETO, D.W.; COELHO, M.A.Z. Use of micellar extraction and cloud point preconcentration for valorization os saponins of sisal (*Agave sisalana*) wast. **Food and Bioproducts Process**, v.94, p.601-609, 2015.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.263, 2003.

SHINODA K., ARAI H. The correlation between phase inversion temperature in emulsion and cloud point in solution of nonionic emulsifier, **The Journal of Physical Chemistry.**, v.68, p.3485-3490, 1964.

SHINODA, K; SAITO, H; The effect of temperature on the phase equilibria and the type of dispersion of the ternary system composed of water, Cyclohexane and nonionic surfactant, *J. Colloid Interface Sci*; v.26, p.70-74, 1969.

SILVA, R.O.; SALVADORI, M.S.; SOUSA, F.B.M.; SANTOS, M.S.; CARVALHO, N.S.; SOUSA, D.P.; GOMES, B.S.; OLIVEIRA, F.A.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M. ALMEIDA, R.N.; MEDEIROS, J.V.R. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plantderived monoterpene alcohol, in mice, **Flavour and Fragrance Journal**, 2014.

SOLANS, C., ESQUENA, J., FORGIARINI, A.M., MORALES, D., IZQUIERDO, P., AZEMAR, N., GARCIA, M.J., Nano-emulsions: formation, properties and applications. *Surfactant Sci. Ser.* 109, 525–554, 2003.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; YUKUYAMA, M.N. PIZZINO, A. Application of Nanoemulsions in Cosmetics. **Nanoemulsions**, v.14, p435-475, 2018.

SULTANA, S.; KHAN, M.R.; KUMAR, M.; KUMAR, S.; ALI, M. Nanoparticles-mediated drug delivery approaches for cancer targeting: a review. **Journal of Drug Targeting**, v.21, p.107-25 2013.

TANG, R.; WANG, C. Synthesis and characterization of new poly (orto ester amidine) copolymers non-viral gene delivery. **Polymer.** v.52, n.7, p.921-932, 2011

TANG, S.Y.; SIVAKUMAR, M.; NG, A.M.H; SHRIDHARAN, P. Anti-inflammatory and analgesic activity of novel oral aspirin-loaded nanoemulsion and nano multiple emulsion formulations generated using ultrasound cavitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.430, p.299–306, 2012.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Adv Drug Deliv Ver.**, v.63, p.131-135, 2011.

TRUJILLO, L.S.; GRAÜ, M.A.R.; FORTUNY, R.S.; BELLOSO, O.M. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v.30, p.401-407, 2013.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 12, p. 40-53, 2012.

used for the reduction of dentin hypersensitivity. **Advances Clinical and Experimental Medicine**. 26(1):15–22, 2017.

WEISS, J., TAKHISTOV, P., MCCLEMENTS, D.J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science** 71 (9), 107–116, 2006

YU, L.; LI, C.; XU, J.; HAO, J.; SUN, D. Highly stable concentrated nanoemulsions by the phase inversion composition method at elevated temperature. **Langmuir**, v.28 (41), p. 14547-14552, 2012.

ZAHI, M.R.;WAN, P.;LIANG, H.; YUAN, Q. Formation and Stability of D-Limonene Organogel-Based Nanoemulsion Prepared by a High-Pressure Homogenizer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 62 (52), pp 12563–12569, 2014.

## Capítulo IV: Atividade anti-inflamatória da nanoformulação do monoterpeno mirtenol

### RESUMO:

O mirtenol é um monoterpeno, encontrado nos óleos essenciais de plantas aromáticas, com atividade anti-inflamatória, como *Rhodiola rosea* L., *Paeonia lactiflora* Pall, *Cyperus rotundus* L., *Tanacetum vulgare* L., *Myrtus communis* L. e *Eucalyptus citriodora* Hook. O objetivo da pesquisa foi a investigação das ações anti-inflamatórias da nanoformulação do mirtenol (NFM). Para tanto, foram realizados os testes de citotoxicidade, edema de pata induzido e peritonite induzido por carragenina, contagem total e diferencial de leucócitos, níveis de mieloperoxidase, citocinas (IL-6 e IL-8), malondialdeído e glutathiona no exsudato peritoneal e, por fim avaliar a ação do NFM no edema articular e incapacitação articular induzidas por Adjuvante Completo de Freund's em ratos. Os resultados indicam baixa citotoxicidade da NFM. O pré-tratamento dos animais com a NFM reduziu de forma significativa o edema de pata induzido por carragenina. Somado a isso, a NFM reduziu a contagem de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos, além de reduzir os níveis de mieloperoxidase e citocinas pró-inflamatórias, mas não os níveis de malondialdeído; os níveis de glutathiona foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. A NFM também foi eficaz na redução do edema articular e do tempo de elevação da pata em modelo de artrite crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund's. Conclui-se que a NFM apresenta potencial atividade anti-inflamatória aguda e crônica.

**Palavras-chave:** Nanoformulação; Mirtenol; Inflamação

### 1 INTRODUÇÃO

A inflamação corresponde ao estresse e/ou lesão do tecido, no qual envolve a migração de células do sistema imune para proteger este tecido de danos adicionais (KOTAS; MEDZHITOV, 2015). Após o reconhecimento do agente agressor pelos leucócitos residentes (mastócitos e macrófagos), ocorre liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides, óxido nítrico, dentre outros, e com isso, há formação de edema (ZHOU et. al., 2007). Simultaneamente, ocorrerá a migração de diversas células para o sítio inflamatório e lá liberam mais enzimas

e moléculas responsáveis por aumentar o fluxo sanguíneo e edema local, atrair e ativar mais leucócitos. Como exemplo, têm-se os neutrófilos, que possuem grânulos azurófilos contendo lisozimas, elastases e colagenases, responsáveis por eliminar microrganismos e outros antígenos nos tecidos. Eles estão entre as principais células de defesa do organismo, representando cerca de 70% dos leucócitos totais circulantes (LAMMERMANN et al., 2013; KAWAI, AKIRA, 2011; CHAPLIN, 2010).

A inflamação é parte integrante da maioria das condições patológicas que envolvem neutrófilos, plaquetas, macrófagos, células endoteliais e os sistemas de coagulação e complemento. Embora a inflamação atenda um papel protetor e de cura, a inflamação crônica frequentemente se torna problemas de saúde (NAGARKAR; JAGTAP, 2017).

Assim, a lesão persistente resulta em inflamação não resolvida, que avança em estágio crônico levando a distúrbios inflamatórios (KOTAS; MEDZHITOV, 2015). A inflamação crônica parece estar associada a diferentes tipos de doenças. Essa resposta desempenha um papel central na patogênese de vários distúrbios, como artrite reumatoide, câncer, diabetes, obesidade, complicações cardiovasculares etc., e seu impacto e papel na patogênese podem variar de doença para doença (DEVI et al., 2015).

A artrite reumatoide é uma doença autoimune que afeta aproximadamente 1% da população em todo o mundo. A artrite é caracterizada por inflamação crônica e simétrica das articulações sinoviais, levando a destruição das articulações, dor crônica, perda de função e deficiência (FIRESTEIN, 2003; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

As terapias disponíveis, como anti-inflamatórios esteroides e não-esteroidais (AINEs), têm vários efeitos secundários adversos, como danos ao trato gastrointestinal, azia, náuseas, úlceras gástricas e duodenais, etc. (PATWARDHAN et al., 2005; MCGETTIGAN; HENRY, 2011). Portanto, a busca por novos medicamentos anti-inflamatórios e a identificação de terapias efetivas ainda é um campo importante na descoberta de drogas.

Desde a antiguidade, as condições inflamatórias e os distúrbios relacionados foram tratados com plantas ou formulações derivadas de plantas. Além disso, inúmeros produtos naturais ricos em substâncias antioxidantes apresentam efeitos protetores contra a inflamação. As atividades anti-inflamatórias de vários extratos de plantas e compostos isolados já foram cientificamente demonstradas (MUELLER et al., 2010).

Nesse contexto, destaca-se o mirtenol, um monoterpene encontrado no óleo essencial de diversas plantas aromáticas, como por exemplo *Rhodiola rosea* L., *Paeonia*



*lactiflora* Pall, *Cyperus rotundus*. L., *Tanacetum vulgare* L., *Myrtus communis* L. e *Eucalyptus citriodora* Hook. Dentre suas atividades farmacológicas comprovadas, destaca-se a atividade anti-inflamatória, cujo principal mecanismo dessa ação consiste na modulação da migração de leucócitos (GOMES et al., 2017).

Nos últimos anos, a ciência tem se dedicado à pesquisa com o uso de substâncias oriundas de produtos naturais com ação anti-inflamatórias em nanoformulações. (KUANG et al. 2006; YU et al. 2008; DU et al. 2007). Nanoformulações são sistemas heterogêneos, medindo 20 a 200 nm de diâmetro, compostos de uma fase aquosa e uma fase oleosa. As nanoformulações à base de óleo-água têm várias vantagens em relação a outros fármacos com limitações de solubilidade (HE et al, 2011; OSTERTAG et al., 2012). Essas preparações tornam-se ideais para a entrega de fármacos com pouca solubilidade e, além disso, há um aumento na relação superfície-volume de nanoformulações, o que aumenta o transporte de fármaco através das membranas celulares, obtendo entrega direcionada e prolongando a liberação de fármacos (MEI; ZHANG; ZHAO, 2013; CHEN; GAO; CHEN, 2012). Outra vantagem é que nanoemulsões são facilmente sintetizadas; portanto, esta é uma técnica promissora para a industrialização e aplicação pré-clínica e clínica (KOTTA et al., 2014; SUN et al., 2014).

O desenvolvimento de nanoformulações adequados à aplicação farmacêutica requer a seleção adequada dos seus adjuvantes tais como polímeros para nanocápsulas (NC), tensoativos e óleos (SCHAFFAZICK et al., 2003; ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001; BOUCHEMAL et al., 2004; FRIEDRICH et al., 2008). Nos últimos anos, uma atenção especial foi destinada ao tipo de fase oleosa utilizada como núcleo na preparação de nanoformulações. Nesse contexto, os óleos essenciais foram os que se mostraram mais adequados devido ao conceito de que são mais seguros, biocompatíveis e, principalmente, devido à diversidade de benefícios apresentados por eles. (HARRIS, 2002; BLOISE, 2003; TADROS, KESSELL, 2004; BAKKALI et al., 2008; OYEDEJI, OKEKE, 2010; CONTRI et al, 2012; HILBIG et al., 2016).

Além disso, a administração oral de nanoformulações pode minimizar a gravidade dos efeitos colaterais relacionados com o fármaco e reduzir o metabolismo de primeira passagem e assim manter o nível de fármaco no plasma por um período de tempo mais longo. Assim, uma formulação de nanoemulsão com boa estabilidade pode ser útil no tratamento de inflamação e dor. Mais importante ainda, as nanoformulações seriam uma abordagem eficiente, conveniente e flexível, em conformidade com os atuais comprimidos e cápsulas de drogas (TANG et al, 2012).

Baseado nos resultados apresentados pelo mirtenol na forma livre (GOMES et al, 2017), o presente trabalho tem como objetivo a investigação da atividade anti-inflamatória da NFM e dos possíveis mecanismos de ação desta atividade em modelos pré-clínicos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Drogas e reagentes**

$\lambda$ -carragenina (Sigma Chemical, EUA), adjuvante completo de Freund (Sigma, USA), indometacina (Sigma Chemical, EUA), Tween 80 (Sigma Chemical, EUA), líquido de Turk (NewProv, BR) e corante panótico (Laborclin, BR). Heparina foi fornecida pela Merck, São Paulo, Brasil. Todos os fármacos já citados foram dissolvidos em 0,9% (w/v) de NaCl (salina).

