



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E  
NANOBIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE NANOEMULSÃO À  
BASE DE ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM MACRÓFAGOS *in vitro*  
E EM MODELO DE EDEMA *in vivo*.**

ANDRÉIA CAMARGO PINHEIRO

2023

ANDRÉIA CAMARGO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE NANOEMULSÃO À  
BASE DE ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM MACRÓFAGOS *in vitro*  
E EM MODELO DE EDEMA *in vivo*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia

**ORIENTADORA:**

PROFA. DRA. GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI

BRASÍLIA, DF

2023

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Regina e ao Edson, por minha vida, educação e formação, as quais foram imprescindíveis para chegar até aqui.

Ao meu marido e parceiro de vida, Leandro, por todo suporte, incentivo, paciência e amor. Aos meus filhos Felipe e Arthur, pela compreensão.

À minha estimada orientadora Graziella Anselmo Joanitti, por todo ensinamento, paciência, carinho, amizade e muita compreensão nos momentos de minhas ausências acadêmicas para fins competitivos. Obrigada pela torcida em todos os aspectos. Você é exemplo de calma, ternura e maestria.

Aos membros da banca, profa. Dra. Andreanne Gomes Vasconcelo, profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocc, Dra. Patrícia Bento da Silva, prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa. Obrigada por terem aceito o convite.

À equipe que colaborou com os ensaios *in vivo*: Dr. Willie Pinheiro, profa. Dra. Laise Rodrigues, Dra. Alicia Ombredane, profa. Dra. Mani Funez e Aryanne Albernaz.

Aos membros do LCBNano, em especial aos que contribuíram de alguma forma para a viabilização deste trabalho.

Ao responsável do Laboratório de Nanotecnologia da Universidade de Brasília, o prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e a todos os professores e colegas do laboratório, por todos esses anos de convivência e trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAP-DF, pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

E por último, e não menos importante, agradeço a mim mesma por todos esses anos de trabalho, estudo, paciência, por ter seguido em frente mesmo quando tudo parecia dar errado. Por não ter desistido. No final, acho que valeu a pena.

## RESUMO

A inflamação é um conjunto de alterações que ocorrem no organismo e se inicia imediatamente após um estímulo, estando associada a diversas causas, que vão desde infecções à estresse ou disfunção relacionados a fatores emocionais, imunológicos ou genéticos. A inflamação crônica é uma consequência da persistência de diversas doenças, tendo relação com a obesidade, diabetes e câncer, que são hoje as principais causas de mortalidade no mundo, fenômeno que tem contribuído para um aumento expressivo da demanda médica para casos inflamatórios. Apesar de serem amplamente estudados ao longo destes anos, ainda há a necessidade de novos fármacos com efetiva ação anti-inflamatória e que tragam segurança para uso a longo prazo. Neste quesito, a biodiversidade brasileira representa fonte rica de moléculas bioativas que podem contribuir tanto para a resolução quanto para a prevenção de processos inflamatórios. O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*), planta originária do Cerrado brasileiro, é constituído principalmente por ácidos graxos e carotenoides que lhe conferem diversas propriedades biológicas, incluindo efeito anti-inflamatório. Entretanto, a hidrofobicidade dessas moléculas representa limitações à suas administrações. Tais limitações podem ser superadas por meio da nanoestruturação dos componentes do óleo afim de otimizar sua biodisponibilidade. Diante do exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi de formular e caracterizar nanoemulsões a base de óleo de pequi (PeNE) e investigar seus efeitos anti-inflamatórios em células de macrófagos, *in vitro* e seus efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em modelo de edema, *in vivo*. Inicialmente, uma revisão sistemática sobre os efeitos anti-inflamatórios do óleo de pequi. Foram selecionados 10 artigos que avaliaram o efeito do óleo de pequi em diferentes modelos de inflamação e tiveram como principais conclusões que o óleo de pequi apresenta atividade ateroprotetora, anti-inflamatória, redução de edema, anti-nociceptivo, redução de citocinas pró-inflamatórias e redução de lesão hepática; redução da pressão arterial e colesterol total. O próximo passo constituiu na avaliação do efeito do óleo de pequi livre e nanoestruturado (PeNE) em células de macrófagos, *in vitro*. Para tanto, foram utilizadas PeNE com diâmetro hidrodinâmico de 124 nm, PDI 0,24 e Potencial Zeta -15,00 mV, com citotoxicidade dose dependente sobre macrófagos em 24 horas, em concentrações iguais ou maiores que 360 µg/mL ( $p < 0,05$ ). Além disso, não alterou a morfologia dos macrófagos, porém, induziu a produção da IL-10 em 100% em relação ao controle, sem diferença significativa em relação ao óleo livre, porém, inibiu IL-12 em 89,32%, sendo significativamente superior em relação ao óleo livre, 82,33% ( $p < 0,05$ ) sugerindo-se atividade anti-inflamatória em modelo *in vitro*. Para os ensaios *in vivo*, obteve-se diâmetro hidrodinâmico da PeNE concentrada na faixa de 230 nm, PDI 0,239 e Potencial Zeta próximo a -15 mV, com morfologia esférica. A suplementação com a nanoemulsão ou óleo livre foram realizados ao longo de 15 dias consecutivos, por gavagem, em dose única diária de 100 ou 400mg/kg. Observou-se ausência de atividade anti-inflamatória, sem redução significativa de edema após indução com carragenina, porém, a PeNE (100 ou 400 mg/kg) reduziu a hipernocicepção em 27 e 40%, respectivamente ( $p < 0,05$ ) e o óleo livre reduziu em 40 e 52%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Além disso, ambos tratamentos não mostraram toxicidade quando analisados os dados bioquímicos e histológicos. Não se observou alterações clínicas, disfunções motoras, alterações de peso e comportamental dos animais, sugerindo-se biocompatibilidade do óleo de pequi e do PeNE. Desta forma,

a utilização do óleo de pequi nanoestruturado como alternativa ou complemento aos fármacos anti-inflamatórias convencionais é promissora e carece de atenção para futuros estudos investigativos para melhor compreensão do seu potencial ant-inflamatório e antinociceptivo.

**Palavras chaves:** óleo de pequi, nanotecnologia, inflamação, nocicepção, macrófagos, fitoterápicos.

## ABSTRACT

Inflammation is a set of changes that occur in the body and begins immediately after stimulus, being associated with various causes, ranging from infections to stress or dysfunction related to emotional, immunological or genetic factors. Chronic inflammation is a consequence of the persistence of several diseases, related to obesity, diabetes and cancer, which are now the main causes of mortality in the world, a phenomenon that has contributed to a significant increase in medical demand for inflammatory cases. Despite being widely studied over the years, there is still a need for new drugs with effective anti-inflammatory action and that are safe for long-term use. In this regard, Brazilian biodiversity represents a rich source of bioactive molecules that can contribute both to the resolution and to the prevention of inflammatory processes. Pequi oil (*Caryocar brasiliense*), a plant native to the Brazilian Cerrado, consists mainly of fatty acids and carotenoids that give it several biological properties, including an anti-inflammatory effect. However, the hydrophobicity of these molecules represents limitations to their administration. Such limitations can be overcome through the nanostructuring of oil components in order to optimize their bioavailability. In view of the above, the general objective of the present work was to formulate and characterize nanoemulsions based on pequi oil (PeNE) and to investigate their anti-inflammatory effects in macrophage cells, *in vitro*, and their anti-inflammatory and antinociceptive effects in a model of edema, *in vivo*. Initially, a systematic review on the anti-inflammatory effects of pequi oil. 10 articles were selected that evaluated the effect of pequi oil in different models of inflammation and had as main conclusions that pequi oil has atheroprotective, anti-inflammatory, edema reduction, anti-nociceptive activity, reduction of pro-inflammatory cytokines and reduction of liver damage; lower blood pressure and total cholesterol. The next step was to evaluate the effect of free and nanostructured pequi oil (PeNE) on macrophage cells, *in vitro*. For this purpose, PeNE with a hydrodynamic diameter of 124 nm, PDI 0.24 and Zeta Potential -15.00 mV were used, with dose-dependent cytotoxicity on macrophages in 24 hours, at concentrations equal to or greater than 360 µg/mL ( $p < 0.05$ ). In addition, it did not change the morphology of macrophages, however, it induced IL-10 production by 100% in relation to the control, without significant difference in relation to the free oil, however, it inhibited IL-12 in 89.32%, being significantly higher than free oil, 82.33% ( $p < 0.05$ ), suggesting anti-inflammatory activity in an *in vitro* model. For the *in vivo* tests, the hydrodynamic diameter of the concentrated PeNE was obtained in the range of 230 nm, PDI 0.239 and Zeta Potential close to -15 mV, with spherical morphology. Supplementation with the nanoemulsion or free oil was carried out over 15 consecutive days, by gavage, in a single daily dose of 100 or 400mg/kg. Absence of anti-inflammatory activity was observed, without significant reduction of edema after induction with carrageenan, however, PeNE (100 or 400 mg/kg) reduced hypernociception by 27 and 40%, respectively ( $p < 0.05$ ) and oil free reduced by 40 and 52%, respectively ( $p < 0.05$ ). Furthermore, both treatments did not show toxicity when biochemical and histological data were analyzed. No clinical alterations, motor dysfunctions, changes in weight or behavior of the animals were observed, suggesting the biocompatibility of pequi oil and PeNE. In this way, the use of nanostructured pequi oil as an alternative or complement to

conventional anti-inflammatory drugs is promising and needs attention for future research studies to better understand its anti-inflammatory and antinociceptive potential.

**Keywords:** pequi oil, nanotechnology, inflammation, nociception, macrophages, herbal medicines.

## LISTA DE FIGURAS

### **Introdução**

**Figura 1.** Etapas envolvidas no processo inflamatório.

**Figura 2.** Formas de ativação dos macrófagos pela via clássica e alternativa.

**Figura 3.** Síntese do óxido nítrico (NO).

**Figura 4. Metabólitos do ácido araquidônico pela ciclo-oxigenase.**

**Figura 5.** Metabolização do ácido araquidônico pela lipoxigenase.

**Figura 6.** Pequi ( *Caryocar brasiliense* ).

**Figura 7.** Regiões identificadas com a ocorrência natural de Pequi no Brasil.

**Figura 8.** Fruto do pequi (pequi).

**Figura 9. Tipos de nanomateriais orgânicos e inorgânicos**

**Figura 10. Tipos de nanoemulsões.**

**Figura 11. Fenômenos macroscópicos observados mediante instabilidade da nanoemulsão.**

### **Capítulo 1**

**Figura 1.** Coocorrência e conectividade dos termos encontrados em “Títulos, palavras-chave e resumos” das publicações recuperadas das bases de dados.

**Figura 2.** Diagrama de fluxo da pesquisa bibliográfica e critérios de seleção do PRISMA.

**Figura 3.** Qualidade geral dos estudos selecionados.

### **Capítulo 2**

**Figura 1.** Análise da estabilidade das características físico-químicas da Nanoemulsão a base de óleo de pequi (PeNE).

**Figura 2.** Análises macroscópicas da nanoemulsão a base de óleo de pequi (PeNE).



**Figura 3.** Imagem de macrófagos obtida por microscopia de luz, com contraste de fase da célula em meio DMEM, sem nenhum tipo de tratamento. **(a)** Sem estímulo com LPS. **(b)** Com estímulo de LPS.

**Figura 4.** Citotoxicidade da formulação nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE).

**Figura 5.** Morfologia de macrófagos por micrografia eletrônica de varredura (MEV) após pré-tratamento de 1h com **(a)** e **(d)** tampão PBS; **(b)** e **(e)** óleo livre (90ug/mL); **(c)** e **(f)** Nanoemulsão a base de óleo de Pequi (PeNE).

**Figura 6.** Efeitos da Nanoemulsão a base de óleo de Pequi (PeNE) sobre macrófagos BML929 na secreção de interleucina-10 (IL-10) induzidos **(a)** ou não **(b)** por LPS por 24h e Interleucina-12 (IL-12) induzidos **(c)** ou não **(d)** por LPS.

### **Capítulo 3**

**Figura 1.** Artigo publicado referente ao capítulo 3.

## LISTA DE TABELAS

### **Introdução**

**Tabela 1.** Composição percentual de ácidos graxos presentes no óleo de pequi extraído pelo método de prensagem a frio.

### **Capítulo 1**

**Tabela 1.** Resumo dos artigos analisados.

### **Capítulo 2**

**Tabela 1.** Caracterização da Nanoemulsão a base de óleo de Pequi (PeNE) e nanoemulsão vazia (Branco), em pH 7.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais ou de corticosteroides
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ATP	Adenosina trifosfato
ARA	Ácido araquidônico
CGE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
COX	Ciclo-oxigenase
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EET	Ácidos epoxieicosatrienoico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies reativas de Oxigênio
FDA	Food and drug administration
HETE	Ácidos hidroxeicosatrienoico
IL	Interleucinas
IFN- $\gamma$	Interferon gama
LOX	Lipoxigenases
LPS	Lipopolissacaríeo
LT	Leucotrienos
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MEV	Microscopio eletrônico de transmissão
MTT	3,4,5-dimetilthiazol-2,5 bifenil tetrazolium bromide
mtEROs	Espécies reativas mitocondriais
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP+	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma oxidada
NO	Óxido nítrico

NOS	Enzima NO-sintase
nNOS	Enzima NO-sintase neuronal
eNOS	Enzima NO-sintase endotelial
iNOS	Enzima NO-sintase induzível
nm	Nanômetros
PeNE	Nanoemulsão à base de óleo de pequi
PdI	Índice de polidispersão
PG	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
PICO	População; intervenção; comparadores; e resultado
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
SFB	Soro fetal bovino
FTC $\beta$	Fator transformador de crescimento $\beta$
Th1	T helper 1
Th2	T helper 1
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxanos

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Inflamação.....	1
1.2 Pequi.....	16
1.3 Bioeconomia.....	21
1.4 Nanotecnologia.....	22
2- JUSTIFICATIVA.....	28
3 – OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
CAPÍTULO1: ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE PEQUI (Caryocar Brasiliense): UMA REVISÃO SISTEMÁTICA .....	32
Resumo.....	32
1- Introdução.....	32
2- Materiais e métodos .....	34
3 – Resultados e discussão.....	36
3.1 Qualidade dos estudos individuais.....	43
3.2 Fisiologia e controle do processo inflamatório.....	44
3.3 Efeitos anti-inflamatórios do óleo de pequi em patologias inflamatórias.....	46
3.3.1 Arteriosclerose.....	46
3.3.2 Colite ulcerosa.....	47
3.3.3 Inflamação pulmonar.....	49
3.3.4 Doenças autoimunes.....	50

3.3.5 Inflamação local e nocicepção .....	51
3.4 Atividade antioxidante do óleo de pequi e impactos nos processos inflamatórios.....	52
3.5 Correlação do efeito anti-inflamatório do óleo de pequi com atividade física e com polimorfismos genéticos.....	53
3.6 Óleo de pequi nanoestruturado.....	55
3.7 Mecanismos de ação anti-inflamatória do óleo de pequi.....	55
3.8 Aspectos de toxicidade do óleo de Pequi.....	58
3.9 Relevância da descrição da caracterização e metodologia de extração do óleo de pequi.....	58
4 – Conclusão.....	60
5 – Conflito de interesses .....	61
6 – Referências bibliográficas .....	62
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE PEQUI (Caryocar Brasiliense) EM MODELOS <i>in vitro</i> .....	70
Resumo.....	70
1- Introdução.....	71
2- Materiais e métodos.....	72
2.1 Materiais.....	72
2.2 Desenvolvimento e caracterização Físico-Químico de Nanoemulsão à Base de Óleo de Pequi (PeNE) .....	72
2.3 Extração de células de medula.....	73
2.4 Cultura celular.....	73
2.5 Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	74
2.6 ELISA – IL-10 e IL-12.....	74
2.7 Análise morfológica por Microscopia.....	75
2.7.1 Confocal.....	75
2.7.2 Microscopia Eletrônica de varredura MEV.....	75

2.8 Análises estatísticas.....	76
3- Resultados e discussões.....	76
3.1 Caracterização do óleo de Pequi.....	76
3.2 Caracterização da nanoemulsão a base de óleo de Pequi (PeNE).....	76
3.3 Análise de estabilidade da PeNE.....	77
3.4 Estabelecimento da cultura primária de Macrófagos.....	79
3.5 Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	80
3.6 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	82
3.7 Produção de Interleucinas IL-10 e IL-12.....	84
4- Conclusão.....	87
5 – Referências bibliográficas.....	87
CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE, ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO DE PEQUI EM MODELO In Vivo E In Vitro.....	91
CONCLUSÃO GERAL.....	92
Referências Bibliográficas da introdução.....	94
ANEXO I.....	102

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Inflamação

- *O que é inflamação*

Do latim (*inflammare*) que significa “em chamas”, a palavra inflamação tornou-se um termo médico por seus clássicos sinais clínicos de edemas, vermelhidão, que quase sempre está acompanhada de calor, dores agudas e, em alguns casos, perda de função. Quando precedida de lesão tecidual, cicatrizes são evidenciadas. Entretanto, por trás de todos estes sintomas, encontra-se uma vasta rede de processos celulares acontecendo simultaneamente dentro dos vasos sanguíneos e tecidos afetados, sendo orquestradas pelo sistema imunológico, desencadeando um processo inflamatório (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; KUPRASH, 2016; ABDULKHALEQ et al., 2018; ACTOR, 2023).

O processo inflamatório é um conjunto de alterações que vão acontecendo em forma de “cascata de ativação”, e se inicia imediatamente após o estímulo com o agente agressor, que pode ser de natureza exógena ou endógena. Os agentes agressores exógenos estão no meio ambiente, e pode ser de natureza física, química ou biológica. Já os endógenos são gerados a partir do próprio organismo, como células danificadas ou mortas mediante a estresse ou disfunção relacionados a fatores emocionais, imunológicos ou genéticos (ABBAS, 2012; LIMA et al., 2007; FRANCO et al., 2015). O tipo de agressor, o local e o tecido estimulado, bem como as condições de saúde do indivíduo são fatores que interferem quanto ao tipo de resposta inflamatória, variando os mediadores inflamatórios ativados e as células envolvidas no processo (SCHRODER & TSCHOPP, 2010; MARCHI, 2022).

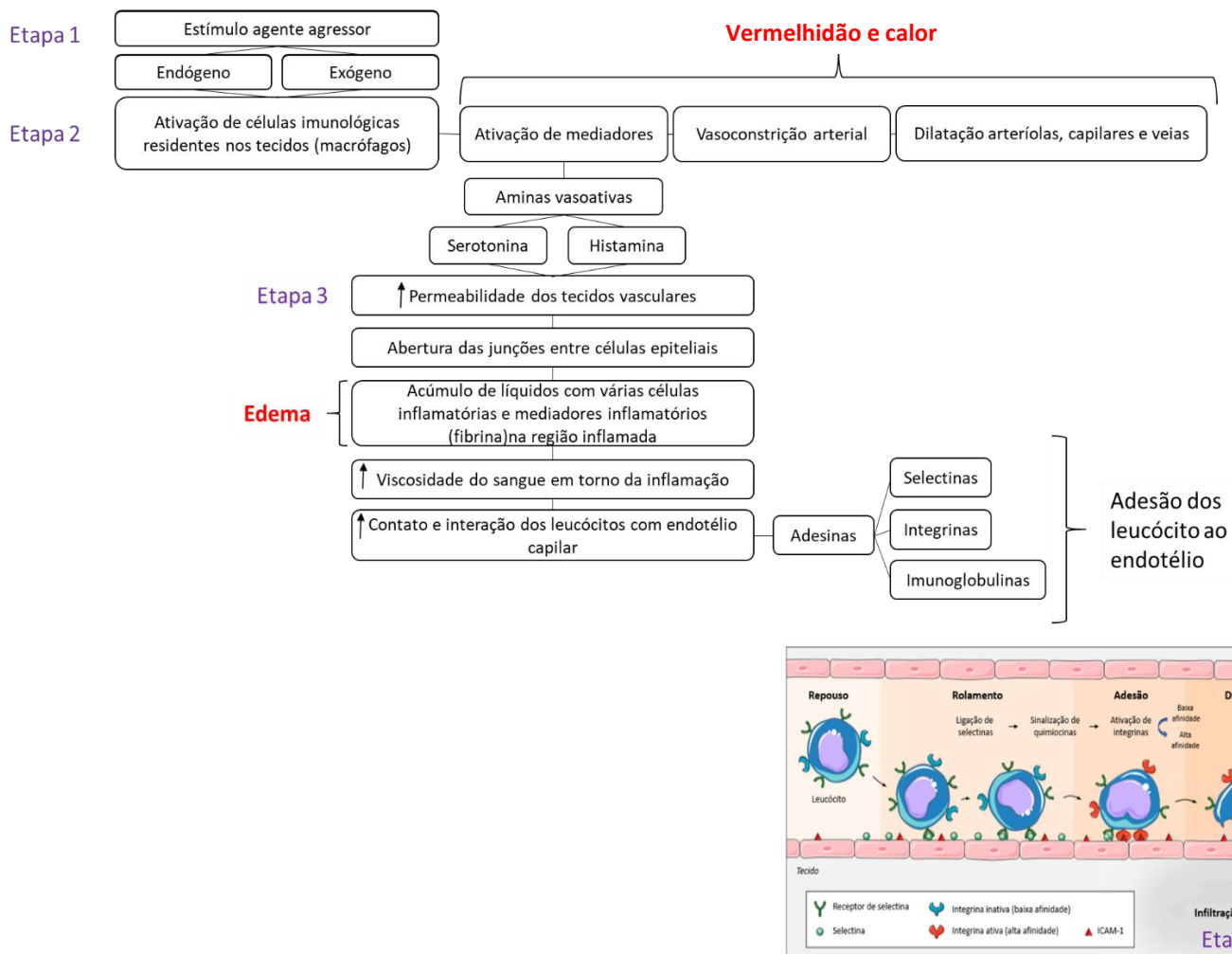
O conjunto de alterações serão descritas a seguir e estão sintetizadas na **figura 1**. Após o estímulo com o agressor ocorrer (etapa 1), a segunda etapa a ocorrer é a ativação de células imunológicas residentes nos tecidos lesados, que geralmente são os macrófagos. Estes ativam diversos mediadores que irão promover a vasoconstrição arterial, seguida por dilatação das arteríolas, capilares e veias (hiperemia) que circundam a região afetada, aumentando a quantidade de vasos funcionantes, justificando os sinais clínicos de vermelhidão e calor. A terceira etapa será caracterizada pelo aumento da permeabilidade destes tecidos vasculares, pela ação proeminente de aminas vasoativas (histamina e serotonina) produzida por mastócitos e basófilos, promovendo aberturas das



junções entre as células epiteliais, permitindo a passagem de moléculas maiores e exsudato. Desta forma, inicia-se o acúmulo de líquido contendo diversas moléculas, fibrinas e células inflamatórias nos interstícios da região inflamada. Esta etapa explica a formação clínica do edema (PTASCHINSKI, 2018; FUJIWARA, 2005; CRUVINEL, 2010; RODRIGUES, 2022).

Com o aumento da permeabilidade dos vasos, ocorre a hemoconcentração devido à saída do líquido, e com isso, o aumento da viscosidade do sangue dos vasos que estão em torno da inflamação. Esta alteração é extremamente importante por ampliar o contato e interação dos leucócitos com o endotélio capilar. Por intermédio de adesinas, denominadas selectinas, integrinas e imunoglobulinas, ocorre adesão dos leucócitos ao endotélio, processo que promove a migração destas células ao espaço subendotelial, com posterior degradação do tecido pela produção de colagenase e, por fim, a chegada dos leucócitos ao interstício (PUNCHARD, 2004; TUOMANEN, 1992; CRUVINEL, 2010, TIRAND, 2023).

Assim, a quarta alteração é caracterizada pela diapedese dos leucócitos, que chegam ao tecido inicialmente agredido. Este processo é controlado por quimioatraentes produzidos durante a inflamação, que determinam qual tipo de célula e o momento de seu recrutamento ao tecido inflamado. Os neutrófilos são os primeiros a chegarem ao tecido inflamado, uma vez que são os tipos de leucócitos mais numerosos do sangue. Depois, chegam os monócitos, que dentro dos tecidos se tornam macrófagos ativados, sendo estas duas células as principais envolvidas nos processos inflamatórios (LORDAN et al., 2019; FRANCO et al., 2015; RODRIGUES, 2022).

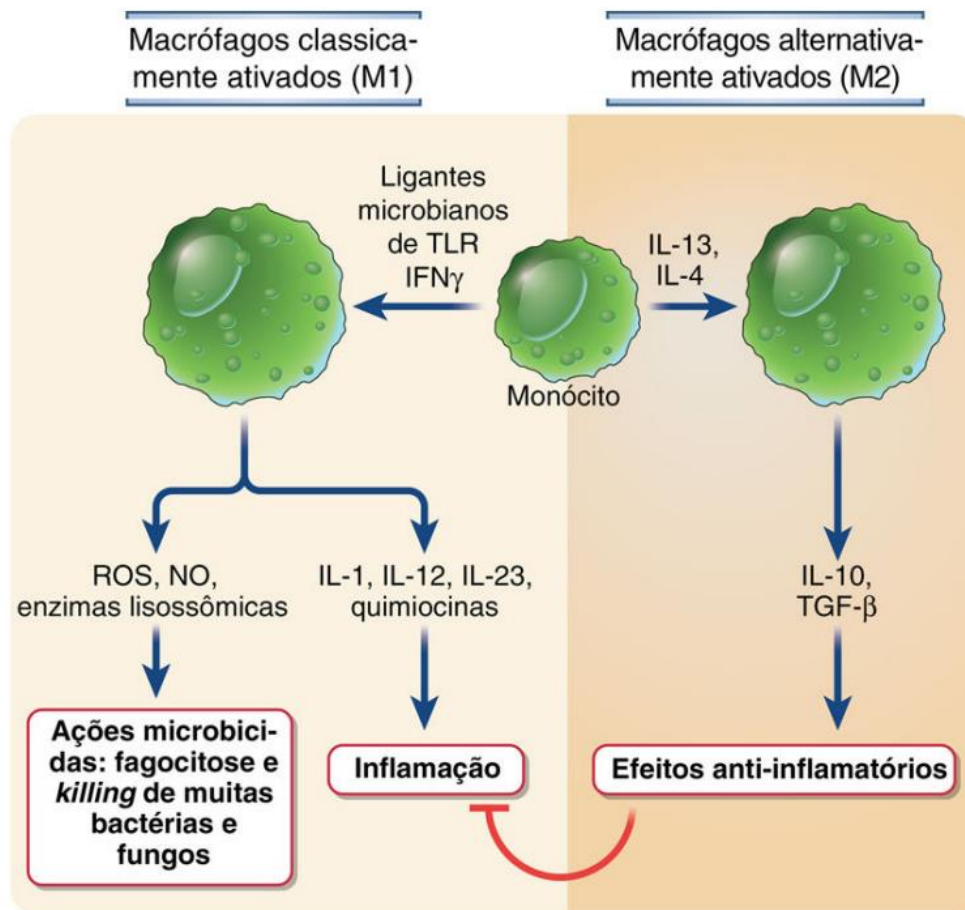


**Figura 1.** Etapas envolvidas no processo inflamatório. Fonte: LAGARRIGUE et al. (2016), adaptado (doi.org/10.1182/blood-2015-12-638700).

Os macrófagos são ativados por diversos mediadores inflamatórios e também por produtos derivados de micróbios, como os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana de bactérias. Tornam-se maiores e com mais pseudópodes, aumentando sua capacidade para matar micróbios e células tumorais. Além disso, passam a produzir diversos compostos ativos que regulam células efetoras inflamatórias e imunes (FUJIWARA et al., 2005; MARROCCO, 2022).

Os macrófagos são células-chave na condução da resposta imune inata e formam uma população heterogênea que possui papéis específicos do tecido, atuando tanto como pró-inflamatórios, quando ativados durante a iniciação e resolução de alterações que ocorrem em resposta a estímulos inflamatórios, fagocitose; ou como anti-inflamatórios, quando são ativados visando a manutenção da homeostase tecidual e remodelação e reparação, após a resolução de uma inflamação (BARRETT, 2015).

IFN- $\gamma$  expresso pelas células Th1 ativam os macrófagos, tornando-os mais eficientes na fagocitose dos microrganismos (estado de ativação clássica) e estimularão inflamação, sendo agora denominados macrófagos M1. Porém, outros tipos de citocinas produzidas por células Th2 ativam os macrófagos para que promovam remodelamento e reparo tecidual (estado de ativação alternativo), inibindo a inflamação, sendo agora denominados macrófagos M2 (**Figura 2**) (ABBAS, 2022).



**Figura 2** – Formas de ativação dos macrófagos pela via clássica e alternativa. Fonte: ABBAS, 2022.

Dentro do tecido, moduladores inflamatórios interagem com os receptores de membrana dos leucócitos, ativando sua movimentação pela formação de pseudópodes e os direcionando por quimiotaxia, guiando a célula na direção da maior concentração de mediadores inflamatórios. Além disso, devido a esta interação, inicia-se a produção de metabólitos de oxigênio, que tem potente atividade microbicida, e ativação da degranulação com a liberação de diversas enzimas que podem digerir substâncias fagocitadas, eliminar micro-organismos, ou agir agredindo tecidos inflamados. Estes mecanismos são eficazes na eliminação do processo infeccioso e do agente inflamatório,

porém, também são capazes de lesar tecidos normais, sendo umas das consequências patológicas da inflamação (MEDZHITOV, 2010; FRANCO et al., 2015; LACY, 2006, GUSEV et al., 2022).

Após a eliminação do agente inflamatório, as células envolvidas passam a secretar mediadores anti-inflamatórios, como citocinas e fator de crescimento TGF- $\beta$ , que atuam inibindo as citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a atividade de células inflamatórias e ativando processos de reparação tecidual (MEDZHITOV, 2010; OKIN & MEDZHITOV, 2012; FEEHAN, 2019). Macrófagos do tipo M2 ativados no tecido durante a inflamação realizarão o desbridamento, auxiliando a restauração tecidual estimulando fibroblastos e promovendo deposição de matriz extracelular. Desta forma, o organismo retorna ao estágio de homeostase e finalizam-se as alterações fisiológicas decorrentes da inflamação aguda (MILLS, 2015; CRUVINEL, 2010).

Entretanto, quando o estímulo inflamatório não é eliminado, ocorre a progressão da inflamação para um estágio crônico, em que a inflamação perdura por longos períodos. Existem três formas de desencadeá-la: pela presença de microrganismos de baixa virulência; exposição a certas substâncias endógenas ou exógenas de difícil eliminação; e perda de tolerância ao autoantígenos, levando a doenças autoimunes (FLEIT, 2015, HERRERO-CERVERA, 2022).

### *Inflamação aguda e crônica*

Mediante ao tempo de permanência do quadro inflamatório, a inflamação pode ser dividida em aguda e crônica. A primeira dura poucos minutos à poucos dias, já a segunda, por semanas à meses devido a persistência do estímulo. A inflamação aguda é caracterizada pela prevalência dos fenômenos exudativos: aumento do fluxo sanguíneo devido às alterações do calibre vascular e aumento da permeabilidade dos vasos, permitindo a saída de líquidos dos para o tecido e formação de edemas. Já na crônica são evidenciados no local fenômenos produtivos, além de exudativos: angiogêneses; deposição de colágeno proveniente da proliferação de fibroblastos; destruição do tecido e formação de fibroses. (ROCHA, 2011; FRANCO et al., 2015; FLEIT, 2014; RODRIGUES, 2022).

De forma simplificada, a inflamação é a forma eficiente que o organismo neutraliza, inativa ou elimina o agente indutor, podendo ter quatro tipos de evolução: (1) resolução sem sequelas, geralmente ocorre em lesões menores; (2) resolução com cicatriz,

que ocorre quando há destruição do tecido com necessidade de reparo; (3) formação de abscesso, quando a infecção é promovida por micro-organismos patógenos ou agentes químicos que se instalam profundamente nos tecidos causando a formação de exsudato purulento, que preencherá o tecido danificado; e a (4) progressão para a inflamação crônica, quando não há eliminação do agente indutor e o dano tecidual persiste, com formação de cicatrizes e alteração do órgão envolvido, ou quando ocorre hipersensibilidade ao agente (FRANCO et al., 2015; RYAN, 1977; KUMAR, 2004, RODRIGUES, 2022; SOLIMAN, 2023).

As circunstâncias da permanência do agente indutor na área inflamada podem variar. Por vezes, tratam-se de agentes inertes e insolúveis, ou pouco agressivos, com dificuldades anatômicas de eliminação por se localizarem em camadas teciduais mais profundas, ou ainda, ficar inoculado dentro das células do hospedeiro. Em consequência desta instalação duradoura, ao mesmo tempo que o quadro inflamatório permanece ativo, o corpo irá produzir defesas para minimizar os efeitos agressivos da inflamação, afim de coexistir com este processo, ativando substâncias anti-inflamatórias (FRANCO et al., 2015; PAWA, 2018, SOLIMAN, 2023).

Além do tempo de permanência, existem diferenças notórias entre a inflamação aguda e crônica, principalmente quanto ao tipo de célula envolvida e aos mediadores inflamatórios produzidos. Na inflamação aguda, os principais leucócitos envolvidos são os neutrófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos, enquanto que na crônica, encontram-se os macrófagos, linfócitos e fibroblastos. Na aguda, os principais mediadores encontrados durante o processo são as aminas vasoativas, eicosanoides e ROS (espécie reativa de O<sub>2</sub>), ao passo que na crônica, observa-se IFN- $\gamma$  (Interferon gama), citocinas, fatores de crescimento e enzimas (CRUVINEL, 2010; ZOTOVA et al., 2023).

A hipersensibilidade está relacionadas a diversas enfermidades, tendo relação com a evolução de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como a obesidade, a diabetes e o câncer, que são hoje as principais causas de mortalidade no mundo, fenômeno que tem contribuído para um aumento expressivo da demanda médica para casos inflamatórios. Deste modo, abre-se uma ampla gama de oportunidades para novos fármacos com potencial de intervenção em doenças de origem inflamatórias (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; MALTA et al., 2019; NATHAN, 2010, NASIR et al., 2022).

