



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

ANA PAULA SANTOS RODRIGUES

**Estudo do óleo essencial e da nanoemulsão à base de *Rosmarinus
officinalis* L. sobre dislipidemia em ratos Wistar**

**Macapá
2018**

ANA PAULA SANTOS RODRIGUES

Estudo do óleo essencial e da nanoemulsão à base de *Rosmarinus officinalis* L. sobre dislipidemia em ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração: Biologia Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

**Macapá
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Orinete Costa Souza – CRB-11/920

Rodrigues, Ana Paula Santos.

Estudo do óleo essencial e da nanoemulsão à base de *Rosmarinus officinalis* L. sobre dislipidemia em ratos Wistar / Ana Paula Santos Rodrigues ; Orientador, José Carlos Tavares Carvalho. – Macapá, 2018.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Dislipidemia. 2. Nanoemulsão. 3. Antiaterogênico. 4. Anti-dislipidêmico. 5. Óleo essencial – *Rosmarinus officinalis* L. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

613.284 R696e
CDD. 22 ed.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Ana Paula Santos Rodrigues

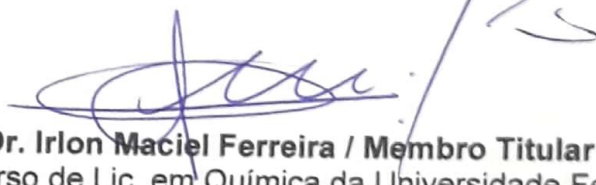
Orientador(a): Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

Co-Orientador(a):



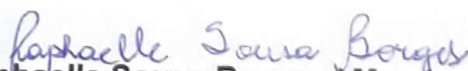
Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho / Presidente

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



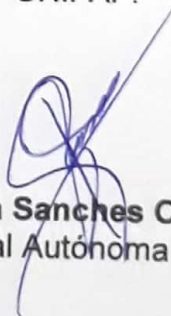
Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira / Membro Titular

Professor Doutor, do Curso de Lic. em Química da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Prof. Dra. Raphaelle Sousa Borges / Membro Titular

Professora Doutora, do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Prof. Dra. Brenda Lorena Sanches Ortiz / Membro Suplente
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM

Data: 14/12/2018

***Dedico este trabalho aos meus
pais Regina Célia e Lucivaldo
Rodrigues. Ao meu tio Moacir
Honorato (in memorian)***

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela vida e por todas as bênçãos recebidas nesta caminhada;

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho por todo suporte, apoio e dedicação, um verdadeiro “Pai Científico”;

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas Prof. Dr. Rodrigo Alves Soares Cruz;

Ao Secretário administrativo do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Edson Júnior por sua eficiência, sempre nos ajudando a resolver questões acadêmicas;

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo conhecimento compartilhado;

Aos meus pais, Regina Célia e Lucivaldo Rodrigues, por sempre me encorajarem a prosseguir e por acreditarem na minha capacidade;

Aos meus irmãos, Lucas Eduardo e Fernando Henrique;

A toda minha família por sempre estarem na torcida pelo meu sucesso;

Aos meus colegas da turma 2017 do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas; em especial Edmilson Moraes e Everton Vale, pelo companheirismo desde o início desta jornada;

À Letícia Boettger, pela ajuda na realização das análises bioquímicas, e sempre estar disposta a colaborar;

Á todos do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, especialmente à Albenise Barros por toda ajuda e companheirismo;

À Adriana Maciel pelo auxílio nas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura;

À Dra. Belmira Faria e Sousa; por todo apoio no desenvolvimento deste trabalho;

Aos coordenadores do Laboratório de NanoBiotecnologia Fitofarmacêutica (Nanofito) pela disponibilidade para o desenvolvimento das nanoemulsões;

À Prof. Dra. Clarissa Lima, coordenadora do Lac1, pela disponibilização do laboratório para realização das análises bioquímicas;

À CAPES/FAPEAP pela bolsa de mestrado concedida;

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão desta pesquisa;

A todos, meus sinceros agradecimentos.