### **2.2 Animais**

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), variedade Swiss, adultos, machos, pesando entre 18-25g e ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar de ambos os sexos, pesando entre 180-220g, obtidos da Universidade Federal do Piauí- UFPI, biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – NPPM. Os animais foram alojados em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada (22+1 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas (12 h de luz/12 h no escuro) com livre acesso à água e dieta padrão. Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.). Os tratamentos, procedimentos cirúrgicos e protocolos experimentais foram conduzidos em conformidade ao Parágrafo 1º. do Art. 14 da Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 do CFMV, e segundo as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e os procedimentos experimentais envolvendo animais estão sob a responsabilidade técnica da médica veterinária, Dra. Adeline de Andrade Carvalho CRMV-PI Nº 866-VP. O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí, Brasil (protocolo nº 138/16). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

## 2.3 Ensaios Farmacológicos

### 2.3.1 Efeito da NFM diante da citotoxicidade sobre macrófagos

A citotoxicidade da NFM foi avaliada utilizando o teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Em placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado e cerca de  $2 \times 10^5$  macrófagos por poço. Essas células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 h para adesão celular. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio RPMI suplementado para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de RPMI 1640 suplementado juntamente com a solução de NFM diluída nas concentrações de 800 a 6,25 µg/mL. Em seguida foram incubadas por 48 h e, ao final da incubação foi adicionado 10 µL de MTT diluído em meio RPMI a 5 mg/mL. Foram incubados por mais 4 h em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, e em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de DMSO em todos os poços. Em seguida, a placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline (modelo AK 0506), à temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) sendo o grupo controle, células não tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular (NOGUEIRA et al., 2007). Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) com limite de confiança de 95%, foram calculadas utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13.0.

### 2.3.2 Toxicidade oral aguda de NFM

A avaliação toxicológica foi realizada de acordo com a Diretriz da OCDE no. 423 (OCDE 2002). Camundongos Swiss de ambos os sexos foram separados em grupos de 3 animais e depois tratados com NFM na dose de 2000 mg / kg (v.o.). Posteriormente, os animais foram submetidos a observação clínica e comportamental durante 8 horas durante o primeiro dia de tratamento. Em seguida, os animais foram observados diariamente durante 2 horas em um período de 14 dias.

### 2.3.3 Efeito da nanoformulação do mirtenol (NFM) sobre o edema de pata induzido por carragenina

Ratos Wistar foram divididos em seis grupos (n=6 animais) e receberam uma injeção intraplantar de 0,1 mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. Os animais foram tratados, via oral, com veículo, NFM (12,5, 25, 50 e 100 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) e, após 1h, receberam a carragenina. A espessura das patas será registrada por paquímetro (Pantec®) em diferentes tempos (1, 2, 3, 4 e 5 h) após a administração intraplantar de carragenina. O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre a espessura final e inicial da pata (WINTER et al., 1962).

### 2.3.4 Efeito da NFM na peritonite induzida por carragenina

Camundongos Swiss foram divididos em seis grupos (n=10) de acordo com o pré-tratamento oral com veículo, indometacina (10 mg/kg, grupo 3) ou NFM (12,5, 25 e 50 mg/kg). Após trinta minutos, os animais dos grupos receberam administração i.p. de carragenina (250 µL; 500 µg/cavidade) e após 4 horas, os animais foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) heparinizado 0,2% para a análise peritoneal de células. Os volumes recuperados foram semelhantes em todos os grupos experimentais e eram equivalentes a 95% do volume injetado. As contagens de células totais foram realizadas em câmara de Neubauer, e as contagens diferenciais (100 células total) foram realizadas em lâminas de citocentrífuga coradas com hematoxilina e eosina (H & E). Os resultados foram apresentados como o número de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos por mililitro (mL) de exsudato peritoneal, como proposto por DAL SECCO e colaboradores (2006). Alíquotas de exsudatos peritoneais foram colhidas para análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), dos níveis de glutathiona (GSH), malondialdeído (MDA) e as concentrações de IL-6, IL-8.

#### 2.3.4.1 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

O ensaio da atividade da enzima MPO foi baseado no método de Bradley et al., (1982). Foram centrifugados 400 µL de exsudato peritoneal a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Depois, 10 µL do sobrenadante foram recolhidos e a atividade da MPO determinada por medição da alteração na absorvância a 450 nm, utilizando o-dihidroclorato dianisidina e 1% peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os resultados foram

expressos em unidades/mL. Uma unidade de atividade de MPO foi definida como a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogénio a água em 1 min a 22 ° C.

#### 2.3.4.2 Dosagem das interleucinas 6 (IL-6) e 8 (IL-8)

Os níveis de IL-6 e IL-8 foram determinados a partir do exsudato peritoneal, utilizando ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) de acordo com as especificações e protocolos do DuoSet ELISA Development kit R&D Systems. Os resultados foram expressos como picogramas de cada citocina por mililitro de exsudato peritoneal (pg/mL).

#### 2.3.4.3 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA)

As concentrações de MDA no exsudato peritoneal foram medidas de acordo com Mihara e Uchiyama, (1978). Resumidamente, alíquotas (500  $\mu\text{L}$ ) do exsudato peritoneal foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C, em seguida, 250  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de ácido fosfórico a 1% ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6% (solução aquosa). Em seguida, esta mistura foi agitada e aquecida em banho-maria durante 45 min. Posteriormente, as amostras foram levadas imediatamente a um recipiente com água gelada seguido pela adição de 4 mL de n-butanol. As amostras foram agitadas, e a camada de butanol foi separada por centrifugação a 1200 g durante 15 min e a absorvância foi lida em 520 e 535 nm no espectrofotômetro. As concentrações de MDA foram expressas como mmol/mL de exsudato.

#### 2.3.4.4 Análise das concentrações de glutathiona (GSH)

A medição das concentrações de GSH foram feitas segundo SEDLAK e LINDSAY (1968). Inicialmente, 400  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante de exsudado peritoneal foram misturadas a 320  $\mu\text{L}$  de água destilada e a 80  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado a 800 $\mu\text{L}$  de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20  $\mu\text{L}$  de ácido ditio-nitrobenzoico DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorvância lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de GSH foram expressas em  $\mu\text{g/mL}$  de exsudato.

### 2.3.5 Efeito da NFM sobre a monoartrite crônica induzida por adjuvante completo de Freund (ACF) em ratas

Essa variação do modelo clássico de artrite induzida por adjuvante descrito por Pearson (1956) difere basicamente por se tratar de uma monoartrite e foi proposto por Gomes (2008). Consta de uma dose inicial de ACF em baixa concentração na base da cauda, seguida de uma dose *booster* ou artritogênica igual à primeira, que em geral é feita na articulação tíbio-társica ou na articulação femorotibial. É um modelo de artrite crônica, mas que se presta a avaliação de parâmetros também em fase aguda e sub-aguda. Ratas Wistar receberam injeção s.c. na base da cauda com 50 µL de adjuvante completo de Freund (SIGMA) contendo 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*. Após 21 dias, as ratas foram divididas em 6 grupos (n = 6 a 9) e tratadas, via oral, com veículo (salina 0,9%, 0,1 mL/10 g), NFM (12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.) ou indometacina (10 mg/kg) em salina e imediatamente receberam uma injeção *booster* semelhante à primeira dose na articulação tíbio-társica direita. O dia da aplicação da segunda dose foi considerado o dia inicial da artrite (D0).

### 2.3.6 Efeito da NFM sobre o edema inflamatório na monoartrite crônica induzida por ACF

As ratas foram avaliadas imediatamente antes da aplicação da dose *booster*, de 1/1 h nas cinco horas imediatamente após (D0) e no (D1) (protocolo fase aguda); nos (D3), (D5) e (D7) (protocolo de fase sub-aguda) e nos (D10) e (D14) (fase crônica). Nesse ensaio, a incidência e severidade da artrite foram avaliadas através da medida de espessura da pata traseira direita com um paquímetro (Pantec®), com todas as medidas feitas por um mesmo observador e em duplicata (PEARSON, 1956).

### 2.3.7 Avaliação da NFM sobre a incapacitação articular induzida por ACF em ratas

Concomitantemente à avaliação sobre o edema induzido por ACF, foi avaliado o grau de incapacitação articular motora do membro que recebeu o ACF. Para isso, foi utilizado o modelo de incapacitação articular, em ratos, descrito por Tonussi e Ferreira (1992). O sistema de registro é feito por meio do incapacitômetro (Insight®), que é constituído por um cilindro de aço inox, que apresenta rotação contínua a uma velocidade de 3 r.p.m. A superfície do cilindro é dividida em três trilhos iguais, cada qual ligado ao fio terra de um computador, o que permite a análise de três animais simultaneamente. Sapatilhas metálicas foram ajustadas em ambas as patas posteriores, sendo que, apenas a

sapatilha que esteve na pata posterior direita foi conectada à porta de entrada de dados do computador. Após a colocação das sapatilhas, os animais foram mantidos em suas respectivas caixas, por pelo menos 1h, para adaptação. Para registrar o estado funcional das articulações, os animais foram submetidos à marcha forçada, no cilindro em rotação, por um período de 60 segundos. O computador registra o tempo total que a pata posterior direita dos animais permanece sem tocar a superfície do cilindro neste período (Tempo de Elevação da Pata - TEP, em segundos). Em todos os procedimentos experimentais os animais foram treinados a caminhar no aparelho de registro no dia anterior ao teste. Para validar o experimento, animais normais foram submetidos à marcha no incapacitômetro (Insight®). Os dados foram apresentados como a média entre os valores do TEP de pelo menos cinco animais, obtidos a cada hora após a injeção do ACF.

#### **2.4 Análise estatística**

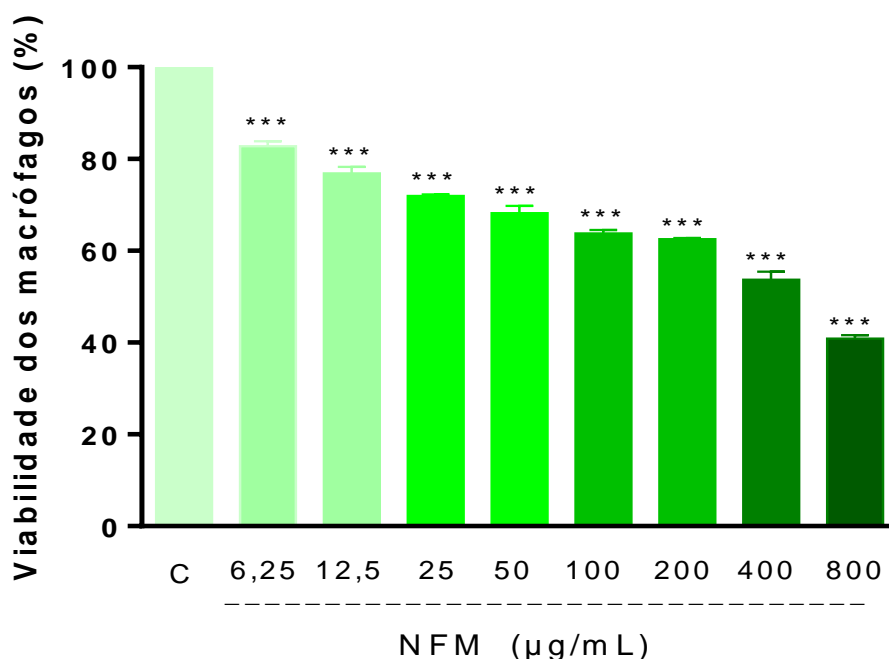
Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Para comparação entre as médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e a significância entre os grupos estabelecida pelos testes de Student Newman-Keuls. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Efeito da NFM diante da citotoxicidade sobre macrófagos**

A NFM (50 mg/kg) apresentou uma baixa toxicidade sobre os macrófagos pelo método do MTT apresentando  $CC_{50}$  de  $485,693 \mu\text{g/mL}$  (**Figura 1**).

**Figura 1** - Efeito citotóxico da NFM sobre macrófagos peritoneais murinos. Macrófagos foram incubados por 48 h na presença de diferentes concentrações de NFM. A viabilidade dos macrófagos foi mensurada pelo sal tetrazóico (MTT). Resultados representam média  $\pm$  E.P.M realizados em triplicata. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs controle (C), células não tratadas, (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).