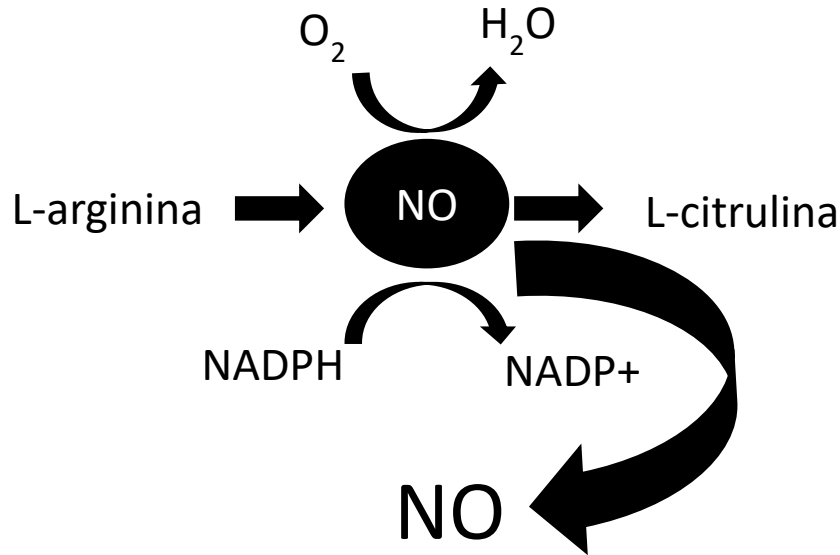
### *Mediadores da inflamação*

Mediadores inflamatórios são substâncias que controlam o desencadeamento da resposta inflamatória, bem como sua intensidade, e irão atuar diretamente nas células e tecidos envolvidos neste processo. Podem ser derivadas do plasma (bradicidinas e derivados do sistema complemento) ou derivadas de células (aminas vasoativas, óxido nítrico, espécie reativa de oxigênio, citocinas, quimiocinas e eicosanoides), sendo que sua ativação ocorre de forma concomitante e integrada (FRANCO et al., 2015; ABBAS, 2022).

#### *Oxido Nitrico (NO)*

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel e de curta duração que é sintetizado por diversos tipos de células. É um radical livre, relativamente estável, e pode reagir com outros radicais livres. Modula muitos parâmetros imunológicos e está associado a algumas das patologias imunológicas mais importantes, como artrite reumatoide, diabetes, lúpus e choque séptico (BRUCKDORFER, 2005; CIRINO et al., 2006; NIEDBALA et al., 2014; ABBAS, 2022).

O NO é um subproduto metabólico da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina gerado pela reação de catálise envolvendo a enzima NO-sintase (NOS) e os átomos de nitrogênio e oxigênio molecular (**Figura 3**). Existem três formas da NOS, sendo a forma neuronal (nNOS) a principal isoforma expressa em neurônios e a forma endotelial (eNOS), em endotélios, as que produzem menores níveis fisiológicos de óxido nítrico. Já a forma induzível (iNOS) ocorre na maioria das células de mamíferos, sendo expressa apenas em respostas a estímulos imunológicos ou inflamatórios. Citocinas, alguns mediadores inflamatórios e LPS podem induzir a expressão de iNOS em macrófagos, catalisando altas quantidades de óxido nítrico (BRUCKDORFER, 2005; ABBAS, 2022).



**Figura 3.** Síntese do óxido nítrico (NO). Fonte: FLORA FILHO, 2000.

Adaptado.

Nos macrófagos ativados, o óxido nítrico acaba atuando como agente microbicida devido a sua toxicidade em altas concentrações. Nas células endoteliais, promove a vasodilatação, uma vez que relaxa o músculo liso vascular. Além disso, outras atribuições associadas à resposta inflamatória são descritas, como a diminuição do recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios, antagonismo a todos os estágios de ativação plaquetária e também, indução de interleucina presentes em infecções e respostas alérgicas (NIEDMABA et al., 2014; LAROUX et al., 2001; WAISMAN et al., 2005; ABBAS, 2022).

Assim, o óxido nítrico pode atuar como agente anti-inflamatório ou como pró-inflamatório, sendo a concentração na qual se encontra e por qual isoforma da enzima que o derivou os principais fatores que vão determinar sua linha de ação. O NO funciona como um mediador pró-inflamatório em baixas concentrações, induzindo vasodilatação, recrutando de neutrófilos e se envolvendo em respostas imunes por macrófagos ativados por citocinas, enquanto que em altas concentrações, atua como mediador anti-inflamatório, regulando negativamente as moléculas de adesão, induzindo a apoptose de células inflamatórias e inibindo a ativação de mastócitos (RIMESSI, 2016; MAN et al., 2022).

#### 1.4 Espécies reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas do oxigênio (EROs) são moléculas instáveis produzidas a partir da redução de uma pequena parcela do oxigênio consumido, sendo extremamente reativas e capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. Por tal efeito, podem provocar danos teciduais e celulares, quando em altas concentrações. O superóxido, o peróxido de hidrogênio e a hidroxila são tipos de EROs que podem ser gerados durante o metabolismo do oxigênio, no interior da mitocôndria, em peroxissomos e no retículo endoplasmático (SILVA & GONÇALVES, 2010; RIMESSI, 2016; ABBAS, 2022; CHENG et al., 2022).

Antigamente, as EROs eram consideradas tóxicas ao organismo. Entretanto, estudos têm demonstrado que as células utilizam estas moléculas como sinalizadores celulares, uma vez que são gerados de forma contínua e fisiológica e exercem diversas funções biológicas essenciais. As EROs atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas; geração de energia (ATP); ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode gerar danos oxidativos, o que leva o organismo a produzir mecanismos de defesa: os antioxidantes (BARBOSA, 2010; LI et al., 2018, CHEIG et al., 2022).

Os antioxidantes surgiram com o objetivo de inibir ou reduzir estes danos. Podem ser enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) ou vitaminas, minerais e compostos fenólicos que, presentes em menores concentrações que as do substrato oxidável, sejam capazes de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Desta forma, o estresse oxidativo provém de um desequilíbrio, em que os compostos oxidantes prevalecem sobre os antioxidantes, promovendo um aumento de EROs (KAPOOR et al., 2019).

Como consequência, tem-se biomoléculas sendo oxidadas e perdendo suas funções biológicas, danos teciduais e alteração de vias metabólicas, como, por exemplo, a cascata da inflamação, atuando como mediadores químicos e ativadores de leucócitos, potencializando a resposta inflamatória. Estudos indicam que espécies reativas mitocondriais (mtEROs) atuam como moléculas sinalizadoras para desencadear produção de citocinas pró-inflamatórias (BARBOSA, 2010; SILVA & GONÇALVES, 2010; NAIK & DIXIT, 2011, CHENG, 2022).

Em geral, o estresse oxidativo pode desencadear a inflamação e o excesso de inflamação pode causar estresse oxidativo, induzindo danos excessivos às células e



tecidos e, finalmente, levando à destruição do tecido normal e inflamação crônica (RIMESSI, 2016, ZHOU et al., 2023).

#### - *Citocinas*

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células imunes sistêmicas. Elas se ligam a seus receptores específicos localizados na membrana celular, resultando na ativação da sinalização via intracelular, que regulam a transcrição gênica, desencadeando uma infinidade de efeitos (ZHANG, 2007; BODDEKE, 2001; ABBAS, 2022).

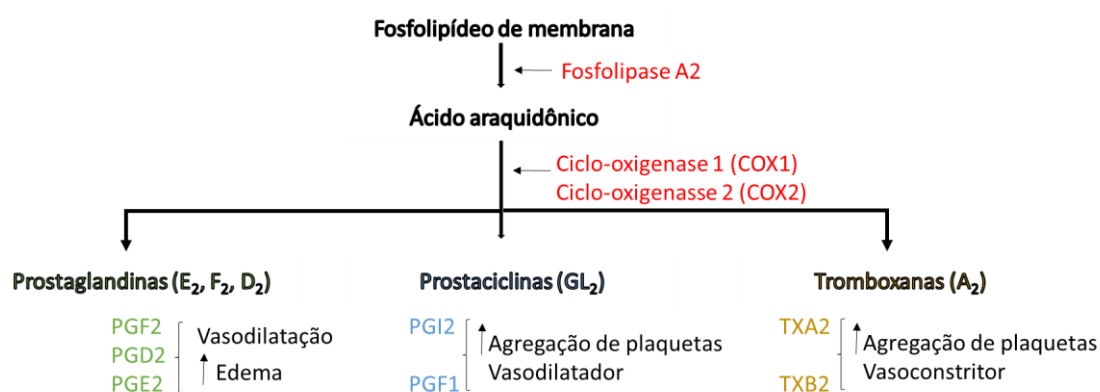
Ao mesmo tempo que uma única citocina pode agir em diversos tipos de células e em vários órgãos em um efeito denominado pleiotropismo, um mesmo efeito pode ser atribuído à diferentes citocinas, observando-se sobreposição de bioatividade destas moléculas e redundância. Atuam especialmente em células vizinhas (ação parácrina), nas próprias células produtoras (ação autócrina), ou ainda, em células distantes (ação endócrina), podendo, ainda, atuar sinergicamente ou antagonicamente (LORDAN, 2019; LIN, 2000).

As citocinas não são armazenados como moléculas pré-formadas, então são produzidas geralmente em cascata, à medida que uma citocina estimula suas células-alvo a produzir citocinas adicionais. A intensidade de seu efeito pode variar de acordo com sua abundância extracelular, com a presença e quantidade de seu receptor na superfície celular e dos sinais ativados pela ligação do receptor, que muda de acordo com o tipo de célula. (LORDAN, 2019; ZHANG, 2007; LIN, 2000)

A nomenclatura “citocina” é um termo geral atribuído a este grupo de mediadores inflamatórios. Entretanto, este é subdividido em outros grupos menores, denominados interleucinas (IL, numerada sequencialmente de 1 a 35), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal. Determinadas citocinas podem aumentar a resposta inflamatória (pró-inflamatórias) ou atenuá-la (anti-inflamatórias) de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, tem-se as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7, 12 e TNF. As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTC $\beta$  (fator transformador de crescimento  $\beta$ ) (DE OLIVEIRA et al., 2011; KRAYCHETE et al., 2006; ABBAS, 2022).

### - Metabólitos do ácido araquidônico

O ácido araquidônico (ARA) é um ácido graxo poli-insaturado (PUFA) encontrado naturalmente incorporado nos fosfolipídios da membrana da célula conferindo-lhe fluidez e flexibilidade, tão necessária para a função de todas as células. Sua liberação ocorre após estímulos traumáticos à célula, infecções e/ou inflamações, ativando a enzima fosfolipase do tipo A2 que catalisa os fosfolipídeos da membrana celular, dando origem ao ácido araquidônico. Este atua como substrato para outras enzimas, sendo metabolizado por vias enzimáticas diferentes, como a ciclooxigenase e a lipoxigenase. Os metabólitos provenientes da oxidação do ácido araquidônico pertencem ao grupo de eicosanoides, e compõem um conjunto de mediadores que modulam a resposta inflamatória e imunológica (**Figura 4**) (WENZEL, 1997; ASTUDILLO, 2012; TALLIMA, 2021).



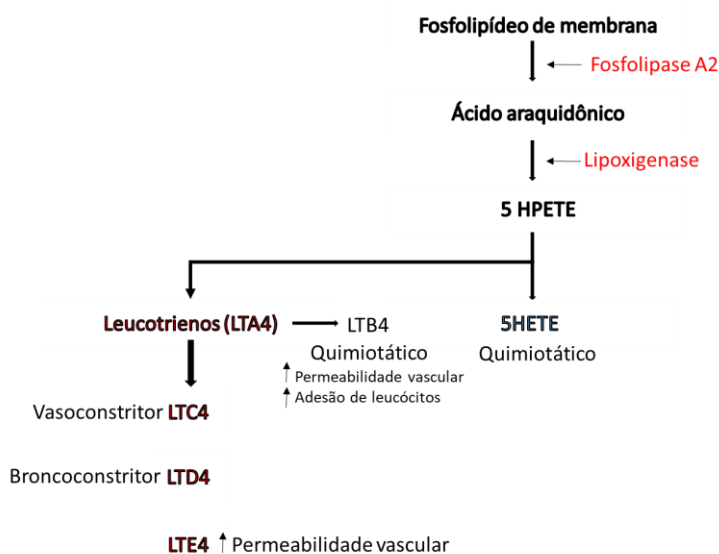
**Figura 4.** Metabólitos do ácido araquidônico pela ciclo-oxigenase.

As ciclooxigenases (COX), sob suas isoformas COX<sub>1</sub> e COX<sub>2</sub>, são enzimas que atuam sobre o ácido araquidônico, gerando os metabólitos. Durante o processo de inflamação, observa-se que os níveis de atividade de COX<sub>1</sub> não mudam, ao passo que os de COX<sub>2</sub> aumentam drasticamente e, como resultado, há um aumento na produção de prostaglandinas. Observa-se também que processos inflamatórios tratados com inibidores específicos de COX<sub>2</sub> obtiveram redução dos níveis de prostaglandinas e do processo inflamatório. Esses dados levaram à conclusão de que a COX<sub>2</sub> está envolvida na inflamação, enquanto COX<sub>1</sub> não. Porém, estudos apontam que, em processos inflamatórios, a enzima COX<sub>1</sub> contribui em sua resolução, e não na sua progressão, estando associada, juntamente a COX<sub>2</sub>, no processo de cicatrização (MORITA, 2002; JU et al., 2022; ABBAS, 2022).

O gene COX<sub>2</sub> é particularmente responsivo aos mediadores da inflamação. IL-1, TNF e LPS induzem a expressão deste gene e, como consequência, há um aumento da geração de metabólitos resultante da ação desta enzima sobre o ácido araquidônico. Dentre os metabólitos gerados, encontram-se as prostaglandinas E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub> e D<sub>2</sub> (então denominadas PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>); prostaciclina GL<sub>2</sub> (PGL<sub>2</sub>); e tromboxanos A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (**Figura 4**) (FRANCO et al., 2105).

As prostaglandinas, em especial a PGE<sub>2</sub>, são responsáveis pela vasodilatação e formação de edema, potencialização da dor promovida pela bradicinina e modulação da função dos macrófagos e células NK, estimulando-as quando em baixas concentrações e inibindo-as quando em alta. Já a PGL<sub>2</sub> também tem papel na vasodilatação, mas também inibe a agregação de plaquetas. Ao contrário desta, a TXA<sub>2</sub> promove a vasoconstrição e agregação de plaquetas (FRANCO et al., 2015; HANNA, 2018).

As lipoxigenases (LOX) são outro tipo de enzimas que também atuam sobre o ácido araquidônico, porém, por outra via. Os metabólitos gerados são os leucotrienos (LT), denominados LTB<sub>4</sub>, LCT<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> (**Figura 5**) e atuam de diversas formas como moduladores inflamatórios. LTB<sub>4</sub>, assim como LTE<sub>4</sub>, está associado ao aumento da permeabilidade vascular, além de quimiotaxia, agregação e adesão de leucócitos às células endoteliais. Já a LCT<sub>4</sub> está associada a vasoconstrição (FRANCO et al., 2015).



**Figura 5.** Metabolização do ácido araquidônico pela lipoxigenase.

Uma terceira via da metabolização do ARA tem sido recentemente estudada, em que as enzimas atuantes sobre o ácido araquidônico são enzimas do citocromo P450.

Como produto, dois principais tipos de eicosanoides são gerados, denominados ácidos epoxieicosatrienoico (EET) e ácidos hidroxieicosatrienoico (HETE) e parecem ter efeito na modulação inflamatória. Entretanto, estes eicosanoides são rapidamente degradados e convertidos em um estado menos ativo, tendo suas ações biológicas limitadas (NORWOOD, 2010; MORGAN, 2002; ELKHATIB et al., 2022)).

*- Tratamentos atuais e suas limitações*

Sintomas clínicos da inflamação inicialmente eram tratados com extrato de plantas, especialmente a casca de salgueiro por conter salicilatos. Este composto foi isolado em 1830, e 67 anos depois, a indústria farmacêutica alemã Bayer criava o primeiro anti-inflamatório: a aspirina (acetil salicilato). Desde então, com o avanço das pesquisas e da tecnologia, diversos fármacos foram surgindo para combater inflamações, com diferentes vias de ação, e com eles, surgiam os efeitos adversos, como diversas lesões renais e gastrointestinais (BINDU, 2020; DE ASSUNÇÃO et al., 2022).

Atualmente, os anti-inflamatórios são classificados em dois grupos: os anti-inflamatórios esteroidais que são denominados de corticosteroides (AIEs) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre a classe de medicamentos mais utilizadas no mundo, sendo a aspirina o representante mais antigo e conhecido deste grupo. São largamente prescritos para o tratamento de inflamações, dores, edemas, artrites e disfunções musculoesqueléticas. A via de ação destes fármacos visa a inibição das enzimas relacionadas a produção de eicosanóides, sendo a COX<sub>1</sub> e COX<sub>2</sub> os principais alvos de ação destes anti-inflamatórios. Uma vez inibido COX<sub>1</sub> e COX<sub>2</sub>, a cascata de produção de prostaglandinas, tromboxanos e lipoxigenases será reduzida, e com isso, efeitos pró-inflamatórios desempenhados por estes mediadores, tais como a vasodilatação e quimiotaxia de leucócitos para a área inflamada será diminuída (BATLOUNI, 2010; SILVA, 2019).

Porém, a isoforma COX<sub>1</sub> é expressa constantemente na maioria dos tecidos e desempenha diversas funções fisiológicas, incluindo a proteção da mucosa do trato gastrointestinal, controle do fluxo sanguíneo renal, sistema nervoso central, cardiovascular, entre outras, estando menos relacionadas à modulação inflamatória. Por este motivo associou-se que a maioria dos efeitos adversos oriundos ao uso de AINEs, principalmente a formação de úlceras gastroduodenais, estavam relacionados ao efeito do

fármaco em inibir COX<sub>1</sub> junto a COX<sub>2</sub>. Assim, uma nova linha de anti-inflamatórios não esteroidais denominada Coxibs foi criada, com o objetivo de inibir seletivamente apenas COX<sub>2</sub>, que é a enzima associada à resposta inflamatória, sem interferir nas atividades de COX<sub>1</sub> (DA SILVA et al., 2014; El-MALAH et al., 2022).

Diversos Coxibs foram produzidos pela indústria farmacêutica na expectativa de reduzir os efeitos adversos oriundos do uso de AINEs. Entretanto, os resultados não foram de acordo com o esperado, e alguns desses fármacos foram retirados do mercado por gerar complicações cardiovasculares, sendo associados casos de infartos do miocárdio e mortes súbitas ao uso deste medicamento. A seletividade de inibição a COX<sub>2</sub> gera um desequilíbrio entre as quantidades de tromboxano (TXA<sub>2</sub>) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que são fatores anti- e pró-trombóticos, desencadeando em uma série de complicações cardiovasculares. Além disso, estudos apontam Coxibs não estão desprovidos de efeitos adversos sobre o sistema digestório, e que o risco de úlceras gástricas foi reduzido, porém não eliminado (DE GODOY et al, 2020; MENDES et al., 2012; El-MALAH et al., 2022).

Estudos evidenciaram que COX<sub>2</sub> também está presente constitutivamente em diversos tecidos, como renais, cerebrais e vasculares do endotélio, desempenhando diversas funções fisiológicas que mediar inflamações. Deste modo, sua inibição implica na desregulação da homeostasia, acarretando em diversos efeitos adversos, principalmente cardiovasculares e renais (LÓPEZ et al., 2020).

Em suma, os AINEs desempenham seu papel na redução de dor, edema, rubor e inflamação, porém, efeitos adversos já são evidenciados e amplamente conhecidos, principalmente relacionados a toxicidade gástrica, alterações cardíacas e renais. Coxibs apresentam menos efeitos adversos gastrointestinais, porém, devido aos maiores riscos de complicações cardiovasculares e insuficiência renal em relação aos AINEs convencionais, são menos utilizados e comercializados. De qualquer forma, a segurança destes fármacos está relacionada ao seu tempo de uso e ao estado de saúde do paciente, bem como a presença de comorbidades (DE OLIVEIRA, 2019; BATLOUNI, 2010).

Os corticoides (corticoesteróides ou ainda glicocorticóides) são hormônios produzidos naturalmente pelo corpo, secretados pela região cortical das glândulas supra-renais estando envolvido em diversas funções fisiológicas, e, devido a sua potente propriedade anti-inflamatória, foram sintetizados por volta de 1950 e prescritos como

fármacos. Desta forma, surgiram os primeiros anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) (ANTI et al., 2008)

Inicialmente considerava-se que estes fármacos agiam pela via imunossupressora, uma vez que as altas dosagens utilizadas inicialmente acarretavam neste efeito, porém, atualmente se sabe que estes fármacos atuam ligando-se aos receptores específicos de glicocorticóides e, por consequência, inibem diversas vias de sinalização celular (como AP-1 e NF- $\kappa$ B) que regulam a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias; inibem moléculas de adesão celular, como selectinas; inibem as espécies reativas de oxigênio e o óxido nítrico, produzidos pelos macrófagos e outras células inflamatórias; inibem a ação da fosfolipase do tipo A2 e consequente inibição do metabolismo do ácido araquidônico e outros mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos e do óxido nítrico que controlam a produção de eicosanóides (BARNES, 2006; RAINSFORD, 2007; ABBAS, 2022).

De um modo geral, os corticosteróides são eficientes para tratar doenças crônicas, entretanto, altas dosagens provocam efeitos adversos severos ou por vezes irreversíveis, como é o caso de lesões ósseas e imunossupressão. Quando administrado em baixas dosagens, os adversos são reduzidos, porém, os efeitos de seu uso prolongado ainda é um problema que gera preocupações (SPIES, 2011; FERREIRA et al., 2022).

Devido às suas propriedades farmacológicas, os AIEs estão entre os medicamentos mais prescritos, embora seu uso seja limitado por promover diversos efeitos adversos, dentre eles a osteoporose, hiperglicemia, insuficiência renal, resistência à insulina, deposição de gordura, hipertensão, atrofia muscular e retardo do crescimento em crianças. Além disso, inúmeras doenças apresentam resistência ao receptor de glicocorticoide, o que torna seu uso ineficaz (ANTI et al., 2008; VANDEWALLE et al., 2018).

Desta forma, os anti-inflamatórios prescritos atualmente apresentam diversas vias de ação e mostram-se eficazes no tratamento de inflamações agudas e crônicas, doenças autoimunes, alergias e dores devido à ação analgésica. Entretanto, existem diversas limitações de seu uso, principalmente relacionados ao tempo de tratamento e a dose prescrita, uma vez que tais medicamentos interferem em diversos mecanismos fisiológicos, promovendo inúmeros adversos. Minimizar tais efeitos requer uma nova abordagem farmacocinética, de entrega e biodistribuição, e até mesmo a utilização de

compostos naturais com potencial efeito anti-inflamatório já evidenciados na literatura (PEGORARO et al., 2021; YUAN et al., 2006).

## 1.2 Pequi

### - *Características e filogenia*

Considerada uma planta ornamental pela beleza de suas copas e das flores alvas, o pequi (Figura 6) (*Caryocar brasiliense*) é uma árvore perene que pode atingir até 10 m de altura, classificada como frutífera ou oleaginosa. É uma espécie arbórea nativa dos Cerrados brasileiros pertencente à família Caryocaraceae, florescendo durante os meses de agosto a novembro, com os frutos iniciando a maturação em meados de novembro, podendo ser encontrados até início de fevereiro. Bem adaptada a habitats secos, necessitam de total exposição solar. Sobrevivem bem com quantidades de água reduzidas, uma vez que são dotadas de raízes longas e extensas. Como característica, apresenta copa com abundância de folhas, mesmo em época de seca, e tronco espesso e tortuoso, com rachaduras de cor escura e a madeira de coloração amarelada, pesada e resistente a agentes de deterioração (SANTOS, 2004; RAISER, 2007; CARVALHO, 2008).



**Figura 6** – Pequizeiro (*Caryocar brasiliense*) (Portal Embrapa, 2022).

O pequizeiro apresenta grande importância econômica para a região Centro-Oeste, uma vez que dele podem ser extraídos matéria bruta para a indústrias de artesanato, combustíveis, lubrificantes e culinária e é a fonte de renda de populações locais. Ainda, há um aumento de valor agregado à flora brasileira, uma vez que diversos biocompostos são extraídos de suas folhas, frutos e sementes para a produção de fitoterápicos com potencial farmacológico (SANTOS, 2004; MORA et al., 2013).

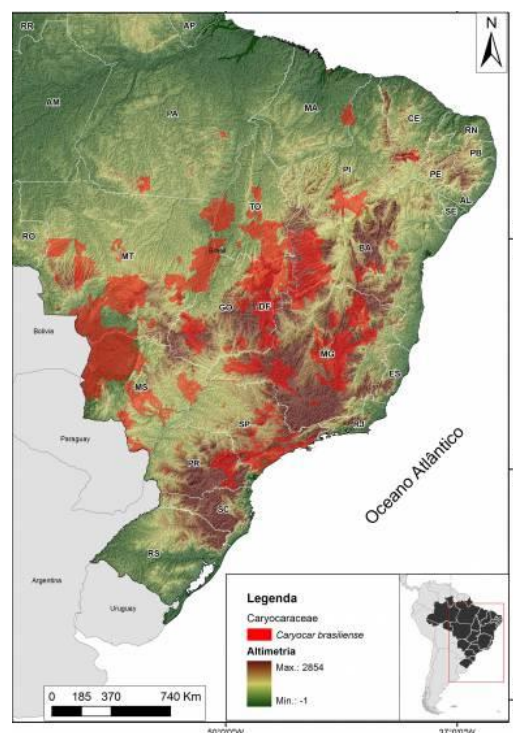
Apresenta um papel importante na recuperação de áreas degradadas, e, por consequência, na manutenção do bioma, uma vez que podem trazer benefícios para a conservação do meio ambiente, preservação da espécie e geração de renda para população local (BATISTA et al., 2019; LORENZI, 2000).

- *Região e habitat*



O pequizeiro é amplamente encontrado nas regiões do Centro-oeste e Sudeste do Brasil, podendo ainda ser visto em algumas áreas do Norte, em Rondônia, do Nordeste, na Bahia, e no Sul, no Paraná (**Figura 7**). Apesar de ser considerada uma planta do Cerrado, espécimes foram encontradas na Mata Atlântica e Pantanal (CARVALHO, 2008).

O clima do cerrado caracteriza-se pela presença de duas estações bem definidas: invernos secos e verões chuvosos. O período seco oscila entre cinco e seis meses, e as chuvas são praticamente concentradas de outubro a março. O solo é caracterizado pela pobreza de minerais e riqueza de alumínio, entretanto, este fator não ameaça os pequizeiros, uma vez que estas estão plantas extremamente adaptadas à estas condições e parece não apresentar déficit nutricional em sua composição e em seus frutos (SANTANA, 2003).



**Figura 7.** Regiões identificadas com a ocorrência natural de Pequizeiro no Brasil. Fonte: CNCFLORA, 2012.

#### - O Fruto

O fruto pequi (**Figura 8**) apresenta cerca de 6 a 10cm de diâmetro, geralmente pesando de 70 a 170g, com pericarpo (casca) esverdeada, polpa amarela alaranjada devido a presença de grandes quantidades de carotenoides. Sua amêndoa é coberta com espinhos

finos de 2 a 5 mm de comprimento, e possui alto teor de lipídios. Cada fruto contém de 2 a 4 sementes, sendo um alimento rico em proteínas, minerais, fibras, carboidratos, ácidos graxos e importante fonte de vitamina A e C, apesar desta composição e características do fruto, bem como quantidades de biocompostos oscilarem de acordo com a região, solo, época e método de colheita (BATISTA et al, 2019; PEREIRA et al, 2019; VERA, 2005).



**Figura 8.** Fruto do pequizeiro (pequi).

Fonte: <https://paladar.estadao.com.br/noticias/comida,pequi-o-rei-do-cerrado-da-polpa-a-castanha,70001648354>).

Sua polpa possui alto valor energético, sendo bastante utilizada na culinária regional no preparo de diversas comidas típicas. Seu óleo é bastante utilizado na forma de azeite, sendo, portanto, uma das principais espécies vegetais do ecossistema cerrado brasileiro, apresentando grande relevância na parte econômica e cultural da região. Devido as suas propriedades terapêuticas, as comunidades locais utilizam o óleo de pequi para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites, doenças inflamatórias, edemas, lesões gástricas, disfunção menstrual, deficiência de vitamina A, condições oftalmológicas,

hepáticas e até mesmo de controle tumoral (AGUILAR et al., 2012; ABREU et al., 2021; BRAGA et al., 2022).

#### *- O óleo e a extração*

O óleo de pequi é geralmente extraído da polpa do fruto e existem diversos mecanismos para sua obtenção, o que impacta severamente em sua composição final, qualidade, preservação de biocompostos e atividade fitoterápica (FERREIRA et al., 2011).

Atualmente três formas de extração são mais conhecidas e utilizadas. A utilização de solventes orgânicos é uma das formas mais comuns empregadas em laboratórios. Neste método, é adicionado solvente como hexano, acetona ou etanol à polpa, e após extração do óleo, este solvente é eliminado. Comunidades extrativistas utilizam uma linha mais rudimentar de extração, por fervura, em que se ferve a polpa do fruto em água em fogo baixo, mexendo até que o óleo comece a emergir para a superfície, e então, é desnatado com uma colher. A extração mecânica a seco, por prensa, também é conhecida. Neste método, a fruta é previamente seca a temperatura de 60°C por 24h, para posteriormente ser colocada em uma prensa, onde o óleo será extraído e filtrado (RIBEIRO et al., 2012; FERREIRA et al., 2011).

Assim, o tempo de produção, eficiência e quantidades de biocompostos obtidos variam de acordo com o método utilizado. Além disso, fatores como exposição a altas temperaturas e luminosidade influenciam na oxidação dos ácidos graxos e elevação do índice de acidez do óleo, além da degradação de compostos que são fotossensíveis, como os carotenoides. Desta forma, a técnica utilizada para extração do óleo pode impactar diretamente sobre a atividade dos compostos bioativos presentes no óleo (BARROS et al., 2019).

#### *- Características físico-químicas do óleo*

O óleo de pequi é constituído de ácidos graxos saturados e insaturados (**Tabela 1**), sendo principalmente composto por ácido oleico (~ 51,22%) e ácido palmítico (~ 40,65%). Óleos de pequi extraídos em diferentes regiões do Brasil apresam uma faixa de variação destes ácidos graxos entre 44 a 51% e 36% a 40%, respectivamente. Esta variação ocorre devido à diversos fatores ambientais, como região, clima, solo e

temperaturas. (OMBREDANE et al., 2021; TORRES et al., 2018; CORDEIRO et al., 2013).

**Tabela 1.** Composição percentual de ácidos graxos presentes no óleo de pequi extraído pelo método de prensagem a frio (OMBREDANE et al, 2021).

Nº Carbono	Ácido graxo	Óleo (%)
C16:0	Ácido Palmítico	40,65 ± 1,2
C16:1 D9	Ácido Palmitoleico	2,80 ± 0,4
C18:0	Ácido Esteárico	4,58 ± 0,6
C18:1 D9	Ácido Oleico	51,22 ± 0,9
C18:2 D9,12	Ácido Linoleico	3,22 ± 0,4

O óleo de pequi tem sido amplamente estudado devido às suas propriedades medicinais. Diversas atividades biológicas já foram descritas, dentre elas, o potencial efeito antitumoral em algumas linhagens tumorais, como em câncer de mama (OMBREDANE et al., 2021). O potencial anti-inflamatório deste óleo tem se tornado alvo de pesquisas, por se mostrar bastante promissor nesta nova frente de fitoterapia. MIRANDA-VILELA e colaboradores (2009) evidenciaram ação anti-inflamatória e hipotensor, além de reduzir o colesterol total em corredores suplementados com o óleo por 15 dias.

Coutinho e colaboradores (2020) observaram algo similar ao avaliarem inflamação pulmonar em ratos suplementados previamente com nanoemulsão de óleo de pequi, com aparente redução o influxo de células inflamatórias na região inflamada e extinção do acúmulo de leucócitos, provavelmente associado aos seus compostos bioativos e por sua composição rica em ácido oleico.

Torres e colaboradores (2016) evidenciaram atividade anti-inflamatória do óleo de pequi em lesão hepática em modelo *in vivo*, também associado à presença de ácidos graxos insaturados e compostos antioxidantes em sua composição. Observaram-se que animais tratados com óleo de pequi apresentaram redução das concentrações de mediadores inflamatórios circulantes, como interleucina-6, leucotrienos -4 e -5 e o receptor do fator de necrose tumoral, comprovando suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias.

### 1.3 Bioeconomia

- O que é

De acordo com o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE, 2022) bioeconomia é definido como toda a atividade econômica derivada de bioprocessos e bioprodutos que contribuem para soluções eficientes no uso de recursos biológicos - frente aos desafios em produtos químicos, alimentação, produção de energia, materiais, serviços ambientais, proteção ambiental e saúde - que promovem a transição para um novo modelo de desenvolvimento sustentável e de bem-estar da sociedade. Ou seja, a bioeconomia visa tornar o planeta mais sustentável de modo a utilizar os recursos naturais de forma inteligente e responsável.

*- Benefícios e potenciais*

O Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo e por isso possui grande potencial para pesquisas em diversas áreas (DE MELO et al., 2023). Isto requer um novo olhar para as políticas públicas referentes à sustentabilidade, bioeconomia e aproveitamento de recursos, gerando maior envolvimento de todos os setores da cadeia produtiva, movimentando a economia. Neste quesito, unir a nanotecnologia aos fitoterápicos aumenta as possibilidades de aplicações e comercialização destes compostos, agregando valor aos compostos bioativos da biodiversidade brasileira. Esta associação promove autonomia nacional e inovação, fortalecendo a bioeconomia no país por reduzir a necessidade de importação de insumos/produtos (ROSA et al., 2022; DUARTE et al., 2023).

É neste quesito que a nanotecnologia se encaixa, pois a inovação que ela traz move o desenvolvimento econômico. A biodiversidade impulsiona a produção de fitoterápicos, porém, um planejamento e gestão de inovação com suporte da ciência e tecnologia são necessários para a criação de produtos com produção sustentável, rentável e que tragam benefícios àqueles que estão na base da cadeia produtiva (ROSA et al., 2022; LASSO et al., 2023).

#### **1.4 Nanotecnologia**

*- O que é*

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar que reúne um conjunto amplo e diversificado de técnicas e equipamentos derivados de engenharia, medicina, química e biologia, que investiga novas propriedades que se manifestam em escala nanométrica para a manipulação e construção de novas estruturas. A aplicação da nanotecnologia para o

desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e seguros (nanomedicina), produtos farmacêuticos, biotecnologia, genômica, neurociência, robótica e tecnologias da informação, vêm influenciando substancialmente as indústrias farmacêuticas e de biotecnologia para as próximas décadas, nos debates globais sobre regulação de riscos e cooperação internacional (Moghimi et al., 2020).

Nanotecnologia é a área multidisciplinar que estuda e manipula diversos materiais em escala nanométrica utilizados para formar variadas estruturas com diversas aplicabilidades. Engloba a síntese de novos materiais, tendo atualmente inúmeras aplicações, que vão desde o campo da saúde humana e animal à despoluição ambiental, além de diversas outras aplicações (JOANITTI et al., 2022).