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS E FITOQUÍMICA DE <i>Rosmarinus officinalis</i> ...	20
1.1.1	Constituição química e atividades biológicas relacionadas ao óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (ORO)	22
1.2	NANOEMULSÃO CONTENDO PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL	26
1.3	METABOLISMO LIPÍDICO.....	29
1.3.1	Mecanismos de transporte dos principais lipídeos no organismo.....	30
1.4	DISLIPIDEMIA E USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	32
1.5	ATEROSCLEROSE.....	35
1.5.1	Mecanismos da patogênese.....	35
1.5.2	Utilização de produtos de origem vegetal sobre aterosclerose.....	38
2	OBJETIVOS.....	42
2.1	OBJETIVO GERAL.....	42
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	43
3.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (ORO).....	43
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO ORO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A MASSA (CG-EM).....	44
3.4	OBTENÇÃO DA GORDURA SATURADA DE <i>Cocos nucifera</i> (GSC).....	44
3.5	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE ORO (NEORO).....	44
3.6	ANIMAIS UTILIZADOS.....	45
3.7	TRATAMENTO E INDUÇÃO DA DISLIPIDEMIA COM GORDURA SATURADA DE <i>Cocos nucifera</i> (GSC)	45
3.8	TRATAMENTO E INDUÇÃO DA DISLIPIDEMIA POR TRITON.....	46
3.9	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	46
3.10	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ATEROGÊNICO.....	47

3.11	ANÁLISE DA ATEROSCLEROSE DA AORTA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)	47
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ORO POR CG-EM.....	48
4.2	CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA NEORO.....	49
4.3	AÇÃO DO ORO E DA NEORO SOBRE MODELO DE DISLIPIDEMIA INDUZIDO POR TRITON.....	51
4.4	AÇÃO DO ORO E DA NEORO SOBRE MODELO DE DISLIPIDEMIA INDUZIDO POR GSC.....	54
4.4.1	Ação do ORO e da NEORO sobre a aterosclerose	59
5	CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	Anexos e apêndices.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (ORO) determinado por análise GC-EM.....	49
Tabela 2. Representa o tamanho das partículas e o índice de polidispersão da NEORO avaliada em triplicata durante o período de 0, 1 e 7 dias. Resultados com média±Desvio padrão (SD)	50
Tabela 3. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão (NEORO) de <i>Rosmarinus officinalis</i> sobre o peso dos órgãos dos ratos <i>Wistar</i> com dislipidemia induzida por GSC.....	56
Tabela 4. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão (NEORO) de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. sobre parâmetros bioquímicos e Índice Aterogênico de ratos <i>Wistar</i> com dislipidemia induzida por GSC.....	58

FIGURA 1. Biossíntese dos terpenos pela via do ácido mevalônico. Adaptado (SIMÕES et al., 2007).....	23
FIGURA 2. Principais compostos químicos encontrados no ORO.....	24
FIGURA 3. Ciclos de transporte de lipídeos no plasma. Ciclo exógeno, endógeno e transporte reverso. Adaptado (FALUDI et al., 2017).....	32
FIGURA 4. Mecanismo da patogênese da aterosclerose. Adaptado de SKEOCH et al., 2015).....	37
FIGURA 5. Perfil cromatográfico obtido da análise do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (ORO) por cromatografia gasosa acoplada - espectrometria de massa (GC-MS), onde 2 - α -pineno (8.13%), 10 - Limoneno (21.99%), 11 - 1,8-cineol (33,70%) e 16 - cânfora (27,68%)	48
FIGURA 6. Distribuição das partículas da NEORO obtidos por Zetasizer, nanoemulsão diluída com água para injeção (1:25) e avaliada em triplicata nos dias 0, 1 e 7 dias	50
FIGURA 7. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão de <i>Rosmarinus officinalis</i> (NEORO) sobre os níveis de colesterol total e triglicerídeos em ratos <i>Wistar</i> com dislipidemia induzida por Triton. Barras representam a média $\pm$ DP (n = 7 / grupo), com * (p <0,05), ** (p<0,01) e *** (p <0,01) representando resultados estatisticamente significativos em comparação com Grupo Triton. Teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.....	52
FIGURA 8. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão de <i>Rosmarinus officinalis</i> (NEORO) sobre os níveis de colesterol LDL e HDL em ratos <i>Wistar</i> com dislipidemia induzida por Triton. Barras representam a média $\pm$ DP (n = 7 / grupo), com * (p <0,05) , ** (p <0,01) e *** (p <0,01) representando resultados estatisticamente significativos em comparação com Grupo Triton. Teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey	53
FIGURA 9. Ativação de Receptores ativados por proliferadores peroxissomais. Linoneno, 1,8-cineol e outros monoterpenos atuam como agonistas de PPAR, para dar início à transcrição de genes responsáveis pela regulação do metabolismo lipídico. Adaptado de Ferreira 2015.....	54