### 3.2 Toxicidade oral aguda de NFM

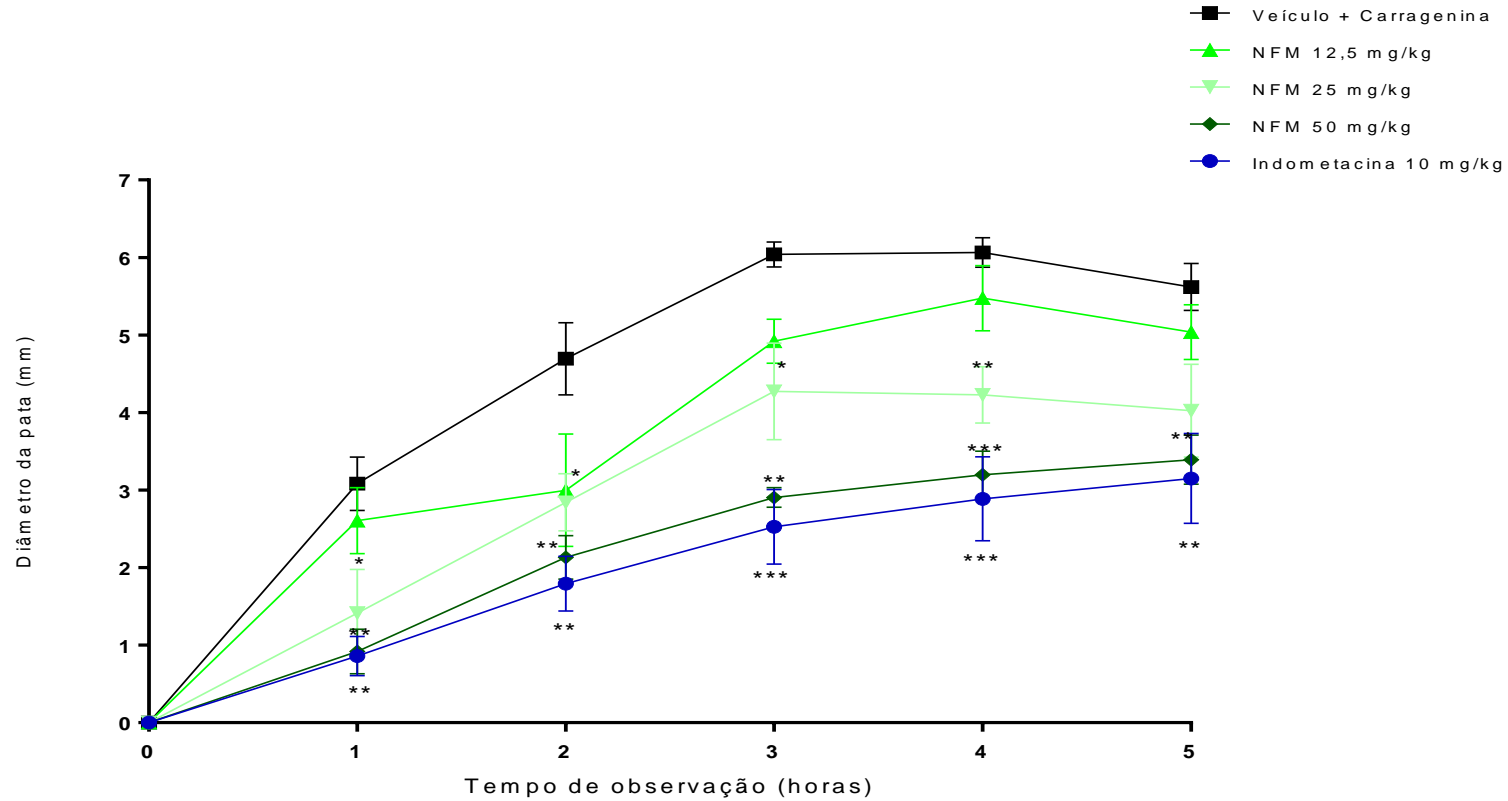
Os resultados observados não revelaram sinais de toxicidade sistêmica após a administração da NFM na dose de 2000 mg/kg (v.o). Não foram observadas mortes e nem alterações de comportamento durante o tempo de observação de 14 dias.

### 3.3 Efeito da nanoformulação do mirtenol (NFM) sobre o edema de pata induzido por carragenina

A **figura 2** e a **tabela 1** mostram que a dose de 12,5 mg/kg da NFM produziu inibição significativa apenas na primeira hora. A dose de 25 mg/kg da NFM inibiu de forma significativa o edema da 1ª à 4ª hora de observação (\* $p < 0,05$ ). O pré-tratamento dos animais com NFM (50 mg/kg) inibiu significativamente (\*\* $p < 0,01$ ) o edema elicitado por carragenina (1%) nas cinco horas de observação, quando comparado ao veículo, efetivando-se como a melhor dose da nanoformulação. A indometacina (10 mg/kg), anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) padrão, foi capaz de reduzir o edema em todos os tempos observados (\*\* $p < 0,001$ ).



**Figura 2** - Efeito da NFM (12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 %; 0,1 mL, i.pl.) em ratos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e Teste de Student Newman Keuls).



**Tabela 1:** Efeito da NFM (12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 %; 0,1 mL, i.pl.) em ratos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 e \*\*\* $p$ <0,001 vs veículo (ANOVA one way e Teste de Student Newman Keuls).

<b>Edema de pata (mm)</b>					
<b>Tratamento (mg/kg, v.o.)</b>	<b>Intervalo de tempo</b>				
	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>3h</b>	<b>4h</b>	<b>5h</b>
<b>Veículo</b>	3.1 $\pm$ 0,30	4,69 $\pm$ 0,46	6,04 $\pm$ 0,16	6,06 $\pm$ 0,19	5,62 $\pm$ 0,30
<b>NFM (12,5)</b>	2,6 $\pm$ 0,40*	2,99 $\pm$ 0,72	4,92 $\pm$ 0,28	5,47 $\pm$ 0,42	5,03 $\pm$ 0,35
<b>NFM (25)</b>	1,4 $\pm$ 0,60*	2,84 $\pm$ 0,36*	4,27 $\pm$ 0,62*	4,22 $\pm$ 0,36*	4,02 $\pm$ 0,59
<b>NFM (50)</b>	0,90 $\pm$ 0,30**	2,13 $\pm$ 0,28**	2,90 $\pm$ 0,12**	3,19 $\pm$ 0,30***	3,39 $\pm$ 0,31***
<b>Indometacina (10)</b>	0,90 $\pm$ 0,30**	1,79 $\pm$ 0,35**	2,52 $\pm$ 0,48***	2,88 $\pm$ 0,54***	2,55 $\pm$ 0,72***

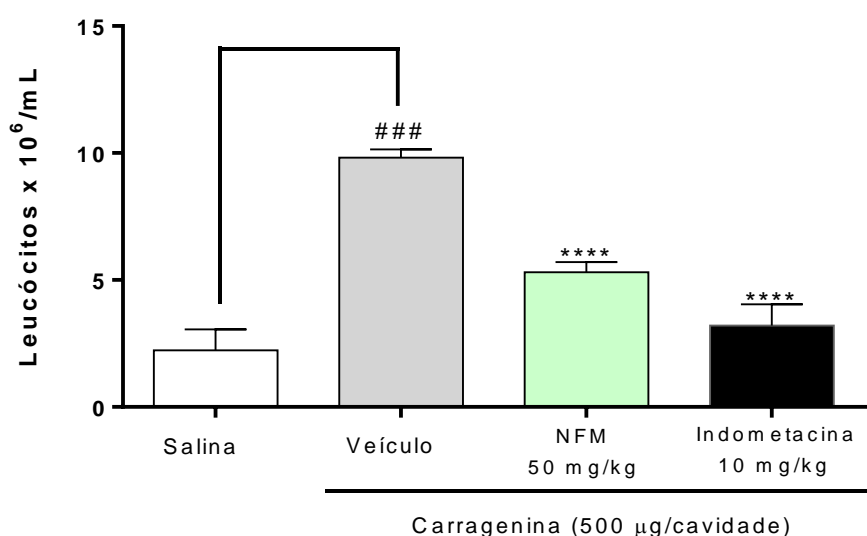
### 3.4 Efeito da NFM no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos.

A injeção intraperitoneal de carragenina 1% (500  $\mu$ g/cavidade) nos camundongos produziu um aumento significativo no número total de leucócitos para a cavidade peritoneal (9,81 $\pm$ 0,30), quando comparado ao grupo salina (2,23 $\pm$  0,33). NFM (50 mg/kg, v.o.) e a indometacina (10 mg/kg, v.o.) reduziram de forma significativa (\*\* $p$ <0,001) a migração de leucócitos peritoneais (5,30 $\pm$ 0,40 e 3,20 $\pm$ 0,34, respectivamente) induzida por carragenina (500  $\mu$ g/cavidade), quando comparados ao grupo controle veículo (**Figura 3**).

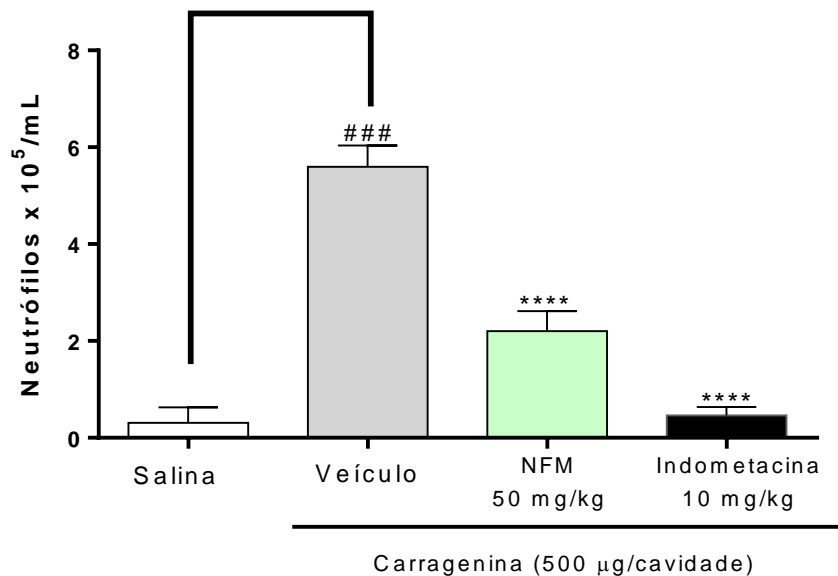
A NFM (50 mg/kg, v.o.) diminuiu de maneira significativa ( $p$ <0,05) a migração de neutrófilos (2,20  $\pm$  0,41) (**Figura 4**) na cavidade peritoneal quando comparado ao grupo controle veículo (5,60 $\pm$ 0,42). A indometacina (10 mg/kg, v.o.) também diminuíram de maneira significativa ( $p$ <0,05) a migração de neutrófilos (0,46  $\pm$ 0,07).

Como mostrado na **Figura 5**, o número de monócitos na cavidade peritoneal também foi reduzido de maneira significativa pela NFM (50 mg/kg, v.o.) ( $p$ <0,05) (1,97  $\pm$  0,19) na cavidade peritoneal quando comparado ao grupo controle veículo (3,23 $\pm$ 0,41). O pré-tratamento com a indometacina (10 mg/kg, v.o.) também diminuiu de maneira significativa ( $p$ <0,05) a migração de monócitos (1,41 $\pm$ 0,18).

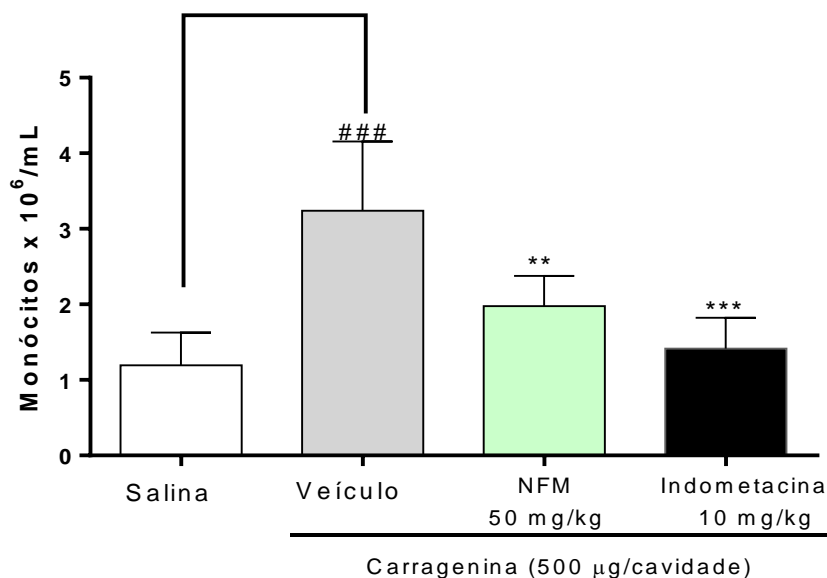
**Figura 3** - Efeito da NFM (50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.) no número total de leucócitos em peritonite induzida por carragenina (500 $\mu$ g/cavidade, i.p.) em camundongos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. ### $p$ <0,001 controle veículo vs salina e \*\*\* $p$ <0,001 vs veículo (ANOVA one way e Teste de Newman Keuls).