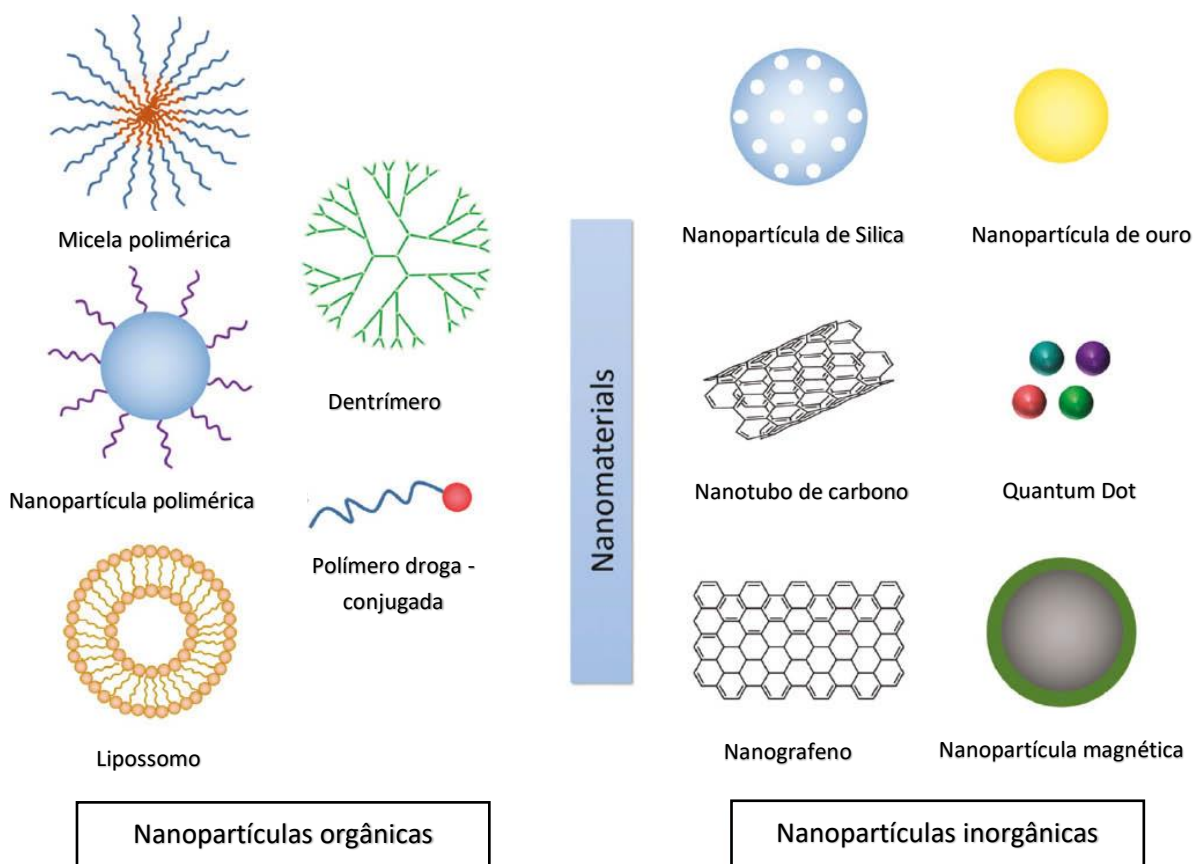
#### *- Aplicações*

No campo da medicina, têm sido utilizadas para tratar, diagnosticar, por meio de biomarcadores ou prevenir doenças de diversas formas, dentre elas a ativação do sistema imunológico (Cancino et al., 2014; Hong & Dobrovolskaia, 2018; Ye et al., 2018; BEZERRA et al., 2022). Já na área farmacêutica, nanopartículas tem sido desenvolvidas como veículo de fármacos, solucionando dificuldades em relação a sua biodisponibilidade, estabilidade e toxicidade. Além disso, são capazes de fazer uma liberação controlada das moléculas e ainda direcioná-las ao seu local específicos de ação, maximizando os efeitos benéficos da terapia, além de auxiliar na redução dos efeitos adversos. Divesas nanopartículas também têm sido utilizadas devido às suas propriedades antivirais, antifúngicas, antibactericidas, antitumorais, anti-inflamatórias e atividade analgésica (Rudramurthy et al., 2016, Ombredane et al., 2022; AZIZ et al., 2019).

#### *- Tipos de nanomateriais*

Existem diversos tipos de nanomateriais (**Figura 9**), sendo classificados como orgânicos, baseados em lipídeos ou polímeros (lipossomo, nanoemulsão, micela, dendrímero, nanopartícula polimérica, além de outros) e inorgânicos, baseados em metal ou carbono (nanotubo de carbono, fulereno, quantum-dots, nanopartículas de ouro, além de outros). Além de sua constituição, variam quanto à forma de sua síntese, tamanhos e

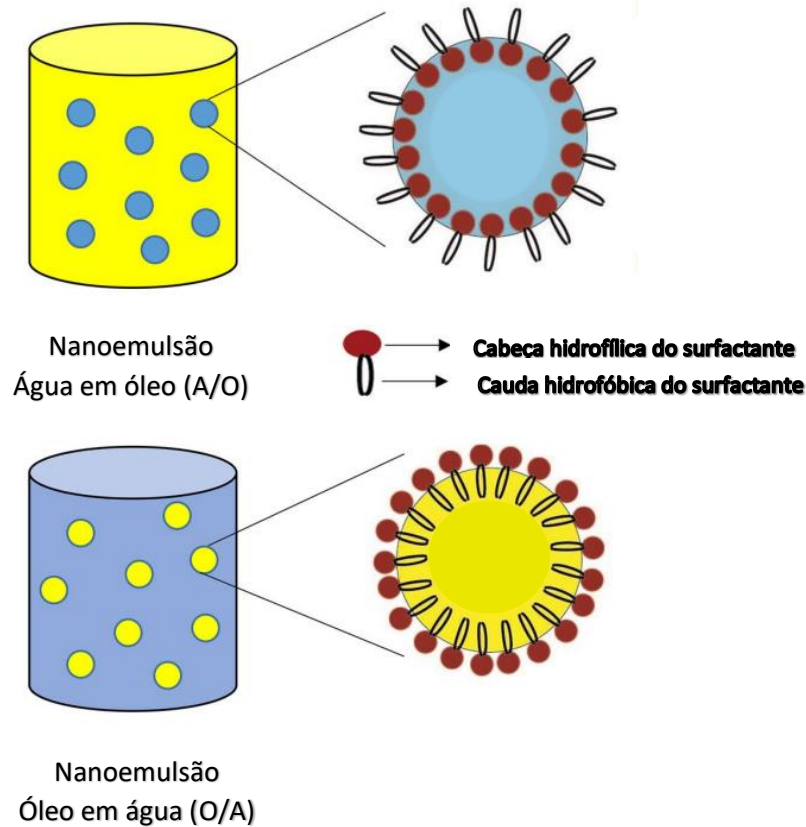
formatos, além da estrutura dimensional (Wilczewska et al., 2012; MODI et al., 2022; ROSA, 2022).



**Figura 9.** Tipos de nanomateriais orgânicos e inorgânicos. Fonte: adaptado de ZHOU, 2017 (DOI 10.1515/ntrev-2016-0102).

*- Nanoemulsão*

Nanoemulsão é um tipo de nanomaterial orgânico que se apresenta em forma de dispersão coloidal de líquidos imiscíveis, dos tipos mais comuns em que se tem água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (**Figura 10**), e outros dois tipos mais incomuns, que são as nanoemulsões múltiplas óleo água em óleo (O/A/O) ou água óleo em água (A/O/A). São estabilizadas por um surfactante (tensoativo) o qual contribui para a manutenção do tamanho, estabilidade e propriedades em nanoescala ( $10^{-9}$  m) (MCCLEMENTS, 2018; JOANITTI et al., 2022).



**Figura 10.** Tipos de nanoemulsões. Fonte: Adaptado de PANDEY, et al., 2023, (doi.org/10.1080/13102818.2021.1915869).

#### - Características

Como característica, as nanoemulsões apresentam estabilidade cinética, resistindo a mudanças físico-químicas no meio, como temperatura, pH, diluição e pressão). Porém, são instáveis termodinamicamente, ou seja, suas fases tenderão a se separar, formando um complexo heterogêneo com o passar do tempo (JOANITTI et al., 2022; MCCLEMENTE et al., 2018).

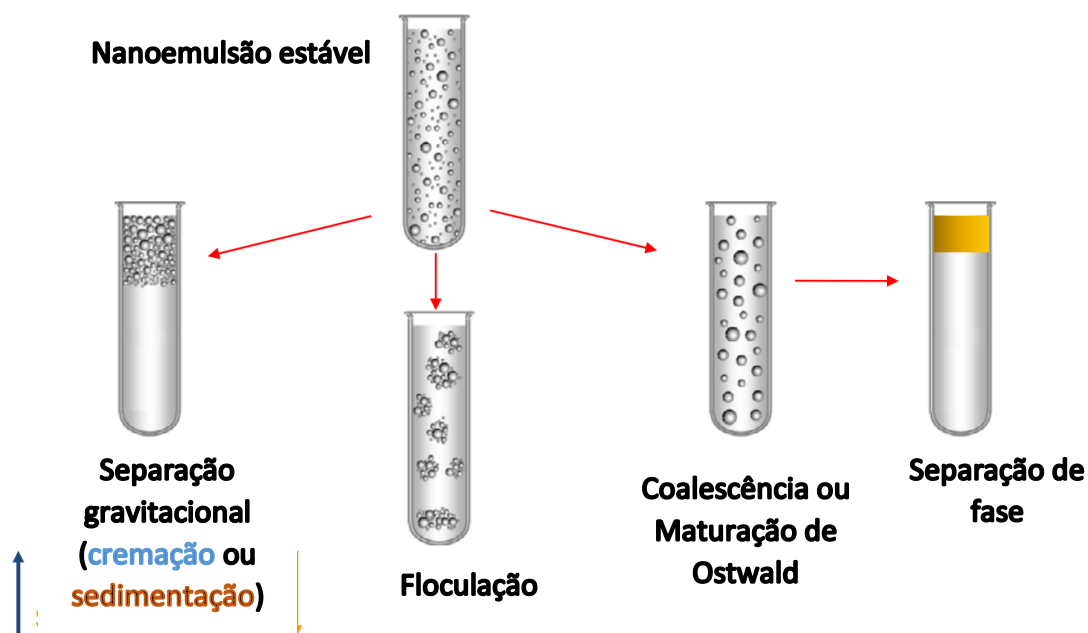
A estabilidade de uma nanoemulsão é um fator importante e deve ser observado desde seu processo de obtenção, armazenamento até aplicação e há diversos parâmetros que devem levados em conta para esta análise. Além do acompanhamento da variação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, pH e potencial Zeta, o aspecto macroscópico também indicia a estabilidade do sistema (MCCLEMENTE et al., 2018).

Sob esta perspectiva, é possível observar fenômenos denominados separação gravitacional, floculação e coalescência, maturação de Ostwald e separação de fase (**Figura 11**). Estes fenômenos que ocorrem pelo fato das nanoemulsões serem constituídas por fluidos de densidade muito diferentes entre si, apresentando uma



tendência a desestabilização com o passar do tempo (PEREIRA, 2015; MCCLEMENTE et al., 2018).

A separação gravitacional é o processo pelo qual as gotículas se movem para cima (cremação) ou para baixo (sedimentação) porque sua densidade é menor ou maior que a do líquido circundante, respectivamente. A floculação é o processo pelo qual duas ou mais gotículas se associam e formam aglomerados devido às forças atrativas que atuam entre elas, porém, sem que se fundam, diferentemente da coalescência, em que as gotículas se atraem, colidem e se fundem, levando à formação de uma gota maior. Já a Maturação de Ostwald ocorre quando nanogotículas menores são incorporadas por gotículas maiores, levando à formação de uma única gota ou a separação de fases. Geralmente a Maturação de Ostwald ocorre com maior frequência em nanoemulsões com dispersão de diâmetros heterogênea, em que o índice de polidispersão (PDI) é próximo de 1 (PEREIRA, 2015; MCCLEMENTE et al., 2018. JOANITTI et al., 2022).



**Figura 11.** Fenômenos macroscópicos observados mediante instabilidade da nanoemulsão. Fonte: Adaptado de MCCLEMENTE et al., 2018, (doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1).

#### - Aplicabilidade

Atualmente as nanoemulsões apresentam diversas aplicações no ramo da agricultura, como alternativa ao uso de agroquímicos e manipulação genética; da indústria

alimentícia, a partir da nanoencapsulação de nutrientes evitando-se alterações físico-químicas; e da indústria farmacêutica, como sistemas carreadores de medicamentos ultrapassando barreiras teciduais devido ao seu tamanho reduzido (JOANITTI et al., 2022). De acordo com Berciano-Guerreiro e colaboradores (2014), devido a capacidade da nanoemulsão se associar a diversos fármacos e direcioná-los às células alvo, a eficácia do fármaco é aumentada, sendo a dose total necessária para o tratamento reduzida, diminuindo os efeitos adversos. Além disso, a nanoemulsão diminui a exposição do fármaco às ações externas, como oxidação e hidrólise, preservando sua atividade (Sharma et al., 2013; Mohanraj & Chen, 2006).

#### - *Aplicabilidade como fitoterapia*

A associação da nanotecnologia com a fitoterapia nanofitoterapia tem se tornado promissora dentro da nanomedicina. Os vegetais apresentam uma fonte rica de compostos bioativos que são mantidos nos produtos derivados, como os óleos extraídos dos frutos, das sementes, das folhas e das raízes. Por esta razão, óleos vegetais apresentam diversas atividades biológicas, porém, com eficácia reduzida devido às suas características hidrofóbicas. Tal característica dificulta sua biodistribuição dentro do organismo e impede uma absorção eficiente, necessitando de doses elevadas para se obter os efeitos terapêuticos desejados, com grandes possibilidades de efeitos adversos. Deste modo, a nanotecnologia entra como uma alternativa para reverter esta problemática, uma vez que a estruturação de fitoterápicos em nanoestruturas carreadoras permite melhorar sua farmacocinética com uma liberação sustentada e gradual, melhorar a biodisponibilidade, aumentando sua absorção e direcionamento dos compostos ao tecido alvo (JOANITTI et al., 2022; ROSA, 2022).

Evidências científicas acerca de estudos de atividades terapêuticas de nanofitoterápicos frente a diversas doenças vem crescendo nos últimos anos. Diversos óleos vegetais têm sido relacionados como potenciais agentes antitumorais, anti-inflamatório, antibacteriano, anti-nociceptivo, dentre outras atividades biológicas e, quando nanoestruturados, apresentam atividade superior em relação à sua forma livre (ROSA, 2022).

AZIZ e colaboradores (2019) demonstraram que a nanopartícula micelar de óleo de *Eucalyptus globulus* é promissora como um nanocarreador transdérmico eficiente para

a alternativa de terapia analgésica, apresentando efeito superior quando comparado ao óleo livre. Nanolipossomas contendo óleo essencial de *Citrus aurantium* apresentou atividade larvicida contra *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* e também foi superior quando o óleo estava nanoestruturado (SANEI-DEHKORDI et al., 2022).

OMBREDANE e colaboradores (2022) destacaram em seu trabalho que o óleo de pequi, quando nanoestruturado, reduz a citotoxicidade em células de fibroblastos e de câncer de mama MCF7 e apresentam maior atividade antitumoral em linhagem de câncer de mama quando comparado à sua forma livre. Já DE SÁ COUTINHO (2020) indicou que nanoemulsão a base de óleo de pequi modulou de forma positiva a atividade inflamatória pulmonar em ratos que as receberam como pré-tratamento, por via oral. Foi evidenciado também que o efeito do óleo nanoestruturado foi superior ao óleo na forma livre. Pinheiro e colaboradores (2022) evidenciaram efeito antinociceptivo do óleo de pequi veiculado por um sistema de nanoemulsão em ratos pré-tratados com este nanofitoterápico. Deste modo, a junção do potencial fitoterápico do óleo de pequi com a nanotecnologia torna-se uma emergente alternativa à terapia convencional na prevenção e tratamento de doenças.

- *Vantagens*

Nanoestruturar um fitoterápico engloba diversas vantagens e pode potencializar os efeitos farmacológicos e medicinais dos compostos bioativos presentes nos vegetais, uma vez que os direcionam ao tecido alvo; aumenta a biodisponibilidade e com isso, reduz a concentração efetiva da dose, o que também contribui para a redução dos efeitos adversos. Além disso, reduz sua citotoxicidade aos tecidos, protege os fitoterápicos da ação de oxidação e degradação dentro do organismo, prolongando sua vida útil e ação, e ainda permite uma liberação lenta, gradativa e controlada dos fitoterápicos dentro do organismo, evitando-se picos de concentrações e períodos sem cobertura de tratamento (ROSA et al., 2022; JOANITTI et al., 2022; CHEN et al., 2019).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo e, por serem medicação de fácil acesso, seu uso torna-se indiscriminado, principalmente por idosos, que geralmente são os que mais necessitam de seu uso. Apesar

de eficientes, os anti-inflamatórios convencionais possuem restrição de seu uso prolongado. Diversas pesquisas recentes apontam, de forma alarmante, os efeitos adversos dos AINEs para complicações gastrointestinais, cardiovasculares, hepáticas, renais, cerebrais e pulmonares até então pouco descritas (BINDU et al., 2020; MONTEIRO et al., 2022). Desta forma, novas terapias anti-inflamatórias são necessárias para complementar ou substituir as medicações convencionais, visando o uso prolongado, seguro, e com menos efeitos adversos.

Diante deste cenário, o uso de terapia utilizando óleo de pequi nanoestruturado apresenta um grande potencial para o tratamento e prevenção de inflamações, sendo uma promissora terapia alternativa aos fármacos anti-inflamatórios convencionais, uma vez que o uso da nanotecnologia associada a fitoterapia com óleo de pequi pode ser uma estratégia promissora para melhorar sua biodistribuição, reduzindo os possíveis efeitos adversos.

A nanotecnologia é a ciência que estuda e controla matéria na escala nanométrica (Nano.gov) e sua união a fitoterápicos tem ganhado evidência no cenário medicinal. Óleos vegetais apresentam diversas atividades biológicas, porém, apresentam baixa absorção e baixa biodisponibilidade devido à sua característica lipofílica e a nanotecnologia entra como uma alternativa para reverter esta problemática e melhorar o potencial terapêutico do óleo de pequi (JOANITTI et al., 2022; ROSA, 2022).

Apesar de alguns trabalhos já evidenciarem o efeito anti-inflamatório do óleo de pequi nanoestruturado, ainda há poucos estudos explorando seus efeitos, e não há nenhum trabalho indicando sua atividade aninocéptica. Deste modo, o presente trabalho pretende preencher essa lacuna fazendo uma revisão sistemática sobre óleo de pequi e efeito anti-inflamatório; buscando investigar evidências sobre os efeitos do óleo de pequi livre ou nanoestruturado em macrófagos estimulados ou não com LPS *in vitro*; e avaliar a biocompatibilidade, efeito anti-inflamatório e antinocéptico do óleo de pequi livre ou nanoestruturado *in vivo*.

Além disso, essa pesquisa evidencia os efeitos do óleo de pequi e contribui para a agregação de valor do mesmo bem como para a movimentação da bioeconomia. Por ser um fruto nativo do Cerrado Brasileiro, desperta atenção dos setores econômicos para a preservação da flora, bem como o uso sustentável da biodiversidade local, além de

valorizar os produtores primários, como comunidades extrativistas de pequi, e do próprio fruto, que tem significativa importância socioeconômica para a população.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Formular e caracterizar nanoemulsões à base de óleo de pequi e investigar seus efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em macrófagos, *in vitro* e em modelo de edema, *in vivo*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

##### **Capítulo 1**

- Fazer busca bibliográfica de artigos relacionados a atividade anti-inflamatória do óleo de pequi;
- Definir critérios de inclusão e exclusão dos artigos, e delimitação de referência bibliográfica;
- Estudo e análise comparativa dos trabalhos delimitados quanto à atividade anti-inflamatória e as vias de ação do óleo de pequi;
- Construção de tabela resumida e comparativa;
- Discutir os resultados observados nos 10 artigos selecionados relacionados aos achados sobre o potencial anti-inflamatório do óleo de pequi;

##### **Capítulo 2**

- Formular nanoemulsão à base de óleo de pequi;
- Caracterizar a formulação concentrada por DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico);
- Avaliar a estabilidade da formulação ao longo do tempo quanto as características microscópicas e macroscópicas;
- Investigar atividade anti-inflamatória, *in vitro*, em células de macrófagos diferenciados de células extraídas da medula óssea de ratos, diferenciadas por L929;

- Avaliar os efeitos das nanoestruturas na morfologia celular dos macrófagos estimulados ou não por LPS, por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de varredura, *in vitro*;
- Analisar os efeitos das nanoestruturas na viabilidade celular de macrófagos através número total de células por azul de tripan;
- Determinar os efeitos das nanoestruturas na produção de interleucinas anti e pró inflamatórias em macrófagos estimulados ou não por LPS, *in vitro*;

### **Capítulo 3**

- Caracterizar as formulações por DLS;
- Avaliar a morfologia da nanoemulsão a base de óleo de pequi por meio de microscopia eletrônica e por microscopia eletrônica de transmissão;
- Analisar a viabilidade celular de macrófagos por MTT, fragmentação de DNA J774-1 em citometria de fluxo, e taxa de associação, *in vitro*;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo em modelo de edema, em ratos, *in vivo*;
- Investigar o impacto na coordenação motora de animais pré-tratados com PeNE;
- Investigar a citotoxicidade da PeNE por meio de análises bioquímicas, hematológicas e histológicas;
- Avaliar a modulação de ROS e NO dos animais a partir de análises de sangue;

# CAPÍTULO 1

## ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar Brasiliense*): UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Este capítulo ainda não foi publicado. Andréia C. Pinheiro; Vitória R. P. Silva; Alicia S. Ombredane; Natália O. Martins; Glécia V. S. Luz; Marcella L. B. Carneiro; Graziella A. Joanitti.

### Resumo

A propriedade anti-inflamatória do óleo de pequi (*Caryocar brasiliensis*) deve-se à presença de diversos compostos bioativos, como ácidos graxos e carotenoides, possibilitando ampla utilização terapêutica. Apesar das inúmeras publicações relacionando as propriedades anti-inflamatórias do óleo de pequi, nenhuma revisão sistemática foi realizada. Portanto, uma revisão sistemática é realizada para fornecer uma visão geral do cenário atual. Foram pesquisadas as bases de dados Scopus, BVS, CINAHL, Cochrane, LILACS, Embase, MEDLINE, ProQuest, PubMed, FSTA, ScienceDirect e Web of Science, até outubro de 2022, após avaliação de “título e resumo” e exclusão de estudos usando a seleção critérios do PRISMA, foram analisados 10 artigos de 8 autores diferentes. Os resultados obtidos através da análise dos artigos incluídos indicam a interação do óleo de pequi com mecanismos do processo inflamatório através da modulação da expressão gênica e dos níveis circulantes de mediadores pró e anti-inflamatórios, redução do estresse oxidativo, migração de células do sistema imune e ocorrência de sinais cardinais de inflamações. É possível observar o impacto da sazonalidade e metodologia de extração na caracterização química do óleo, correlacionando com as propriedades terapêuticas, estabilidade e segurança do óleo de pequi.

**Palavras-chave:** Óleo de pequi, *Caryocar brasiliensis*, Anti-inflamatório, Compostos bioativos, Fitoterapia, Nanotecnologia.

### Introdução

O processo inflamatório é um mecanismo complexo formado pelo sistema imunológico em resposta a estímulos nocivos, como infecções e lesões teciduais. O objetivo da resposta inflamatória é devolver o organismo a um estado de homeostase,

porém, em situações de desordem esse mecanismo pode ser orquestrado de forma exacerbada, tornando-o ineficaz em seu objetivo principal. O controle do processo inflamatório por meio de mediadores anti-inflamatórios é uma importante abordagem terapêutica para o tratamento de diversas doenças em que a natureza da patogenicidade envolve um processo inflamatório descontrolado (Tasneem et al., 2019).

Mundialmente, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os corticosteroides estão classificados entre os medicamentos mais comercializados. São moléculas que possuem mecanismos de ação que atuam diretamente na cadeia gênica da inflamação, impedindo sua ativação. No entanto, a toxicidade dessas substâncias resulta na ocorrência de efeitos colaterais graves. No caso dos AINEs, o efeito adverso mais frequente envolve a ulceração da mucosa gastrointestinal pela reação antagonista da droga em relação à secreção de muco envolvido na proteção das células gastrointestinais. Portanto, a descoberta de novos mediadores anti-inflamatórios eficazes e seguros é necessária (Bindu et al., 2020).

A existência de uma grande variedade de espécies vegetais no Brasil confere à biodiversidade brasileira uma posição de destaque como fonte de recursos naturais com valioso potencial terapêutico (Dutra et al., 2016; Pimentel et al., 2015). Aproximadamente 55.000 espécies já foram catalogadas no Brasil, das quais apenas cerca de 1.100 receberam atenção científica em termos de realização de estudos para avaliar suas propriedades terapêuticas. Esse cenário revela um enorme potencial da biodiversidade brasileira ainda a ser explorado e que pode fornecer matéria-prima para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos inovadores (Ribeiro Neto et al., 2020; VALLI et al., 2018).

O Pequi é um fruto da árvore *Caryocar brasiliense*, nativa do Cerrado brasileiro. Da polpa do Pequi é possível extrair um óleo muito utilizado na culinária e na medicina tradicional. O uso terapêutico do óleo de Pequi é resultado da presença de diversas substâncias bioativas em sua composição, como ácidos graxos e carotenoides (Brito et al., 2022). Essas moléculas possuem interações relevantes com mecanismos promotores de inflamação, sendo capazes de modular respostas inflamatórias por meio da regulação da liberação de citocinas e da atividade de células do sistema imunológico envolvidas na cascata inflamatória, resultando em efeitos anti-inflamatórios observados *in vitro*, *in vivo* e modelos clínicos (Coutinho et al., 2020; Miranda-Vilela et al., 2016; Torres et al., 2016b).



Apesar do crescente número de publicações sobre a atividade anti-inflamatória do óleo de Pequi, até onde sabemos, nenhuma revisão sistemática foi realizada analisando os resultados desses trabalhos. Considerando a relevância desse tipo de revisão como uma importante ferramenta para análise e associação de evidências científicas, esta revisão busca reunir, por meio de um delineamento sistemático, as informações presentes na literatura sobre as propriedades antiinflamatórias do óleo de Pequi extraído do fruto do a espécie *Caryocar brasiliensis*, para fornecer um panorama do cenário atual de pesquisas envolvendo este óleo e assim fomentar futuras investigações científicas que possam servir de base para aplicações clínicas.

## **Materiais e métodos**

### **Protocolo e registro**

O estudo foi desenvolvido com base nos critérios estabelecidos pela lista de verificação PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyzes) (Shamseer et al., 2015). O protocolo desta revisão sistemática foi registrado no International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) (NIHR, 2020) com o número de registro: CRD42023335323.

### **Critério de eleição**

### **Critério de inclusão**

Os critérios de inclusão para esta revisão sistemática foram baseados na questão de pesquisa delineada pelo acrônimo PICO (população; intervenção; comparadores; e resultado) (Methley et al., 2014). Foram considerados estudos que avaliaram a atividade anti-inflamatória (O) do óleo bruto extraído do fruto da espécie *Caryocar brasiliense* (Pequi) (I) em comparação com controles negativos (C) em modelos *in vitro*, *in vivo* e de ensaios clínicos (P).

### **Critério de exclusão**

Foram excluídos desta revisão sistemática os artigos que se enquadravam nos seguintes critérios i) Óleo de pequi de espécie diferente da *Caryocar Brasiliense*; ii) Óleo de Pequi Fracionado ou outros compostos isolados de *Caryocar Brasiliense*; iii) Atividade anti-inflamatória não avaliada em modelo de teste (*in vitro*, *in vivo* ou clínico); iv) Artigos de revisão, capítulos de livros, teses, cartas, opiniões pessoais, resumos de congressos e patentes.

### **Fontes de informação e estratégia de busca**

A busca na literatura foi realizada através da construção de diferentes *strings* de busca para se adaptar a cada uma das seguintes bases bibliográficas consultadas: CINAHL, Cochrane, LILACS, Embase, FSTA, MEDLINE, ProQuest, BSV regional portal, PubMed, ScienceDirect, Scopus, e Web of Science (Anexo 2). A busca foi realizada em janeiro de 2023. Não foram aplicadas restrições de idioma ou período de publicação. As referências duplicadas foram removidas pelo software gerenciador de referências Mendeley®.

### **Seleção de estudo**

A seleção dos artigos foi realizada em duas fases de verificação da adequação do estudo aos critérios de inclusão e exclusão. Na fase 1, dois autores (V.R.P.S & A.C.P) analisaram o título e o resumo de todos os estudos presentes nos resultados da busca. Na fase dois, os autores foram organizados em quatro pares (V.R.P & A.C.P; A.S.O & N.O.M; M.L.B.C & G.A.J) e analisaram de forma independente o texto completo dos estudos incluídos na fase 1. Após completar a fase de seleção, as informações relevantes dos incluídos estudos foram extraídas independentemente pelos pares. Discordâncias entre os pares foram resolvidas consultando um terceiro autor.

### **Análise de qualidade em estudos individuais**

A análise de qualidade dos estudos incluídos nesta revisão foi realizada usando a diretriz ARRIVE 2.0 (Percie du Sert et al., 2020) adaptada para 21 questões (Tabela S3). Essas questões foram respondidas pelas duplas de forma independente e as discordâncias

foram resolvidas por um terceiro revisor. Respostas ALTAS indicaram alta qualidade, BAIXAS indicaram baixa qualidade, UNCLEAR indicaram que não foi possível medir a qualidade e SEM INFORMAÇÕES indicaram que a informação não foi encontrada no artigo.

## Resultados e discussão

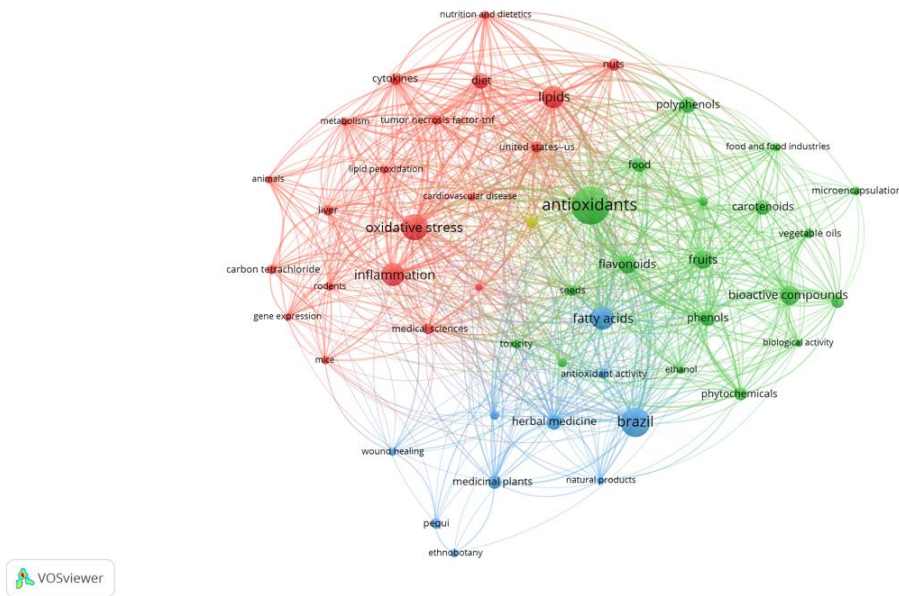
### Seleção de Estudos

Utilizando a string de busca "(ALL ((pequi OR "Pequi oil")) AND *caryocar*)" na base de dados Scopus em 29 de janeiro de 2023, é possível identificar um número crescente de estudos envolvendo o Pequi, com a publicação de 1.490 estudos. Curiosamente, quando restringimos a busca a estudos envolvendo especificamente o óleo de Pequi da espécie *Caryocar brasiliensis* por meio da string de busca "(ALL ("Óleo de Pequi" AND "*Caryocar brasiliensis*"))" aplicada à base de dados Scopus em 29 de janeiro de 2023, observaram o número de 46 estudos publicados, sendo 82,6% deles publicados por grupos de pesquisadores brasileiros.

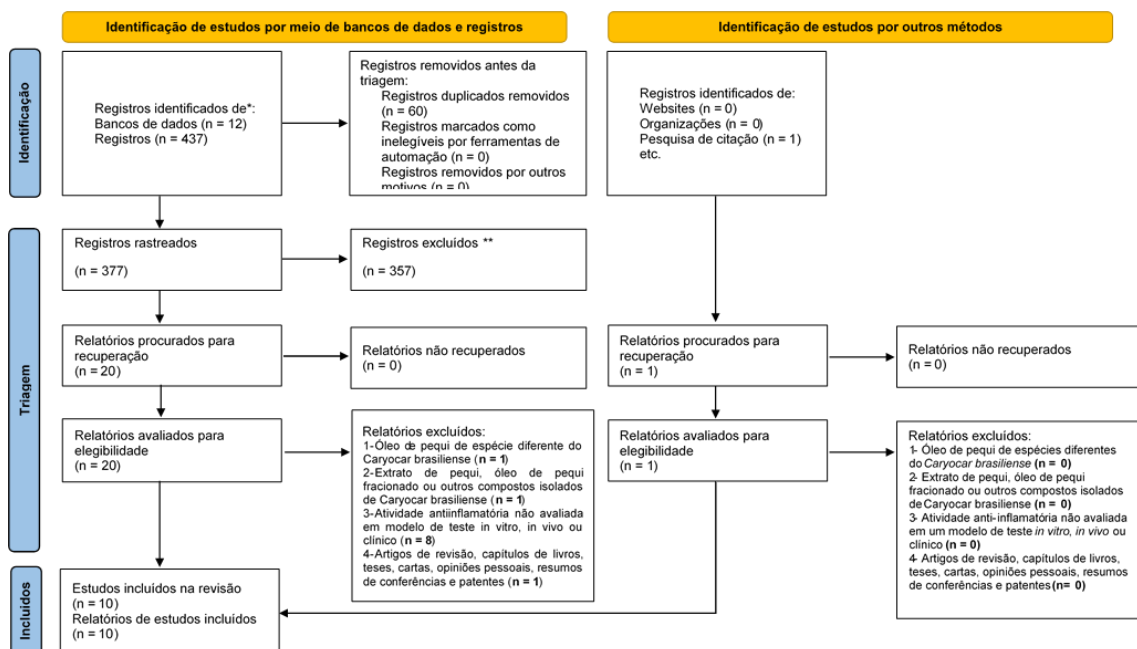
Ao associar o óleo de pequi e inflamação usando a *string* de busca descrita na tabela S1, um total de 377 publicações de diferentes bases de dados foram encontrados (SCOPUS, BVS, CINAHL, Cochrane, Lilacs, Embase, ProQuest, PubMed, ScienceDirect e Web of Science) até outubro de 2022. Com relação às referências desses documentos, é possível observar na **Figura 1** a coocorrência dos termos (pelo menos 10 vezes, com configuração “*full count*”, utilizando o software VOSviewer Versão 1.6.18) em seus Títulos, Palavras-chave e Resumos. As análises mostradas na **Figura 1** também fornecem informações sobre os termos mais concorrentes (que possuem suas esferas maiores). A atenção da comunidade acadêmica se concentra, por exemplo, no estresse oxidativo, antioxidantes, flavonoides, inflamação, ácidos graxos e lipídios.