FIGURA 10. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão (NEORO) de <i>Rosmarinus officinalis</i> sobre peso corporal e gordura abdominal de ratos <i>Wistar</i> com dislipidemia induzida por GSC. Barras representam a média $\pm$ DP (n = 7 / grupo), com ** (p <0,01) representando resultados estatisticamente significativos em comparação ao Grupo VEI+GSC. Teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey	55
FIGURA 11. Imagem por Microscopia Eletronica de Varredura (MEV) de corte transversal da aorta torácica. 1) ORO; 2) ORO + GSC; 3) VEI+ GSC; 4) NEORO + GSC; 5) SIN + GSC. Seta branca indica a formação da placa de ateroma no endotélio vascular da artéria aorta.....	59
FIGURA 12. Imagem por Microscopia Eletronica de Varredura (MEV) de corte longitudinal da aorta torácica. 1) ORO; 2) ORO + GSC; 3) VEI+ GSC; 4) NEORO + GSC; 5) SIN + GSC. Seta branca indica a formação da placa de ateroma no endotélio vascular da artéria aorta.....	60
FIGURA 13. Mecanismo de sinalização NF-KB. (Borges et al., 2018).....	62
FIGURA 14. Mecanismo antioxidante dos componentes do ORO na peroxidação lipídica e formação de ROS. Adaptado de Borges et al., 2018.....	63

ANEXOS E APÊNDICES

Anexo 1. Parecer do Comitê de ética.....	78
Anexo 2. Manuscrito submetido para publicação.....	79

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGS	Ácidos Graxos Saturados
ALT	Alanina aminotransferase
Apo (a)	Lipoproteína (a)
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Animal
DCV	Doenças Cardiovasculares
CT	Colesterol Total
DMAPP	Dimetilalil Pirofosfato
DGAT	Diacilglicerol Aciltransferase
FPP	Farnesil Difosfato
GPP	Trans-Geranilpirofosfato
GPx	Glutationa Peroxidase
GSC	Gordura Saturada de <i>Cocos nucifera</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3metilglutaril Coenzima A

IA	Índice aterogênico
IPP	Isopentenil-pirofosfato
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
Kg	Quilogramas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
Mg	Miligramas
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NEORO	Nanoemulsão contendo óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
OE	Óleo essencial
ORO	Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
ON	Óxido nítrico
PPARs	Receptores Ativados por Proliferadores de peroxissomos
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RXR	Receptor do ácido 9-cis retinóico
SIN	Sinvastatina
SOD	Superóxido dismutase

TG	Triglicerídeos
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
UNICAMP	Universidade de Campinas
VEI	Veículo
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular -1
VLDL	Lipoproteína de Muito baixa Densidade

Estudo do óleo essencial e da nanoemulsão à base de *Rosmarinus officinalis* L. sobre dislipidemia em ratos Wistar

RESUMO

Introdução: As dislipidemias são alterações no metabolismo de lipídeos que apresentam como principais consequências elevações dos níveis séricos das lipoproteínas, colesterol e triglicerídeos, e configuram-se como fator determinante no desenvolvimento da aterosclerose. **Objetivo:** Investigar a ação do óleo essencial (ORO) e da nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* L. (NEORO), sobre a dislipidemia induzida por Triton e Gordura Saturada de *Cocos nucifera* (GSC) em ratos Wistar. **Metodologia:** A indução de dislipidemia foi realizada em dois modelos: no primeiro foram administrados 2 mL de GSC por via oral, enquanto no segundo modelo de indução utilizou-se Triton na dose de 150 mg/kg por via intraperitoneal, em ambos, os animais foram tratados com ORO (100 mg/kg) e NEORO (500 µg/kg). Posteriormente foram coletadas amostras de sangue para análises bioquímica. Após a eutanásia, foram retirados os órgãos, gordura abdominal e artéria aorta para avaliação quanto ao processo ateromatoso por microscopia eletrônica de varredura (MEV). **Resultados e discussões:** Na avaliação fitoquímica do ORO, os compostos majoritários detectados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) foram: α -pineno (8.13 %), limoneno (21.99%), 1,8-cineol (33.70%) e cânfora (27.68%). A dislipidemia induzida por Triton resultou em aumento significativo no nível de colesterol total, LDL e triglicerídeos. Os grupos tratados com ORO e NEORO promoveram redução significativa nos níveis de colesterol total, LDL e Triglicerídeos, assim como o grupo tratado com sinvastatina (SIN). A dislipidemia induzida por GSC apresentou aumento no acúmulo de gordura abdominal, seguido de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, aumento nos níveis de LDL e formação de processos aterogênicos na artéria aorta. Os grupos tratados (ORO+GSC, NEORO+GSC, SIN+GSC) reduziram de forma significativa a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, além de reduzir a gordura abdominal e inibir a formação de placas ateromatosas no endotélio vascular. **Conclusões:** Os resultados evidenciaram que tanto o ORO quanto a NEORO nos modelos empregados, apresentam efeito anti-dislipidêmico e propriedades antiaterogênicas.