**Figura 4** - Efeito da NFM (50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.) no número de neutrófilos em peritonite induzida por carragenina (500µg/cavidade, i.p.) em camundongos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. <sup>###</sup> $p < 0,001$  controle veículo vs salina, <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$  e <sup>\*\*\*\*</sup> $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e Teste de Newman Keuls).



**Figura 5** - Efeito da NFM (50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.) no número de monócitos em peritonite induzida por carragenina (500µg/cavidade, i.p.) em camundongos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. <sup>###</sup> $p < 0,001$  controle veículo vs salina, <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$  e <sup>\*\*\*\*</sup> $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e Teste de Newman Keuls).

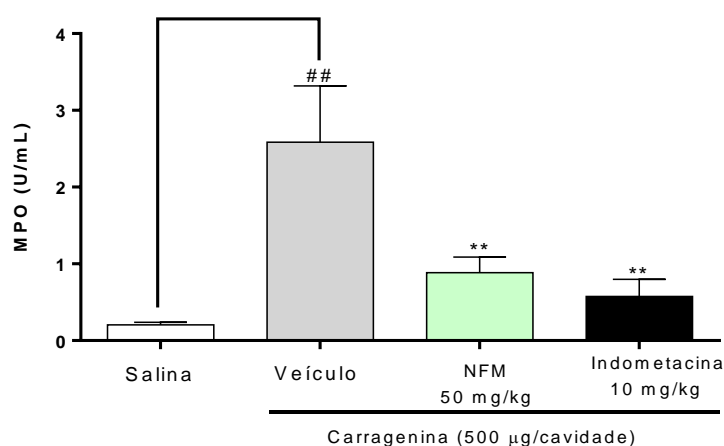


### 3.5 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A **Figura 6** mostra que a atividade da MPO encontra-se aumentada nos grupos pré-tratados com veículo (2,58 ± 0,73 U/mL) mais carragenina (500 µg/250 µL por

cavidade, i.p.), em comparação ao grupo que apenas recebeu salina ( $0,20 \pm 0,03$  U/mL), sem a indução por carragenina. Através da análise dos resultados obtidos nos grupos pré-tratados com NFM (50 mg/kg), observa-se que houve redução da atividade da MPO ( $0,88 \pm 0,20$  U/mL,  $p < 0,01$ ), resultado semelhante ao que foi encontrado nos grupos indometacina 10 mg/kg ( $0,57 \pm 0,22$  U/mL,  $p < 0,01$ ).

**Figura 6** - Efeito da NFM (50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.) na atividade da mieloperoxidase em peritonite induzida por carragenina (500 $\mu$ g/cavidade, i.p.) em camundongos. Os valores estão expressos como porcentagem de inibição e média  $\pm$  E.P.M. ## $p < 0,01$  controle veículo vs salina, \* $p < 0,05$  vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Newman Keuls).

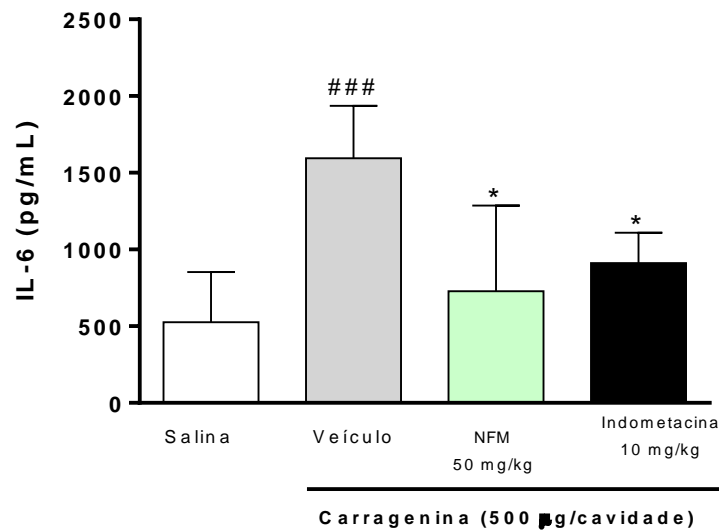


### 3.6 Dosagem das interleucinas 6 (IL-6) e 8 (IL-8)

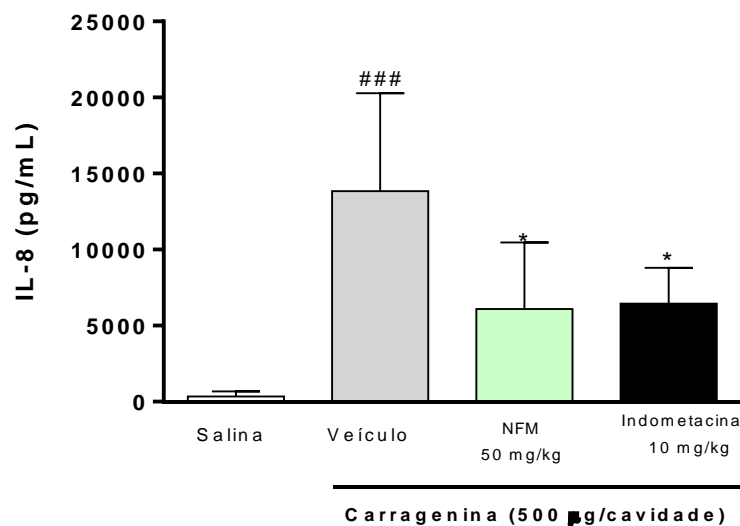
Como explicitado pela **Figura 7**, houve significativa diminuição das concentrações de IL-6 e IL-8 no exsudato do peritônio dos camundongos pré-tratados com NFM (50 mg/kg) ( $727,96 \pm 279,5$  pg/mL e  $6087,0 \pm 1963$  pg/mL, respectivamente), em comparação ao grupo que recebeu veículo ( $1595,0 \pm 170,5$  pg/mL de IL-6; e  $13850 \pm 3216$  pg/mL de IL-8). Este resultado foi similar aos valores encontrados nos grupos pré-tratados com indometacina ( $911,1 \pm 99,0$  pg/mL de IL-6,  $p < 0,05$ ; e  $6458 \pm 1349$  pg/mL de IL-8,  $p < 0,05$ ) e animais que receberam apenas salina ( $525,5 \pm 164,2$  pg/mL de IL-6; e  $350,4 \pm 165,8$  pg/mL de IL-8).

**Figura 7:** Efeito da NFM (50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.) nos níveis de IL-6 (7A) e IL-8 (7B) em peritonite induzida por carragenina em camundongos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.  $###p < 0,001$  controle veículo vs salina,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Newman Keuls).

A



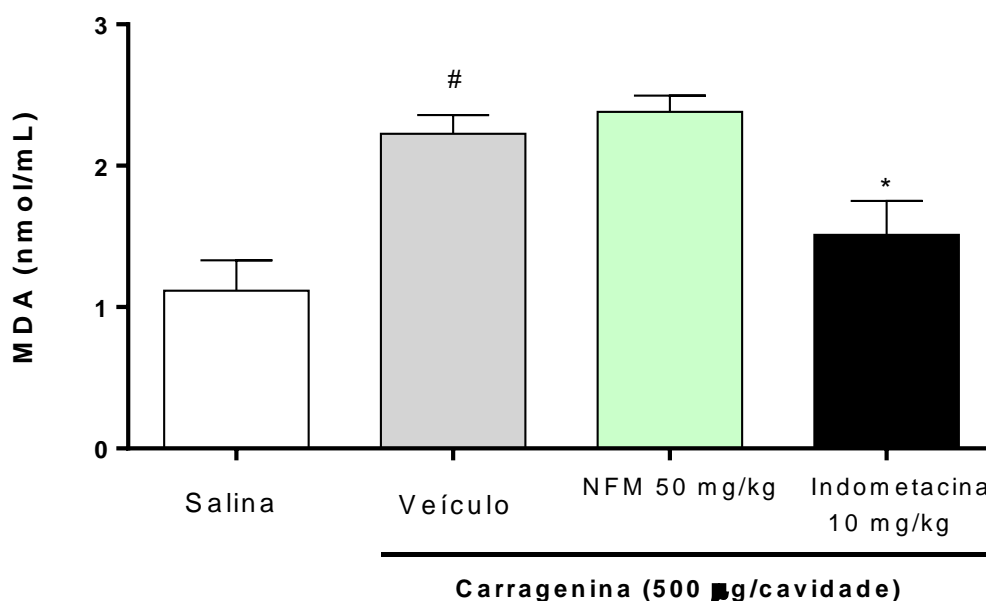
B



### 3.7 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA)

Após a indução da peritonite pela carragenina, observou-se o aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) (**Figura 8**) nos grupos veículo mais carragenina ( $2,226 \pm 0,133$  nmol/mL), em comparação ao grupo salina ( $1,115 \pm 0,2161$  nmol/mL). O grupo pré-tratado com indometacina exibiu diminuição nos níveis de MDA ( $1,512 \pm 0,240$  nmol/mL,  $p < 0,05$ ). Nos animais pré-tratados com NFM na dose de 50 mg/kg, contudo, não observou-se redução dos níveis de MDA quando comparado ao veículo.

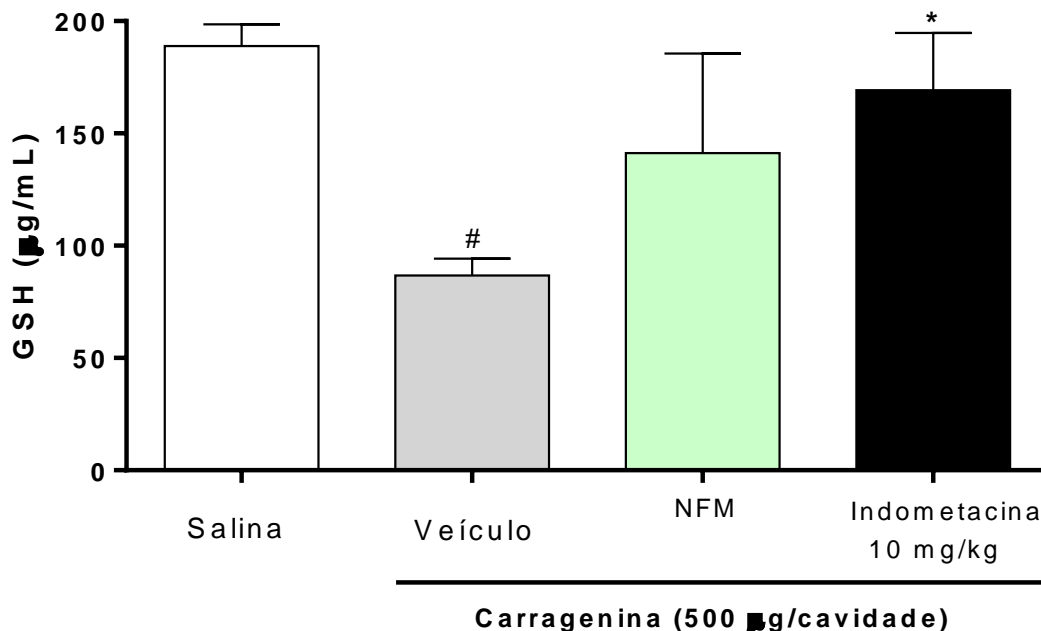
**Figura 8** - Efeito da NFM (50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.) na atividade da malondialdeído em peritonite induzida por carragenina (500µg/cavidade, i.p.) em camundongos. Os valores estão expressos como porcentagem de inibição e média  $\pm$  E.P.M.  $^{##}p < 0,01$  controle veículo vs salina,  $^*p < 0,05$  vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Newman Keuls).