Na presente revisão sistemática, conforme mostrado na **figura 2**, um total de 437 estudos foram identificados em diferentes bases de dados (84 do Scopus; 64 do ScienceDirect; 3 do LILACS; 31 do Embase; 22 do MEDLINE; 25 do Portal Regional BSV; 5 da PubMed; 22 da Web of Science; 21 da CINAHL, 12 da FSTA e 142 da ProQuest). Após a remoção de duplicatas, 377 estudos permaneceram e uma avaliação de “título e resumo” resultou na exclusão de 357 estudos. Os 20 artigos restantes foram

analisados por revisão de texto completo. Esse processo levou à exclusão de 11 artigos de acordo com os critérios de exclusão (Tabela S2). Além disso, 1 artigo foi incluído nesta revisão por busca de citações. Ao final, 10 artigos foram analisados nesta revisão sistemática.



**Figura 1:** Coocorrência e conectividade dos termos encontrados em “Títulos, palavras-chave e resumos” das publicações recuperadas das bases de dados. Análise usando o software VOSviewer 1.6.18 (2022); mínimo 10x; configuração de “contagem total”. Fonte: SCOPUS, BVS, CINAHL, Cochrane, Lilacs, Embase, ProQuest, PubMed, ScienceDirect, Web of Science (2022).



**Figura 2:** Diagrama de fluxo da pesquisa bibliográfica e critérios de seleção do PRISMA.

### **Características dos estudos incluídos (n=10)**

Todos os estudos incluídos são artigos de pesquisa que avaliaram os efeitos anti-inflamatórios do PO (Óleo de pequi). As principais características dos estudos estão resumidas na Tabela 1.

Study	Population	Fruit species/Extraction method	Lipid profile analysis	Intervention	Outcomes
Autor, Ano/ País	In vitro/ In vivo model (n)			Model/Treatment regimen	Results
<b>Aguilar et al., 2012/ Brazil</b>	<i>In vitro</i> : Cultura primária de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos fêmeas, C57BL/6, deficiente em receptor de LDL (suscetível a aterosclerose), de 6 a 8 semanas de idade (n=5)  <i>In vivo</i> : Camundongos fêmeas, C57BL/6, receptor de LDL deficiente (suscetível à aterosclerose), de 6 a 8 semanas de idade (n=12)	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> / Método de extração: sem informações	Ácido oleico: 56,98% - Ácido palmítico: 34,45% - MUFA: 57,89% - SFA: 36,53% - β-caroteno: 18.62 mg/100 g de óleo - β- criptoxantina: 17.03 mg/100 g de óleo - Vitamina A: 2261,9 RAE/100g de óleo	<i>In vitro</i> : <u>Explosão respiratória de macrófagos</u> : PO 7% por via oral na dieta diária por 2 semanas → macrófago residente peritoneal banhado e estimulado ou não com zymosan (1 x 10 <sup>7</sup> partículas/50 µL) → medida de quimioluminescência da produção de ROS durante um período de 60 minutos.  <i>In vivo</i> : <u>Hipercolesterolemia e aterosclerose</u> : PO 7% por via oral na dieta diária com 1,25% de colesterol (aterogênico) por 6 semanas → Amostra de sangue (Análise bioquímica); Fígado (lípidos totais); Coração e aorta (análise de lesões ateroscleróticas)  <u>Atividade antioxidante</u> : PO 7% por via oral na dieta diária com 1,25% de colesterol (aterogênico) por 6 semanas → Peroxidação lipídica hepática (teste TBARS); Níveis plasmáticos de autoanticorpos LDL anti-oxidados (ELISA); Atividade de enzimas antioxidantes hepáticas (SOD e CAT).  Nota: Grupos controle receberam dieta com 7% de óleo de soja com 1,25% de colesterol (aterogênico)	<i>In vitro</i> : ↓ Produção de ROS (p<0.05)  <i>In vivo</i> : ↑ Colesterol total, colesterol não HDL e triacilgliceróis (p<0.05) ↑ Lipídios hepáticos totais (p<0.05) ↑ No número de lesões em estágio avançado na raiz da aorta ↓ Lesões ateroscleróticas da aorta ↓ Peroxidação lipídica hepática (p<0.05) Sem diferenças nas atividades das enzimas antioxidantes ↓ Níveis de anticorpos anti-LDL oxidados (p<0.05)
<b>Coutinho et al., 2020/ Brazil</b>	<i>In vivo</i> : Camundongos machos A/J (n não claro)	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> / extração por solvente (hexano)	- Ácido oleico: 24.4% (NMR) e 25.9% (GC-MS)	<i>In vivo</i> : <u>Inflamação pulmonar</u> : PO, e PO-nanoemulsão (PO-NE) 20mg/kg; nanoemulsão de ácido oleico (OA-NE) 5mg/kg via oral 18 e 4h antes da administração intranasal de LPS → análise AHR (elastância pulmonar com aerosolização de metacolina); Análise de células inflamatórias BALF; Atividade pulmonar de MPO e níveis de citocinas (MCP-1, TNF-a, IL-6, IL-1b, e KC); Análise de atividade CAT; Peroxidação lipídica pulmonar por TBARS .	<i>In vivo</i> : ↓ Migração de leucócitos e neutrófilos para o pulmão (PO; p<0.05) Nenhuma migração de leucócitos e neutrófilos para o pulmão (PO-NE, e OA-NE de forma similar; p<0.001) ↓ Atividade de MPO (PO-NE, e OA-NE de forma similar; p<0.001) ↓ TNF-α, IL-1β, IL-6, MCP-1 e KC (PO-NE; p<0.001) ↓ AHR (PO, PO-NE, e OA-NE de forma similar; p<0.001) ↑ Atividade de CAT (PO-NE, e OA-NE de forma similar ; p<0.05) ↓ Peroxidação de lipídio (PO-NE, e OA-NE de forma similar; p<0.05)
<b>Junior et al., 2020 / Brazil</b>	<i>In vivo</i> : Camundongos Swiss machos (n=6); 50 dias	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> (polpa) / prensado a frio em prensa “expeller” seguido de centrifugação	- Ácido oleico: 56.5% - Ácido palmítico: 38.11%	<i>In vivo</i> : - <u>Pleurisia</u> : VO oral 300, 700 ou 1000 mg/Kg 1h antes da indução da pleurisia com Cg → exsudato pleural foi avaliado 4h depois (número de leucócitos e teor de proteína);  - <u>Edema da pata</u> : VO 300, 700 ou 1000 mg/Kg 1h antes da indução do edema da pata com Cg → volume da pata (avaliado 1, 2 e 4h após Cg); Hiperalgisia mecânica e sensibilidade ao frio (3 e 4h após Cg);  - <u>Modelo de dor</u> : VO 1000 mg/Kg 1h antes da indução da dor com formalina (pata) → Hiperalgisia mecânica, volume da pata e sensibilidade ao frio (30 min após formalina);  - <u>Nocicepção induzida</u> : PO por via oral 1000 mg/Kg 1h antes da indução da nocicepção com ácido acético → contagem de contrações abdominais ao longo de 20 min.	<i>In vivo</i> :  ↓ Migração de leucócitos (~36%) para exsudato pleural (PO 1000 mg/Kg; p<0,05); Sem alterações no extravasamento de proteínas plasmáticas (exsudato pleural); ↓ Edema da pata → PO 700 mg/Kg (~28% depois 1, 2 e 4h); PO 1000 mg/Kg (~60%, 42%, e 40% depois 1, 2 e 4h respectivamente; p<0.05); ↑ Atividade anti-hiperalgésica : PO 1000 mg/Kg efeito semelhante à Dexametasona 1mg/Kg, p<0.05; ↑ Efeito antinociceptivo do frio: PO 1000 mg/Kg (~25% depois 3h; p<0.05); ↓ Nocicepção e sensibilidade ao frio induzida por formalina : PO 1000 mg/Kg (~95%, p<0.05); ↓ Nocicepção induzida por ácido acético: PO 1000 mg/Kg (~90%, p<0.05);

<b>Miranda-Vilela et al., 2009/Brazil I</b>	<i>Clínico:</i> Voluntários saudáveis com desempenho de corrida de pelo menos 4.000 m: homens (n=76) e mulheres (49); Idade: 15 a 67 anos	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> (polpa) / extração por solvente (clorofórmio)	- Ácido oleico: 54.28%; - Ácido palmítico: 41.78%; - Pró-vitamina A: 6.26-11.5 mg/100 mg pulp - Licopeno: 1.12-2.08 mg/100 mg de polpa	<i>Clínico:</i> - Duas provas (mesmo percurso e tempo) para cada voluntário: (1) prova sem suplementação PO e (2) prova após ingestão de 400 mg de cápsulas PO diariamente por 14 dias consecutivos.  - Análises bioquímicas (Perfis lipídicos séricos e hs-CRP); Hemograma; Peroxidação lipídica por ensaio TBARS	<i>Clínico:</i> ↓ Plaquetas e plaquetócrito – total de voluntários (p=0.00); ↑ Monócitos - voluntários totais (p<0.02); ↑ Eosinófilos - 5-19 anos (p<0.48); ↓ Colesterol e LDL, > 45 anos (principalmente para homens) (p<0.05); ↑ HDL – total de voluntários; ↑ TG e VLDL, 20 – 24 anos (p<0.05); ↓ Hs- valores de PCR, 30 – 34 anos (p<0.05); Sem diferenças no ensaio TBARS Efeito adverso menor em 18 voluntários (apenas nos primeiros 3 a 4 dias de tratamento);
<b>Miranda-Vilela et al., 2011 / Brazil</b>	<i>Clínico:</i> Voluntários saudáveis com desempenho de corrida de pelo menos 4.000 m: homens (n=76) e mulheres (49); Idade: 15 a 67 anos	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> (polpa) / extração por solvente (clorofórmio)	- Ácido oleico: 54.28%; - Ácido palmítico: 41.78%; - Pró-vitamina A: 6.26-11.5 mg/100 mg pulp - Licopeno: 1.12-2.08 mg/100 mg de polpa	<i>Clínico:</i> - Duas provas (mesmo percurso e tempo) para cada voluntário: (1) prova sem suplementação PO e (2) prova após ingestão de 400 mg de cápsulas PO diariamente por 14 dias consecutivos.  - Amostras de sangue (colhidas após cada corrida): Hemograma; genotipagem de polimorfismos; ensaio TBARS; perfil lipídico pós-prandial e proteína C-reativa.	<i>Clínico:</i> Polimorfismos que influenciaram as respostas de PO (p<0.05): - CAT, GST-M1/T1, CRP-G1059C e MTHFR-C677T no leucograma; - Hp e MTHFR-C677T em plaquetas; - Hp, ACE, GSTT1 e MTHFR-A1298C no perfil lipídico; - MTHFR-A1298C nos níveis de PCR; - Hp e MnSOD no ensaio TBARS; - As diferenças entre os genótipos da ECA no leucograma e colesterol total desapareceram após PO, e o mesmo ocorreu para Hp e MnSOD no ensaio TBARS e para MTHFR-A1298C com níveis de PCR.
<b>Miranda-Vilela et al., 2016/Brazil I</b>	<i>Clínico:</i> Voluntários saudáveis com desempenho de corrida de pelo menos 4.000 m: homens (n=76) e mulheres (49); Idade: 15 a 67 anos	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> (polpa) / extração por solvente (clorofórmio)	- Ácido oleico: 54.28%; - Ácido palmítico: 41.78%; - Pró-vitamina A: 6.26-11.5 mg/100 mg pulp - Licopeno: 1.12-2.08 mg/100 mg de polpa	<i>Clínico:</i> - Duas provas (mesmo percurso e tempo) para cada voluntário: (1) prova sem suplementação PO e (2) prova após ingestão de 400 mg de cápsulas PO diariamente por 14 dias consecutivos.  - Análises bioquímicas (análises séricas de ALT, AST, CK, PCR, perfil lipídico pós-prandial e PCR-us sérica); Hemograma; Genotipagem (polimorfismo IL-6 → 174 G/C); Peroxidação lipídica (ensaio TBARS)	<i>Clínico:</i> Equilíbrio de Hardy-Weinberg da frequência genotípica de IL-6-174 G/C (SNP rs1800795) (p<0,05); ↑ Peroxidação lipídica GG comparada a CC e GC (p=0.023 e p=0.041 respectivamente); ↑ Níveis de PCR no genótipo CC (p = 0,021); ↑ PDW no GC comparar com GG (p=0.045); ↓ LDL no CC comparado ao GG e GC (p=0,012 ep=0,03 respectivamente); ↓ CK e AST no genótipo GC (p=0.03); Sem correlação entre triglicerídeos e PCR-us para genótipo CC; ↑ 2,9 vezes o risco de peroxidação lipídica em portadores de GG (OR com IC 95%)
<b>Montalvão et al., 2016/Brazil I</b>	<i>Clínico:</i> Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico Homens e Mulheres (n=29) Idade: 20-54 anos	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> / Extração prensada a frio	Não avaliado.	<i>Clínico:</i> <u>Lúpus Eritematoso Sistêmico:</u> PO via oral 400mg por 60 dias consecutivos. Medidas antropométricas (IMC, CA, ST, AMC, CC e PC); Hemograma; Análises bioquímicas (uréia, fosfatase alcalina, GGT, glicose, AST, ALT, complemento C3, complemento C4, PCR-us, ácido úrico, CT, proteína total e fração (albumina e globulina), EAS e perfil lipídico); Danos no DNA por ensaio cometa;	<i>Clínico:</i> ↓ Hs-CRP após tratamento PO (p = 0.0161) Nenhum efeito significativo do tratamento com óleo de pequi em medidas antropométricas, hemograma, perfil lipídico, EAS, análise bioquímica e danos ao DNA.
<b>Moreno et al., 2021/ Brazil</b>	<i>In vivo:</i> Camundongos machos C57BL/6 (n=15)	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> / Método de extração: não informado	- Ácido palmítico: 40.14g/100g de óleo - Ácido oleico: 54.76g/100g de óleo - carotenóides totais: 36.16mg g <sup>-1</sup>	<i>In vivo:</i> <u>DSS-colite ulcerosa:</u> PO via oral 280 mg homogeneizado na ração por 36 dias consecutivos → DSS- colite ulcerativa foi induzida no 28º dia de tratamento → DAI (perda de peso corporal, consistência das fezes e presença de sangue); Análise histopatológica do cólon; Imunofenotipagem de linfócitos intraepiteliais do cólon e células	<i>In vivo:</i> Sem alterações significativas no DAI ↓ Criptas e perda de células caliciformes (p<0.05) ↓ Infiltração de células imunes (p<0.05) ↓ Colônico (p<0,005), linfonodos mesentéricos e células T CD8+ do baço (p<0.05) Sem alterações nas células T CD4+

			mononucleares esplênicas; Detecção de marcadores inflamatórios (IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-17, IL-10 e PCR); determinação de S-IgA.	<p>↑ Células na superfície da mucosa <math>\gamma\delta</math> T (p=0.008)</p> <p>↑ S-IgA no cólon e nas fezes (p&lt;0.05)</p> <p>↓ IL-17 e CRP (p&lt;0.05)</p> <p>↑ TNF<math>\alpha</math> e IL-6 (p&lt;0.05)</p>	
<b>Roll et al., 2018 / Brazil</b>	<i>In vivo:</i> camundongos Swiss fêmeas e machos (n=6); 6 a 7 meses e 11 a 12 meses	Óleo de <i>Caryocar Brasiliense</i> (polpa) / pressão mecânica e centrifugação	<p>- Ácido oleico: 54.28%;</p> <p>- Ácido palmítico: 41.78%;</p> <p>- Carotenóides: 27.75 mg/100 mg de polpa</p> <p>- Pró-vitamina A: 6.26-11.5 mg/100 mg de polpa</p> <p>- Licopeno: 1.12-2.08 mg/100 mg de polpa</p> <p>- Macronutrientes (g/Kg): Mg (0.114); Ca (0.97), e K (0.042);</p> <p>- Micronutrientes (mg/Kg): Fe (186.8); Mn (2.02); Zn (2.03).</p>	<p><i>In vitro:</i></p> <p>- <u>Atividade antioxidante:</u> Método DPPH (PO + reagente DPPH → 20 min → Absorvância 517 nm)</p> <p><i>In vivo:</i> VO 30 mg/animal/dia por 15 dias</p> <p>- Amostra de sangue: hemograma e danos no DNA (ensaio do cometa);</p> <p>- Medula óssea: genotoxicidade (ensaio de micronúcleo)</p>	<p><i>Análise antioxidante:</i> Atividade antioxidante (EC50): 26,26 mg/mL para reduzir 50% dos níveis de DPPH;</p> <p><i>In vivo:</i> Sem efeitos genotóxicos ou clastogênicos;</p> <p>↑ Linfócitos e ↓ níveis de neutrófilos+monócitos no grupo de 11 a 12 meses (feminino e masculino); p&lt;0.05;</p> <p>↓ Níveis de eosinófilos no grupo de 6-7 meses (feminino); p&lt;0.05;</p> <p>↓ Contagens de leucócitos no grupo de 6-7 meses (masculino); p&lt;0.05;</p> <p>↓ PDW contagens no grupo de 11-12 meses (masculino); p&lt;0.05.</p>
<b>Torres et al., 2016/ Brazil</b>	<i>In vivo:</i> Ratos wistar machos (n=8)	Óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> / extração prensada a frio e artesanal (fervura)	<p><u>PO feito à mão (HPO)</u></p> <p>Ácido palmítico: 33,76%</p> <p>Ácido oleico: 56,34%</p> <p>Compostos fenólicos: 252,00mg GAE/100g</p> <p>Carotenóides: 118,42mg/100g</p> <p>Tocoferóis: 154,27mg/kg</p> <p>Fitoesteróis: 793,32mg/kg</p> <p><u>PO prensado a frio (CPO)</u></p> <p>Ácido palmítico: 29,48%</p> <p>Ácido oleico: 59,99%</p> <p>Compostos fenólicos: 113,01mg GAE/100g</p> <p>Carotenóides: 89,82mg/100g</p> <p>Tocoferóis: 155,31mg/kg</p> <p>Fitoesteróis: 808,62mg/kg</p>	<p><i>In vivo:</i></p> <p><u>Toxicidade hepática:</u> HPO 3 e 6 mL/kg; CPO 3 mL/kg por gavagem intragástrica por 21 dias consecutivos → Toxicidade hepática induzida por dose única i.p. de 3mL/kg CCl4 no dia 22</p> <p>Lesão hepática: - Análise bioquímica (ALT, ALP, AST e perfis lipídicos); Análise histopatológica hepática; Análise lipídica hepática (lípidos totais e peroxidação lipídica por TBARS)</p> <p>Atividade antioxidante: - Capacidade antioxidante do fígado hidrofílico e lipofílico; Atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX, GR, GSH);</p> <p>Atividade anti-inflamatória: - Expressão gênica de marcadores inflamatórios (qRT-PCR); Concentração de citocinas (leptina, IL-1b, IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-<math>\alpha</math>, PPAR-<math>\gamma</math>, LTB-4, LTB-5, PGE-2)</p>	<p><i>In vivo:</i></p> <p>↓ Níveis de AST e ALT em 30 e 38%, respectivamente (HPO6; p&lt;0.05)</p> <p>↓ Nível AST 67% (CPO3; p&lt;0.05)</p> <p>↓ Triglicérides em 36% (CPO3; p&lt;0.05)</p> <p>↑ HDL em 14, 34 e 27% (HPO3,6 e CPO3, respectivamente; p&lt;0.05)</p> <p>↓ Lesões hepáticas (HPO3,6 e CPO3 de forma semelhante)</p> <p>↑ Peroxidação lipídica em 32% (HPO6 e CPO3; p&lt;0.05)</p> <p>↑ Capacidade antioxidante hidrofílica do fígado em 15 e 8% (HPO6 e CPO3, respectivamente; p&lt;0.05)</p> <p>- ↑ Atividades GPX e GR em 38% e 36% (HPO6 e CPO3, respectivamente; p&lt;0.05)</p> <p>↑ Atividade SOD em 25% (HPO6; p&lt;0.05)</p> <p>↑ GSH hepático em 101% (CPO3; p&lt;0.05)</p> <p>↓ Expressão do gene GST (HPO3; p&lt;0.05)</p> <p>↓ Leptina, IL-6, LTB-4 e LTB-5 (HPO6 e CPO3 de forma similar; p&lt;0.05)</p> <p>↓ Razão IL-6/IL-10 (HPO3 e 6 similarmente; p&lt;0.05)</p> <p>↑ Níveis de PGE2 (HPO6; p&lt;0.05)</p> <p>↓ Expressão do gene TNFR (CPO3; p&lt;0.05)</p> <p>↓ Expressão de gene IL-1, TNF-<math>\alpha</math>, IKK-<math>\beta</math>, TGFR1 (HPO6; p&lt;0.05)</p> <p>↑ Taxa de expressão gênica TNF-<math>\alpha</math>/IL-10 (CPO3; p&lt;0.05)</p>



AC = arm circumference; ACE = angiotensin converting enzyme; AHR = airway hyper-reactivity; AMC = arm muscle circumference; ALP = alkaline phosphatase; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; BALF = bronchoalveolar fluid; BMI = body mass index ; CAT = catalase; CBA = cytometric bead assay; CI = confidence intervals; CK = creatine kinase; Cg = carrageenan; CRP = C-reactive protein; CRP-G1059C = C-reactive protein polymorphism; DAI – disease activity index; DPPH = 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate; DSS = dextran sulfate sodium; EAS= abnormal elements of sediment; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; GC-MS = gas chromatography–mass spectrometry; GGT = gamma glutamyl transferase; GPX = glutathione peroxidase; GR = glutathione reductase; GSH = glutathione; GST-M1/T1 = glutathione S-transferase M1 and T1; GSTT1 = glutathione S-transferase; HC= hip circumference; HDL = high-density lipoprotein; Hp = haptoglobin; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein; IEL = intraepithelial lymphocytes; IFN- $\gamma$  = interferon gama; IKK $\beta$  = IkappaB kinase-beta; IL = interleukins; i.p = intraperitoneal; KC = keratinocyte derived chemokine; LDL = low density lipoprotein; LPS = lipopolysaccharide; LTB = leukotriene; MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1; MnSOD = manganese superoxide dismutase; MPO = myeloperoxidase; MTHFR-C677T and MTHFR-A1298C = methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms; MUFA = monounsaturated fatty acids; NE = nanoemulsion; NMR = nuclear magnetic resonance; OA = oleic acid; OR = odds ratio; PDW = platelet distribution width; PGE-2 = prostaglandin E2; PO = pequi oil; PPAR- $\gamma$  = peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; qRT-PCR = quantitative real-time polymerase chain reaction; ROS = reactive oxygen species; SFA = saturated fatty acid; S-IgA = secretory-immunoglobulin A; SNP = single-nucleotide polymorphisms; SOD = superoxide dismutase; TBARS = thiobarbituric acid reactive substances; TG = triglycerides; TGF $\beta$ 1 = transforming growth factor beta receptor 1; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor alpha; TNFR = tumor necrosis factor receptor; TS=triceps skinfold; VLDL = very low-density lipoprotein; v.s. = via subcutaneous; WBC = white blood cells; WC= waist circumference

**Tabela 1:** Síntese das características descritivas dos estudos incluídos.

Curiosamente, todos os estudos selecionados foram realizados no Brasil e foram publicados de 2009 a 2021 no idioma inglês.

Os PO utilizados nos estudos incluídos foram extraídos principalmente por solvente (n= 4) (Coutinho et al., 2020; Miranda-Vilela et al., 2009, 2011, 2016), fervura (n=1)(Torres et al. , 2016c), prensado a frio/centrifugação (n=4 ) (Junior et al., 2020; Montalvão, 2016; Roll et al., 2018; Torres et al., 2016a), e não informado (n=2) (Aguilar et al., 2012; Moreno et al., 2021). Alguns estudos avaliaram as características do óleo analisando o perfil lipídico (n=9) e outros metabólitos (n=7).

Os estudos *in vitro* (n=2) e *in vivo* (n=6) avaliaram o efeito anti-inflamatório da PO avaliando diferentes modelos envolvendo marcadores inflamatórios (Tabela 1), como a aterosclerose (n=1) (Aguilar et al., 2012); colite ulcerativa (n=1) (Moreno et al., 2021), pleurise (n=1) (Junior et al., 2020), inflamação pulmonar (n=1) (Coutinho et al., 2020), edema de pata (n=1) (Junior et al., 2020), atividade antioxidante e seu impacto na inflamação (n=2) (Roll et al., 2018; Torres et al., 2016). Os estudos clínicos (n = 4) compararam os efeitos da suplementação oral PO em marcadores inflamatórios (por exemplo, peroxidação lipídica) de voluntários saudáveis (corredores) após corridas e em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Tabela 1) (Miranda-Vilela et al., 2009, 2011, 2016; Montalvão, 2016).

Com relação ao desenho experimental, os estudos *in vitro* e *in vivo* foram heterogêneos quanto ao modelo animal, duração do experimento e dose de tratamento. Um estudo *in vitro* avaliou a atividade antioxidante do PO pelo ensaio DPPH (Roll et al.,

2018), enquanto o outro investigou a produção de ROS de uma cultura primária de macrófagos residentes no peritônio de animais suplementados com 7% de PO por via oral por 2 semanas (Aguilar et al., 2012). Em relação aos estudos *in vivo*, 84% dos estudos adotaram camundongos como modelos animais (n=5) e 16% usaram ratos (n=1) (Torres et al., 2016). A linhagem de camundongos utilizada foi *C57BL/6* (n=2); selvagem e geneticamente modificado), *A/J* (n=1) e *Swiss* (n=2). Para o estudo com ratos, foi utilizada a cepa *Wistar*. Em relação à idade dos roedores, os efeitos da PO foram avaliados em camundongos de 6 a 8 semanas (n=2) (Aguilar et al., 2012; Junior et al., 2020) e 6 a 12 meses (n=1) (Roll et al., 2018) que são equivalentes a humanos aproximadamente adolescentes e idosos, respectivamente (Jackson et al., 2017). A idade do roedor de três estudos *in vivo* não foi informada (Coutinho et al., 2020; Moreno et al., 2021; Torres et al., 2016).

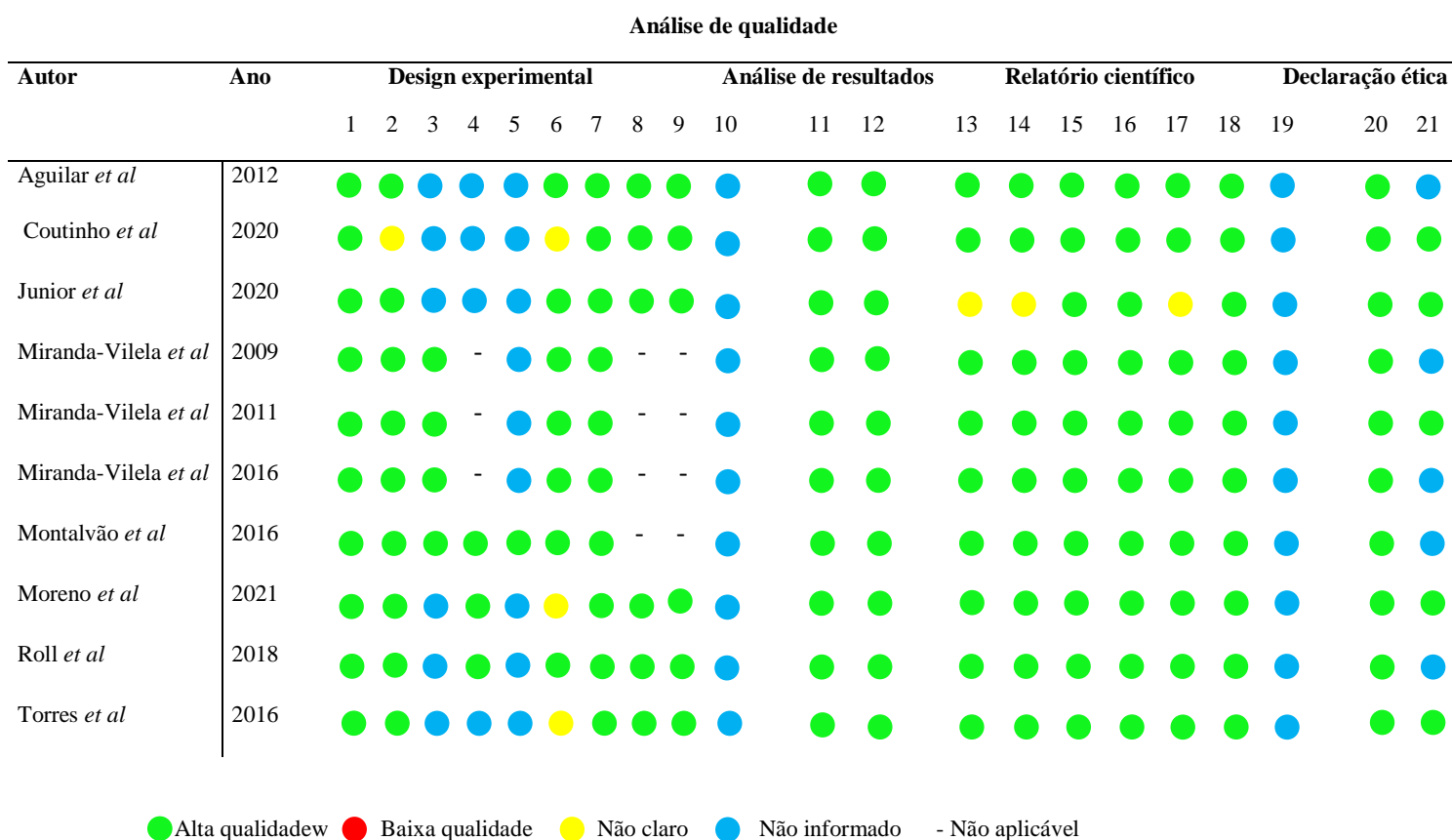
A administração oral foi a via utilizada em todos os estudos *in vivo* (n=6), com dois estudos utilizando uma mistura de PO com a dieta (Aguilar et al., 2012; Moreno et al., 2021). PO foi administrado diariamente em curto prazo (1 a 18 h; n = 2) ou longo prazo (variando de 2 semanas a 6 semanas; n = 4). As doses PO utilizadas nos tratamentos variaram entre ~ 20 mg e 1000 mg/Kg (n=3). Em outro estudo, a dose informada variou de 3 a 6 mL/Kg; essa dose não foi convertida para “mg/Kg” por falta de maiores detalhes sobre a densidade do óleo, por exemplo (Torres et al., 2016). Em dois estudos, não foi possível calcular a dose administrada com precisão, pois o óleo foi misturado à dieta e não havia informações sobre a média de consumo de ração/grupo experimental (Aguilar et al., 2012; Moreno et al., 2021).

Para todos os estudos clínicos (n=4), adotou-se a administração oral de 400 mg PO diariamente por 14 (n=3) e 60 dias (n=1) (Tabela 1). Os voluntários eram pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (n=1) e pessoas saudáveis com desempenho de pelo menos 4.000 m de corrida, incluindo homens e mulheres com idades variando de 15 a 67 anos (n=3).

### **Qualidade dos estudos individuais**

A avaliação da qualidade baseou-se nas diretrizes ARRIVE de todos os estudos incluídos (Figura 3) onde os critérios não claramente relatados ou com informações incompletas foram classificados como “pouco claros”. O desenho do estudo foi bem

executado na maioria dos estudos e alguns artigos mencionaram claramente a presença de grupos de controle (n=10), via de administração (n=10), tempo de tratamento (n=10) e dose de PO (n=9). Estudos in vivo e clínicos foram considerados adequados e a aprovação do comitê de ética foi claramente relatada em todos os estudos. A maioria dos estudos não descreve claramente as informações sobre cegamento (n=9), alocação/randomização (n=4) e a idade dos roedores avaliados (n=3), o que é necessário para avaliação de qualidade.



**Figura 3:** Qualidade geral dos estudos selecionados. A descrição detalhada dos parâmetros avaliados é encontrada no anexo 3.

### Fisiologia e controle do processo inflamatório

A inflamação é um processo complexo caracterizado pela ação dinâmica de moléculas e células do sistema imunológico para restabelecer a homeostase em um local tecidual lesado ou invadido por patógenos (Panigrahy et al., 2021). A orquestração da inflamação ocorre por meio de um equilíbrio ordenado da produção de mediadores pró e anti-inflamatórios responsáveis pelo início e subsequente cessação da resposta

inflamatória (Rossi et al., 2021). Esses mediadores atuam por meio de sinais parácrinos, autócrinos e endócrinos, regulando a inflamação e promovendo alterações celulares relacionadas à modulação da expressão gênica, redirecionamento do metabolismo energético, ativação de vias de biossíntese, rearranjo do citoesqueleto e liberação de grânulos citoplasmáticos (Dias et al., 2020; GAO et al., 2021; Mughees et al., 2022).

A ativação do processo inflamatório ocorre por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e danos (PAMPs e DAMPs, respectivamente) por receptores de reconhecimento de padrões expressos em células do sistema imunológico, principalmente macrófagos, células dendríticas e mastócitos (Dias et al., 2020; Leuti et al., 2020). O reconhecimento desses padrões estimula a liberação de moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias como MCP-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$  e eicosanóides derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) que promovem a ativação e o recrutamento de novos leucócitos e linfócitos para o sítio inflamatório, integrando as respostas imunes inata e adaptativa (Leuti et al., 2020; Rossi et al., 2021).

O microambiente inflamatório é benéfico quando formado em situações agudas diante de estímulos nocivos, promovendo a erradicação do agente infeccioso e preparando o tecido lesado para a remodelação (Dias et al., 2020). Porém, a perpetuação desse processo e seu estabelecimento de forma sistêmica impactam o funcionamento de diversos tecidos, gerando doenças de natureza inflamatória, como doença de Crohn, mal de Alzheimer, aterosclerose, acne, infartos, carcinogênese, entre outras complicações (Liu et al., 2022).

A resolução da inflamação é um processo ativo mediado pela produção de fatores anti-inflamatórios que marcam o retorno do tecido às suas condições fisiológicas (Panigrahy et al., 2021). Os macrófagos são as principais células envolvidas nesse processo devido à sua alta plasticidade estímulo-dependente (Dias et al., 2020). Quando sinalizados por citocinas regulatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13, os macrófagos fagocitam restos celulares e ativam vias metabólicas relacionadas à oxidação fosforilativa e produção de mediadores anti-inflamatórios lipídicos derivados de ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ -3, como resolvinas, protectinas e maresinas que impedem a cronificação do processo inflamatório, limitando a migração tecidual de neutrófilos e inibindo a liberação de citocinas e eicosanóides pró-inflamatórios (Dias et al., 2020; Leuti et al., 2020; Li et al., 2020; Locati et al., 2020; Panigrahy et al., 2021).