Palavras-Chave: Dislipidemia, nanoemulsão, antiaterogênico, anti-dislipidêmico.

Agradecimentos: Fundação de Amparo à pesquisa do Amapá (FAPEAP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Study of essential oil and nanoemulsion based on *Rosmarinus officinalis* L. on dyslipidemia in Wistar rats

ABSTRACT

Introduction: Dyslipidemias are metabolic alterations of lipids which induce increased serum lipoproteins, cholesterol, and triglycerides, being a risk factor for the development of atherosclerosis. **Objective:** This study aimed to assess the effect of *Rosmarinus officinalis*' essential oil (ORO), and its nanoemulsion (NEORO) on dyslipidemia induced by Triton and *Cocos nucifera* saturated fat (GSC) in Wistar rats. **Methodology:** The induction of dyslipidemia was performed in two models: in the first, 2 mL of GSC were administered orally, while in the second induction model Triton was used at a dose of 150 mg / kg intraperitoneally, in both animals the animals were treated with ORO (100 mg / kg) and NEORO (500 µg / kg). Then, blood samples were collected for biochemical analysis; after animals were euthanized, their organs and abdominal fat were removed for analysis, and the aorta was assessed through MEV for atheromatous processes. Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism (7.0), values were represented as a mean and standard deviation. **Results and Discussion:** In the phytochemical evaluation of ORO, the major compounds detected by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) shows the presence of α-pinene (8.13%), limonene (21.99%), 1,8-cineole (33.70%), and camphor (27.68%). Triton-induced dyslipidemia led to a significant increase of total cholesterol, LDL, and triglycerides. Groups treated with ORO and NEORO had a significant decrease in total cholesterol, LDL, and triglycerides, just as the group treated with simvastatin (SIN). GSC-induced dyslipidemia resulted in an increased amount of abdominal fat, hypercholesterolemia, hyperglyceridemia, increased levels of LDL, and atheromatous process formation in the aorta. All treated groups (ORO+GSC, NEORO+GSC, SIN+GSC) had a significant decrease of hypercholesterolemia, hyperglyceridemia, abdominal fat, and inhibition of atheromatous process formation in the vascular endothelium. **Conclusion:** The results reported in this study evidence that treatment either with ORO or NEORO exerts anti-dyslipidemic and anti-atherogenic effects in the tested models.

Keywords: Dyslipidemia, nanoemulsions, anti-atherogenic, anti-dyslipidemic

Acknowledgment: We acknowledge the Amapá Research Support Foundation (FAPEAP) and Higher Education Staff Improvement Coordination (CAPES), for grant support.

As dislipidemias são alterações no metabolismo de lipídeos que apresenta como principais consequências elevações dos níveis séricos das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), colesterol total e triglicerídeos, assim como a diminuição nas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (SILVA et al., 2011; HERNANDO et al., 2014, SANTOS et al., 2015), e estão diretamente ligadas ao desenvolvimento da aterosclerose, que se caracteriza como uma doença inflamatória e progressiva acometendo as artérias de médio e grande calibre, gerada em resposta à disfunção endotelial, deposição lipídica, migração de células musculares e calcificação, que afeta principalmente a camada íntima das artérias (BONFIM et al., 2015; WANG et al., 2017; DONG et al., 2018; LIN et al., 2018; DOWLA et al., 2018; RAGGI et al., 2018).

Esta patologia está associada ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares (DCV), diabetes e síndrome metabólica. As DCVs representam grande problema de saúde pública, acometendo a cada ano aproximadamente 12 milhões de pessoas, e a dificuldade do tratamento pode levar à mortalidade precoce, sendo estas as principais causas de morbimortalidade no mundo, em decorrência de complicações como infarto agudo do miocárdio, embolia e acidente vascular cerebral. (SOUZA et al., 2017).