### 3.8 Análise das concentrações de glutathiona (GSH)

Na **Figura 9**, observam-se as dosagens de GSH nos grupos que receberam pré-tratamento oral com NFM, bem como os controles indometacina, veículo e salina. Assim, pode-se analisar que houve manutenção dos níveis de GSH nos animais pré-tratados com o NFM ( $141,21 \pm 26,08$  µg/mL) em comparação ao grupo veículo mais carragenina ( $86,76 \pm 7,50$  µg/mL). Este resultado é semelhante aos achados nos grupos indometacina ( $169,20 \pm 25,53$  µg/mL) e salina ( $188,9 \pm 9,61$  µg/mL).

**Figura 9** - Efeito da NFM (50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.) na atividade da glutathiona peroxidase em peritonite induzida por carragenina (500µg/cavidade, i.p.) em camundongos. Os valores estão expressos como porcentagem de inibição e média  $\pm$  E.P.M.  $^{##}p<0,01$  controle veículo vs salina,  $^*p<0,05$  vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Newman Keuls).

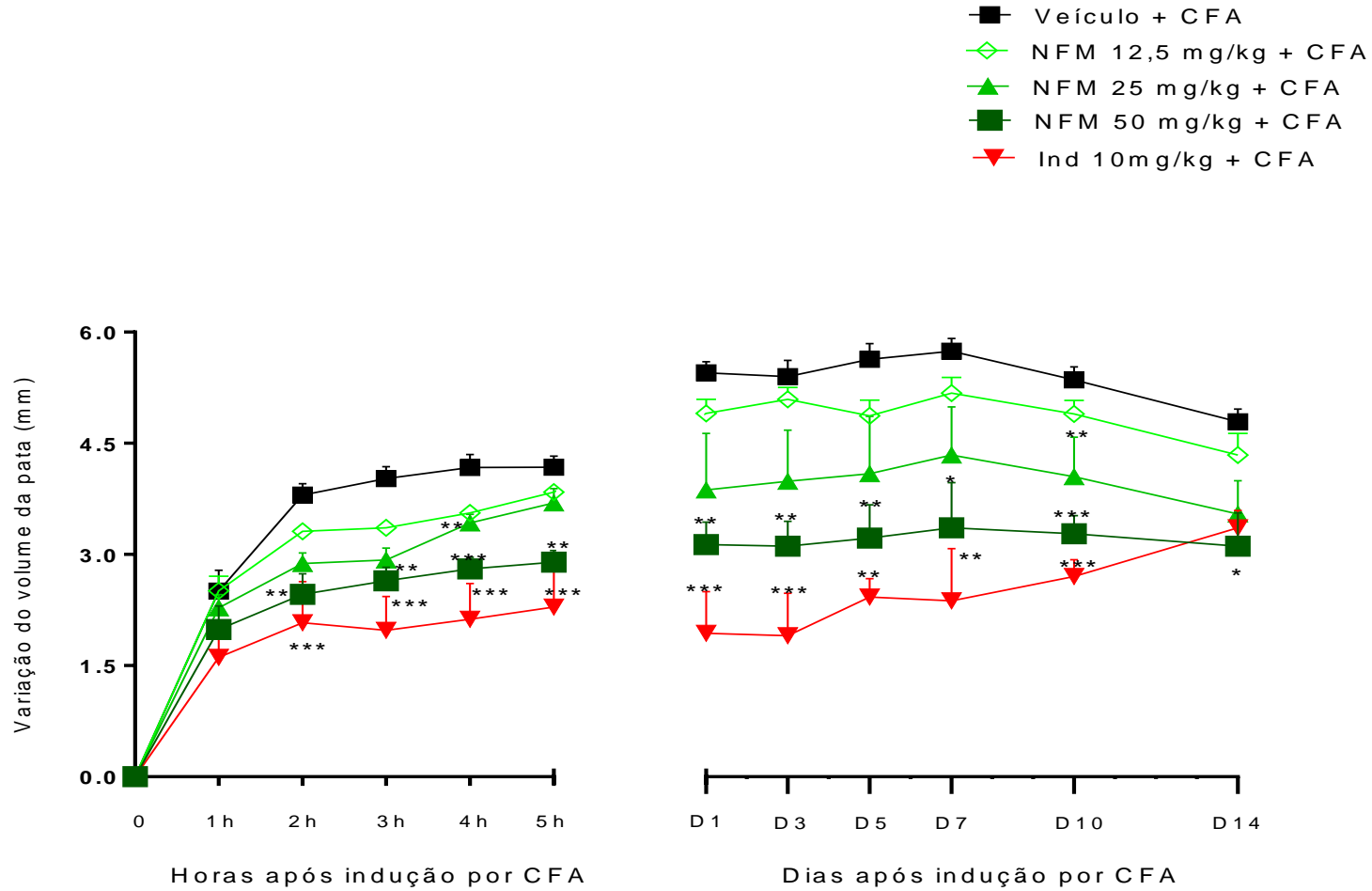


### 3.9 Efeito da NFM sobre o edema inflamatório na monoartrite crônica induzida por ACF

A **figura 10** mostra que o pré-tratamento dos animais com NFM (50 mg/kg) inibiu significativamente ( $^{**}p<0,01$ ) o edema articular elicitado por ACF nas primeiras horas e nos 15 dias de observação, quando comparado ao veículo. As doses de 12,5 e 25 mg/kg da NFM não mostrou inibição significativa apenas na primeira hora. A indometacina (10 mg/kg), anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) padrão, foi capaz de reduzir o edema em todos os tempos observados ( $^{***}p<0,001$ ) (**Tabela 2**).



**Figura 10:** Efeito da NFM (12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.), indometacina (Ind 10 mg/kg, v.o.) sobre o edema articular induzido por ACF (50  $\mu$ L + 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, i.ar.) em ratos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 e \*\*\* $p$ <0,001 vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Student Newman Keuls).



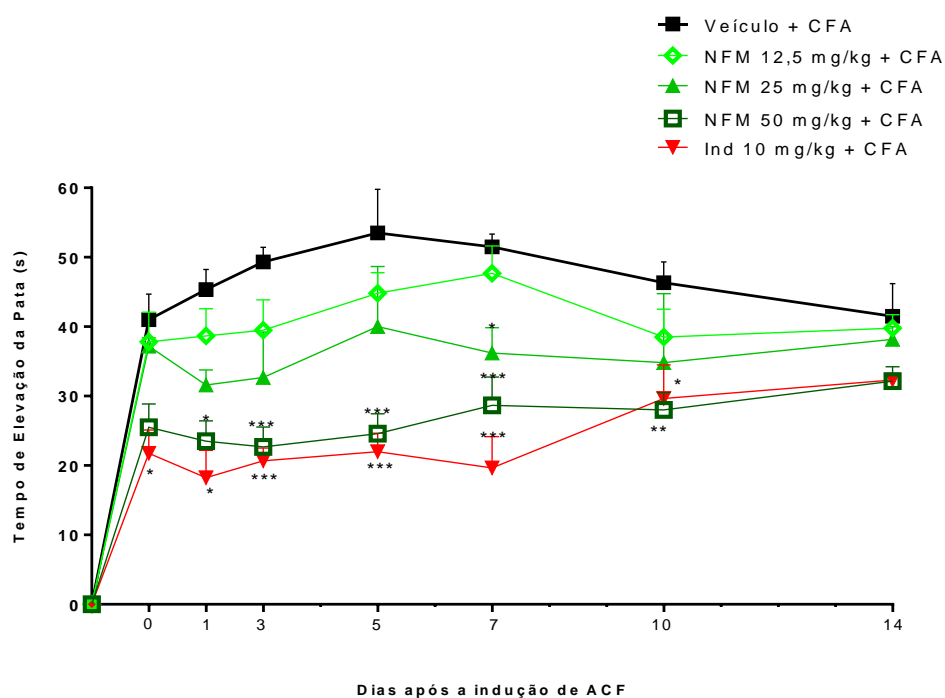
**Tabela 2:** Efeito da NFM (12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por ACF (50  $\mu$ L + 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, i.ar.) em ratas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 e \*\*\* $p$ <0,001 vs veículo (ANOVA one way e Teste de Student Newman Keuls).

Edema de pata (mm)					
Tratamento (mg/kg, v.o.)	Intervalo de tempo				
	Veículo	NFM (12,5)	NFM (25)	NFM (50)	Indometacina (10)
<b>1h</b>	2,50 $\pm$ 0,28	2,50 $\pm$ 0,19	2,27 $\pm$ 0,18	1,98 $\pm$ 0,31*	1,61 $\pm$ 0,44*
<b>2h</b>	3,8 $\pm$ 0,15	3,31 $\pm$ 0,07	2,87 $\pm$ 0,14	2,46 $\pm$ 0,27**	2,08 $\pm$ 0,55***
<b>3h</b>	4,02 $\pm$ 0,15	3,36 $\pm$ 0,07	2,92 $\pm$ 0,15	2,64 $\pm$ 0,18**	1,97 $\pm$ 0,45***
<b>4h</b>	4,17 $\pm$ 0,17	3,56 $\pm$ 0,10	3,42 $\pm$ 0,11**	2,80 $\pm$ 0,15***	2,12 $\pm$ 0,48***
<b>5h</b>	4,17 $\pm$ 0,15	3,84 $\pm$ 0,06	3,69 $\pm$ 0,19	2,89 $\pm$ 0,15***	2,29 $\pm$ 0,51***
<b>D1</b>	5,45 $\pm$ 0,14	4,90 $\pm$ 0,18	3,87 $\pm$ 0,76	3,13 $\pm$ 0,30**	1,93 $\pm$ 0,56***
<b>D3</b>	5,40 $\pm$ 0,21	5,09 $\pm$ 0,16	3,98 $\pm$ 0,68	3,11 $\pm$ 0,33**	1,90 $\pm$ 0,57***
<b>D5</b>	5,63 $\pm$ 0,21	4,87 $\pm$ 0,20	4,09 $\pm$ 0,77	3,22 $\pm$ 0,44**	2,42 $\pm$ 0,24**
<b>D7</b>	5,74 $\pm$ 0,17	5,17 $\pm$ 0,21	4,34 $\pm$ 0,65	3,36 $\pm$ 0,61*	2,37 $\pm$ 0,70**
<b>D10</b>	5,35 $\pm$ 0,17	4,89 $\pm$ 0,18	4,05 $\pm$ 0,53**	3,28 $\pm$ 0,24***	2,70 $\pm$ 0,22***
<b>D14</b>	4,79 $\pm$ 0,17	4,34 $\pm$ 0,29	3,54 $\pm$ 0,44	3,11 $\pm$ 0,44*	3,36 $\pm$ 0,23*

### 3.10 Avaliação do mirtenol sobre a incapacitação articular induzida por ACF em ratas

A injeção de ACF (50  $\mu$ L + 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, i.ar.) na articulação tíbiotársica dos animais provocou incapacitação articular evidenciado pelo aumento no tempo de elevação das patas, quando comparado aos animais normais. O grupo pré-tratado com mirtenol (50 mg/kg) mostrou significativa diminuição no TEP nos 15 dias de observação, quando comparado ao veículo ( $p < 0,05$ ). A indometacina (10 mg/kg) foi capaz de reduzir o TEP em todos os tempos observados ( $*p < 0,05$ ) (**Figura 11**).

**Figura 11:** Efeito da NFM (12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.), indometacina (Ind 10 mg/kg, v.o.) sobre a incapacitação articular induzida por ACF (50  $\mu$ L + 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, i.ar.) em ratas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Student Newman Keuls).



#### 4 DISCUSSÃO

O principal mecanismo de ação da atividade anti-inflamatória do mirtenol é a sua inibição da migração leucocitária e atividade moduladora do estresse oxidativo (GOMES, 2017). Contudo, não se encontram na literatura estudos correlacionados à propriedade anti-inflamatória da nanoformulação do mirtenol em modelos experimentais que mimetizem uma resposta inflamatória, fato que garante o ineditismo deste trabalho.