Além do processo de resolução fisiológica, a inflamação pode ser interrompida por meio do uso de anti-inflamatórios, que atuam inibindo diretamente as vias de gênese e manutenção da inflamação (Panigrahy et al., 2021). Apesar de serem eficazes na contenção da inflamação, a maioria desses medicamentos gera efeitos adversos graves devido à sua interação com componentes responsáveis pelo funcionamento fisiológico de alguns tecidos (Patil et al., 2019). Assim como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), cujo mecanismo de ação é a inibição da enzima ciclooxigenase (COX) responsável pela produção de prostaglandinas, porém, essa inibição impacta diretamente nas funções fisiológicas desempenhadas pela enzima relacionadas à hemostasia, citoproteção gástrica e entre outras atividades que resultam na ocorrência de efeitos adversos como lesões gástricas, hipertensão, nefropatias e outros (Patil et al., 2019). Portanto, a descoberta de novas moléculas capazes de conter a inflamação sem afetar a homeostase dos tecidos saudáveis é relevante.

A biodiversidade brasileira contribui significativamente para a descoberta de novas moléculas com atividade terapêutica (Xavier-Santos et al., 2022). Dentre as fontes de estudo, os óleos fixos extraídos de fontes vegetais têm sido amplamente investigados por sua atividade antiinflamatória (A. R. Ribeiro et al., 2022). Vários estudos avaliaram a capacidade do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em modular a inflamação por meio de modelos experimentais in vitro, in vivo e ensaios clínicos abordando os impactos dos tratamentos com óleo de pequi nos aspectos clínicos, celulares e moleculares da inflamação, bem como, na evolução de várias doenças inflamatórias.

## **Efeito anti-inflamatório do óleo de pequi em patologias inflamatórias**

### **Aterosclerose**

A aterosclerose é uma doença caracterizada pela deposição excessiva de lipoproteínas contendo apolipoproteína B na íntima da parede arterial causada pela perda da integridade endotelial devido a tensões no fluxo sanguíneo (Kotlyarov & Kotlyarova, 2022). As alterações na estrutura do endotélio e a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (oxLDL) ativam as respostas imunes inata e adaptativa, formando um quadro inflamatório crônico responsável por prejuízos no funcionamento do sistema cardiovascular (Ruparelia & Choudhury, 2020). O importante papel dos mecanismos inflamatórios na gênese e progressão da aterosclerose reflete o uso de terapias anti-

inflamatórias como abordagens terapêuticas para prevenir eventos cardiovasculares (Pedro-Botet et al., 2020).

O óleo de pequi é composto por ácidos graxos saturados e insaturados que desempenham funções na aterogênese, principalmente relacionadas ao processo inflamatório, integridade do endotélio vascular e promoção de dislipidemia (Aguilar et al., 2012; Kotlyarov & Kotlyarova, 2022). A interação desses ácidos graxos com a membrana plasmática das células endoteliais impacta sua fluidez, bem como aumenta a expressão de moléculas de adesão importantes para a ativação da resposta inflamatória em sítios aterogênicos (Kotlyarov & Kotlyarova, 2022).

Apesar dos efeitos aterogênicos promovidos pelos ácidos graxos presentes na composição do óleo de Pequi, no estudo desenvolvido por Aguilar et al., 2012, foi possível observar uma redução no número de lesões ateroscleróticas na aorta de camundongos fêmeas, *C57BL/6*, deficiente de receptor de LDL tratado com óleo de Pequi. Esse efeito pode estar relacionado à presença de metabólitos secundários na composição do óleo com atividade antioxidante, como carotenoides, tocoferóis e compostos fenólicos que possuem regiões eletrodensas capazes de reduzir os radicais livres e assim atenuar o estresse oxidativo produzido durante o processo inflamatório, além de apresentar importante papel na diminuição dos níveis de oxLDL e sua imunogenicidade detectada no estudo (Aguilar et al., 2012; Torres et al., 2016).

Corroborando com os resultados ateroprotetores do óleo de Pequi, em estudos clínicos com corredores por Miranda-Vilela et al., 2009, 2011, 2016 a suplementação com o óleo foi capaz de inibir a ativação plaquetária detectada pela redução da contagem plaquetária e do volume médio de plaquetas, e, ao contrário dos impactos no perfil lipídico esperados com a ingestão do óleo, os voluntários apresentaram redução nos níveis de LDL, VLDL, colesterol total, triglicérides e aumento do HDL. Esses efeitos do óleo de Pequi na aterogênese também foram associados à capacidade modulatória de polimorfismos em componentes relacionados a mecanismos antioxidantes endógenos e ao controle do funcionamento cardiovascular (Miranda-Vilela et al., 2009, 2011, 2016).

### **Colite ulcerosa**

A colite ulcerativa (CU) é uma doença inflamatória idiopática crônica do cólon. Esse distúrbio, no intestino, causa inflamação persistente da mucosa que cobre desde o reto até o cólon mais proximal, com duração variável e caracterizada por um curso

recorrente e remitente. Os sintomas clássicos são diarreia sanguinolenta com ou sem muco, urgência retal e graus variáveis de dor abdominal. A UC é caracterizada por eritema, perda do padrão vascular normal, granularidade, erosões, friabilidade, sangramento e ulcerações, com demarcação distinta entre intestino inflamado e não inflamado (Gajendran et al., 2019).

A interação entre a microbiota, o epitélio intestinal e o sistema imunológico são fatores importantes na fisiopatologia da RCU, pois podem implicar em alterações no perfil celular, resultando em aumento da produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. Além disso, o sistema imunológico pode conduzir a inflamação intestinal por resposta imune inata e adaptativa. Evidências recentes sugerem que vários fatores podem desequilibrar a homeostase intestinal, apresentando desafios futuros para o desenvolvimento de novas terapias para a UC (Danese, 2012; Maloy & Powrie, 2011).

Os alimentos com propriedades imunomoduladoras poderiam auxiliar no tratamento farmacológico da retocolite ulcerativa, uma vez que favorecem a manutenção da integridade intestinal. Nesse contexto, um alimento nutracêutico de destaque é o óleo extraído da polpa do pequi (*Caryocar Brasilense*). Possui quantidades consideráveis de ácidos graxos monoinsaturados imunomoduladores, principalmente ácido oleico, e carotenoides. Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) podem reduzir a intensidade da resposta inflamatória diminuindo a secreção de citocinas e reduzindo as proteínas plasmáticas pró-inflamatórias. Os carotenóides, que são amplamente conhecidos por sua atividade antioxidante, podem minimizar os efeitos prejudiciais devido aos altos níveis de radicais livres induzindo uma modulação do sistema imunológico (Moreno et al., 2021).

Estudos anteriores já demonstraram efeitos biológicos do pequi, como antioxidante e anti-inflamatório. Moreno et al., 2021 avaliaram os efeitos do óleo de pequi sobre elementos da resposta imune intestinal em camundongos com colite ulcerativa induzida por sulfato de dextrana sódica (DSS). Foi demonstrado que a ingestão de óleo de pequi contribuiu para a regulação da resposta imune e melhorou os sinais clínicos e histológicos de camundongos modelo de RCU. Encontrou-se redução de células citotóxicas e outros marcadores inflamatórios e estimulação de células reguladoras, preservando células produtoras de muco. Assim, este estudo forneceu novos insights sobre a importância da ingestão regular de óleo de pequi para melhor prognóstico da colite ulcerativa aguda (Moreno et al., 2021).

## **Inflamação pulmonar**

Várias doenças das vias aéreas estão relacionadas à inflamação das estruturas pulmonares. Por exemplo, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e a lesão pulmonar aguda (ALI) são doenças pulmonares inflamatórias em que danos à barreira alvéolo-capilar estão envolvidos na liberação de grânulos de neutrófilos e lesão oxidativa (Meyer et al., 2021; Moldoveanu et al., 2009). Além disso, algumas das causas da pleurisia, uma condição em que as camadas que separam os pulmões do tórax são lesadas, também estão relacionadas à inflamação (Karpathiou et al., 2022). A inflamação excessiva e crônica nos pulmões pode ser fatal, pois é um órgão vital.

Curiosamente, uma única dose oral de óleo de Pequi (1000 mg/Kg) 1 h antes da indução da pleurisia mostrou reduzir significativamente a migração de leucócitos para o exsudato pleural (Junior et al., 2020). Efeitos semelhantes foram observados por Coutinho e colaboradores (2020) onde um único tratamento oral com óleo de Pequi poucas horas antes da indução da inflamação pulmonar resultou em redução significativa na migração de leucócitos e neutrófilos para o pulmão. Vale ressaltar que efeitos anti-inflamatórios mais pronunciados foram observados quando o óleo de Pequi foi administrado em nanocarreadores (Coutinho et al., 2020). As vantagens do uso de nanoestruturas para fornecer óleos naturais são exploradas no óleo de pequi nanoestruturado.

A composição de ácidos graxos do óleo de pequi desempenha um papel importante em seus resultados anti-inflamatórios. O ácido palmítico é conhecido por induzir efeitos pró-inflamatórios nas células imunes (Radzikowska et al., 2019). Por outro lado, os efeitos do ácido oleico, um dos principais ácidos graxos encontrados no óleo de Pequi, na inflamação pulmonar são controversos. Vários estudos mostram que o ácido oleico desencadeia lesão pulmonar e inflamação após ser injetado por via intravenosa (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2015). No entanto, estudos avaliando a ingestão oral de ácido oleico evidenciam seu papel anti-inflamatório na SDRA e outras doenças respiratórias (Cazzoletti et al., 2019; Farag & Gad, 2022) corroborando os achados de Coutinho et al (2020) e Junior et al (2020). Vale a pena mencionar que a inflamação dos pulmões e suas estruturas geralmente envolve estresse oxidativo associado a danos nos tecidos (Meyer et al., 2021; Moldoveanu et al., 2009). Nesse contexto, compostos bioativos antioxidantes encontrados na composição do óleo de Pequi, como carotenóides e compostos fenólicos (Brito et al., 2022; Torres et al., 2016) também podem contribuir



para os efeitos anti-inflamatórios observados nos modelos de doenças das vias aéreas observado por Junior e colaboradores (2020) e Coutinho e colaboradores (2020).

### **Doenças autoimunes**

As doenças autoimunes são desencadeadas pela ativação do sistema imunológico contra autoantígenos, formando uma resposta imune que resulta em danos aos tecidos saudáveis. O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada por inflamação crônica na qual há atividade exacerbada de linfócitos B e T e produção maciça de autoanticorpos reativos, principalmente antinucleares, que se complexam e se depositam nos tecidos, promovendo a ocorrência de diversas manifestações clínicas (Kiriakidou & Ching, 2020). Pacientes com LES também apresentam maior incidência de dano ao DNA, o que pode estar relacionado ao estresse oxidativo causado pelo processo inflamatório (Montalvão, 2016).

A administração oral de 400mg de óleo de Pequi em pacientes com LES, não mostrou efeitos significativos na redução de danos ao DNA, bem como, esses pacientes mostraram resistência aos efeitos do óleo no perfil lipídico em comparação com outros estudos com corredores que receberam Pequi suplementação de óleo na mesma dose (Miranda-Vilela et al., 2009; Montalvão, 2016). Esses resultados contraditórios podem estar relacionados às diferenças entre os métodos de extração do óleo nos dois estudos, pois no estudo com pacientes com LES o óleo foi extraído por prensagem a frio e no estudo com rotores a extração foi feita com um solvente orgânico capaz de extrair maiores concentrações de componentes antioxidantes, como carotenoides (Miranda-Vilela et al., 2009; Montalvão, 2016). Além disso, a alta atividade do sistema imunológico no LES desencadeia alterações no metabolismo lipídico que podem afetar a sensibilidade aos efeitos do óleo de Pequi, sendo a redução dos níveis de HDL comum em pacientes com doenças autoimunes (Hahn et al., 2007).

Apesar desses resultados, a ingestão de óleo de Pequi por pacientes com LES foi capaz de reduzir os níveis de PCR-us (Montalvão, 2016). No entanto, embora a PCR seja um marcador clássico de inflamação, isso não é uma regra para todos os tipos de inflamação e, no caso do LES, a resposta inflamatória é caracterizada por citocinas de interferon tipo I que, diante de um quadro inflamatório exacerbado, com alta produção de IL-6, os níveis de PCR permanecem moderados, portanto, a correlação entre níveis

reduzidos de PCR-us e atividade antiinflamatória do óleo de Pequi não pode ser afirmada (Enocsson et al., 2021). Além disso, a PCR pode auxiliar na eliminação de complexos de anticorpos formados no LES por meio da ativação do sistema complemento e estimulação da fagocitose, podendo ter efeitos benéficos em pacientes com LES (Enocsson et al., 2021).

### **Inflamação local e nocicepção**

O processo inflamatório é um conjunto de alterações que ocorrem na forma de uma cascata de ativação. Diversos mediadores promovem vasoconstrição arterial, seguida de dilatação de arteríolas, capilares e veias (hiperemia) que circundam a região acometida, aumentando o número de vasos funcionantes, justificando os sinais clínicos de vermelhidão e calor. A segunda alteração será caracterizada pelo aumento da permeabilidade desses tecidos vasculares, pela ação proeminente de aminas vasoativas (histamina e serotonina) produzidas por mastócitos e basófilos, promovendo a abertura das junções entre as células epiteliais, permitindo a passagem de moléculas maiores e exsudato. Dessa forma, inicia-se o acúmulo de líquido contendo diversas moléculas, fibrinas e células inflamatórias nos interstícios da região inflamada. Esta etapa explica a formação clínica do edema e a liberação de certas moléculas explica a dor (Cruvinel et al., 2010; Fujiwara & Kobayashi, 2005; Ptaschinski & Lukacs, 2018)

O óleo de pequi tem sido descrito na literatura por sua ação anti-inflamatória e antinociceptiva. Um dos efeitos apresentados é a redução da migração de leucócitos para o tecido exsudado, o que pode refletir na redução da cascata de ativação de mediadores inflamatórios (Coutinho et al., 2020; Junior et al., 2020). Animais tratados com óleo de pequi e que apresentaram edema de membros inferiores induzido por carragenina reduziram o inchaço em até 60%, e também reduziram a dor em até 95% quando a dor foi induzida por formalina (Junior et al., 2020). A redução dessas condições está associada à atividade antiinflamatória proporcionada pelos flavonoides e terpenoides presentes no óleo de pequi, o que possivelmente reduz os efeitos da liberação de citocinas inflamatórias.

Outros estudos apontam o potencial anti-inflamatório dos ácidos graxos oleico e palmítico abundantemente presentes no óleo de pequi. Esses ácidos têm sido estudados por inibir a cascata de ativação inflamatória via metabólitos do ácido araquidônico,

modulando a resposta inflamatória, o que pode explicar a redução do edema de membros posteriores induzido por carragenina em animais previamente tratados com óleo de pequi (de Figueiredo et al., 2016). Estudos in vitro mostraram que monócitos humanos tratados com ácido linoléico e estimulados com LPS apresentaram inibição de diversas citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , interleucina 1 e 6 (Zhao et al., 2005).

### **Atividade antioxidante do óleo de pequi e impactos nos processos inflamatórios**

O estresse oxidativo é definido pelo desequilíbrio entre os níveis circulantes de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade dos mecanismos antioxidantes endógenos de neutralizá-los (Forman & Zhang, 2021). A instabilidade desses radicais livres é caracterizada pela presença de elétrons desemparelhados que permitem que eles reajam com macromoléculas celulares essenciais, comprometendo a viabilidade celular (Neha et al., 2019). Associado a isso, EROs são liberados durante a inflamação, que desempenham papéis essenciais no processo como mediadores da transdução do sinal de citocinas e NF- $\kappa$ B e promovem a erradicação de agentes infecciosos por ataques oxidativos, porém, a inflamação exacerbada está relacionada como fator promotor de processos oxidativos estresse e, curiosamente, altos níveis de ROS também podem ativar o processo inflamatório (Donia & Khamis, 2021; Neha et al., 2019)

Antioxidantes são moléculas capazes de serem oxidadas por radicais livres, reduzindo seus níveis circulantes. O óleo de pequi é rico em antioxidantes como carotenóides, vitamina E e polifenóis, em vista disso, muitos estudos têm sido realizados utilizando o óleo para prevenir danos celulares por estresse oxidativo mostraram que a suplementação com óleo de pequi foi capaz de atenuar o estresse oxidativo causado pelo exercício físico em ratos, promovendo a manutenção da integridade do tecido hepático, reduzindo os níveis de ROS e reduzindo os sinais de inflamação, como a infiltração de linfócitos (Miranda-Vilela et al., 2009, 2011, 2016; Vale et al., 2019) .

Além da atividade antioxidante direta promovida por reações como transferência de elétrons, captação de átomos de hidrogênio e adição do radical livre à estrutura molecular do antioxidante, o óleo de pequi também atua por meio da estimulação de mecanismos antioxidantes endógenos, conforme observado no estudo de Torres et al. ., 2016 com ratos em que a suplementação com óleo foi capaz de aumentar a atividade das enzimas GR, GPX e SOD que desempenham papéis importantes na desintoxicação de

radicais livres (Sandhiya & Zipse, 2022; Torres et al., 2016). Os resultados do ensaio de DPPH corroboram as observações da atividade antioxidante do óleo in vivo, uma vez que a dose de 26,26 mg/mL de óleo foi capaz de reduzir os níveis de DPPH em 50% (Roll et al., 2018).

No entanto, em relação à peroxidação lipídica, resultados diferentes foram observados nos estudos incluídos na revisão, pois no estudo de Torres et al., 2016, a suplementação com óleo de Pequi extraído por fervura e prensagem a frio foi capaz de aumentar em 32% o teor lipídico peroxidação em homogenatos hepáticos detectados pelo ensaio TBARS, mas em outros estudos o óleo foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica como demonstrado no estudo de Aguilar et al., 2012 e Coutinho et al., 2021 com amostras de fígado e pulmão de animais tratados com óleo de Pequi (Aguilar et al., 2012; Coutinho et al., 2020). Esses resultados paradoxais podem estar associados a predisposições genéticas de marcadores de inflamação que impactam o metabolismo lipídico, como observado no estudo de Miranda-Vilela et al., 2016, no qual indivíduos portadores do genótipo GG da interleucina 6 têm risco 2,9% maior peroxidação (Miranda-Vilela et al., 2016).

### **Correlação do efeito anti-inflamatório do óleo de pequi com atividade física e com polimorfismos genéticos**

A prática de atividade física promove o metabolismo celular relacionado ao aumento do consumo de oxigênio e à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Miranda-Vilela et al., 2009). Essas alterações são essenciais para o desempenho da contração muscular, porém, a prática de exercícios de forma exacerbada aumenta a produção de EROs em níveis acima da capacidade dos antioxidantes endógenos, gerando danos celulares por estresse oxidativo, e os DAMPs formados podem ser reconhecidos por células do sistema imunológico que inicia a formação de uma resposta inflamatória aguda (Arazi et al., 2021).

O óleo de pequi é rico em moléculas antioxidantes capazes de atenuar o estresse oxidativo e regular a inflamação gerada pela atividade física (Miranda-Vilela et al., 2009, 2011, 2016). Em estudos clínicos com corredores, a ingestão oral de 400 mg de óleo de Pequi reduziu a contagem de linfócitos e neutrófilos e os níveis circulantes de proteína C-reativa. Os resultados associados à redução da peroxidação lipídica detectada com o

ensaio de TBARs corroboram a estreita relação entre a atividade antioxidante do óleo de Pequi e seu efeito anti-inflamatório (Miranda-Vilela et al., 2009).

Uma das complicações decorrentes do estresse oxidativo é o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, atrelado a isso, um efeito comum da atividade física intensa é a elevação da pressão arterial (Daiber et al., 2021; Miranda-Vilela et al., 2011). Os ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oléico, presentes em grande proporção na composição do óleo de Pequi, estão associados a efeitos protetores do sistema cardiovascular por reduzirem a pressão arterial (Miranda-Vilela et al., 2009). Esse efeito foi demonstrado através da suplementação com óleo de Pequi em corredores, que apresentaram pressão arterial mais baixa em relação aos níveis detectados antes da suplementação, além disso, principalmente nos homens, os níveis de colesterol total e LDL também foram reduzidos, mas nas mulheres, os níveis de HDL foram maiores, o que pode estar relacionado ao efeito dos hormônios sexuais nos impactos da dieta no perfil lipídico (Miranda-Vilela et al., 2009).

Polimorfismos genéticos são responsáveis por alterações na expressão de proteínas e, conseqüentemente, impactam na atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo (Tripathi et al., 2020). Além disso, os compostos químicos presentes na composição do óleo de Pequi podem se ligar a fatores de transcrição, alterar as concentrações do substrato ou interagir com vias metabólicas, resultando na modulação da estabilidade genômica (Miranda-Vilela et al., 2011). A suplementação com óleo de pequi em corredores foi capaz de modular polimorfismos genéticos associados à predisposição ao estresse oxidativo e ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Miranda-Vilela et al., 2011, 2016).

Os genótipos de haptoglobina 1S/1T/2-2, MnSOD Val9Ala, T1 null glutathione S-transferases, enzima conversora de angiotensina I ID, proteína C-reativa GG, metilenotetrahidrofolato redutase C677T e IL-6 174 G/C estão associados a um maior risco de desenvolver doença cardiovascular através do aumento da peroxidação lipídica, níveis de LDL, VLDL, TG, colesterol total, proteína C-reativa e contagens de plaquetas e leucócitos. Após suplementação com óleo de pequi em corredores com esses genótipos, observou-se redução dos marcadores supracitados e das pressões arteriais diastólica e sistólica, caracterizando o efeito protetor cardiovascular do óleo de pequi (Miranda-Vilela et al., 2011, 2016).

## **Óleo de pequi nanoestruturado**

Nanotecnologia é a ciência relacionada ao desenvolvimento de materiais na escala nano (10<sup>-9</sup>m). O grande interesse na produção de nanomateriais se deve às grandes possibilidades abertas pela ocorrência de novas características físico-químicas quando comparadas com materiais a granel (Bayda et al., 2019). Especialmente no que diz respeito às aplicações biológicas, os nanomateriais são uma ferramenta incrível para superar os desafios fisiológicos para a entrega de compostos bioativos (Zorzi, 2015). A produção de nanofitoterápicos é um campo emergente que tem sido crucial para melhor compreender os mecanismos que possibilitam o uso terapêutico de moléculas derivadas de plantas com baixa estabilidade, aumentando também sua atividade biológica (Sampaio et al, 2022).

A nanoestruturação do óleo de pequi é uma estratégia eficiente para superar a limitação de seu uso terapêutico ocasionada por seu perfil hidrofóbico que causa baixa biodistribuição. O encapsulamento do óleo de Pequi em nanoemulsões pode aumentar sua eficiência, melhorando a biodistribuição, reduzindo possíveis efeitos adversos, além de reduzir a exposição do óleo a ações externas, como oxidação e hidrólise, preservando seus compostos bioativos (Ombredane et al., 2022). As nanoemulsões são caracterizadas por possuírem diâmetro variando entre 50-200 nm e serem constituídas por uma fase oleosa, uma fase aquosa e um agente tensoativo (Coutinho et al., 2020; Gupta et al., 2016).

No estudo de Coutinho et al.,2021, a nanoencapsulação do óleo de Pequi em nanoemulsões (PENE) foi capaz de aumentar a atividade antiinflamatória do óleo. Animais suplementados com 20mg/kg de PENE apresentaram ausência de migração de leucócitos e neutrófilos para os pulmões estimulados com LPS, também, níveis reduzidos de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 e KC. Curiosamente, esses efeitos não foram observados nos animais tratados com óleo de Pequi livre na mesma dose, indicando que a formulação de PENE foi capaz de otimizar a apresentação do óleo às barreiras fisiológicas e diretamente com células imunes (Coutinho et al. , 2020).

## **Mecanismos de ação anti-inflamatória do óleo de pequi**

Um dos grandes desafios envolvendo a investigação de aplicações terapêuticas de fitoterápicos é a elucidação dos mecanismos de ação relacionados às suas bioatividades.

Sua matriz é composta por diferentes substâncias que atuam em conjunto, apresentando sinergismos e antagonismos em diferentes pontos do metabolismo celular (Yatoo et al., 2018). Além disso, fatores como metodologia de extração e sazonalidade impactam diretamente na caracterização química e, portanto, na reprodutibilidade dos efeitos moleculares (Torres et al., 2016). Diante desse contexto, a definição do mecanismo de ação dos fitoterápicos é um quebra-cabeça complexo no qual as peças se encaixam através da investigação de suas substâncias isoladas formando uma visão limitada, mas que serve de base para a compreensão de sua eficácia terapêutica.

De acordo com os resultados de caracterização química dos estudos incluídos na presente revisão, o óleo de Pequi é composto principalmente por ácido oleico (~55%) e ácido palmítico (40%) (Aguilar et al., 2012; Coutinho et al., 2020; Junior et al., 2020; Miranda-Vilela et al., 2009, 2011, 2016; Moreno et al., 2021; Roll et al., 2018; Torres et al., 2016). Ambos os ácidos gordos têm efeitos paradoxais na resposta inflamatória, estando o ácido palmítico associado a efeitos pró-inflamatórios e o ácido oleico a efeitos anti-inflamatórios (Korbecki & Bajdak-Rusinek, 2019; Santamarina et al., 2021). Essas associações são resultado da interação desses ácidos graxos na via de sinalização celular mediada pelos toll-like receptors 4 (TLR-4), esses receptores são expressos na membrana das células do sistema imune e quando ativados estimulam o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) para iniciar a transcrição gênica de vários mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) e matriz metalopeptidase 9 (MMP9) (Korbecki & Bajdak-Rusinek, 2019). Os ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico, ao se ligarem ao TLR4, estimulam a via de sinalização resultando na ativação da inflamação, enquanto os ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico, a inibem (Korbecki & Bajdak-Rusinek, 2019; Santamarina et al., 2021).

A presença do ácido oleico em concentração superior ao ácido palmítico leva à predominância de efeitos anti-inflamatórios relacionados à inibição da via TLR4. Conforme observado no estudo de Coutinho et al., houve redução dos níveis dos mediadores TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, MCP-1 e quimiocinas derivadas de queratinócitos (KC) em animais tratados com 20mg/kg de nanoemulsões à base de óleo de Pequi (Coutinho et al., 2020). Além disso, o estudo de Torres et al., mostrou um efeito semelhante relacionado à redução da expressão gênica dos marcadores inflamatórios IL-1, TNF-alfa, IkappaB quinase-beta (IKK-beta) e receptor do fator de crescimento

transformador beta 1 (TGFR1) em animais suplementados com óleo de Pequi extraído manualmente na concentração de 6mL/kg (Torres et al., 2016).

Os mediadores pró-inflamatórios desempenham um papel essencial na sinalização dos componentes do sistema imunológico durante a gênese da inflamação, com redução dos níveis circulantes dessas moléculas, resulta em redução da migração e dos níveis plasmáticos de leucócitos envolvidos na inflamação aguda, principalmente monócitos, macrófagos e neutrófilos (Rossi et al., 2021). Animais tratados com óleo de pequi apresentam níveis reduzidos de leucócitos (Coutinho et al., 2020; Junior et al., 2020; Moreno et al., 2021; Roll et al., 2018; Torres et al., 2016). Vale ressaltar que no estudo de Coutinho et al., 20mg/kg de nanoemulsões à base de óleo de Pequi atenuou a migração de leucócitos pulmonares em camundongos na mesma proporção que o tratamento com 5mg/kg de nanoemulsões à base de ácido oleico, evidenciando a proximidade relação entre o ácido oleico na atividade anti-inflamatória do óleo de Pequi (Coutinho et al., 2020). Os resultados encontrados em modelos *in vivo* corroboram a atividade inibitória da migração leucocitária do óleo de Pequi, constatada no ensaio clínico com atletas realizado por Miranda-Vilella et al., 2009 onde este efeito foi observado uma vez que todos os voluntários apresentaram redução nos níveis de neutrófilos e linfócitos (Miranda-Vilella et al., 2009).

Durante a resposta inflamatória, vários mediadores de natureza lipídica são produzidos, entre eles, as prostaglandinas desempenham papéis importantes na inflamação ao se ligarem a receptores acoplados à proteína G, iniciando uma cascata de sinalização intracelular que dependendo do contexto do microambiente inflamatório e citocinas liberadas podem resultar na estimulação ou resolução da inflamação (Oyesola & Tait Wojno, 2021). No estudo de Torres et al., o tratamento com óleo de Pequi extraído artesanalmente foi capaz de aumentar a produção de prostaglandina E2 (PGE2), esse mesmo efeito foi observado no estudo de Muller et al., em macrófagos RAW264 tratados com ácido oleico e pode estar relacionado com a incorporação desse ácido graxo na composição fosfolipídica da membrana celular, que passa a competir com o ácido araquidônico no sítio enzimático da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) e assim é convertido em PGE2 (Müller et al., 2021). Sinergicamente, o ácido palmítico foi ligado ao aumento da expressão do gene COX-2 em macrófagos RAW264.7 (Tsai et al., 2021). No contexto dos resultados encontrados no estudo de Torres et al., a PGE2 pode estar



exercendo um efeito anti-inflamatório devido à redução dos níveis de leptina, IL-6 e leucotrienos 4 e 5 detectados nos mesmos grupos de animais (Torres et al., 2016).

### **Aspectos de toxicidade do óleo de Pequi**

A avaliação da toxicidade é um aspecto importante a ser analisado, principalmente se a aplicação do óleo de pequi for voltada para uso terapêutico. No estudo realizado por Traesel et al. (2017) para avaliar os efeitos maternos, embriotóxicos e teratogênicos do óleo de Pequi, o óleo foi administrado por gavagem em camundongos, nas concentrações de 250 a 1000 mg/kg/dia por grupo até o 15º dia de gestação e não apresentou toxicidade e não afetou taxas de variáveis reprodutivas, embrionárias ou fetais, sugerindo que o consumo do óleo durante a gravidez é seguro para a fêmea e o feto. O mesmo grupo de pesquisa estuda a toxicidade aguda com a administração de 2.000 mg/kg/pv em dose única em ratas Wistar fêmeas e o óleo de pequi apresentou baixa toxicidade, não causando morte, mudança de hábitos fisiológicos ou alteração no comportamento dos animais Estado de saúde. No entanto, nos achados subcrônicos, o óleo de pequi causou alguma irregularidade hematopoiética, não ficou claro o motivo dessas anormalidades, portanto mais experimentos são necessários (Traesel et al., 2017).

Em relação à genotoxicidade, estudos que realizaram o ensaio do cometa, metodologia amplamente utilizada para detectar danos ao DNA, o óleo de pequi quando administrado cronicamente a animais nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 mg/kg/pc, apresenta índice de dano e frequência de danos semelhantes ao grupo de controle negativo, não mostrando danos significativos no DNA. O teste do micronúcleo não apresenta efeito clastogênico/aneugênico na medula óssea, corroborando com o ensaio do cometa e indicando ausência de efeito genotóxico em ratos Wistar machos e fêmeas (Traesel et al., 2017).

### **Relevância da descrição da caracterização e metodologia de extração do óleo de pequi**

O óleo de pequi apresenta considerável variabilidade em suas características físicas e químicas, conforme a região de origem, pois o tipo de solo, clima, região e época de colheita são fatores que interferem na composição do fruto, de forma que óleos

extraídos em diferentes regiões tendem a apresentar diferentes concentrações de seus compostos principais (Cordeiro et al., 2013).

Em geral, o óleo de pequi possui o ácido oleico como principal ácido graxo constituinte, chegando a 54 a 59% do total, seguido do ácido palmítico, compreendendo 29 a 41% do total de ácidos graxos. O óleo de pequi também possui ácidos linoleico e palmitoleico, porém em menor quantidade. Além disso, sua constituição é muito rica em metabólitos secundários, como carotenoides, ácidos fenólicos, licopeno, vitamina A, vitamina C e tocoferóis (Aguilar e col., 2012; Miranda-Vilela e col., 2016; Moreno e col., 2021; Roll et al., 2018; Torres et al., 2016). No entanto, esses percentuais têm variado muito à medida que surgem novos estudos sobre as diferenças nutricionais das frutas de diferentes regiões.

Estudos indicaram que a polpa de pequi colhida na região de Goiás apresentou 60% de ácido oleico e 28% de ácido palmítico, enquanto a polpa de pequi colhida no Tocantins apresentou 35% e 16% desses mesmos constituintes, respectivamente. Indicam ainda que as concentrações de compostos fenólicos na fruta também oscilaram quanto à origem da fruta, sendo que as colhidas em Goiás apresentam 34% menos compostos fenólicos em relação às colhidas no Tocantins, assim como os teores de vitamina C, que foram cerca de 3 vezes maiores nos frutos colhidos em Minas Gerais em relação aos colhidos na região de Goiás (Ribeiro, 2011). As concentrações de carotenóides também são diferentes de acordo com a região, sendo que frutas colhidas no Mato Grosso e Minas Gerais possuem 5 vezes mais carotenóides em comparação com as colhidas no Tocantins (Ribeiro, 2011).

As concentrações dos carotenoides que compõem o óleo de pequi são muito variáveis, chegando a discrepância de 6,5 vezes em alguns trabalhos, porém, muitos autores não descrevem a região de origem do fruto, portanto não se pode afirmar que essas variações estejam de fato associadas à localização da coleção de pequi (Aguilar et al., 2012; Cordeiro et al., 2013; Oliveira et al., 2017; Torres et al., 2016)

Adicionalmente, foi observado que o método de extração escolhido interfere nas concentrações de ácidos graxos obtidos e nos compostos bioativos presentes no óleo de pequi, bem como em sua qualidade para consumo (Ribeiro et al., 2012). Tanto os ácidos gordos saturados como os insaturados e os carotenóides têm efeitos imunomoduladores, estando associados à resposta inflamatória, devido à sua notável atividade antioxidante,

reduzindo os efeitos nocivos dos radicais livres produzidos em excesso pelo organismo (Coutinho et al., 2020). No entanto, os carotenóides são altamente instáveis devido ao seu alto grau de estabelecimento, sendo mais susceptíveis aos efeitos de oxidação e isomerização quando expostos a fatores abióticos como calor, luz e oxigênio (Ribeiro et al., 2012). Assim, técnicas de extração que apresentam variação de temperatura e alta incidência de luz podem resultar em óleos com oxidação química de ácidos graxos insaturados, além de menores quantidades de compostos bioativos como carotenoides e ácidos fenólicos, interferindo diretamente em sua propriedade biológica e potencial farmacológico (Ferreira et al., 2011; Mariano et al., 2009; Moreno et al., 2021; Ribeiro et al., 2012).