Atualmente, a busca por alternativa ao meio de produtos naturais tem sido tornado crescente, uma vez que representam a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos que possam ser financeiramente mais acessíveis, com menor toxicidade, e maior eficácia e segurança. Além disso, a grande biodiversidade da flora brasileira contribui para a obtenção de plantas medicinais que por muito tempo foram utilizadas de forma tradicional pela população e hoje podem ser elucidadas pela comunidade científica acerca de suas propriedades farmacológicas e compostos bioativos.

Entre as espécies estudadas, se destaca o *Rosmarinus officinalis* L., popularmente conhecido como alecrim no Brasil, que é uma planta amplamente reconhecida na medicina tradicional por suas propriedades terapêuticas. O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (ORO) é bastante apreciado na indústria cosmética e alimentar, e alguns estudos com ORO conduzidos para avaliar suas propriedades farmacológicas atribuídas aos compostos, mostraram resultados satisfatórios para testes antioxidantes, hipoglicemiantes, antifúngicos, anti-inflamatórios, anti-hipertensivo, antinociceptivo (AMAR et al., 2014; ABDELHALIM et al., 2015; BORGES et al., 2017).

Dentro do contexto abordado e a necessidade do desenvolvimento de meios alternativos que possam contribuir com o tratamento de dislipidimias, a aplicação da nanotecnologia associada aos óleos essenciais (OE) tem a capacidade de proporcionar uma otimização das propriedades farmacológicas favorecida pela escala nanométrica da composição das formulações, uma vez que os OE são formados por substâncias voláteis e insolúveis em água, o que dificulta a penetração através da membrana biológica. As nanoemulsões são dispersões estáveis constituídas por óleo, água, e um ou mais agentes surfactantes, e o desenvolvimento dessas nanoformulações contendo produtos de origem vegetal possibilita a estabilidade termodinâmica e formação de pequenas gotículas, variando entre 20 a 200 nm. Desta forma, está sendo empregada nas indústrias farmacêuticas para melhor aproveitamento e distribuição dos compostos bioativos utilizados para diversas finalidades (RAHMAN et al., 2018).

Desta forma, a biodiversidade se destaca como uma grande fonte de recursos naturais e devido a sua grande variedade de espécies de plantas ricas em substâncias bioativas com potencial farmacológico para a prevenção e tratamento de várias patologias, incluindo a dislipidemia. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do óleo essencial e da nanoemulsão contendo *Rosmarinus officinalis* L. sobre dislipidemia induzida com gordura saturada de *Cocos nucifera* L. e Triton em ratos Wistar.

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E FITOQUÍMICA DE *Rosmarinus officinalis* L.

O *Rosmarinus officinalis* L. é um arbusto denso, ramificado, com hastes lenhosas de folha persistente e flor azul-esbranquiçada, podendo atingir uma altura de cerca de 1 metro (AL-SEREITI et al., 1999; MAY et al 2010). Caracteriza-se pelas folhas com 1 a 4 cm de comprimento e 2 a 4 mm de largura, sésseis, coriáceas, lineares a lineares-lanceoladas, com margens recurvadas e apresenta cheiro muito característico (BEGUM et al., 2013). Pode ser utilizado na forma de planta fresca (in natura), seca ou como óleo essencial para fins culinários, medicinais e aromáticos, o óleo essencial também é utilizado em cosméticos e perfumaria (MAY et al., 2010; GONÇALVES et al., 2018).

Tradicionalmente conhecido como alecrim, é também chamado pelos nomes populares de alecrim-da-horta, alecrim-de jardim, alecrim-de-cheiro, alecrim-rosmarinho, roris marino (latim), rosemary (inglês), romero (espanhol), romarin (francês), ramerino

(italiano), rosmarin (alemão) (MAY et al., 2010; ABDELHALIM et al., 2015). É uma planta pertencente à família Lamiaceae (Labiatae), originária do Sul da Europa e do Norte da África e mediterrâneo, porém é uma planta de fácil adaptação e atualmente é cultivada em locais temperados ao redor do mundo. É reconhecido por apresentar diversas propriedades bioativas, entre elas se destacam principalmente as atividades anti-inflamatória, antifúngica, antidepressiva, antibacteriana e antioxidante, o que tem sido de grande interesse para indústria e realização de novas pesquisas, tanto no âmbito farmacológico, quanto cosmético e alimentar. (MACHADO et al., 2013; SEDIGHI et al., 2015; BORGES et al., 2017; SATYAL et al., 2017).