Substâncias constituintes de plantas, como o mirtenol, apresentam propriedades farmacológicas importantes e ganharam terreno no campo farmacêutico. Somado ao avanço da nanotecnologia, o encapsulamento desses óleos em nanoemulsões é considerado uma estratégia promissora para facilitar a aplicabilidade desses produtos naturais e potencializar suas ações. Estas formulações oferecem várias vantagens para a entrega tópica e sistêmica de fármacos, incluindo tamanho de gotícula controlada, proteção da substância ativa à luminosidade, instabilidade térmica e volatilização e capacidade de dissolução e estabilização de drogas lipofílicas (BAJERSKI et al., 2016).

A investigação do potencial desse monoterpene ainda se encontra reduzida, o que impulsiona o investimento em pesquisas que analisem o potencial farmacológico da nanoformulação do mirtenol.

O ensaio da avaliação da citotoxicidade *in vitro* de novas moléculas, biomateriais e de novos produtos cosméticos e farmacêuticos para uso humano deve ser um dos primeiros estudos a ser realizado, uma vez que, que esse tipo de estudo poderá estimar a biocompatibilidade precoce desses novos produtos, podendo ser realizado através da análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular e ainda da proliferação celular e de sua atividade biosintética (MBIANTCHA et al, 2017; MALMONGE et al, 1999).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, utilizando-se de corantes como o MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio] (TANASIEWICZ et al, 2017). O MTT é um sal amarelo que quando solubilizado no dimetilsulfoxido (DMSO) é reduzido pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial e adquire uma cor violeta em decorrência da formação do formazan que possui essa coloração característica, não obstante que esta redução ocorre somente nas células vivas (MOSSMAN, 1983).

Desta maneira, a viabilidade celular pode ser determinada pela quantificação espectrofotométrica da citotoxicidade induzida pela substância avaliada, quantificando assim as células que estão viáveis e as que não estão viáveis (DENIZOT et al, 1986).

Os resultados encontrados mostram que a NFM apresentou uma baixa atividade citotóxica resultando em um valor de  $CC_{50}=485,693\mu\text{g/mL}$ . Trabalhos recentes com nanoformulações de *Rosmarinus ofcinalis* L. mostram resultados equivalentes ao do presente estudo nos testes de viabilidade celular *in vitro*. O mirtenol faz parte da composição desse óleo essencial (BORGES et al., 2018).

Em seguida, a toxicidade oral aguda da nanoformulação também foi avaliada. Os animais pré-tratados com uma super dosagem (2000 mg/kg) da NFM não apresentaram sinais de toxicidade. Esses resultados assemelham-se aos descritos por Ribeiro et al. (2014) para uma nanoemulsão de *Eucalyptus citriodora* Hook, em que o processo de encapsulamento da nanoformulação não promoveu toxicidade em camundongos.

A partir desses estudos de toxicidade, partiu-se para a investigação do potencial anti-inflamatório da NFM e elucidação dos principais mecanismos de ação envolvidos nesta atividade por meio de modelos animais que mimetizam o processo inflamatório.

A resposta inflamatória da pata de rato induzida por carragenina foi utilizada como um teste de modelo animal bem conhecido para avaliar a atividade anti-inflamatória das preparações.

A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas *Chondrus crispus* que tem origem em *Carraghen* (Waterford – Irlanda), onde cresce abundantemente (MADAN et al, 2003; SCHRODER et al, 2006). Winter e colaboradores (1962) descreveram o uso da carragenina como um agente irritante para induzir o edema de pata em ratos, sendo o primeiro e mais popular método para avaliar as novas terapias anti-inflamatórias (WINTER et al, 1962; SULAIMAN et al, 2009).

Sua ação causa um tipo de reação inflamatória bifásica, caracterizada por uma fase celular com liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina e intensa infiltração de polimorfonucleares (PMN) para o local da resposta inflamatória durante as primeiras horas (KALITNIK et al., 2015; DI ROSA et al., 1971; WINTER, 1962); e uma fase vascular com aumento da permeabilidade do endotélio e acúmulo de líquidos e proteínas plasmáticas, com pico de edema na terceira hora após administração do agente na pata do animal (BARTH et al., 2016; ANTONIO e BRITO, 1998). Em seguida, há a formação de uma resposta marcada pela presença de prostaglandinas, óxido nítrico (NO) e estresse oxidativo (WANG et al., 2016; WINTER, 1962).

Por essas características o uso da carragenina tornou-se um modelo amplamente utilizado para induzir a resposta inflamatória aguda em animais de laboratório (DI ROSA, 1971). As substâncias que apresentam uma atividade inibitória no edema de pata induzido

por carragenina apresentam um forte indício de atividade anti-inflamatória (OTTERNESS et al., 1979). Além disso, as doses de AINEs utilizadas para esta inibição são bem correlacionadas com as utilizadas no tratamento em seres humanos (MORRIS, 2003).

Os dados apresentados neste estudo mostram que os animais pré-tratados com a NFM (25 e 50 mg/kg) exibiram redução no desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina, em ratos.

Corroborando com esses resultados, a nanoformulação do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., cujo mirtenol em sua forma livre é um dos constituintes, apresentou redução do edema de pata induzido por carragenina em animais (BORGES et al., 2017; LAHSEN et al., 2015). Em outros estudos semelhantes de investigação do potencial anti-inflamatório, nanoformulações obtidas de produtos naturais também apresentaram eficácia na diminuição do processo da inflamação, como a nanoformulação do eugenol, cujas características químicas assemelham-se à do mirtenol e a nanoformulação do óleo de copaíba (ESMAELI et al, 2015; LUCCA et al, 2017).

O método empregado para a síntese da nanoformulação do mirtenol permitiu a obtenção de partículas de tamanho pequeno e monodisperso. Essas propriedades permitem uma maior permeabilidade em tecidos e células biológicas, facilitando a absorção (ALBANESE et al, 2012). Pesquisas têm reportado o uso de substâncias anti-inflamatórias em nanoformulações. Este campo concentra-se principalmente em compostos ativos de produtos naturais, como é o caso do Z-ligustilide. Esta substância é isolada e purificada a partir do óleo essencial de *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels., e atenua o comportamento inflamatório e nociceptivo em camundongos (KUANG et al. 2006; YU et al. 2008; DU et al. 2007).

Diante do efeito observado da NFM nas fases inicial e tardia sobre o edema de pata induzido por carragenina, investigou-se os mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória da NFM sobre a migração leucocitária, atividade da enzima mieloperoxidase, concentração de citocinas (IL-6 e IL-8) e atividade de complexos enzimáticos importantes tais como malondialdeído e glutathiona reduzida. Para tanto, utilizou-se o modelo de peritonite induzida por carragenina.

O protocolo de peritonite é amplamente utilizado para investigação de compostos com potenciais atividade anti-inflamatórias, pois é capaz de mimetizar um processo inflamatório agudo, possibilitando a observação tanto de parâmetros inflamatórios quanto do estresse oxidativo (LONGHI-BALBINOT et al., 2012). O processo de inflamação

aguda é caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular, como resultado da exsudação de fluidos e proteínas, e conspiciamente associado à migração de células polimorfonucleares (neutrófilos primários) para o local inflamatório (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que houve diminuição significativa da migração de leucócitos totais e de monócitos e neutrófilos. Estes resultados corroboram com os estudos da atividade anti-inflamatória do mirtenol na sua forma livre (SILVA et al., 2014; GOMES et al., 2017) e sugerem que a NFM possa ter uma importante ação anti-inflamatória, uma vez que os neutrófilos, um tipo de leucócito polimorfonuclear, constituem o principal tipo celular encontrado na circulação sistêmica e por serem as primeiras células a migrarem para o sítio inflamatório, apresentam papel fundamental na progressão das doenças inflamatórias (PORTO: STEIN, 2016). O neutrófilo é bem conhecido como uma das principais células a atuarem na resposta inflamatória aguda (PHILLIPSON; KUBES, 2011). Geralmente, são as primeiras células leucocitárias a serem recrutadas para um sítio inflamatório, além de serem capazes de eliminar agentes patogênicos através de vários mecanismos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

A fim de confirmar este resultado, o efeito da NFM sobre a infiltração de neutrófilos foi indiretamente avaliado através do ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma importante enzima encontrada principalmente nos grânulos azurófilos de células polimorfonucleares, secretada por neutrófilos nos sítios inflamatórios que induz danos ao tecido. Portanto, esta enzima contribui para a patogênese da inflamação e é largamente utilizada como um marcador de infiltração de neutrófilos (VLASOVA et al, 2012).

Os resultados obtidos nesse ensaio mostraram que o pré-tratamento com NFM reduziu de maneira significativa a atividade de MPO no exsudato peritoneal e indicam que a atividade anti-inflamatória da NFM envolve, além de outros fatores, a diminuição da migração de neutrófilos. Resultados semelhantes na inibição de neutrófilos e, conseqüentemente de MPO, foram encontrados em ensaios com o monoterpene mirtenol (SILVA et al., 2014).

Uma vez ativados, os neutrófilos produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel relevante no processo inflamatório (KASAMA et al., 2005). Desse modo, partiu-se para a avaliação do efeito da NFM sobre os níveis de citocinas no exsudado peritoneal.

As citocinas são pequenos polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, que são produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imune através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos (OLIVEIRA et al, 2011) e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras), induzindo quimiotaxia, expressão de moléculas de adesão, sistemas enzimáticos e amplificação da produção de outras citocinas podendo ainda exercer ação anti-inflamatória, como por exemplo a interleucina 10 (IL-10) (NEWTON; DIXIT, 2012). Citocinas estão envolvidas na gênese e agravamento de diversas doenças autoimunes como artrite reumatoide de tal forma que as drogas mais avançadas para tais patologias são anticorpos monoclonais anti-citocinas (DINARELLO, 2007).

De acordo com os resultados deste estudo, a NFM foi eficaz na supressão dos níveis de IL-6 e IL-8. Estes dados sugerem que o efeito anti-inflamatório do mirtenol pode estar associado à inibição da produção destas citocinas. Confirmando os resultados encontrados, o monoterpene citronelol, um monoterpene álcool com estrutura semelhante à do mirtenol, monoterpene usado para a obtenção da nanoformulação, apresentou resultados semelhantes na atenuação do processo inflamatório por meio da diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (PINA et al., 2018).

A literatura descreve que o mirtenol livre foi eficaz na diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e confirmam os resultados alcançados (SILVA et al., 2014). Giongo e colaboradores (2017) descreveram que a nanoformulação do óleo de Geranium, que tem como constituintes os terpenos citronelol e geraniol, com estruturas semelhantes à do mirtenol, diminuíram os níveis de citocinas no processo inflamatório, o que vai ao encontro dos resultados encontrados em nossa pesquisa (GIONGO et al., 2017).

Além da expressão de citocinas pró-inflamatórias, o recrutamento de neutrófilos resulta em aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BOGDAN, 2001). As EROs induzem uma série de danos nos tecidos; elas podem danificar biomembranas, atacando as suas proteínas e induzindo a oxidação destrutiva de lipídios da membrana, num processo conhecido como peroxidação lipídica (RANGAN; BULKLEY, 1993). Uma das formas de avaliar o estresse oxidativo experimentalmente se dá a partir do exsudato peritoneal de camundongos em modelos de peritonite induzida por carragenina. Já é bem descrito na literatura que a carragenina, quando administrada intraperitonealmente, é capaz de induzir a formação de EROs (BARTH et al., 2016).



Um dos marcadores da desregulação da atividade oxidante e antioxidante do organismo é o malondialdeído (MDA). Este composto orgânico é formado através da reação entre radicais de oxigênio e lipídios insaturados, numa reação denominada peroxidação lipídica induzida por EROs (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2016). Como consequência deste processo, ocorre perda de integridade e fluidez da membrana celular, bem como interferência no transporte de íons e outras moléculas pelas membranas (ZHANG et al., 2016). Contudo, no meio intracelular existem diversos sistemas de regulação e defesa contra os radicais livres formados, destacando-se o papel do superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona reduzida (GSH), por exemplo (CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU; MUZYKANTOV, 2006).

A GSH é o principal antioxidante do sistema não-enzimático endógeno. Ele consiste num tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) encontrado em altas concentrações dentro das células, e participa da biotransformação e eliminação de xenobióticos, bem como da reversão do estresse oxidativo a partir da sua atividade antioxidante (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Tal ação é oriunda da sua ligação às EROs, formando a glutathiona dissulfeto (GSSG), em um tipo de reação dependente de glutathiona peroxidase (GSH-Px) e oxidase (GO). Fisiologicamente, as concentrações de GSH são restauradas pela ação da glutathiona redutase (GR), na presença de NADPH (ROVER-JÚNIOR; HÖEHR; VELLASCO, 2001).