A técnica de extração também interfere na estabilidade do óleo e de seus compostos. Evidenciou-se que a extração do óleo de pequi pelo uso de solventes promove quase 2 vezes mais carotenóides quando comparada à extração mecânica e por fervura, porém, após um período de 6 meses, a concentração de carotenóides presentes no óleo extraído por fervura permaneceu próximo do inicial, enquanto o extraído por solventes o reduziu a quase metade, e por extração mecânica, a um terço (Ribeiro et al., 2012). Assim, é de extrema importância descrever o método utilizado para a extração do óleo de pequi, pois a técnica está intimamente ligada à composição do óleo e à preservação de suas características bioquímicas e, conseqüentemente, de sua atividade biológica.

## **Conclusão**

A presente revisão sistemática destaca a potencial atividade anti-inflamatória do óleo de Pequi contra diversas patologias de natureza inflamatória. Os resultados encontrados nos estudos incluídos indicam a capacidade do óleo de interagir com mecanismos intrínsecos do processo inflamatório através da modulação da expressão gênica e dos níveis circulantes de mediadores pró e anti-inflamatórios, redução do estresse oxidativo, migração de células do sistema imunológico e ocorrência de sinais cardinais da inflamação, como edema e nocicepção. Além disso, a atividade antiinflamatória do óleo de Pequi foi potencializada pelo encapsulamento em nanoemulsões, contornando a característica hidrofóbica do óleo e otimizando sua interação com os componentes biológicos. Adicionalmente, com a inclusão de estudos utilizando modelos experimentais *in vitro*, *in vivo* e clínicos, também foi possível observar, sob a ótica de diferentes níveis

de complexidade biológica, os efeitos tóxicos e genotóxicos nulos ou baixos do óleo de Pequi. No entanto, os impactos da sazonalidade e da metodologia de extração na caracterização química do óleo chamam a atenção para a importância do desenvolvimento de estudos que avaliem comparativamente a eficácia terapêutica e a segurança do óleo de pequi de diferentes origens e metodologias de extração.

### **Conflito de interesses**

G. A. Joanitti é o inventor nomeado do seguinte pedido de patente (patente provisória: BR 10 2017 025294 9, 24 de novembro de 2017, Instituto Nacional da Propriedade Industrial—INPI) relativo ao desenvolvimento e uso de nanoemulsões à base de óleo de pequi. Esta patente não representa um conflito de interesse direto com os dados relatados neste manuscrito. Todos os outros autores declaram não haver conflito de interesses.

### **Declaração de disponibilidade de dados**

As contribuições originais apresentadas no estudo estão incluídas no artigo/Material Suplementar. Dúvidas adicionais podem ser dirigidas ao autor correspondente.

### **Financiamento**

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código Financeiro 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiotecnologia (INCT Nanobiotecnologia) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF). Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

## Referências bibliográficas

- Aguilar, E. C., Jascalca, T. L., Teixeira, L. G., Lages, P. C., Ribeiro, A. C. C., Vieira, E. L. M., Peluzio, M. C. G., & Alvarez-Leite, J. I. (2012). Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *45*(7), 601–609. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500074>
- Arazi, H., Eghbali, E., & Suzuki, K. (2021). Creatine Supplementation, Physical Exercise and Oxidative Stress Markers: A Review of the Mechanisms and Effectiveness. *Nutrients*, *13*(3), 869. <https://doi.org/10.3390/nu13030869>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, *25*(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, *180*, 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>
- Brito, R. M., Barcia, M. T., Farias, C. A. A., Zambiasi, R. C., de Marchi, P. G. F., Fujimori, M., Honorio-França, A. C., França, E. L., & Pertuzatti, P. B. (2022). Bioactive compounds of pequi pulp and oil extracts modulate antioxidant activity and antiproliferative activity in cocultured blood mononuclear cells and breast cancer cells. *Food & Nutrition Research*, *66*. <https://doi.org/10.29219/FNR.V66.8282>
- Cazzoletti, L., Zanolin, M. E., Spelta, F., Bono, R., Chamitava, L., Cerveri, I., Garcia-Larsen, V., Grosso, A., Mattioli, V., Pirina, P., & Ferrari, M. (2019). Dietary fats, olive oil and respiratory diseases in Italian adults: A population-based study. *Clinical & Experimental Allergy*, *49*(6), 799–807. <https://doi.org/10.1111/cea.13352>
- Cordeiro, M. W. S., Cavallieri, Â. L. F., Ferri, P. H., & Naves, M. M. V. (2013). Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa de Caryocar brasiliense nativo do estado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *35*(4), 1127–1139. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000400024>
- Coutinho, D. D., Pires, J., Gomes, H., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Silva, P., Martins, M. A., Ferrarini, S. R., & Bernardi, A. (2020). Pequi (Caryocar brasiliense Cambess)-Loaded Nanoemulsion, Orally Delivered, Modulates Inflammation in LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *PHARMACEUTICS*, *12*(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111075>
- Cruvinel, W. de M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. de, Silva, N. P. da, & Andrade, L. E. C. (2010). Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, *50*(4), 434–447. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>
- Daiber, A., Steven, S., Euler, G., & Schulz, R. (2021). Vascular and Cardiac Oxidative Stress and Inflammation as Targets for Cardioprotection. *Current Pharmaceutical Design*, *27*(18), 2112–2130. <https://doi.org/10.2174/1381612827666210125155821>

- Danese, S. (2012). New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut*, *61*(6), 918–932. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300904>
- de Figueiredo, P. R. L., Oliveira, I. B., Neto, J. B. S., de Oliveira, J. A., Ribeiro, L. B., de Barros Viana, G. S., Rocha, T. M., Leal, L. K. A. M., Kerntopf, M. R., Felipe, C. F. B., Coutinho, H. D. M., & de Alencar Menezes, I. R. (2016). Caryocar coriaceum Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, *191*, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.038>
- Dias, I. H. K., Milic, I., Heiss, C., Ademowo, O. S., Polidori, M. C., Devitt, A., & Griffiths, H. R. (2020). Inflammation, Lipid (Per)oxidation, and Redox Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *33*(3), 166–190. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8022>
- Donia, T., & Khamis, A. (2021). Management of oxidative stress and inflammation in cardiovascular diseases: mechanisms and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(26), 34121–34153. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14109-9>
- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, *112*, 4–29. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Enocsson, H., Karlsson, J., Li, H.-Y., Wu, Y., Kushner, I., Wetterö, J., & Sjöwall, C. (2021). The Complex Role of C-Reactive Protein in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(24), 5837. <https://doi.org/10.3390/jcm10245837>
- Farag, M. A., & Gad, M. Z. (2022). Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *20*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00329-0>
- Ferreira, B. S., de Almeida, C. G., Faza, L. P., de Almeida, A., Diniz, C. G., Silva, V. L. da, Grazul, R. M., & le Hyaric, M. (2011). Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. *Molecules*, *16*(7), 5875–5885. <https://doi.org/10.3390/molecules16075875>
- Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(9), 689–709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target - Inflammation & Allergy*, *4*(3), 281–286. <https://doi.org/10.2174/1568010054022024>
- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umopathy, C., Ziade, N., & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-Month*, *65*(12), 100851. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.02.004>
- GAO, W.-J., LIU, J.-X., LIU, M.-N., YAO, Y.-D., LIU, Z.-Q., LIU, L., HE, H.-H., & ZHOU, H. (2021). Macrophage 3D migration: A potential therapeutic target for inflammation and deleterious progression in diseases. *Pharmacological Research*, *167*, 105563. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105563>
- Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Silva, A. R., Burth, P., Castro-Faria, M. V., & Castro-Faria-Neto, H. C. (2015). Acute Respiratory Distress Syndrome: Role of Oleic Acid-Triggered

- Lung Injury and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/260465>
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- Hahn, B. H., Grossman, J., Chen, W., & McMahon, M. (2007). The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: Roles of inflammation and dyslipidemia. *Journal of Autoimmunity*, 28(2–3), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.02.004>
- Jackson, S. J., Andrews, N., Ball, D., Bellantuono, I., Gray, J., Hachoumi, L., Holmes, A., Latcham, J., Petrie, A., Potter, P., Rice, A., Ritchie, A., Stewart, M., Strepka, C., Yeoman, M., & Chapman, K. (2017). Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Laboratory Animals*, 51(2), 160–169. <https://doi.org/10.1177/0023677216653984>
- Junior, A. J., Leitão, M. M., Bernal, L. P. T., dos Santos, E., Kuraoka-Oliveira, Â. M., Justi, P., Argandoña, E. J. S., & Kassuya, C. A. L. (2020). Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Caryocar brasiliense. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 19(3), 313–322. <https://doi.org/10.2174/1871523018666190408144320>
- Karpathiou, G., Péoc'h, M., Sundaralingam, A., Rahman, N., & Froudarakis, M. E. (2022). Inflammation of the Pleural Cavity: A Review on Pathogenesis, Diagnosis and Implications in Tumor Pathophysiology. *Cancers*, 14(6), 1415. <https://doi.org/10.3390/cancers14061415>
- Kiriakidou, M., & Ching, C. L. (2020). Systemic Lupus Erythematosus. *Annals of Internal Medicine*, 172(11), ITC81–ITC96. <https://doi.org/10.7326/AITC202006020>
- Korbecki, J., & Bajdak-Rusinek, K. (2019). The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflammation Research*, 68(11), 915–932. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01273-5>
- Kotlyarov, S., & Kotlyarova, A. (2022). Involvement of Fatty Acids and Their Metabolites in the Development of Inflammation in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms23031308>
- Leuti, A., Fazio, D., Fava, M., Piccoli, A., Oddi, S., & Maccarrone, M. (2020). Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 133–169. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.028>
- Li, C., Wu, X., Liu, S., Shen, D., Zhu, J., & Liu, K. (2020). Role of Resolvins in the Inflammatory Resolution of Neurological Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00612>
- Liu, Z., Lu, Y., Zhong, K., Wang, C., & Xu, X. (2022). The associations between endocrine disrupting chemicals and markers of inflammation and immune responses: A systematic review and meta-analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234, 113382. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113382>

- Locati, M., Curtale, G., & Mantovani, A. (2020). Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *15*(1), 123–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>
- Maloy, K. J., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, *474*(7351), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature10208>
- Mariano, R. G. de B., Couri, S., & Freitas, S. P. (2009). Enzymatic technology to improve oil extraction from *Caryocar brasiliense* camb. (Pequi) Pulp. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *31*(3), 637–643. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452009000300003>
- Methley, A. M., Campbell, S., Chew-Graham, C., McNally, R., & Cheraghi-Sohi, S. (2014). PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. *BMC Health Services Research*, *14*(1), 579. <https://doi.org/10.1186/s12913-014-0579-0>
- Meyer, N. J., Gattinoni, L., & Calfee, C. S. (2021). Acute respiratory distress syndrome. *The Lancet*, *398*(10300), 622–637. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00439-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00439-6)
- Miranda-Vilel, A. L., Ribeiro, I. F., & Grisolia, C. K. (2016). Association between interleukin 6 -174 G/C promoter gene polymorphism and runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi (*Caryocar Brasiliense* camb.) oil: A before-after study. *Genetics and Molecular Biology*, *39*(4), 554–566. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0299>
- Miranda-Vilela, A. L., Lordelo, G. S., Akimoto, A. K., Alves, P. C. Z., Pereira, L. C. da S., Klautau-Guimarães, M. de N., & Grisolia, C. K. (2011). Genetic polymorphisms influence runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): a before-after study. *Genes & Nutrition*, *6*(4), 369–395. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0217-y>
- Miranda-Vilela, A. L., Pereira, L. C. S., Gonçalves, C. A., & Grisolia, C. K. (2009). Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. *Nutrition Research*, *29*(12), 850–858. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.10.022>
- Miranda-Vilela, A. L., Ribeiro, I. F., & Grisolia, C. K. (2016). Association between interleukin 6 -174 G/C promoter gene polymorphism and runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil: a before-after study. *Genetics and Molecular Biology*, *39*(4), 554–566. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2015-0299>
- Moldoveanu, B., Otmishi, P., Jani, P., Walker, J., Sarmiento, X., Guardiola, J., Saad, M., & Yu, J. (2009). Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of Inflammation Research*, *2*, 1–11.
- Montalvão, T. M. (2016). Anti-inflammatory Effect of Antioxidant Pequi (*Caryocar Brasiliense*) Oil Capsules and Antioxidant Effect of Vitamin D and Physical Activity on Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Journal of Rheumatic Diseases and Treatment*, *2*(1). <https://doi.org/10.23937/2469-5726/1510029>



- Moreno, L. G., Evangelista-Silva, P. H., Santos, E. C., Prates, R. P., Lima, A. C., Mendes, M. F., Ottone, V. O., Ottoni, M. H. F., Pereira, W. F., Melo, G., & Esteves, E. A. (2021). Pequi Oil, a MUFA/Carotenoid-Rich Oil, Exhibited Protective Effects against DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 123(9). <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000332>
- Mughees, M., Kaushal, J. B., Sharma, G., Wajid, S., Batra, S. K., & Siddiqui, J. A. (2022). Chemokines and cytokines: Axis and allies in prostate cancer pathogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.02.017>
- Müller, A. K., Albrecht, F., Rohrer, C., Koeberle, A., Werz, O., Schlörmann, W., Glei, M., Lorkowski, S., & Wallert, M. (2021). Olive Oil Extracts and Oleic Acid Attenuate the LPS-Induced Inflammatory Response in Murine RAW264.7 Macrophages but Induce the Release of Prostaglandin E2. *Nutrients*, 13(12), 4437. <https://doi.org/10.3390/nu13124437>
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- NIHR. Registering a review of animal studies on PROSPERO [Internet]. National Institute for Health Research: International prospective register of systematic reviews. 2020. p. 1–12. Available from: [https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/export\\_record\\_pdf.php](https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/export_record_pdf.php)
- Oliveira, C. F; Pinto, E.; Rezende, P. (2017). Compostos Bioativos de Extratos de pequi de diferentes regiões do Cerrado. Enciclopédia Biosfera, v. 14, n. 25. Available from: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2017a/agrar/compostos%20bioativos.pdf>
- Ombredane, A. S., Silva, L. R. A., Araujo, V. H. S., Costa, P. L., Silva, L. C., Sampaio, M. C., Lima, M. C. F., Veiga Junior, V. F., Vieira, I. J. C., Azevedo, R. B., & Joanitti, G. A. (2022). Pequi oil (Caryocar brasiliense Cambess.) nanoemulsion alters cell proliferation and damages key organelles in triple-negative breast cancer cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113348. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113348>
- Oyesola, O. O., & Tait Wojno, E. D. (2021). Prostaglandin regulation of type 2 inflammation: From basic biology to therapeutic interventions. *European Journal of Immunology*, 51(10), 2399–2416. <https://doi.org/10.1002/eji.202048909>
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, n71. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
- Panigrahy, D., Gilligan, M. M., Serhan, C. N., & Kashfi, K. (2021). Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, 227, 107879. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107879>
- Patil, K. R., Mahajan, U. B., Unger, B. S., Goyal, S. N., Belemkar, S., Surana, S. J., Ojha, S., & Patil, C. R. (2019). Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of

- Phytopharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4367. <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>
- Pedro-Botet, J., Climent, E., & Benaiges, D. (2020). Arteriosclerosis e inflamación. Nuevos enfoques terapéuticos. *Medicina Clínica*, 155(6), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.04.024>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Ptaschinski, C., & Lukacs, N. W. (2018). Acute and Chronic Inflammation Induces Disease Pathogenesis. In *Molecular Pathology* (pp. 25–43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802761-5.00002-X>
- Radzikowska, U., Rinaldi, A. O., Çelebi Sözen, Z., Karaguzel, D., Wojcik, M., Cypryk, K., Akdis, M., Akdis, C. A., & Sokolowska, M. (2019). The Influence of Dietary Fatty Acids on Immune Responses. *Nutrients*, 11(12), 2990. <https://doi.org/10.3390/nu11122990>
- Ribeiro, D. M. (2011) Propriedades físicas, químicas e bioquímicas de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) de diferentes regiões do Cerrado. 2011. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/9962>
- Ribeiro, A. R., Silva, S. S., & Reis, R. L. (2022). Challenges and opportunities on vegetable oils derived systems for biomedical applications. *Biomaterials Advances*, 134, 112720. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2022.112720>
- Ribeiro, M. C., Vilas Boas, E. V. de B., Riul, T. R., Pantoja, L., Marinho, H. A., & Santos, A. S. dos. (2012). Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) oil. *Food Science and Technology*, 32(2), 386–392. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000053>
- Ribeiro Neto, J. A., Pimenta Tarôco, B. R., Batista dos Santos, H., Thomé, R. G., Wolfram, E., & Maciel de A Ribeiro, R. I. (2020). Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 112547. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112547>
- Roll, M. M., Miranda-Vilela, A. L., Longo, J. P. F., Agostini-Costa, T. da S., & Grisolia, C. K. (2018). The pequi pulp oil (Caryocar brasiliense Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. *Genetics and Molecular Biology*, 41(4), 858–869. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0218>
- Rossi, J.-F., Lu, Z. Y., Massart, C., & Levon, K. (2021). Dynamic Immune/Inflammation Precision Medicine: The Good and the Bad Inflammation in Infection and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.595722>
- Ruparelia, N., & Choudhury, R. (2020). Inflammation and atherosclerosis: what is on the horizon? *Heart*, 106(1), 80–85. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2018-314230>

- SAMPAIO, M. C. ; S. V. R. P. ; O. A. S. ; M. N. O. ; P. A. C. ; C. M. L. B. ; J. G. A. (2022). Nanotecnologia aplicada a fitoterápicos: Perspectivas para o SUS. . In C. R. M. ; F. L. A. ; R. M. F. F. ; S. M. S. ; B. P. C. ; C. S. J. M. ; R. S. S. R. F. (Org. ) LEITE (Ed.), *Ecossistema de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica em saúde* (1st ed., pp. 229–262). Rio Grande do Norte: Edições UERN.
- Sandhiya, L., & Zipse, H. (2022). Conformation-dependent antioxidant properties of  $\beta$ -carotene. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 20(1), 152–162. <https://doi.org/10.1039/D1OB01723C>
- Santamarina, A. B., Pisani, L. P., Baker, E. J., Marat, A. D., Valenzuela, C. A., Miles, E. A., & Calder, P. C. (2021). Anti-inflammatory effects of oleic acid and the anthocyanin keracyanin alone and in combination: effects on monocyte and macrophage responses and the NF- $\kappa$ B pathway. *Food & Function*, 12(17), 7909–7922. <https://doi.org/10.1039/D1FO01304A>
- Shamseer, L., Moher, D., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., Shekelle, P., & Stewart, L. A. (2015). Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ*, 349(jan02 1), g7647–g7647. <https://doi.org/10.1136/bmj.g7647>
- Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I., & Wang, W. (2019). Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological Research*, 139, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.001>
- Torres, L. R. de O., Santana, F. C. de, Torres-Leal, F. L., Melo, I. L. P. de, Yoshime, L. T., Matos-Neto, E. M., Seelaender, M. C. L., Araújo, C. M. M., Cogliati, B., & Mancini-Filho, J. (2016a). Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.009>
- Torres, L. R. de O., Santana, F. C. de, Torres-Leal, F. L., Melo, I. L. P. de, Yoshime, L. T., Matos-Neto, E. M., Seelaender, M. C. L., Araújo, C. M. M., Cogliati, B., & Mancini-Filho, J. (2016b). Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 97, 205–216. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2016.09.009>
- Torres, L. R. de O., Santana, F. C. de, Torres-Leal, F. L., Melo, I. L. P. de, Yoshime, L. T., Matos-Neto, E. M., Seelaender, M. C. L., Araújo, C. M. M., Cogliati, B., & Mancini-Filho, J. (2016c). Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.009>
- Traesel, G. K., de Lima, F. F., dos Santos, A. C., Souza, R. I. C., Cantadori, D. T., Kretschmer, C. R., Navarini, V. J., & Oesterreich, S. A. (2017). Evaluation of embryotoxic and

- teratogenic effects of the oil extracted from *Caryocar brasiliense* Cambess pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.018>
- Tripathi, P., Agarwal, S., Sarangi, A. N., Tewari, S., & Mandal, K. (2020). Genetic Variation in SOD1 Gene Promoter Ins/Del and Its Influence on Oxidative Stress in Beta Thalassemia Major Patients. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 14(2), 110–117.
- Tsai, Y.-W., Lu, C.-H., Chang, R. C.-A., Hsu, Y.-P., Ho, L.-T., & Shih, K.-C. (2021). Palmitoleic acid ameliorates palmitic acid-induced proinflammation in J774A.1 macrophages via TLR4-dependent and TNF- $\alpha$ -independent signalings. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 169, 102270. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2021.102270>
- Vale, A. F., Ferreira, H. H., Benetti, E. J., Rebelo, A. C. S., Figueiredo, A. C. R., Barbosa, E. C., & Simões, K. (2019). Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. *Brazilian Journal of Biology*, 79(2), 257–262. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.180015>
- VALLI, M., RUSSO, H. M., & BOLZANI, V. S. (2018). The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1 suppl 1), 763–778. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>
- Xavier-Santos, J. B., Passos, J. G. R., Gomes, J. A. S., Cruz, J. V. C., Alves, J. S. F., Garcia, V. B., da Silva, R. M., Lopes, N. P., Araujo-Junior, R. F., Zucolotto, S. M., Silva-Junior, A. A., Félix-Silva, J., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2022). Topical gel containing phenolic-rich extract from *Ipomoea pes-capre* leaf (Convolvulaceae) has anti-inflammatory, wound healing, and antiophidic properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112921. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112921>
- Yatoo, Mohd. I., Gopalakrishnan, A., Saxena, A., Parray, O. R., Tufani, N. A., Chakraborty, S., Tiwari, R., Dhama, K., & Iqbal, H. M. N. (2018). Anti-Inflammatory Drugs and Herbs with Special Emphasis on Herbal Medicines for Countering Inflammatory Diseases and Disorders - A Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 12(1), 39–58. <https://doi.org/10.2174/1872213X12666180115153635>
- Zhao, G., Etherton, T. D., Martin, K. R., vanden Heuvel, J. P., Gillies, P. J., West, S. G., & Kris-Etherton, P. M. (2005). Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), 909–917. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.204>
- ZORZI, G. K. et al. (2015). On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 426–436.

## CAPÍTULO 2

### AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar Brasiliense*) EM MODELOS *in vitro*

Este capítulo ainda não foi publicado. Andréia Camargo Pinheiro, Marina Mesquita Simões, Karen de Paiva; Graziella Anselmo Joanitti.

#### Resumo

Os macrófagos são peça fundamental durante um processo inflamatório, pois atuam diretamente nos tecidos lesados e, quando ativados, produzem diversas citocinas pró ou anti-inflamatórias que irão orquestrar diversas outras células do sistema imune. Os fármacos mais utilizados para aliviar os sintomas inflamatórios são esteroidais (AIEs) e não esteroidais (AINEs). Entretanto, apresentam limitações de uso a longo prazo devido a importantes efeitos adversos. O surgimento de novas terapias anti-inflamatórias é necessária. O óleo de pequi é composto por diversos compostos bioativos, cuja atividade anti-inflamatória já foi descrita na literatura. Associado à nanotecnologia, melhora sua absorção e biodisponibilidade dentro do organismo. Assim, o objetivo deste estudo foi formular e caracterizar nanoemulsão a base de óleo de pequi e avaliar seu potencial anti-inflamatório *in vitro* em macrófagos diferenciados de células da medula de ratos, a partir de L929. Nossos dados mostram que a nanoemulsão monodispersa (PdI 0,23) de óleo de pequi (123 nm -diâmetro hidrodinâmico; -15 mV - potencial zeta) foram preparados utilizando lecitina como surfactante em que se manteve a estabilidade físico-química ao longo de 60 dias, a 4°C. Efeitos anti-inflamatórios em macrófagos foram observados, com indução de produção de IL-10 e inibição de IL-12, com preservação do estado inativo dos macrófagos, observados por MEV. Estes resultados revelam que a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE) apresenta-se como promissor nanofitoterápico anti-inflamatório.

**Palavras-chave:** Óleo de pequi, *Caryocar brasiliensis*, Anti-inflamatório, Macrófagos, Fitoterapia, Nanotecnologia.

#### 1. Introdução

O processo inflamatório é clinicamente caracterizado por sintomas de vermelhidão, calor, dores agudas e perda de função. Porém, quando se fala de alterações fisiológicas,

observa-se uma ampla rede de processos celulares acontecendo simultaneamente dentro dos vasos sanguíneos e tecidos afetados, sendo orquestradas pelo sistema imunológico em forma de várias “cascatas de ativação” modulada por diversos mediadores (FRANCO et al., 2015; KUPRASH, 2016; ABDULKHALEQ et al., 2018; ACTOR, 2023).

Os macrófagos são umas das principais células envolvidas no processo de inflamação, pois atuam tanto como pró-inflamatórios, quando ativados durante a iniciação, ou como anti-inflamatórios, quando são ativados visando a manutenção da homeostase tecidual e remodelação e reparação, após a resolução de uma inflamação. Por produzirem diversos mediadores inflamatórios, como óxido nítrico, espécie reativa de oxigênio e citocinas, acabam sendo células-chave na condução da resposta inflamatória. (FUJIWARA et al., 2005; MARROCCO, 2022).

Sintomas clínicos da inflamação inicialmente eram tratados com extrato de plantas, porém, com o avanço das pesquisas e da tecnologia, diversos fármacos anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e não esteroidais (AINEs) foram desenvolvidos e hoje estão entre os mais prescritos no mundo (BINDU, 2020; DE ASSUNÇÃO et al., 2022; BATLOUNI, 2010; SILVA, 2019). Entretanto, diversas pesquisas recentes apontam, de forma assombrosa, os efeitos adversos dos AINEs para complicações gastrointestinais, cardiovasculares, cerebrais, pulmonares, hepáticas e renais, até então pouco descritas (BINDU et al., 2020; MONTEIRO et al., 2022). Desta forma, novas terapias anti-inflamatórias são necessárias para complementar ou substituir as medicações convencionais, visando o uso prolongado, seguro, e com menos efeitos adversos (PEGORARO et al., 2021; YUAN et al., 2006).

O óleo de pequi tem sido amplamente estudado devido às suas propriedades medicinais associados à sua composição, que é rica em ácidos graxos, como ácido oleico e palmítico, além de diversos carotenoides, flavonoides e terpenoides (OMBREDANE et al., 2021; TORRES et al., 2018; CORDEIRO et al., 2013). O potencial anti-inflamatório deste óleo já foi evidenciado em diversos trabalhos e por isso, tem se tornado alvo de pesquisas, uma vez que tem se mostrado bastante promissor nesta nova frente de fitoterapia (MIRANDA-VILELA et al., 2009; COUTINHO et al., 2020; TORRES et al., 2016; PINHEIRO et al., 2022). Entretanto, por se tratar de um composto lipofílico, possui baixa biodistribuição e baixa absorção dentro do organismo.

A nanotecnologia entra como uma alternativa para reverter esta problemática e melhorar o potencial terapêutico do óleo de pequi. Nanoemulsão a base deste óleo apresenta diversas vantagens em sua aplicabilidade, como o aumento a biodisponibilidade e redução da concentração efetiva da dose, com redução de possíveis efeitos adversos (ROSA *et al*, 2022; JOANITTI *et al*, 2022; CHEN *et al*, 2019).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi formular e caracterizar nanoemulsões à base de óleo de pequi e investigar seus efeitos anti-inflamatórios, *in vitro*, em macrófagos (BMDM) diferenciados de células de medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*).

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Materiais*

O óleo de pequi foi extraído da polpa do fruto por prensagem a frio e doado pela Farmacotécnica (empresa de desenvolvimento farmacotécnico, Brasília, Brasil). A lecitina de ovo foi adquirida da empresa Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha). Os kits para ELISA foram adquiridos da eBioscience (San Diego, CA, EUA). O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), Dimetil Sulfóxido (DMSO), Etanol, Azul de tripano, Bicarbonato de sódio, Aminoácido não essencial, LPS, meio condicionado com L929 e tampão de lise de glóbulos vermelhos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina foram todos adquiridos da Thermo (Gibco, EUA).

### *2.2. Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química de Nanoemulsão à Base de Óleo de Pequi (PeNE)*

A nanoemulsão de óleo de pequi (PeNE) foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita em nosso estudo anterior (Ombredane, 2021). Resumidamente, uma suspensão foi preparada adicionando lecitina de ovo e óleo de pequi em 5 mL de PBS, sendo colocada em vórtex por 60 segundos. As proporções de lecitina de ovo e óleo de pequi utilizadas foram de 2:1 p/p. A suspensão foi colocada em sonicador (450 Sonifier Cell Disruptors) 40 kHz, sob um banho de gelo durante 3 minutos em pulso alternado de 1 segundo. As formulações foram diluídas 7,5 X em PBS e colocada em sonicador por mais 3 minutos com pulso alternado de 1 segundo, em banho de gelo. As formulações de

PeNE desenvolvidas foram armazenadas a 4°C e no escuro até análise posterior. Uma formulação em branco (sem o óleo) foi preparada de forma semelhante à descrita acima. Análises do pH foram mensuradas por faixa indicadora de pH

O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta foram avaliados para a PeNE e o Branco, usando ZetaSizer® Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido). Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente, colocando-se 1mL de amostra não diluída em cubeta.

### *2.3. Extração de células da medula*

A extração das células de medula ocorreu imediatamente após eutanásia do animal e foi adaptada do protocolo descrito por Barret et al, 2015. Deste modo, utilizou-se um rato (*Rattus norvegicus*) macho adulto, com 23 semanas, cujo projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) n.º 23106.058193/2021-48, da Universidade de Brasília. O animal foi eutanasiado com superdose de uretano (1,5 mg/kg). Os membros inferiores foram higienizados com álcool 70% e posteriormente, removeu-se a pele e músculos envoltos na tíbia e fêmur. Os ossos já limpos foram imergidos em álcool 70% por 1 a 2 minutos e transferidos para o fluxo, onde foram cortados com tesouras estéreis as pontas finais do fêmur e tíbia. Com uma seringa acoplada a uma agulha, lavou-se a medula em fálcon estéril, utilizando meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), 1% de aminoácido não essencial e 1% de antibiótico. A suspensão de células foi filtrada com filtro de malha de nylon (40 µm) e centrifugada a 400xg por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise de glóbulos vermelhos. Centrifugou-se a suspensão a 400xg por 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante. As células foram lavadas com DMEM suplementado e mais uma vez centrifugadas a 400xg por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em 20 mL de meio DMEM suplementado com meio condicionado com L929 (20%) e então, as células foram semeadas em frasco de cultivo (175cm<sup>2</sup>), mantidos a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub> (dia zero).

### *2.4. Cultura celular*

No dia 4 adicionou-se mais 5 mL de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), 1% de aminoácido não essencial e 1%



de antibiótico em cada placa de cultivo, mantendo-se a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub> por mais 3 dias. No dia 8 trocou-se o meio, e as células foram mantidas em estufa por mais 3 dias.

No dia 11 as células foram removidas das placas de cultivo utilizando 4 mL de tripsina, por 4 minutos, depois neutralizadas com mais 4 mL de meio DMEM, centrifugadas por 5 min a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com 3 mL de meio, seguindo as próximas etapas de plaqueamento para a realização dos demais ensaios.

### *2.5. Ensaio de viabilidade celular por MTT*

Para o ensaio de viabilidade celular, as células foram semeadas em uma placa de cultura de 96 poços a uma densidade de  $4 \times 10^4$  células por poço em meio de cultura DMEM durante a noite a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> em uma atmosfera úmida. Em seguida, o meio foi trocado e várias concentrações de nanoemulsão a base de óleo de pequi (PeNE), formulações em branco e óleo de pequi livre foram adicionados (90, 180 e 360 µg/mL). O óleo de pequi livre foi diluído em etanol antes do tratamento. A concentração final de etanol foi inferior a 1% por poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado usando o ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Após 24 h de incubação, os tratamentos foram removidos e 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em DMEM) foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em uma atmosfera úmida. O meio de cultura foi descartado e 150 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço. A absorbância foi monitorada em triplicata, por espectrofotômetro com leitor de microplacas a 595 nm (Molecular Devices, EUA). O grupo controle foi considerado com 100% de viabilidade celular.

### *2.6. ELISA – IL-10, IL-12*

Para as análises de citocinas, as células foram semeadas em uma placa de cultura de 24 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço em meio de cultura DMEM durante a noite a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> em uma atmosfera úmida. Em seguida, o meio foi trocado e as células foram tratadas com os grupos PeNE, Branco e óleo de pequi livre nas

concentrações de 180, 180 e 90 µg/mL, respectivamente, por 1h. Após este período, as células foram estimuladas ou não com LPS na concentração de 1,0 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida.

O nível das citocinas foram avaliadas com um kit ELISA de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, 50 µL dos sobrenadantes das amostras foram colocados em poços duplicados e incubados à temperatura ambiente por 45 min. Após a lavagem, 100 µL de reagente conjugado enzimático foram adicionados a cada poço e depois incubados. A reação foi interrompida e as amostras foram medidas com um leitor de microplacas.

## *2.7. Análise morfológica por Microscopia*

### *2.7.1. Confocal*

Para a análise *in vitro* 1×10<sup>5</sup> células por poço em meio de cultura DMEM células foram semeadas em lamínulas de vidro redondas no fundo de uma placa de 24 poços. Após o tratamento as células foram incubadas com 5 µM de CellROX por 30 minutos em estufa à 37°C. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,4) e fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos. As amostras foram lavadas novamente três vezes em PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro usando ProLong Gold Antifade, de acordo com as recomendações do fabricante, e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica Microsystems).

### *2.7.2. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)*

A fim de analisar as diferenças morfológicas apresentadas pelas células após os tratamentos, realizou-se a análise por microscopia eletrônica de varredura. Inicialmente, 1×10<sup>5</sup> células por poço em meio de cultura DMEM foram plaqueadas em lamínulas 13x13 mm colocadas em placas de 24 poços. Após 24 horas de tratamento com os grupos PeNE, Branco e óleo de pequi livre nas concentrações de 180, 180 e 90 µg/mL, respectivamente, e após 1h estimuladas ou não com LPS na concentração de 1,0 µg/mL, ocorreu descarte do meio de cultivo e do tratamento e as células passaram pelo processo de lavagem, foram fixadas em 2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 overnights à 4° C. Posteriormente ao descarte do fixador, as linhagens

foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixadas, por 30 min, com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. As células passaram por uma desidratação seriada com concentrações crescentes de acetona (30%-100%), pela secagem ao ponto crítico CPD 030 (BALZERS, EUA) e metalização SCD 500 (LEICA, Germany) e foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-7001F (JEOL, Japan).

### *2.8. Análises estatísticas*

As diferenças estatísticas entre células tratadas com controle (PBS) e os demais tratamentos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) e teste post hoc de Tukey em um nível de significância de 0,05 usando Graph Pad Prism 5.08 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) após verificar a normalidade de dados com Shapiro-Wilk. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

## **3. Resultados e discussões**

### *3.1. Caracterização óleo de Pequi*

O óleo de pequi utilizado neste trabalho foi analisado quanto à sua composição lipídica em uma publicação anterior (Pinheiro, A.C, 2022), em que foi constatada a presença de ácidos graxos insaturados e ácidos graxos saturados, sendo que o ácido oleico (47,91%) e ácido palmítico (35,22%) foram os componentes majoritários. Outros componentes em menores quantidades também foram encontrados, como ésteres palmitato (7,89%) e ésteres oleato (8,99%).