Etnofarmacologicamente, as pessoas do Mediterrâneo costumavam usar para cozinhar como erva, ou como chás e alguns deles usavam seu óleo essencial para tratamentos terapêuticos sobre espasmos, inflamação, como diurético e atividades colaterais, além disso, por muito tempo, esta planta foi usada não somente para melhorar ou modificar o sabor dos alimentos, mas também para evitar deterioração devido às suas atividades antimicrobiana e antioxidante (LOPEZ-MUNOZ et al., 2006; OMRI et al., 2010). Estudiosos encontraram evidências de que esta planta aromática era usada na culinária, na medicina e para fins cosméticos no antigo Egito, China, Índia e Mesopotâmia. Em alguns países europeus, como Grã-Bretanha, Grécia e Itália, utilizava-se para revigorar a memória, para melhorar o fluxo menstrual, estimular o crescimento do cabelo, para ajudar na digestão e contra a flatulência e distúrbios hepáticos (RIBEIRO-SANTOS et al., 2015).

Foram identificados altos níveis de compostos biologicamente ativos incluindo terpenos, como ácido carnosico, carnosol, ácido ursólico e ácido betulínico, bem como ácido rosmarínico, rosmanol, ácido oleanólico, além de antioxidantes adicionais incluindo ácidos fenólicos e os flavonoides (ALMELA et al., 2006; AFONSO et al., 2010; BENINCÁ et al., 2011).

Atualmente estudos avaliaram as atividades biológicas desta espécie como antiproliferativo e anti-câncer, anti-inflamatório, analgésico, antimicrobiano, antifúngico, antihiperlipêmico, hipoglicemiante, hepatoprotetor (BORGES et al., 2017; GONÇALVES et al., 2018; AMARAL et al., 2018). Além disso, extratos de alecrim estão sendo aplicados como aditivos naturais em produtos alimentícios, melhorando a vida útil de alimentos perecíveis (GONÇALVES et al., 2018).

Relatos recentes mostram que o extrato de folhas de alecrim limita ganho de peso e esteatose hepática em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura (GAYA et al., 2013). Wu et al., (2011) demonstram que o extrato de alecrim apresenta efeito significativo no tratamento de hiperlipidemia. O ácido carnósico é descrito como um

importante componente do extrato de *R. officinalis*, atuante sobre obesidade e síndrome metabólica. Em um modelo de estudo com camundongos observou-se a ação do extrato sobre animais que tiveram dieta rica em gordura, com diminuição do peso corporal, redução de triglicérides e níveis de glicose, além disso, análises histológicas mostraram diminuição do acúmulo de lipídeos nos hepatócitos (ZHAO et al., 2015).

Em estudo realizado por Afonso et al., (2013), utilizando ratos com hiperlipidemia induzida por dieta, demonstrou-se que o extrato aquoso de alecrim foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total melhorando o perfil lipídico, além de atuar sobre enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, aumentando suas atividades, fator que pode ser atribuído à prevenção de processos ateroscleróticos. Supõe-se que estas moléculas antioxidantes podem agir como seqüestradores de radicais livres, mas adicionalmente podem desempenhar um papel na regulação da atividade e/ou expressão de certos sistemas enzimáticos implicados em processos fisiológicos relevantes como apoptose, destruição de células tumorais, transdução do sinal intracelular ou na regulação também das enzimas que metabolizam xenobióticos no fígado (DALMARCO 2012).