Desta maneira, a GSH neutraliza as espécies de oxigênio, promovendo a proteção de lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos celulares. Em decorrência deste mecanismo, as concentrações de GSH diminuem durante o estresse oxidativo e há aumento dos níveis de MDA (BARBOSA et al., 2014; PENG et al., 2014).

A NFM não foi capaz de reduzir os níveis de MDA, o que mostra que seu efeito anti-inflamatório não está relacionado a essa via. Entretanto, os animais dos grupos pré-tratados com a NFM mantiveram as concentrações de GSH em valores similares aos grupos veículo sem carragenina.

A glutathiona, por meio da concentração de tióis totais e a atividade da catalase protege a célula contra a ação dos radicais livres (MARTIN; TEISMANN, 2009). Através deste sistema, os radicais livres são removidos por mecanismo não enzimático via redução com GSH (LUBOS et al, 2011). Animais tratados com a NFM apresentaram maior concentração de tióis totais demonstrando aumento dos elementos do complexo da glutathiona. Desse modo, os resultados expostos mostram uma discreta ação antioxidante da NFM.

Diante dos resultados favoráveis à atividade anti-inflamatória aguda e antioxidante, buscou-se avaliar o efeito da NFM sobre modelos de inflamação crônica.

As lesões persistentes resultam em inflamação não resolvida, que avança em estágio crônico levando a distúrbios inflamatórios. A inflamação foi estudada universalmente na tentativa de combater seus efeitos deletérios sobre o corpo humano (JAGADISHA et al, 2016). No entanto, a inflamação desempenha um papel central na patogênese de vários distúrbios, como artrite reumatoide (KOTAS; MEDZHITOV, 2015). Dentre os modelos que mimetizam tal enfermidade destaca-se a artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF). Em função disso, buscou-se investigar o efeito da NFM frente a inflamação crônica por meio do modelo de artrite induzida por ACF. Avaliou-se, nesse ensaio, o edema articular e a incapacitação articular em ratos.

A injeção do ACF na pata de ratos, em experimentos pré-clínicos, mimetiza de modo mais preciso a lesão persistente semelhante a artrite. Portanto, o aspecto do estudo é compreender a ação anti-inflamatória de formulações de ervas selecionadas através da modulação da expressão de genes inflamatórios na inflamação induzida por ACF em ratos como modelo (REN; DUBNER, 1999; NAGARKAR; JAGTAP, 2017).

O adjuvante completo de Freund consiste em um tipo de emulsão de água-em-óleo composta por micobactérias inativadas, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*. No geral, o protocolo consiste de uma ou várias injeções de ACF como sensibilizante seguida de várias semanas ou meses, de uma ou várias injeções *booster* (BILLIAU; MATTHYS, 2001). A monoartrite induzida por ACF consiste em edema e vermelhidão dose-dependente (DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993). Tal procedimento gera resposta inflamatória com forte celularidade, marcadamente linfócitos T, e anticorpos antígeno-específicos circulantes. Várias citocinas e inúmeras quimiocinas são induzidas pelo ACF, mimetizando em vários aspectos a fisiopatologia de um processo inflamatório crônico (CHILLINGWORTH; DONALDSON, 2003).

No caso da avaliação incapacitação articular promovida pela injeção de ACF, a literatura relata que o tempo de um minuto de deambulação no incapacitômetro é o ideal, pois deambulações por maior tempo resultam em diminuição da incapacitação, do infiltrado celular e do edema articular em modelos de artrite induzida por ACF, provavelmente devido ao efeito da mobilização articular e liberação de  $\beta$ -endorfinas (GOMES et al, 2014).

A artrite reumatoide, mimetizada pelo ACF, é caracterizada por dor, inchaço e destruição de articulações e é uma das mais prevalentes de todas as doenças articulares

inflamatórias crônicas, no qual acomete, aproximadamente, 1% da população do mundo e mais de 3.000.000 novos casos são diagnosticados a cada ano. A artrite não só induz a deficiência que afeta a função física e a mobilidade, mas também resulta em morte prematura; Além disso, os pacientes com artrite reumatoide têm uma expectativa de vida substancialmente mais curta do que a população em geral (CHOI et al, 2002; SMOLEN et al, 2007; SCOTT et al, 2010)

O edema articular foi empregado como índice de artrite. Os dados expressos nesse protocolo evidenciaram uma redução do edema na articulação tíbio-társica dos animais tratados com NFM, quando comparado ao grupo controle. Essa redução mostrou-se significativa até o 14º dia de observação. Dados da literatura corroboram com os resultados obtidos, mostrando que o monoterpene alcoólico mirtenol em sua forma livre também exibiu significativa redução do edema elicitado por ACF (GOMES et al, 2017). Estudos desenvolvidos por Zheng e colaboradores (2015) também evidenciaram a atividade anti-inflamatória crônica de uma nanoformulação proveniente de substância extraída de produtos naturais em modelos de artrite induzida por ACF. Monoterpenos, como o linalol, também apresentaram atividade anti-inflamatória em modelos induzidos por ACF (BATISTA et al., 2010).

A atividade da NFM nesse ensaio mostrou ter resultado na diminuição do tempo de elevação da pata (TEP) dos animais com artrite. A característica marcante da artrite é a inflamação crônica das articulações sinoviais associada com a proliferação das células sinoviais e da infiltração de células imunoativadas que conduzem à destruição de cartilagem e osso e, por conseguinte, incapacitação da articulação (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004). Assim como os resultados evidenciados nesse ensaio, o mirtenol livre também obteve eficácia na diminuição do TEP induzido por ACF em ratos (GOMES, 2017).

Os resultados apresentados destacam que a NFM possui atividade anti-inflamatória. Dentre as possíveis vantagens da nanoformulação podemos destacar que, uma vez que o pequeno tamanho de gotículas de nanoemulsões promove uma maior área de contato com a superfície das membranas biológicas, favorecendo a distribuição em todo o trato gastrointestinal, consequentemente melhora a absorção do fármaco (FERREIRA et al., 2016). O aumento da disponibilidade de drogas na área alvo pode permitir o aumento das propriedades farmacológicas e reduzir a incidência de efeitos colaterais (FERREIRA et al., 2016).

Os dados exibidos neste trabalho contribuem para o conhecimento farmacológico da NFM, o qual apresenta importante efeito anti-inflamatório estudado em modelos de inflamação aguda e crônica.

## 5 CONCLUSÃO

A investigação realizada no presente trabalho nos permite concluir que a NFM não apresentou citotoxicidade, o tratamento em animais não mostrou sinais de toxicidade oral aguda, a nanoformulação do mirtenol apresentou atividade anti-inflamatória aguda e crônica ao reduzir o edema induzido por carragenina e ACF e reduziu o tempo de elevação da pata em ratos, em modelo de artrite crônica. Sugere-se, portanto, que os mecanismos desta atividade são via modulação direta da migração de neutrófilos, modulação do estresse oxidativo e bloqueio da liberação local de citocinas pró-inflamatórias.

## REFERÊNCIAS

ALBANESE, A.; TANG, P.S. ; CHAN, W.C. .The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems, **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.14, p.1–16, 2012.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.52, p.191-195, 2001.

AMIRSHAHROKHI, K.; KHALILI, A. Carvedilol attenuates paraquat-induced lung injury by inhibition of proinflammatory cytokines, chemokine MCP-1, NF- $\kappa$ B activation and oxidative stress mediators. **Cytokine**, v. 88, p.144-153, 2016.

ANTONIO, M.A.; BRITO, A.R.M.S.. Oral anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Journal of Ethnopharmacology** , v. 61, p. 215–228, 1998.

BAJERSKI, L.; MICHELS, L.R.; COLOMÉ, L.M.; BENDER, E.A.; FREDDO, R.J.; BRUXEL, F.; HAAS, S.E. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 52, n. 3, 2016.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARTH, C.R.; FUNCHAL, G.A.; LUFT, C.; OLIVEIRA, J.R.; PORTO, B.N.; DONADIO, M.V.F. Carragenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. **European Journal of Immunology**, v. 46, p. 964-970, 2016.

BATISTA, P.A.; WERNER, M.F.P.; OLIVEIRA, E.C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L.F.S.; STORY, G.M.; SANTOS, A.R.S. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. **Journal of Pain**, 11, 1222–1229, 2010.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, vol.70, n. 12, p. 849-860, 2001.

BLOISE, M.I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, n.5, p.46-49, 2003.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology** v.2, p.907–916, 2001.

BOONYARIKPUNCHAI, W.; SUKRONG, S.; TOWIWAT, P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 67–73, 2014.

BORGES, R. S., KEITA, H., ORTIZ, B. L. S., DOS SANTOS SAMPAIO, T. I., FERREIRA, I. M., LIMA, E. S.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in zebrafish studies. **Inflammopharmacology**, v.26(4), p.1057–1080, 2018.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.280, p.241-251, 2004.

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

CHAPLIN, D.D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy Clinical and Immunology**, v. 125, n. 2, p. 5-22, 2010.

CHEN, Y; GAO, Y; CHEN, H. Engineering inorganic nanoemulsions/nanoliposomes by fluoride-silica chemistry for efficient delivery/co-delivery of hydrophobic agents. **Adv Funct Mater**, v.22(8): p.1586–1597, 2012.

CHILLINGWORTH, N. L.; DONALDSON, L. F. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 128, p.45-52, 2003.

CHOI, H.K.; HERNÁN, M.A.; SEEGER, J.D.; ROBINS, J.M.; WOLFE, F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*. 2002;359(9313):1173–1177.

CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; MUZYKANTOV, V. Antioxidant strategies in respiratory medicine. **Treatments in Respiratory Medicine**, v. 5, n. 1, p. 47–78, 2006.

CONTRI, V.R.; RIBEIRO, K.L.F; FIEL, L.A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **J. Exp. Nanosci.**, v.8, p.913-924, 2012.

DAL SECCO, D.; MOREIRA, A.P.; FREITAS, A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric oxide**, v. 15, p. 77– 86, 2006.

DEVI, K. P.; MALAR, D. S.; NABAVI, S. F.; SUREDA, A.; XIAO, J.; NABAVI, S. M., Kaempferol and inflammation: from chemistry to medicine. **Pharmacol. Res.**, v.99, p.1–10, 2015.

DI ROSA, M.D.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A.. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **European Journal of Immunology**. vol. 37(Suppl 1), p. S34–S45, 2007.

DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R.; MCQUEEN, D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 49, p. 5-10, 1993.

DU, J.; YU, Y.; KE, Y.; WANG, C.; ZHU, L.; QIAN, Z.M. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. **Journal of Ethnopharmacol.**, v112:211–214, 2007.

ESMAEILI, F.; RAJABNEJHAD, S.; ALI REZA PARTOAZAR, A.R.; MEHR, S.E. FARIDI-MAJIDI, R.; SAHEBGHARANI, M.; SYEDMORADI, L.; RAJABNEJHAD, M.R.; AMANI, A. Anti-inflammatory effects of eugenol nanoemulsion as a topical delivery system. **Pharmaceutical Development and Technology**. 1-7, 2015.

FERREIRA, L.M.; SARI, M.H.M.; CERVI, V.F.; GEHRCKE, M.; BARBIERI, A.V.; ZBOROWSKI, V.A.; BECK, R.C.R.; NOGUEIRA, C.W.; CRUZ, L. Pomegranate seed oil nanoemulsions improve the photostability and in vivo antinociceptive effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.144, p.214–221, 2016.

FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v.12, n.31, p.1131-1136, 2008.

G.S. FIRESTEIN, Evolving concepts of rheumatoid arthritis, **Nature**, v.423, p.356–361, 2003.

GIONGO, J.L.; VAUCHER, R.A.; SAGRILLO, M. R.; VIANNA, R. C. S.; DUARTE, M. M. M. F., RECH, V. C., STEPPE, M. Anti-inflammatory effect of geranium nanoemulsion macrophages induced with soluble protein of *Candida albicans*. **Microbial Pathogenesis**, 110, 694–702, 2017.