### *3.2. Caracterização da nanoemulsão a base de óleo de Pequi (PeNE)*

A nanoemulsão PeNE e o Branco foram analisados e caracterizados quanto ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta e pH, em triplicata de leitura (**Tabela 1**). A PeNE apresentou diâmetro hidrodinâmico dentro da escala manométrica (124,20 nm) e foi menor do branco (157,90 nm). O índice de polidispersão

foi inferior a 0,25, indicando uma nanoemulsão monodispersa e o potencial zeta da PeNE (-15,00 mV) foi mais negativo que o Branco (-1,68 mV).

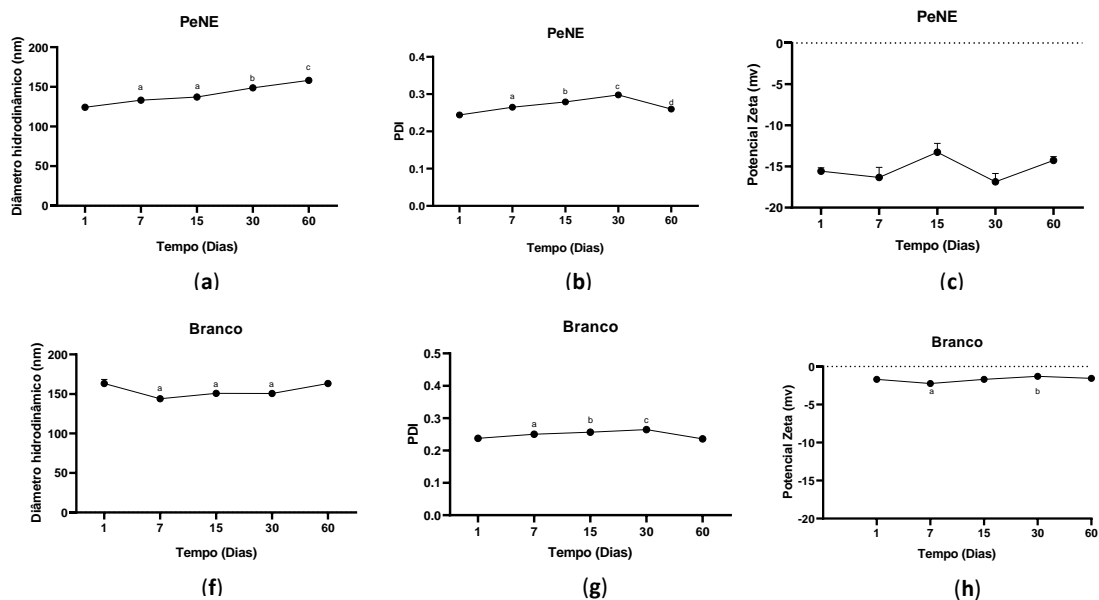
**Tabela 1.** Caracterização da Nanoemulsão a base de óleo de Pequi (PeNE) e nanoemulsão vazia (Branco), em pH 7.

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
PeNE	124.20 ± 2.40	0.24 ± 0.0030	-15.00 ± 1.70
Branco	157.90 ± 12.12	0.24 ± 0.010	-1.68 ± 0.08

### 3.3. Análise de estabilidade da PeNE

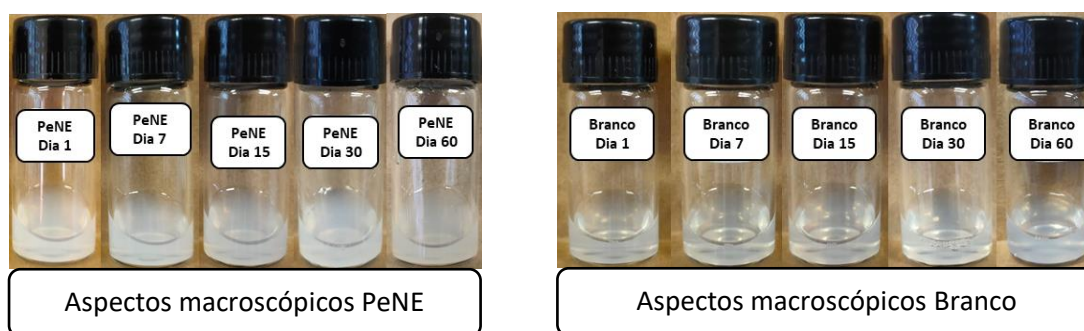
A PeNE e o Branco foram estocadas e armazenadas a 4° C por períodos de 7, 15, 30 e 60 dias (**Figura 1**). Após esses períodos, as formulações foram analisadas quanto a seus aspectos físico-químicos para avaliar a estabilidade.

As análises evidenciaram que ao longo do tempo a PeNE apresentou discreta variação de aproximadamente 40 nm no Diâmetro hidrodinâmico, e o índice de polidispersão e potencial zeta mantiveram-se constante, com pouca oscilação em pH que se manteve-se 7.0. Apesar de haver diferença estatística na variação de tamanho e PDI da PeNE, ambos permaneceram dentro da faixa considerável aceitável de tamanho (menor que 200nm) e PDI (menor que 0,3).



**Figura 1.** Análise da estabilidade das características físico-químicas da Nanoemulsão a base de óleo de pequi (PeNE) e nanoemulsão vazia (Branco) ao longo dos dias 1, 7, 15, 30 e 60. (a) Diâmetro hidrodinâmico da PeNE; (b) PDI da PeNE; (c) Potencial Zeta da PeNE; (d) Diâmetro hidrodinâmico do Branco (nanoemulsão vazia, contendo apenas lecitina); (e) PDI do Branco; (f) Potencial Zeta do Branco. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA: diferença significativa entre os dias, em que  $p < 0,05$ . Tukey post hoc test.

Além disso, as características macroscópicas também foram observadas para avaliar a estabilidade da nanoemulsão (**Figura 2**). A PeNE apresentou-se homogênea após formulação e tal característica se manteve ao longo dos 60 dias observados. Durante o período não foram observados sinais de cremação, sedimentação, floculação e coalescência, nem outro aspecto macroscópico que indicasse instabilidade da nanoemulsão. O mesmo foi observado com o Branco.



**Figura 2.** Análises macroscópicas da nanoemulsão a base de óleo de pequi (PeNE) e nanoemulsão vazia (branco) nos dias 1, 7, 15, 30 e 60 após formulação.

Uma nanoemulsão estável apresenta aspecto visual homogêneo porque as nanogotículas estão uniformemente distribuídas no sistema. Adicionalmente, quanto menor for o tamanho das nanogotículas, menos opaca será a nanoemulsão. Tal fato está condizente com a formulação obtida neste estudo, que se manteve translúcida ao longo dos 60 dias sem tornar-se opaca. Seu diâmetro hidrodinâmico também se manteve constante e menor que 200 nm, podendo ser visualmente observada na figura 2 ao se constatar translucidez. Apesar de nanoemulsões serem termodinamicamente instável ao longo do tempo por conter dois compostos de densidades diferentes (óleo menos densa que a fase aquosa), a PeNE mostrou-se estável ao longo dos 60 dias, possivelmente devido

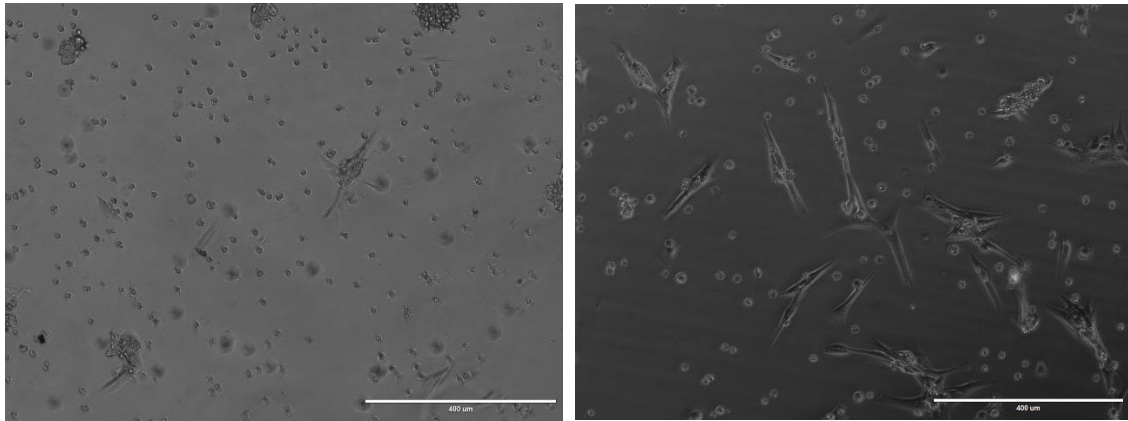
à sua composição e ao método utilizado para sua formulação (JOANITTI et al., 2022; MCCLEMENTS et al., 2012; MARHAMATI et al., 2021).

Além disso, o PDI manteve-se constantemente menor que 0,3, indicando a homogeneidade da distribuição dos diâmetros das nanogotículas. O potencial zeta está relacionado às cargas presentes na superfície da nanopartícula, que sofre interferência do pH e da sua composição. O potencial zeta da PeNE se manteve constante durante o período observado, possivelmente devido a constância do pH 7 e preservação dos compostos presentes no óleo de pequi e surfactante (JOANITTI, et al., 2022). Estas características de estabilidade da nanoemulsão a base de óleo de pequi (PeNE) também foram observadas nas formulações contendo óleo de pequi desenvolvidas e avaliadas por OMBREDANE e colaboradores (2020) e por DE SÁ COUTINHO e colaboradores (2020), cujas nanoemulsões também apresentaram carga negativa.

#### *3.4. Estabelecimento da cultura primária de Macrófagos*

As células utilizadas para todos os ensaios deste trabalho foram extraídas com sucesso da medula óssea dos fêmurs e tíbias de um único rato, e, portanto, são classificadas como de linhagem primária. A diferenciação destes promonoblastos em macrófagos gerou um total de  $1,24 \times 10^7$  células, e foram suficientes para os ensaios de viabilidade celular, ELISAS e microscopias.

O aspecto morfológico destes macrófagos diferenciados pode ser observado na **figura 3**, em que se nota células com uniformes corpos celulares esféricos, espalhados e aderidos a placa de cultivo celular (Figura 3 **a**). Entretanto, sob estímulo de LPS, os macrófagos tornam-se ativados, assumindo um perfil pró-inflamatório, com modificações morfológicas (figura 3 **b**), em que se observa um prolongamento do citoplasma, as células ficam maiores e com um perfil longilíneo.



**(a)**

**(b)**

**Figura 3.** Imagem de macrófagos obtida por microscopia de luz, com contraste de fase da célula em meio DMEM, sem nenhum tipo de tratamento. **(a)** Sem estímulo com LPS. **(b)** Com estímulo de LPS (escala de 400 $\mu$ M, aumento de 10X).

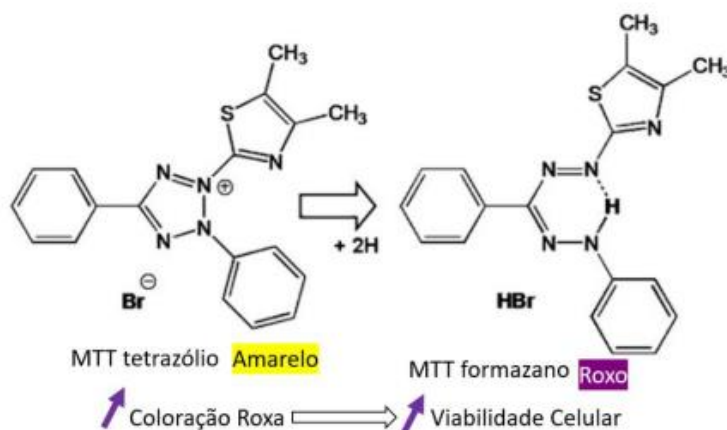
O lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula que se encontra abundantemente na membrana externa das bactérias gram-negativas e gera diversas respostas pró-inflamatórias em diferentes tipos de células, inclusive macrófagos (Barret et al., 2015). Nos macrófagos, tem a capacidade de regular de forma positiva sua expressão de citocinas anti-inflamatórias e promover o estado ativado M2 (TI et al., 2015). BANETE e colaboradores (2015) também observaram alterações morfológicas de macrófagos extraídos da medula óssea de camundongos e diferenciado com L929 quando estimulados com LPS, apresentando as mesmas características de prolongamento de citoplasma e aumento de tamanho que as observadas neste trabalho.

A partir desta análise morfológica e de averiguar que os macrófagos estavam viáveis e responsivos ao estímulo com LPS, iniciaram-se então a sequência de ensaios com os tratamentos a base de óleo de pequi nanoestruturado ou em sua forma livre.

O primeiro passo foi avaliar a citotoxicidade e a concentração ótima da nanoemulsão PeNE e do óleo livre nesta linhagem de macrófagos. Para tal, utilizou-se a metodologia de ensaios de viabilidade celular por MTT.

### *3.5. Ensaio de viabilidade celular por MTT*

Células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em um produto de formazan de cor púrpura que pode ser mensurada por análise de absorbância (Figura 4).



**Figura 4.** Reação de conversão do MTT em formazan (STOCKERT, 2012)

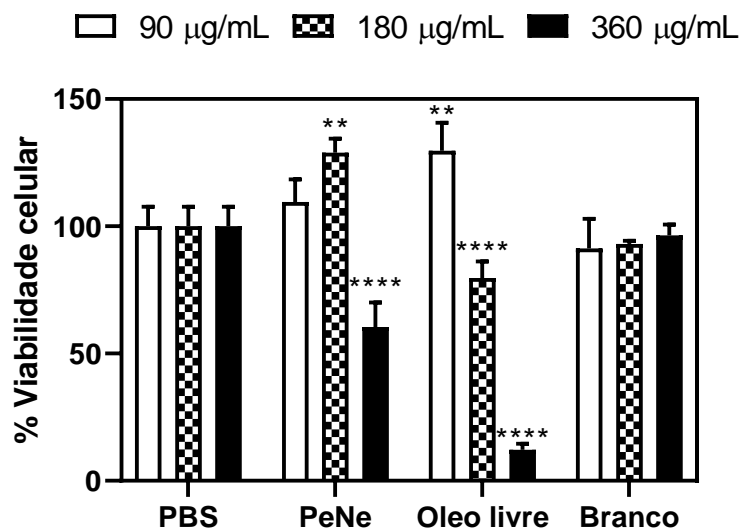
Quando as células morrem, elas rapidamente perdem a capacidade de converter o substrato em produto, sendo possível mensurar a viabilidade das células após exposição com algum componente (Riss, 2016)

O ensaio de viabilidade celular realizado por MTT apontou um aumento significativo na viabilidade celular (28 e 29%;  $p < 0,005$ ) de células tratadas com 90  $\mu\text{g/mL}$  de óleo livre e 180  $\mu\text{g/mL}$  de PeNE, respectivamente. Além disso, houve uma redução significativa de 40% ( $p < 0,0001$ ) na viabilidade celular das células tratadas com PeNE na concentração mais alta avaliada (360  $\mu\text{g/mL}$ ). Porém, a redução da viabilidade celular foi ainda mais expressiva (redução de 88%) nas células tratadas com óleo de pequi livre nesta mesma concentração (360  $\mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 5**).

Resultados similares foram observados por OMBREDANE 2022, em que o óleo livre nas concentrações mais altas mostraram-se citotóxicas para a linhagem de célula tumoral 4T1, enquanto que, na mesma concentração, quando nanoestruturado, o efeito citotóxico foi menor. Essa redução da citotoxicidade do óleo de pequi nanoestruturado condiz com as vantagens em se utilizar estruturação de fitoterápicos em nanoestruturas carreadoras, uma vez que a exposição dos compostos à célula ocorre de forma gradativa, melhorando sua farmacocinética com uma liberação sustentada e gradual (JOANITTI et al., 2022; ROSA, 2022).



Deste modo, as concentrações escolhidas para prosseguir com os demais ensaios foram de 180 µg/mL para PeNE e para o Branco, e para o óleo livre, 90 µg/mL.



**Figura 5.** Citotoxicidade da formulação nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), óleo livre de pequi e branco (sem óleo) a 90, 180 e 360 µg/mL sobre a viabilidade de macrófagos primários (ML929) após exposição por 24 horas. O grupo controle foi tratado com PBS. O ensaio foi realizado usando o método MTT. Os valores são expressos como média ± SEM. Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Tukey post hoc test.

Depois de estabelecer as concentrações seguras para tratamento, o segundo passo foi avaliar se houve alterações morfológicas nos macrófagos expostos aos tratamentos com a nanoemulsão de pequi ou ao óleo livre, estimulados ou não por LPS, sendo a morfologia destas células avaliadas em microscopia eletrônica de varredura.

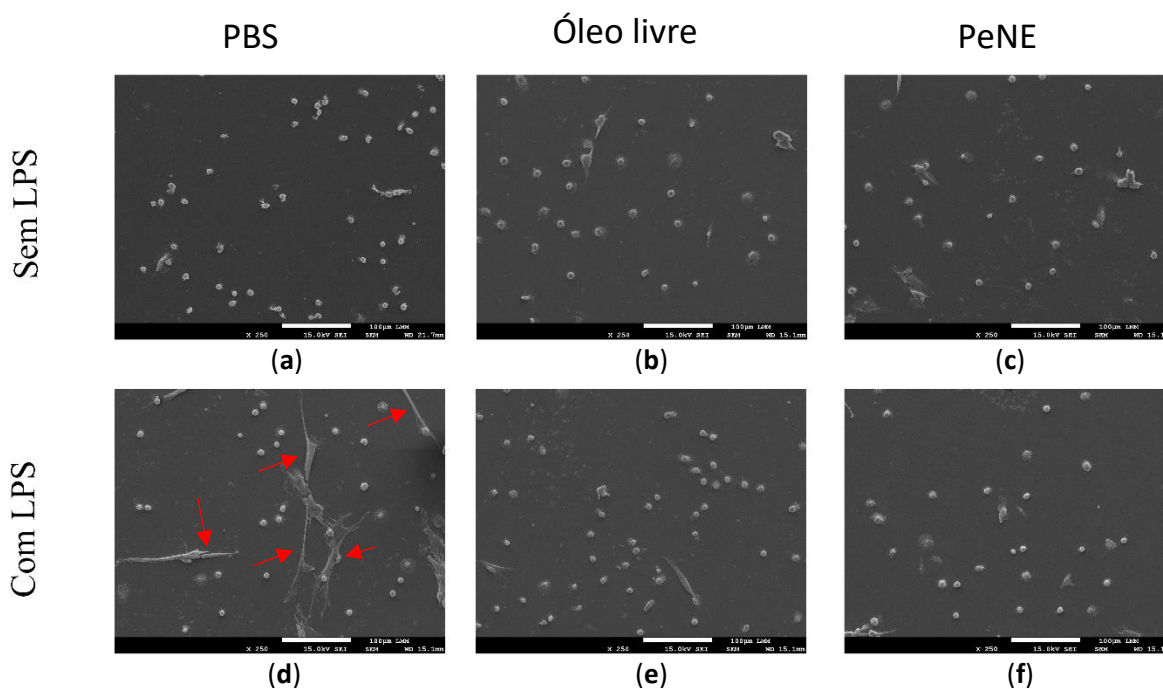
### 3.6. Microscopia Elettronica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura mostram o aspecto morfológico dos macrófagos após estímulo com LPS. Observando o grupo controle, que recebeu tampão PBS como tratamento, nota-se alterações morfológicas compatíveis com macrófagos ativados, em que se observa projeções citoplasmáticas amplas, estrutura mais longilínea e aumento do tamanho da célula, que são características de macrófagos com perfil pró-inflamatório (**Figura 6 d**). Tais alterações ficam mais evidentes quando se

compara aos macrófagos que foram tratados com o mesmo tampão PBS e não receberam o estímulo inflamatório por LPS, os quais apresentam uma morfologia mais esférica e com projeções citoplasmáticas reduzidas (**Figura 6 a**).

Analisando agora as células que receberam tratamento tanto com o óleo em sua forma livre ou nanoestruturado (PeNE), sem adição do LPS, nota-se que a morfologia se manteve similar ao controle (PBS), com células mais arredondadas e sem alterações de tamanho. Isso sugere que ambos os tratamentos aparentemente não induziram um estado inflamatório dos macrófagos, inferindo-se que, morfologicamente, o óleo de pequi não aparenta ter perfil pró-inflamatório (**Figura 6 b e c**).

Por outro lado, analisando as células pré-tratadas com o óleo de pequi (livre ou nanoestruturado) e posteriormente estimuladas com LPS (**Figura 6 e e f**), observa-se que os macrófagos apresentaram características morfológicas de estrutura esférica com poucas projeções, diferente do observado das células controles (PBS) ativadas com LPS (**Figura 6 d**). Estes fatos observados podem ser indicativos de uma atividade anti-inflamatória do óleo de pequi (tanto livre quanto nanoestruturado) devido a redução das características morfológicas de macrófagos ativos (ou pró-inflamados).



**Figura 6.** Morfologia de macrófagos por micrografia eletrônica de varredura (MEV) após pré-tratamento de 1h com (a) e (d) tampão PBS; (b) e (e) óleo livre (90ug/mL); (c) e (f) Nanoemulsão a base de óleo de Pequi (PeNE) (180 ug/mL). As células receberam ou não estímulo inflamatório

por LPS (0,1 ug/mL) no tempo de 24h. As setas vermelhas mostram a projeção citoplasmática nas células.

Aguilar e colaboradores (2012) observaram uma redução na produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) em macrófagos primários extraídos do peritônio de camundongos que receberam tratamento com óleo de pequi na forma livre, indicando possível efeito anti-inflamatório que posteriormente foi comprovado nos ensaios *in vivo* do grupo. Roll e colaboradores (2018) evidenciaram atividade anti-oxidante do óleo de pequi nos ensaios *in vitro*, e posteriormente, potencial atividade anti-inflamatório em modelos *in vivo*. Porém, nenhum trabalho até o momento avaliou as alterações morfológicas de macrófagos após tratamento com óleo de pequi, sendo uma novidade deste estudo.

Ausência de alterações morfológicas observadas em macrófagos que receberam um determinado tratamento e foram estimulados com LPS pode ser um indicativo de propriedades anti-inflamatórias do composto analisado. Porém, uma análise mais robusta é necessária para confirmar tal hipótese.

Mediadores inflamatórios são substâncias que controlam o desencadeamento da resposta inflamatória, bem como sua intensidade, e são passíveis de serem mensurados em diversos modelos de ensaios *in vitro*. Os macrófagos são células bastante resposivas e liberam diversas citocinas, tanto pró quanto anti-inflamatórias, como forma de sinalização.

Desta forma, o terceiro passo foi avaliar se o óleo de pequi em sua forma livre ou nanoestruturada modula a liberação IL-10 e IL-12 por macrófagos pré-tratados com este composto.

### 3.7. Produção de Interleucinas IL-10 e IL-12

As citocinas são moléculas sinalizadoras produzidas por células do sistema imunológico que desempenham um papel fundamental na ativação dos macrófagos. Diferentes tipos de citocinas podem desencadear diferentes respostas imunológicas, incluindo a ativação dos macrófagos para um fenótipo tanto pró-inflamatório quanto anti-

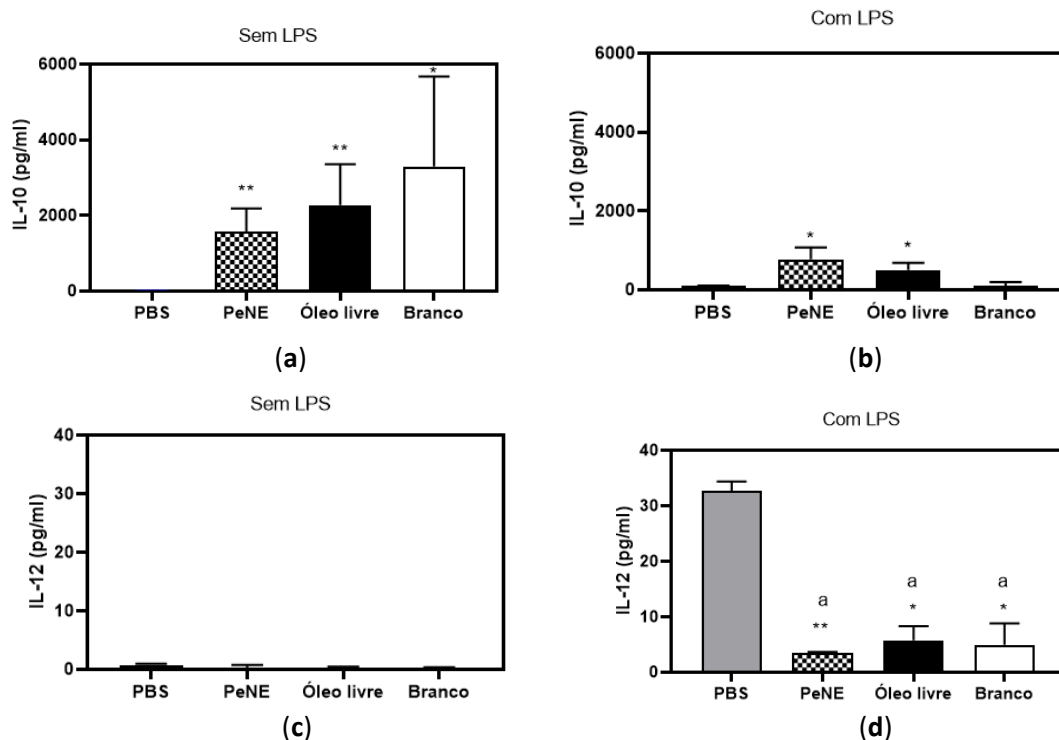
inflamatório. Além disso, a ativação dos macrófagos por citocinas pode levar à produção de outras citocinas, que por sua vez podem afetar a resposta imunológica como um todo.

DE BRITO MONTEIRO (2020) e colaboradores observaram que macrófagos originados de células da medula de camundongos e diferenciados por tampão L929, quando ativados por LPS exibiram expressão gênica de  $Tnf\alpha$ , IL-12 e IL-10, secretaram níveis altos de IL-10 e reduzidos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-12. A secreção maior de IL-10 pode ter relevância metabólica para essas células, sendo uma característica de macrófagos do tipo M2, frequentemente associados a funções anti-inflamatórias e reparo, além de fazer sentido, uma vez que IL-10 tem ação anti-inflamatória e uma das suas ações é inibir a expressão de IL-12, uma citocina pró-inflamatória (ABBAS et al, 2022).

Observando os resultados obtidos, observou-se que quando não estimulada por LPS, os pré-tratamentos com PeNE e óleo de pequi livre induziram os macrófagos a secretarem IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Figura 7 **a**). Por outro lado, células que foram pré-tratadas com PeNE e óleo de pequi livre e, posteriormente estimuladas com LPS, apresentaram liberação menor de IL-10 pelos macrófagos, sugerindo-se que os tratamentos amenizaram o estímulo pró-inflamatório gerado pelo LPS (Figura 7 **b**).

Em contrapartida, sobre os resultados obtidos pelo ELISA de IL-12 pode-se observar que o óleo de pequi em sua forma livre ou nanoestruturada não induziram a produção desta interleucina pró-inflamatória (Figura 7 **c**), e mesmo após estímulo com LPS, os macrófagos que foram pré-tratados com PeNE, óleo livre e branco, tiveram liberação da IL-12 reduzida, sendo o tratamento com PeNE mais significativo em relação aos demais tratamentos (Figura 7 **d**).

Dessa maneira, ao avaliar a produção de citocinas IL-10 e IL-12 de forma conjunta, sugere-se que o óleo de pequi possui potencial para prevenir e reduzir a inflamação, induzindo a liberação de IL-10 e inibindo IL-12, sendo a inibição de IL-12 significativamente maior quando este está nanoestruturado.



**Figura 7.** Efeitos da Nanoemulsão a base de óleo de Pequi (PeNE) sobre macrófagos BML929 na secreção de interleucina-10 (IL-10) induzidos (a) ou não (b) por LPS por 24h e Interleucina-12 (IL-12) induzidos (c) ou não (d) por LPS por 24h após pré-tratamento de 1h com os grupos controle (PBS), PeNE na concentração de 180 ug/mL, óleo livre na concentração de 90 ug/mL e Branco (nanoemulsão vazia) na concentração de 180 ug/mL. Os níveis de IL-10 e IL-12 foram analisadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM. One-way ANOVA: diferença significativa entre grupos vs. PBS \*  $p < 0,05$ , diferença significativa entre os grupos \*\*  $p < 0,005$  (Tukey post hoc test).

O óleo de pequi apresenta diversos compostos bioativos que podem ser responsáveis por tal atividade, dentre eles, o ácido oleico, componente mais abundante dentre os ácidos graxos, o qual a atividade anti-inflamatória já é estudada na literatura, além de flavonoides e terpenoides. Vários autores relataram efeito anti-inflamatório do ácido oleico pela via de diminuição de mediadores promotores de estresse oxidativo, por exemplo, lipopolissacarídeos (LPSs) e modulação de diversas citocinas, dentre elas, o aumento de IL-10 e redução de IL-12 (SANTA MARIA et al., 2023; OMBREDANE et al., 2021).

A nanoemulsão de pequi (PeNE) apresentou inibição da IL-12 significativamente maior em relação ao óleo livre. Além da possibilidade de tal resultado estar associado à nanotecnologia melhorar a entrega dos compostos bioativos à célula, possivelmente por

aumentar a interação da nanoemulsão com a membrana celular, aumentando sua eficácia (JOANITTI et al., 2022), o surfactante utilizado na formulação, a lecitina de ovo, também apresenta compostos lipídicos que possuem algum efeito anti-inflamatório. De acordo com NASAB e colaboradores (2019), lipossomas de lecitina apresentaram papel modulador na inflamação por estimulação da migração de macrófagos e inibição da produção de citocinas inflamatórias nos estágios iniciais da inflamação, pois os fosfolipídios de sua composição podem inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 e estimular IL-10 (ALEMÁN et al., 2021). Tal fato justifica os resultados obtidos com o branco (nanoemulsão contendo apenas lecitina), que também mostraram-se capazes de induzir, em menores proporções, a produção de IL-10 e inibir IL-12.

#### 4. CONCLUSÃO

A nanoemulsão a base de óleo de pequi (PeNE) apresentou características Físico-Química compatível com os padrões de nanomateriais, além de ser estável tanto nos parâmetros micro quanto macroscópicos. Os dados experimentais *in vitro* indicaram alta citotoxicidade do óleo livre para macrófagos de linhagem primária diferenciados com L929 a partir de células da medula óssea de ratos, na concentração maior testada, porém, quando na forma nanoestruturada, a citotoxicidade do óleo foi reduzida. Além disso, a PeNE apresentou indicativos de atividade anti-inflamatória e preventiva à inflamação, uma vez que inibiu a ativação morfológica dos macrófagos, além de inibir a IL-12 e induzir a IL-10. Este foi o primeiro estudo avaliando o potencial anti-inflamatório do óleo de pequi nanoestruturado quanto às alterações morfológicas de macrófagos, de forma que mais estudos são necessários para trazer robustez aos resultados já obtidos e entender o seu mecanismo de ação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (capítulo 2)

AGUILAR, E. C. et al. Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, p. 601-609, 2012.

ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world*, v. 11, n. 5, p. 627, 2018 (10.14202/vetworld.2018.627-635).

ACTOR, Jeffrey. **Introductory immunology: basic concepts for interdisciplinary applications**. Elsevier, 2023 (ISBN 978-0-443-15307-5).

ALEMÁN, Ailén et al. Physicochemical, antioxidant, and anti-inflammatory properties of rapeseed lecithin liposomes loading a chia (*Salvia hispanica* L.) seed extract. *Antioxidants*, v. 10, n. 5, p. 693, 2021 (<https://doi.org/10.3390/antiox10050693>)

Barret, J.P.; et al. Bone marrow-derived macrophages from aged rats are more responsive to inflammatory stimuli. *Journal of Neuroinflammation*, 2015, Volume 12, pp. 1-11. (doi 10.1186/s12974-015-0287-7)

BANETE, A. et al. Immortalized murine macrophage cell line as a model for macrophage polarization into classically activated M (IFN $\gamma$ + LPS) or alternatively activated M (IL-4) macrophages. *J Clin Cell Immunol*, v. 6, n. 318.10, p. 4172, 2015 (10.4172/2155-9899.1000318).

BATLOUNI, Michel. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 94, p. 556-563, 2010. (<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010000400019>)

BINDU, Samik; MAZUMDER, Somnath; BANDYOPADHYAY, Uday. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, v. 180, p. 114147, 2020. (<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>)

CHEN, Zhongjian et al. Sustained and controlled release of herbal medicines: The concept of synchronized release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, p. 116-125, 2019 (<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.074>).

COUTINHO, D. D., Pires, J., Gomes, H., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Silva, P., Martins, M. A., Ferrarini, S. R., & Bernardi, A. (2020). Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess)-Loaded Nanoemulsion, Orally Delivered, Modulates Inflammation in LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *PHARMACEUTICS*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111075>

CORDEIRO, Madison Willy Silva et al. Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa de *Caryocar brasiliense* nativo do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1127-1139, 2013 (<https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000400024>).

DE ASSUNÇÃO, Tayna Coutinho; JUNIOR, Omero Martins Rodrigues. Efeitos adversos no uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais: diclofenaco versus ibuprofeno. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e532111335937-e532111335937, 2022. (<https://orcid.org/0000-0002-5333-793X>)

DE SÁ COUTINHO, Diego et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess)-loaded nanoemulsion, orally delivered, modulates inflammation in LPS-induced acute lung

injury in mice. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 11, p. 1075, 2020 (doi:10.3390/pharmaceutics12111075).

FRANCO, Marcello et al. **Patologia: processos gerais**. 6ª edição. Editora Atheneu. p. 165-190. 2015 (ISBN: 978-85-388-0095-8).

FUJIWARA, Nagatoshi; KOBAYASHI, Kazuo. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005 (https://doi.org/10.2174/1568010054022024).

JOANITTI, Graziella Anselmo; MORAIS, Paulo César de; AZEVEDO, Ricardo Bentes de. *Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente*. 2022.

KUPRASH, D. V.; NEDOSPASOV, S. A. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 11, p. 1237-1239, 2016 (https://doi.org/10.1134/S0006297916110018).

MARHAMATI, Masoumeh; RANJBAR, Golnaz; REZAIE, Mitra. Effects of emulsifiers on the physicochemical stability of Oil-in-water Nanoemulsions: A critical review. *Journal of Molecular Liquids*, v. 340, p. 117218, 2021 (doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117218).

MARROCCO, Antonella; ORTIZ, Luis A. Role of metabolic reprogramming in pro-inflammatory cytokine secretion from LPS or silica-activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 6418, 2022 ( https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.936167).

MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012 (https://doi.org/10.1039/C2SM06903B).

MIRANDA-VILELA, A. L., Ribeiro, I. F., & Grisolia, C. K. (2016). Association between interleukin 6 -174 G/C promoter gene polymorphism and runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil: a before-after study. *Genetics and Molecular Biology*, 39(4), 554–566. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2015-0299>

MONTEIRO, Cristina et al. Safety of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Elderly: An Analysis of Published Literature and Reports Sent to the Portuguese Pharmacovigilance System. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 6, p. 3541, 2022 (https://doi.org/10.3390/ijerph19063541).

OMBREDANE, Alicia S. et al. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 58, p. 101819, 2020 (https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101819).

OMBREDANE, Alicia S. et al. Pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) nanoemulsion alters cell proliferation and damages key organelles in triple-negative breast cancer cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 153, p. 113348, 2022 (https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113348).



PEGORARO, Nathali Schopf et al. Oleic acid exhibits an expressive anti-inflammatory effect in croton oil-induced irritant contact dermatitis without the occurrence of toxicological effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113486, 2021

Riss, Terry L. et al. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual*, 2016. (<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113486>).

PINHEIRO, Andréia C. et al. Evaluation of Biocompatibility, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Activities of Pequi Oil-Based Nanoemulsions in In Vitro and In Vivo Models. **Nanomaterials**, v. 12, n. 23, p. 4260, 2022. (<https://doi.org/10.3390/nano12234260>)

Roll, M. M., Miranda-Vilela, A. L., Longo, J. P. F., Agostini-Costa, T. da S., & Grisolia, C. K. The pequi pulp oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. *Genetics and Molecular Biology*, 41(4), 858–869, 2018 (<https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0218>)

ROSA, Mário Fabrício Fleury. Pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) do respirador vesta: Universidade de Brasília (UnB) como vetor da pesquisa translacional em saúde. 2022.

SANTA-MARÍA, Consuelo et al. Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. *Nutrients*, v. 15, n. 1, p. 224, 2023 (<https://doi.org/10.3390/nu15010224>).

SILVA, Mairon Mota et al. O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, v. 2, n. 2, 2019.

STOCKERT, Juan C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012. (<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>)

TORRES, L. R. O. et al. Bioactive compounds and functional potential of pequi (*Caryocar* spp.), a native Brazilian fruit: a review. *Grasas y Aceites*, v. 69, n. 2, p. e257-e257, 2018. (<https://doi.org/10.3989/gya.1222172>)

TI, Dongdong et al. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *Journal of translational medicine*, v. 13, p. 1-14, 2015 ( DOI 10.1186/s12974-015-0287-7).

YUAN, Gaofeng et al. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 15, n. 2, 2006 (<http://www.healthyeatingclub.org/APJCN>).

## CAPÍTULO 3

### **AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE, ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO DE PEQUI EM MODELO *In Vivo* E *In Vitro***

Este capítulo foi publicado em 2022. Para evitar o auto-plágio, este capítulo será disponibilizado pelo <https://doi.org/10.3390/nano12234260>.



Article

## Evaluation of Biocompatibility, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Activities of Pequi Oil-Based Nanoemulsions in In Vitro and In Vivo Models

Andréia C. Pinheiro <sup>1,2</sup>, Alicia S. Ombredane <sup>1,2</sup>, Willie O. Pinheiro <sup>1,3</sup>, Laise R. Andrade <sup>1,2</sup>, Vitória R. P. Silva <sup>1</sup>, Gisela J. Felice <sup>1</sup>, Débora S. Alves <sup>4</sup>, Aryanne F. Albernaz <sup>3</sup>, Ariane P. Silveira <sup>5</sup>, Milena C. F. Lima <sup>6</sup>, Valdir F. Veiga-Junior <sup>6</sup>, Thamís F. S. Gomes <sup>1,2</sup>, Emanuel A. M. Damasceno <sup>7</sup>, Fabiane H. Veiga-Souza <sup>4,8</sup>, Paulo E. N. Souza <sup>9</sup>, Sônia N. Bão <sup>5</sup>, Eliza C. B. Duarte <sup>10</sup>, Marcella L. B. Carneiro <sup>1,11</sup>, Ricardo B. Azevedo <sup>2</sup>, Mani I. Funez <sup>3,12</sup> and Graziella A. Joanniti <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Bioactive Compounds and Nanobiotechnology (LBCNano), Campus Universitário—Centro Metropolitano, University of Brasília, Ceilândia Sul, Brasília 72220-275, DF, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation Program in Nanoscience and Nanobiotechnology, Institute of Biological Sciences, Campus Universitário Darcy Ribeiro, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Health Sciences and Technologies, School of Ceilândia, Campus Universitário—Centro Metropolitano, University of Brasília, Ceilândia Sul, Brasília 72220-275, DF, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, Campus Universitário Darcy Ribeiro, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil

<sup>5</sup> Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, Campus Universitário Darcy Ribeiro, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil

<sup>6</sup> Chemistry Section, Military Institute of Engineering, Praça Gen. Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, Rio de Janeiro 22290-270, RJ, Brazil

<sup>7</sup> Health Department, Nucleus of Cytopathology and Anatomic Pathology, Regional Hospital of Taguatinga, Taguatinga, Brasília 72120-970, DF, Brazil

<sup>8</sup> Pharmaceutical Sciences School, Faculty of Ceilândia, Campus Universitário—Centro Metropolitano, University of Brasília, Ceilândia Sul, Brasília 72220-275, DF, Brazil

<sup>9</sup> Laboratory of Electron Paramagnetic Resonance, Institute of Physics, Campus Universitário Darcy Ribeiro, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil

<sup>10</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine, Campus Universitário Darcy Ribeiro, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil

<sup>11</sup> Post-Graduation Program in Biomedical Engineering—PPGEB, Faculty of Gama—FGA, University of Brasília, St. Leste Projeção A—Gama Leste, Brasília 72444-240, DF, Brazil

<sup>12</sup> Nursing Course, School of Ceilândia, Campus Universitário—Centro Metropolitano, University of Brasília, Ceilândia Sul, Brasília 72220-275, DF, Brazil

\* Correspondence: gjoanniti@unb.br



**Citation:** Pinheiro, A.C.; Ombredane, A.S.; Pinheiro, W.O.; Andrade, L.R.; Silva, V.R.P.; Felice, G.J.; Alves, D.S.; Albernaz, A.F.; Silveira, A.P.; Lima, M.C.F.; et al. Evaluation of Biocompatibility, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Activities of Pequi Oil-Based Nanoemulsions in In Vitro and In Vivo Models. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 4260. <https://doi.org/10.3390/nano12234260>

Academic Editor: Ying Liu

## CONCLUSÃO GERAL

Concluímos deste estudo que:

- Nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE) foi obtida com sucesso por método de ultrasonicação.
- As características de PeNE corroboram com dados da literatura ( $124,2 \pm 2,4$  nm –  $PdI=0,24 \pm 0,003$  e potencial Zeta =  $-15,00 \pm 1,70$  mV).
- PeNE apresentou estabilidade ao longo do tempo (60 dias) quanto ao diâmetro hidrodinâmico, PdI e potencial Zeta em temperaturas de 4°C de armazenamento.

- PeNE apresentou atividade citotóxica em concentração de 360 µg/mL, mas foi viável a 180 µg/mL em macrófagos oriundos da medula óssea de ratos, porém, não se observou citotoxicidade nesta mesma concentração em macrófago J774-1. O óleo livre apresentou citotoxicidade na concentração de 360 µg/mL nas duas linhagens de macrófagos.
- Na concentração de 180 µg/mL em tempos de incubação de 24 horas a PeNE apresenta possível efeito anti-inflamatório, com inibição de IL-12 (interleucina pró-inflamatória).
- A PeNE não altera a morfologia de macrófagos oriundos de células da medula, e aparentemente, inibe sua ativação perante estímulo com LPS. O mesmo foi observado com o óleo de pequi livre.
- A associação da PeNE com macrófagos J774-1 foi observada com 1h de tratamento, concluindo-se que a internalização da nanoemulsão pela célula ocorre com sucesso, sem fragmentação de DNA aparente.
- As formulações apresentaram estabilidade quando armazenadas a 4°C, protegidas da luz, por até 60 dias (tempo máximo avaliado).
- A PeNE apresentou efeito antinociceptivo, porém não apresentou efeito na indução de edema por carragenina.
- O efeito antinociceptivo observado por tratamentos orais com PeNE ou óleo de pequi livre não é decorrente de comprometimento da coordenação motora.
- O bioquímico, colesterol e triglicérides, eritrograma e o leucograma dos animais tratados não apresentaram alterações significativas quando comparados aos seus respectivos controles. A presença de ROS e NO em amostras de sangue não apresentaram diferença significativa quando comparados aos grupos controles (dados não mostrados), o que sugere compatibilidade do óleo de pequi nanoestruturado ou em sua forma livre.
- Este estudo demonstra a importância na valorização da biodiversidade brasileira através o uso sustentável dos biomas como na bioeconomia.

## Referências Bibliográficas da Introdução

ABBAS, Abul. **Imunologia celular e molecular 7a edição**. Elsevier Brasil, 2012.

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Inmunología celular y molecular**. Elsevier Health Sciences, 2022.

ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary world**, v. 11, n. 5, p. 627, 2018.

ABREU, Laís Lima; ROLIM, Rodrigo Feijão; DE ABREU ALMEIDA, Alisson. Diabetes mellitus tipo 2 versus potencial antioxidante do pequi: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e321101119603-e321101119603, 2021.

ACCIOLY, Maria T. et al. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. **Cancer research**, v. 68, n. 6, p. 1732-1740, 2008.

ACTOR, Jeffrey. **Introductory immunology: basic concepts for interdisciplinary applications**. Elsevier, 2023.

AGUILAR, E. C. et al. Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 601-609, 2012.

ANTI, Sônia Maria Alvarenga; GIORGI, Rina Dalva Neubarth; CHAHADE, William Habib. Antiinflamatórios hormonais: glicocorticóides. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. 159-165, 2008.

ASTUDILLO, Alma M. et al. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 2, p. 249-256, 2012.

AZIZ, Zarith Asyikin Abdul et al. Enrichment of Eucalyptus oil nanoemulsion by micellar nanotechnology: Transdermal analgesic activity using hot plate test in rats' assay. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019.

BATISTA, Francine Oliveira; DE SOUSA, Romaildo Santos. Compostos bioativos em frutos pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) E baru (*Dipteryx alata* Vogel) e seus usos potenciais: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 7, p. 9259-9270, 2019.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARNES, Peter J. How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture 2005. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 245-254, 2006.

BARROS, Maria Elizabeth et al. Silveira Obtenção do Óleo da Polpa de Pequi por Separação Física Utilizando-se Centrifugação. **Comunicado técnico 254**, Embrapa, 2019.

BATLOUNI, Michel. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 94, p. 556-563, 2010.

BEZERRA, Thaynara Paula Warren et al. A nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos: revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e99111436115-e99111436115, 2022.

BINDU, Samik; MAZUMDER, Somnath; BANDYOPADHYAY, Uday. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, v. 180, p. 114147, 2020.

BODDEKE, Erik WGM. Involvement of chemokines in pain. **European journal of pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 115-119, 2001.

BOZZA, Patricia T.; VIOLA, João PB. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 82, n. 4-6, p. 243-250, 2010.

BRAGA, Karla MS et al. Pequi Fruit Extract Increases Antioxidant Enzymes and Reduces Oxidants in Human Coronary Artery Endothelial Cells. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 474, 2022.

BRANCO, Anna Cláudia Calvielli Castelo et al. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2018, 2018.

BRUCKDORFER, Richard. The basics about nitric oxide. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, 2005. CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 3, 2008.

CGEE consultado dia 4 de março de 2023 disponível pelo site - [https://www.cgee.org.br/documents/10195/6917123/CGEE\\_2\\_Boletim\\_de\\_Bioeconomi\\_a.pdf/94978d99-3631-40b6-9ac0-18f0ced767cf?version=1.0](https://www.cgee.org.br/documents/10195/6917123/CGEE_2_Boletim_de_Bioeconomi_a.pdf/94978d99-3631-40b6-9ac0-18f0ced767cf?version=1.0)

CHEN, Zhongjian et al. Sustained and controlled release of herbal medicines: The concept of synchronized release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, p. 116-125, 2019.

CHENG, Xin-Meng et al. Reactive oxygen Species and oxidative stress in vascular-related diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022.

CNCFLORA, 2012, acessado em março de 2023 no site <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Caryocar%20brasiliense>

CIRINO, Giuseppe; DISTRUTTI, Eleonora; WALLACE, John L. Nitric oxide and inflammation. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy) (Discontinued)**, v. 5, n. 2, p. 115-119, 2006.

CORDEIRO, Madison Willy Silva et al. Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa de Caryocar brasiliense nativo do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1127-1139, 2013.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010.

D'AVILA, Heloisa et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3087-3097, 2006.

DA SILVA, Jerusa Marques; MENDONÇA, Patrícia Pereira; PARTATA, Anette Kelsei. Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais. **Rev Cient ITPAC [Internet]**, v. 7, n. 4, p. 5-12, 2014.

DE ASSUNÇÃO, Tayna Coutinho; JUNIOR, Omero Martins Rodrigues. Efeitos adversos no uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais: diclofenaco versus ibuprofeno. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e532111335937-e532111335937, 2022.

DE GODOY, Arthus Franco et al. BENEFÍCIOS E RISCOS DO USO DE COXIBES. **Revista InterSaúde**, v. 1, n. 2, p. 118-128, 2020.

DE MELO, Eliane Gonçalves et al. O RESGATE E O USO DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS: CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E PRINCIPAIS UTILIZAÇÕES NA ALIMENTAÇÃO HUMANA. **Educamazônia-Educação, Sociedade e Meio Ambiente**, v. 16, n. 1 jan-jun, p. 215-231, 2023.

DE OLIVEIRA, Caio Marcio Barros et al. Citocinas e dor. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 61, n. 2, p. 260-265, 2011.

DE SÁ COUTINHO, Diego et al. Pequi (Caryocar brasiliense Cambess)-loaded nanoemulsion, orally delivered, modulates inflammation in LPS-induced acute lung injury in mice. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1075, 2020.

DUARTE, Ludmila Ferreira; DE OLIVEIRA, João Paulo Leonardo; D'ANDREA, Catherine. A BIOECONOMIA COMO FATOR DE FOMENTO PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL NA ZONA FRANCA DE MANAUS. **REVISTA FOCO**, v. 16, n. 02, p. e1008-e1008, 2023.

ELKHATIB, Mohammed AW; ISSE, Fadumo Ahmed; EL-KADI, Ayman OS. Effect of inflammation on cytochrome P450-mediated arachidonic acid metabolism and the consequences on cardiac hypertrophy. **Drug Metabolism Reviews**, p. 1-25, 2022.

EL-MALAH, Afaf A. et al. Selective COX-2 inhibitors: road from success to controversy and the quest for repurposing. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 827, 2022.

ESTADÃO, <https://paladar.estadao.com.br/noticias/comida,pequi-o-rei-do-cerrado-da-polpa-a-castanha,70001648354>, acessado em 15 de março de 2022.

FEEHAN, Karen T.; GILROY, Derek W. Is resolution the end of inflammation? **Trends in molecular medicine**, v. 25, n. 3, p. 198-214, 2019.

FERREIRA, Bianca Silva et al. Comparative properties of amazonian oils obtained by different extraction methods. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5875-5885, 2011.

FERREIRA DE MATOS, Christophe et al. Risk of vaso-occlusive episodes in patients with sickle cell disease exposed to systemic corticosteroids: a comprehensive review. **Expert Review of Hematology**, v. 15, n. 12, p. 1045-1054, 2022.

FLEIT, H.B. Inflamação crônica. *Patobiologia da doença humana*. p. 300-314. 2014.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FRANCO, Marcello et al. **Patologia: processos gerais**. 6ª edição. Editora Atheneu. p. 165-190. 2015.

FUJIWARA, Nagatoshi; KOBAYASHI, Kazuo. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GUSEV, Evgenii; ZHURAVLEVA, Yulia. Inflammation: A new look at an old problem. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4596, 2022.

HANNA, Violette Said; HAFEZ, Ebtisam Abdel Aziz. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of advanced research**, v. 11, p. 23-32, 2018.

HERRERO-CERVERA, Andrea; SOEHNLEIN, Oliver; KENNE, Ellinor. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 19, n. 2, p. 177-191, 2022.

- KANDASAMY, Richard Kumaran. A modular map of Bradykinin-mediated inflammatory signaling network. 2021.
- JOANITTI, Graziella Anselmo; MORAIS, Paulo César de; AZEVEDO, Ricardo Bentes de. Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente. 2022.
- JU, Zhiran et al. Recent development on COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: The past 10 years. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2022.
- KAPOOR, Dhriti et al. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). **Plant Gene**, v. 19, p. 100182, 2019.
- KRAYCHETE, Durval Campos; CALASANS, Maria Thais de Andrade; VALENTE, Camila Motta Leal. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 199-206, 2006.
- KUMAR, Rukmini et al. The dynamics of acute inflammation. **Journal of theoretical biology**, v. 230, n. 2, p. 145-155, 2004.
- KUPRASH, D. V.; NEDOSPASOV, S. A. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 11, p. 1237-1239, 2016.
- LACY, Paige. Mechanisms of degranulation in neutrophils. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, p. 1-11, 2006.
- LAGARRIGUE, Frederic; KIM, Chungho; GINSBERG, Mark H. The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 128, n. 4, p. 479-487, 2016.
- LAROUX, F. S. et al. Role of nitric oxide in inflammation. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 173, n. 1, p. 113-118, 2001.
- LASSO, Alejandro et al. BIOECONOMIA E SOCIOBIODIVERSIDADE NA PERSPECTIVA AGROECOLÓGICA PARA O BEM VIVER. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 18, n. 1, p. 129-150, 2023.
- LI, Xinyuan et al. IL-35 (interleukin-35) suppresses endothelial cell activation by inhibiting mitochondrial reactive oxygen species-mediated site-specific acetylation of H3K14 (histone 3 lysine 14). **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 38, n. 3, p. 599-609, 2018.
- LIN, Edward; CALVANO, Steve E.; LOWRY, Stephen F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.
- LIMA, Rafael Rodrigues et al. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29-34, 2007.
- LÓPEZ, Diana E.; BALLAZ, Santiago J. The role of brain cyclooxygenase-2 (Cox-2) beyond neuroinflammation: Neuronal homeostasis in memory and anxiety. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 12, p. 5167-5176, 2020.
- LORDAN, Ronan; TSOUPRAS, Alexandros; ZABETAKIS, Ioannis. Capítulo 2 – Inflamação. **O impacto da nutrição e estatinas nas doenças cardiovasculares**, p. 23-51. 2019.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, 2000.



- MALTA, Deborah Carvalho et al. Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e regiões, projeções para 2025. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, p. e190030, 2019.
- MARCHI, Saverio et al. Mitochondrial control of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-15, 2022.
- MARROCCO, Antonella; ORTIZ, Luis A. Role of metabolic reprogramming in pro-inflammatory cytokine secretion from LPS or silica-activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 6418, 2022.
- MAN, Mao-Qiang et al. Regulatory role of nitric oxide in cutaneous inflammation. **Inflammation**, v. 45, n. 3, p. 949-964, 2022.
- MCCLEMENTS, David J.; JAFARI, Seid Mahdi. General aspects of nanoemulsions and their formulation. In: **Nanoemulsions**. Academic press, 2018. p. 3-20.
- MEDZHITOV, Ruslan. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.
- MELO, Rossana CN et al. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011.
- MENDES, Reila Tainá et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**. V. 52, n.5, p. 767-782, 2012.
- MILLS, Charles Dudley. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 212, 2015.
- MODI, Shreya et al. Recent trends in fascinating applications of nanotechnology in allied health sciences. **Crystals**, v. 12, n. 1, p. 39, 2022.
- MONTEIRO, Cristina et al. Safety of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Elderly: An Analysis of Published Literature and Reports Sent to the Portuguese Pharmacovigilance System. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 6, p. 3541, 2022.
- MORGAN, B. Paul. The complement system: an overview. **Complement methods and protocols**, p. 1-13, 2000.
- MORGAN, Edward T.; LI-MASTERS, Tong; CHENG, Po-Yung. Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. **Toxicology**, v. 181, p. 207-210, 2002.
- MORITA, Ikuo. Funções distintas de COX-1 e COX-2. **Prostaglandins & outros mediadores lipídes**, v. 68, p. 165-175, 2002.
- MOURA, Nara Fernandes; CHAVES, Lázaro José; NAVES, Ronaldo Veloso. Caracterização física de frutos de pequi (Caryocar brasiliense Camb) do cerrado. **Revista Árvore**, v. 37, p. 905-912, 2013.
- NAIK, Edwina; DIXIT, Vishva M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 417-420, 2011.
- NASIR, Naurah Nabihah et al. Kirenol: a potential natural lead molecule for a new drug design, development, and therapy for inflammation. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 734, 2022.
- NATHAN, Carl; DING, Aihao. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010.

NIEDBALA, Wanda et al. Nitric oxide enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2014.

NORWOOD, Stephanie et al. Epoxyeicosatrienoic acids and soluble epoxide hydrolase: potential therapeutic targets for inflammation and its induced carcinogenesis. **American journal of translational research**, v. 2, n. 4, p. 447, 2010.

OKIN, Daniel; MEDZHITOV, Ruslan. Evolution of inflammatory diseases. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. R733-R740, 2012.

O'MAHONY, Liam; AKDIS, Mübeccel; AKDIS, Cezmi A. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 1153-1162, 2011.

OMBREDANE, Alicia S. et al. Pequi oil (Caryocar brasiliense Cambess.) nanoemulsion alters cell proliferation and damages key organelles in triple-negative breast cancer cells in vitro. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113348, 2022.

PAHWA, Roma et al. **Chronic inflammation**. 2018.

PEGORARO, Nathali Schopf et al. Oleic acid exhibits an expressive anti-inflammatory effect in croton oil-induced irritant contact dermatitis without the occurrence of toxicological effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113486, 2021.

PEREIRA, Tácio Fragoso; DOS SANTOS SOUSA, Maura Vieira; LEITE, Itamara Farias. Caryocar brasiliense do Cerrado brasileiro ao tratamento de feridas-Revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e29710616404-e29710616404, 2021.

PEREIRA, Luciano José Barreto; GARCIA-ROJAS, Edwin Elard. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, v. 45, p. 155-162, 2015.

PORTAL EMBRAPA, <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/4122008/pequizeiro-comum>, acessado dia 15 de março de 2022.

PTASCHINSKI, Catherine; LUKACS, Nicholas W. Acute and chronic inflammation induces disease pathogenesis. In: **Molecular Pathology**. Academic Press, p. 25-43, 2018.

PUNCHARD, Neville A.; WHELAN, Cliff J.; ADCOCK, Ian. The journal of inflammation. **Journal of inflammation**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2004.

QUEROL, Luis A. et al. The role of the complement system in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: implications for complement-targeted therapies. **Neurotherapeutics**, v. 19, n. 3, p. 864-873, 2022.

RAINSFORD, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. **Inflammation in the pathogenesis of chronic diseases**, p. 3-27, 2007.

RAISER, Alécia Lorenzi et al. Avaliação da estabilidade e potencial atividade antioxidante de óleo de pequi em emulsões cosméticas (Caryocar brasiliense Camb.). 2017.

RIBEIRO, Milton Cosme et al. Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) oil. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 386-392, 2012.

RIMESSI, Alessandro et al. Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: Molecular mechanisms, diseases and promising therapies. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 81, p. 281-293, 2016.

ROCHA, A. **Patologia**. 2ª edição. Editora Rideel, p. 155-190. 2011.

RODRIGUES, Carla Pereira Fiuza. Imunologia básica: uma revisão aplicada a estudantes. Livro digital, 2022.

ROSA, Mário Fabrício Fleury. Pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) do respirador vesta: Universidade de Brasília (UnB) como vetor da pesquisa translacional em saúde. 2022.

RYAN, Graeme B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **The American journal of pathology**, v. 86, n. 1, p. 183, 1977.

SANEI-DEHKORDI, Alireza et al. Nanoliposomes containing limonene and limonene-rich essential oils as novel larvicides against malaria and filariasis mosquito vectors. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, p. 140, 2022.

SANTANA, João das Graças; NAVES, Ronaldo Veloso. Caracterização de ambientes de cerrado com alta densidade de pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.) na região sudeste do estado de Goiás. 2003.

SANTOS, Breno Régis et al. Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): uma espécie promissora do cerrado brasileiro. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, v. 64, 2004.

SARMA, J. Vidya; WARD, Peter A. The complement system. **Cell and tissue research**, v. 343, n. 1, p. 227-235, 2011.

SCHMID-SCHÖNBEIN, Geert W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93-151, 2006.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The inflammasomes. **cell**, v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010.

SPIES, Cornelia M. et al. Glucocorticoids. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 6, p. 891-900, 2011.

SILVA, Andreza Amaral da; GONÇALVES, Roberto Calderon. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, p. 994-1002, 2010.

SILVA, Mairon Mota et al. O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, v. 2, n. 2, 2019.

SOLIMAN, Amro M.; BARREDA, Daniel R. Acute Inflammation in Tissue Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 641, 2023.

TALLIMA, Hatem. Clarification of Arachidonic Acid Metabolic Pathway Intricacies. **ACS Omega**, 2021.

TORRES, L. R. O. et al. Bioactive compounds and functional potential of pequi (*Caryocar* spp.), a native Brazilian fruit: a review. **Grasas y Aceites**, v. 69, n. 2, p. e257-e257, 2018.

TIRANDI, Amedeo et al. Inflammatory biomarkers of ischemic stroke. **Internal and Emergency Medicine**, p. 1-10, 2023.

- TUOMANEN, Elaine I. Biology of adhesins of *Bordetella pertussis*: integrins, selectins, and mimicry of leukocyte adherence to endothelia. In: **Molecular Recognition in Host-Parasite Interactions**. Springer, Boston, MA, p. 1-6, 1992.
- VANDEWALLE, Jolien et al. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 42-54, 2018).
- VERA, Rosângela et al. Caracterização física de frutos do pequi (Caryocar brasiliense Camb.) No Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 71-79, 2005.
- WANG, Tianqi et al. Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3683, 2019.
- WAISMAN, Dan et al. Effects of inhaled nitric oxide on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion in rats. **Shock**, v. 23, n. 2, p. 150-155, 2005.
- WENZEL, Sally E. Arachidonic acid metabolites: mediators of inflammation in asthma. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 17, n. 1P2, p. 3S-12S, 1997.
- YUAN, Gaofeng et al. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 15, n. 2, 2006.
- ZHANG, Jun-Ming; AN, Jianxiong. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27, 2007.
- ZHOU, Qing; ZHANG, Li; WU, Hong. Nanomaterials for cancer therapies. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 5, p. 473-496
- ZHOU, Jing et al. Reactive oxygen species-sensitive materials: A promising strategy for regulating inflammation and favoring tissue regeneration. **Smart Materials in Medicine**, 2023.
- ZOTOVA, Natalya et al. Acute and Chronic Systemic Inflammation: Features and Differences in the Pathogenesis, and Integral Criteria for Verification and Differentiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1144, 2023.

# ANEXO 1

Brasília, 28 de junho de 2021.

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "**AValiação DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA *IN VITRO* E *IN VIVO***", SEI n.º 23106.058193/2021-48, sob responsabilidade da Professora Graziella Anselmo Joanitti, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 155ª reunião ordinária, realizada em 8/6/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus*, sendo 108 machos, com procedência do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília ou do biotério da Universidade Federal de Goiânia. O presente certificado é válido pelo período de 9/7/2021 a 20/12/2023.



  
Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo  
Coordenador da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO 2

Data base	String	Results	Search date
BSV regional portal	((("Caryocar brasiliense" OR Pequi) AND (oil OR "plant oil*" OR "fatty acid" OR "vegetable oil") AND (inflammation* OR "anti-inflammatory")))	25	31.10.2022
CINAHL	(Pequi OR "Caryocar brasiliense" OR Caryocar) AND (Oil* OR fatty acid OR "vegetable oil" OR "plant oil") AND (inflammation OR inflammatory OR "inflammatory marker" OR "antiinflammatory")	21	31.10.2022
Cochrane	(Pequi OR "Caryocar brasiliense" OR Caryocar) AND (Oil* OR fatty acid OR "vegetable oil" OR "plant oil") AND (inflammation OR inflammatory OR "inflammatory marker" OR "antiinflammatory")	6	31.10.2022
LILACS	((("Caryocar brasiliense" OR Pequi) AND (oil OR "plant oil*" OR "fatty acid" OR "vegetable oil") AND (inflammation* OR "anti-inflammatory")))	3	31.10.2022
Embase	('pequi oil'/exp OR pequi OR 'caryocar brasiliense'/exp) AND ('oil'/exp OR 'vegetable oil'/exp OR 'fatty acid'/exp) AND ('inflammation'/exp OR 'antiinflammatory agent'/exp OR 'inflammatory marker'/exp OR 'immune system'/exp)	31	31.10.2022
FSTA	(Pequi OR "Caryocar brasiliense" OR Caryocar) AND (Oil* OR fatty acid OR "vegetable oil" OR "plant oil") AND (inflammation OR inflammatory OR "inflammatory marker" OR "antiinflammatory")	12	31.10.2022
MEDLINE	((("Caryocar brasiliense" OR Pequi) AND (oil OR "plant oil*" OR "fatty acid" OR "vegetable oil") AND (inflammation* OR "anti-inflammatory")))	22	31.10.2022
ProQuest	((SU.X(Pequi)) OR "Caryocar brasiliense" OR "Pequi oil") AND (oil OR "vegetable oil" OR "fatty acid" OR "plant oil") AND (inflammation OR "inflammatory markers" OR "anti-inflammatory")  Refine filter "academic journals" were applied.	142	31.10.2022
PubMed	(Pequi OR "Caryocar brasiliense") AND ( "Plant Oils"[Mesh]) AND ("Inflammation"[Mesh] OR "Inflammation Mediators"[Mesh] OR "Anti-Inflammatory Agents"[Mesh])	5	31.10.2022
ScienceDirect	(Pequi OR 'Caryocar brasiliense' OR 'pequi oil') AND (oil OR 'plant oil') AND (inflammation OR 'inflammatory markers' OR 'anti-inflammatory')  Refine filter "research articles" were applied.	64	31.10.2022
Scopus	( TITLE-ABS-KEY-AUTH ( pequi OR "caryocar brasiliense" OR "Pequi oil" ) ) AND ( ALL(inflammation* OR "inflammatory response" OR "anti-inflammatory" ) AND ( oil OR "plant oil" ) )	84	31.10.2022
Web of Science	ALL=((Pequi OR "Caryocar brasiliense" OR "pequi oil") AND oil* AND (inflammation* OR "inflammatory markers*" OR "anti-inflammatory"))	22	31.10.2022

## ANEXO 3

### **Descrição detalhada dos parâmetros avaliados sobre qualidade geral dos estudos selecionados.**

#### Item 1: Desenho do estudo

- Os grupos experimentais são comparáveis e os grupos de controle estão presentes?

#### Item 2: Tamanho da amostra

- O número de unidades experimentais em cada grupo está claramente relatado? E o mesmo número (n) é avaliado na análise estatística?

#### Item 3: Critérios de inclusão e exclusão

- Os critérios pré-estabelecidos para inclusão ou exclusão de unidades experimentais foram descritos durante os experimentos ou durante as análises?

#### Item 4: Randomização

Aplicável apenas para estudos *in vivo*.

- Existe descrição de algum método de randomização das unidades experimentais nos grupos de tratamento?

#### Item 5: Cegueira

Aplicável apenas para estudos *in vivo*.

- Há descrição da aplicação de algum método de cegamento pelos pesquisadores, principalmente pelos responsáveis pelo manejo dos animais e pelos analistas dos resultados?

Item 6: Medidas de resultados

- As variáveis biológicas consideradas para a mensuração dos desfechos (conclusões) foram claramente descritas?

Item 7: Métodos estatísticos

- Os detalhes da análise estatística utilizada em cada análise foram relatados?

Item 8: Animais experimentais

- Todas as informações relevantes sobre as características dos animais e células foram descritas com clareza?

*In vitro*: linha celular e origem.

*In vivo*: espécie, sexo, idade e peso.

Item 9: Procedimentos experimentais

- As etapas dos procedimentos experimentais e seus intervalos e medições estão descritos de forma clara e com nível de detalhamento que permite a replicação?

Item 10: Resultados

- Os resultados contêm dados de todos os experimentos claramente descritos com uma indicação do valor da diferença estatisticamente significativa (valor  $p$ )?

Item 11: Resumo

- O resumo do estudo é claro e contém todas as informações relevantes? Como objetivos, modelo experimental, principais métodos utilizados e resultados relevantes?



#### Item 12: Histórico

- A introdução fornece informações que contextualizam e justificam o estudo?

#### Item 13: Objetivos

- A questão de pesquisa está claramente descrita nos objetivos do estudo?

#### Item 14: Declaração ética

##### *In vitro*

- Há descrição de aprovação do uso de células, apenas no caso de doadores humanos, por comitê de ética e o nome do comitê foi informado? Se não houve aprovação, há justificativa para o desenvolvimento do estudo?

##### *In Vivo*

- Há descrição de aprovação do uso de animais por comitê de ética e o nome do comitê foi informado? Se não houve aprovação, há justificativa para o desenvolvimento do estudar?

#### Item 15: Casa e criação

Aplicável apenas para estudos *in vivo*.

- As condições experimentais de alocação e suplementação dos animais foram informadas com clareza?

#### Item 16: Cuidados e monitoramento de animais

Aplicável apenas para estudos *in vivo*

- Foram descritos procedimentos para redução do estresse, dor e sofrimento dos animais?

Item 17: Interpretação/Implicações científicas

- A interpretação dos resultados está em contexto com os objetivos do estudo? E as limitações do estudo foram descritas?

Item 18: Generalização/tradução

- Existe descrição dos resultados que indique a possibilidade ou não de tradução para futuros experimentos em outros modelos experimentais? (Para estudos *in vivo* ou clínico)

Item 19: Registro de protocolo

Aplicável apenas para estudos *in vivo*

- Existe informação sobre um protocolo de estudo que foi desenvolvido antes do início dos experimentos? Em caso afirmativo, há uma indicação de onde foi publicado?

Item 20: Acesso a dados

- O estudo forneceu dados brutos para os resultados?

Esses dados referem-se aos dados completos utilizados nas estatísticas e podem ser disponibilizados em qualquer plataforma e o link deve estar presente no artigo.

Item 21: Declaração de interesses

- Há declaração de presença ou não de conflitos de interesse no estudo?

Os itens foram respondidos em cada estudo por dois revisores individualmente, os desacordos foram resolvidos por um terceiro revisor. Respostas BAIXAS indicam baixo risco de viés, ALTAS indicam alto risco de viés, NÃO CLARO indicam que a informação não está clara e NÃO INFORMADO indica que não há informações no artigo e não é possível atribuir viés.