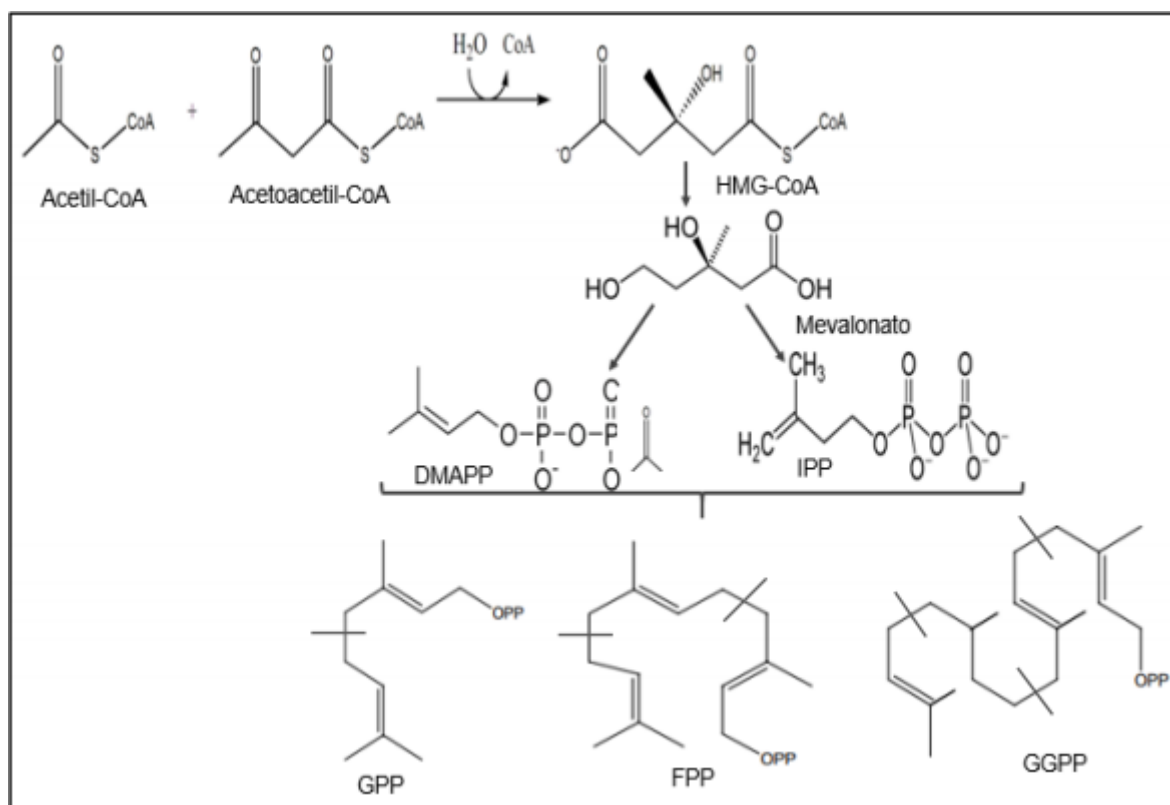
1.1.1 Constituição química e atividades biológicas relacionadas ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (ORO)

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos, na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênica (DE MORAIS et al., 2009).

Os terpenos são hidrocarbonetos naturais que pertencem a uma diversificada classe de metabolitos secundários oriundo da via biossintética do ácido mevalônico, sintetizados no citoplasma das células vegetais. A via biossintética origina-se da condensação de uma unidade de acetoacetil-CoA com outra de acetil-CoA, posteriormente a uma hidrólise, forma o 3-hidroxi-3-metilglutarilCoA (HMG-CoA) que necessita da enzima HMG-CoA-redutase que catalisa a uma redução mediante NADPH para dar origem ao ácido mevalônico. Posteriormente o ácido mevalônico é convertido em Isopentenil-pirofosfato (IPP) e Dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que por sua vez dão origem a unidades de isopreno (2-metil- 1,3 Butadieno). A condensação de unidades de

isoprenos pelos compostos IPP e DMAPP, irão dar origem ao trans-geranilpirofosfato (GPP) que poderá ser convertido em monoterpenos (C₁₀), e sua polimerizações com IPP darão origem aos demais esqueletos carbônicos dos terpenos, sendo o Farnesil difostato (FPP) originará os sesquiterpenos (C₁₅) e triterpenos (C₃₀) e o Geranil geranil difosfato (GGPP) os diterpenos (C₂₀) (SIMÕES et al., 2007).

Figura 1: Biossíntese dos terpenos pela via do ácido mevalônico. Adaptado (SIMÕES et al., 2007).