GOMES, B.S.; SOUSA-NETO, B.P.S. ; LOPES, E.M. ; CUNHA, F.V.M. ; ARAÚJO, A.R. ; WANDERLEY, C.W.S. ; WONG, D.V.T. ; LIMA-JÚNIOR, R.C. P. ; RIBEIRO, R.A. ; SOUSA, D.P. ; VENES R.M.J. ; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, F. A. . Anti-inflammatory effect of the monoterpene myrtenol is dependent on the direct modulation of neutrophil migration and oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions** , v. 273, p. 73-81, 2017.

GOMES, R. P.; BRESSAN, E.; SILVA, T. M.; GEVAERDA, M. S.; TONUSSI, C. R.; DOMENECH, S. C. Efeitos de um minuto e dez minutos de deambulação em ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund sobre os sintomas de dor e edema. **Revista Brasileira de Reumatologia**, vol. 54, n. 02, p. 83-89, 2014.

GOMES, R.P.; BRESSAN, E.; SILVA, T.M.; GEVAERD, M.S.; TONUSSI, C.R.; DOMENECH, S.C. Standardization of an experimental model suitable for studies on the effect of exercise on arthritis. **Einstein**, v.11(1), p.76-82, 2013.

HARRIS, R. Synergism in the essential oil world. **Int. J. Aromather.**, v.12, p.179-186, 2002.

HE, W.; TAN, Y.; TIAN, Z.; CHEN, L.; HU, F.; WU, W. Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation, *in vitro* characterization, and pharmacokinetics in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.521–533, 2011.

HILBIG, J.; MA, Q.; DAVIDSON, P. M.; WEISS, J.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties of cinnamon bark oil co-nanoemulsified by lauric arginate and Tween 80. **Int. J. Food Microbiology**, v.233, p.52-59, 2016.

HITCHON, C.A.; EL-GABALAWY, H.S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**. v.6, p.265–278, 2004.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

JAGADISHA, P.C.; LATHAB, K.P.; MUDGALC, J.; NAMPURATHC, G.K. Extraction, characterization and evaluation of *Kaempferia galanga* L. (Zingiberaceae)



rhizome extracts against acute and chronic inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology** v.194, p.434–439, 2016.

KALITNIK, A.A.; MARCOV, P.A.; ANASTYUK, S.D.; BARABANOVA, A.O.B.; GLAZUNOV, V.P.; POPOV, S.V.; OVODOV, Y.S.; YERMAK, I.M.. Gelling polysaccharide from *Chondrus armatus* and its oligosaccharides: The structural peculiarities and anti-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 768–775, 2015.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 273, 2005

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, p. 637–650, 2011.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.13, p.159-175, 2013.

KOTAS, M.E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v.160, p.816–827, 2015.

KOTTA, S; KHAN, A.W.; ANSARI, S.H.; SHARMA, R.K.; ALI, J. Anti HIV nanoemulsion formulation: optimization and in vitro–in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.462(1–2), p.129–134, 2014.

KUANG, X.; YAO, Y.; DU, J.R.; LIU, Y.X.; WANG, C.Y.; QIAN, Z.M. Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. **Brain Res.**, v.1102, p.145–153, 2006.

LAHSEN, E.G.; DRISS, E.; MERYEM, B.; NABIL, E.; HASSAN, E.H.E.; MOHAMMED, A.M.M.; PETIT, D. Chemical Composition of Essential Oils from *Rosmarinus officinalis* L and Acridicide Activity on *Dociostaurus maroccanus* Thunberg, 1815 in Morocco. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.6, 2015

LAMMERMANN, T.; AFONSO, P.V.; ANGERMANN, B.R.; WANG, J.M.; KASTENMULLER, W.; PARENT, C.A.; GERMAIN, R.N. Neutrophil swarms require ltb4 and integrins at sites of cell death in vivo. **Nature**, v. 498, p. 371-375, 2013.

LONGHI-BALBINOT, D.T.; LANZNASTER, D.; BAGGIO, C.H.; SILVA, M.D.; CABRERA, C.H.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory effect of triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 59-64, 2012.

LUBOS, E.; KELLY, N. J.; OLDEBEKEN, S. R.; LEOPOLD, J. A.; ZHANG, Y.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 (GPX-1) deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 286, n. 41, p. 35407–35417, 2011.

LUCCA, L.G.; MATOS, S.P.; MATTOS, C.B.; TEIXEIRA, H.F.; LIMBERGER, R.P.; VEIGA, V.F.; ARAÚJO, B.V.; KOESTER, L.S. Nanoemulsification Potentiates In Vivo Antiedematogenic Effect of Copaiba Oil. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.13, n.5, p.583-590(8), 2017.

MADAN B., MANDAL B.C., KUMAR S., GHOSH B. *Canscora decussata* (Roxb.) Schult (Gentianaceae) inhibits LPS-induced expression of ICAM-1 and E-selectin on endothelial cells and carrageenan-induced paw-edema in rats. **Journal of Ethnopharmacol** v.89(2-3) p.211-6, 2003.

MARTIN, H. L.; TEISMANN, P. Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, vol. 23, n. 10, p. 3263-3273, 2009.

MCGETTIGAN P, HENRY D. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. **PLoS Med.**, v.8, p.1–18, 2011.

MEI, L.; ZHANG, Z.; ZHAO L. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. **Adv Drug Deliv Ver.**, v.65(6), p.880–890, 2013.

MORRIS, C.J. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. **Inflammation Protocols**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MUELLER, D.; TRIEBEL, S.; RUDAKOVSKI, O.; RICHLING, E. Influence of triterpenoids present in apple peel on inflammatory gene expression. associated with inflammatory bowel disease (IBD). **Food Chemistry**, v.139, p.339–346, 2013.

NAGARKAR, B.; JAGTAP, S. Effect of new polyherbal formulations DF1911, DF2112 and DF2813 on CFA induced inflammation in rat model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.17, p.194, 2017.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 04, n. 03, p. 01-19, 2012.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol 61, n. 02, p. 255-265, 2011.

OTTERNESS, I. G.; WISEMAN, E. H.; GANS, D. A comparison of the carrageenan edema test and the ultraviolet light-induced erythema test as predictors of the clinical dose in rheumatoid arthritis. **Agents Actions**, v. 9, p. 177–183, 1979.

OYEDEJI, F.O.; OKEKE, I.E. Comparative analysis of moisturizing creams from vegetable oils and paraffin oil. *Res. J. Appl. Sci.*, v.5, n.3, p.157-160, 2010.

PATWARDHAN B, WARUDE D, PUSHPANGADAN P, BHATT N. Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. **Evid Based Complement Alternat Med**,v.2, p.465–73, 2005.

PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 91. n. 1. p. 95-101. 1956.

PENG, C.; WANG, X.; CHEN, J.; JIAO, R.; WANG, L.; LI, Y.M.; ZUO, Y.; LIU, Y.; LEI, L.; MA, K.Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Biology of Ageing and Role of Dietary Antioxidants. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Med**. v.17, p. 1381–1390, 2011.

PINA, L.T.S.; FERRO, J.N.S.; RABELO, T.K.; OLIVEIRA, M.A.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; WALKERD, C.I.B.; BARRETO, E.O.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GUIMARÃES, A.G. Alcoholic monoterpenes found in essential oil of aromatic spices reduce allergic inflammation by the modulation of inflammatory cytokines. **Natural Product Research**, p.1-5, 2018.

PORTO, B.N.; STEIN, R.T. Neutrophil extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? **Frontiers in Immunology**, v. 7, p.1-13, 2016.

RANGAN, U., BULKLEY, G.B. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. **British Medical Bulletin**.v. 49, p. 700–718, 1993.

REN, K.; DUBNER, R. Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. **ILAR J**, v.40, p.111–118, 1999.

RIBEIRO, J.C., RIBEIRO, W.L.C., CAMURC, A-VASCONCELOS, A.L.F., MACEDO, I.T.F., SANTOS, J.M.L., PAULA, H.C.B., ARAÚJO-FILHO, J.V., MAGALHÃES, R.D., BEVILAQUA, C.M.L. Efficacy of free and nanoencapsulated Eucalyptus citriodora essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. **Vet. Parasitol.**, v.204, p.243–248, 2014.

ROVER-JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SCHAFFAZICK, S.R.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físicoquímica de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.25, p.726-737, 2003.

SCHRODER, A.K.; KOLLING U., ALTSTAEDT J., UCIECHOWSKI P., FLEISCHER D., DALHOFF K., JU X., ZENKE M., HEUSSEN N., RINK L. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. **Immunology** v.119(3), p. 317-27, 2006.

SCOTT, D.L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T.W. Rheumatoid arthritis, **Lancet**, v.376, p.1094–1108, 2010.

SCOTT, D.L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T.W.J. Rheumatoid arthritis. **Lancet**. 2010;376(9746):1094–1108.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein 525 sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analls Biochemistry.**, v. 25, p. 526 192–205, 1968.

SHERWOOD, E.R., TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiology**, v.18, p.385–405, 2004.

SILVA, R.O.; SALVADORI, M.S.; SOUSA, F.B.M.; SANTOS, M.S.; CARVALHO, N.S.; SOUSA, D.P.; GOMES, B.S.; OLIVEIRA, F.A.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M. ALMEIDA, R.N.; MEDEIROS, J.V.R. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plantderived monoterpene alcohol, in mice, **Flavour Fragr. J.** 2014.

SMOLEN, J.S.; ALETAHA, D.; KOELLER, M.; WEISMAN, M.H.; EMERY, P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007; 370(9602):1861–1874.

SULAIMAN MR; ZAKARIA ZA; ADILIUS M; MOHAMAD AS; ISMAIL M; ISRAF DA. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Alpinia conchigera* Griff. leaves in various animal models. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**. v.31(4): p.241-7, 2009.

SUN, D.Q.; WEI, X.B.; XUE, X. Enhanced oral absorption and therapeutic effect of acetylpuerarin based on D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoemulsions. **Int J Nanomedicine**, v.9, p.3413–3423, 2014.

TADROS, T.; KESSELL, L. Stabilizing nanodispersions in personal care and cosmetic applications. **Cosmet. Toilet.**, v.119, p.41-46, 2004.

TANASIEWICZ, M.; SKUCHA-NOWAK, M; GIBAS, M; PAWLAK, J.; WIĘCKIEWICZ, W. MERTAS, A.; KRÓL, W. The analysis of cytotoxicity of an experimental preparation. **Europe PMC**, 2017.

TANG, S.Y.; SIVAKUMAR, M.; NG, A.M.H; SHRIDHARAN, P. Anti-inflammatory and analgesic activity of novel oral aspirin-loaded nanoemulsion and nano multiple emulsion formulations generated using ultrasound cavitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.430, p.299–306, 2012.

TONUSSI, C. R., FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**.v. 48. n. 3. p. 421 427. 1992.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v.86, p.271-278, 1978.

VLASOVA I.I.; SOKOLOV A.V.; ARNHOLD J. The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 106, p. 76-83, 2012.

WINTER, C.A, RISLEY, E.A, NUSS, G.W. "Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs". **Proceeding of the Society Experimental Biological**. v.111, p. 544-551, 1962.

YU, Y.; DU, J.R.; WANG, C.Y.; QIAN, Z.M. Protection against hydrogen peroxide-induced injury by Z-ligustilide in PC12 cells. **Experimental Brain Research**, v.184(3), p.307–312, 2008.

ZHANG, Y.; WANG, H.; RUXUE, B.; WANG, M.; DU, S. Baicalin attenuates alcoholic liver injury through modulation of hepatic oxidative stress, inflammation and sonic hedgehog pathway in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 1129-1140, 2016.

ZHENG, Z.; SUN, Y.; LIU, Z.; ZHANG, M.; LI, C.; CAI, H. The effect of curcumin and its nanoformulation on adjuvant-induced arthritis in rats. **Drug Design, Development and Therapy**, v.9, p.4931–4942, 2015.

ZHOU, H.Y.; SHIN, E.M.; GUO, L.Y.; ZOU, L.B.; XU, G.H.; LEE, S.H.; ZE, K.R.; KIM, E.K.; KANG, S.S. & KIM, Y.S. Anti-inflammatory activity of 21 (a,b)-methymelianodiol, novel compounds from Poncirus trifoliata Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 239-248, 2007.