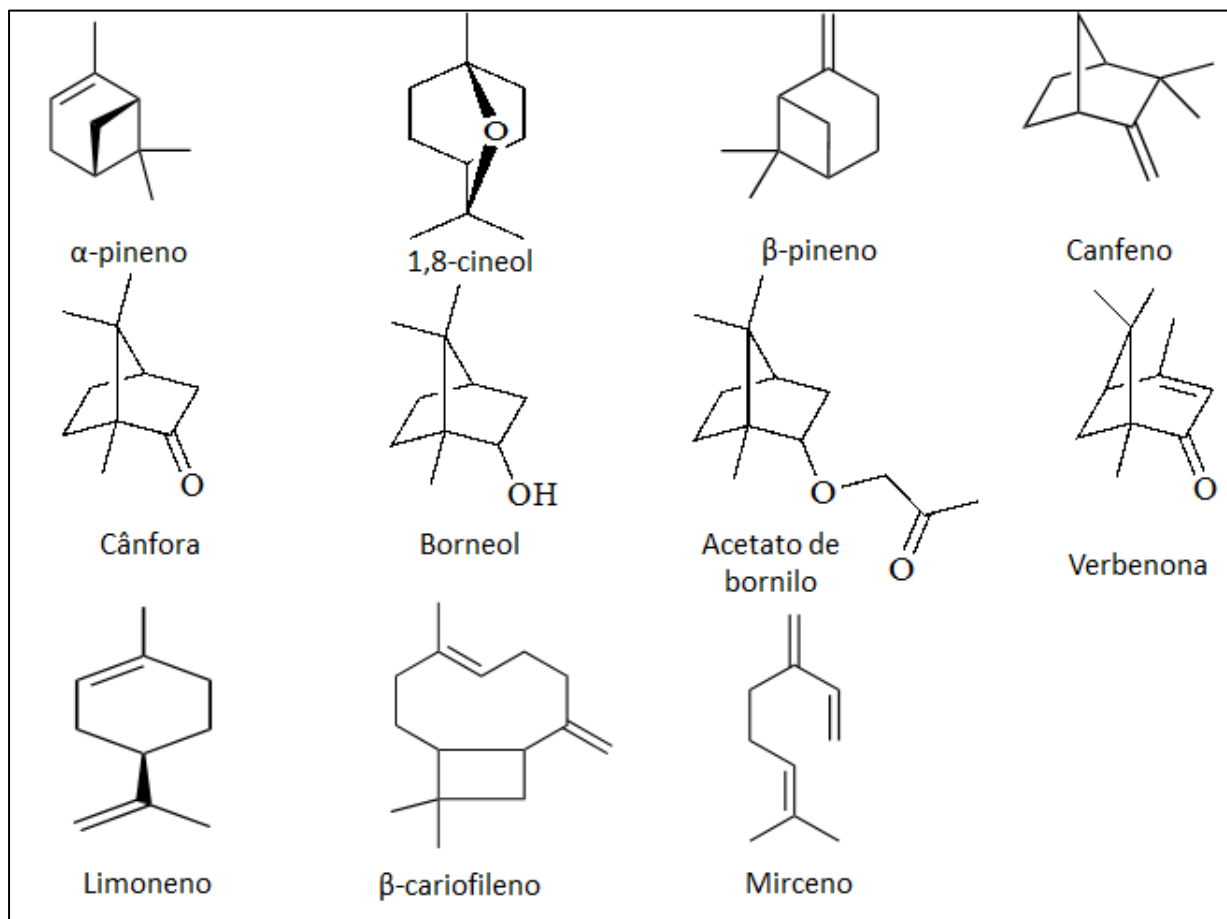


O ORO é um líquido incolor ou amarelo pálido, com odor característico da planta, pode ser extraído através da destilação por arraste a vapor, a partir das folhas, flores, hastes e raízes (RAŠKOVIĆ et al., 2014). Devido a sua atividade antibacteriana e antioxidante, o ORO é amplamente utilizado na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar (AFFHOLDER et al., 2013).

A composição do ORO pode variar de acordo com fatores de solo, cultivo e extração (BORGES et al., 2017). De acordo com Borges et al., (2018) cerca de 150 compostos químicos já foram identificados em amostras de ORO em diversos estudos. Os componentes químicos mais característicos encontrados no ORO são α -

pineno, 1,8-cineol, β -pineno, canfeno, cânfora, borneol, acetato de bornilo, verbenona, limoneno, β -cariofileno e mirceno (**Figura 2**) (BERNARDES et al., 2010; AFFHOLDER et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2014; AOUADI et al., 2014 ÉVORA, 2015; BORGES et al., 2017; SATYAL et al., 2017).

Figura 2: Principais compostos químicos encontrados no Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.



A composição química do ORO foi descrita por vários autores. Salido et al., (2003) verificou que as amostras provenientes do sul da Espanha eram maioritariamente constituídas por α -pineno, 1,8-cineol e cânfora.

Segundo Cleff et al., (2012) e Satyal et al., (2017), no óleo essencial de alecrim, destacam-se como principais constituintes os monoterpenos como cânfora, 1,8-cineol, α -pineno, limoneno, os quais são reconhecidos por apresentar atividades inseticidas, antioxidantes e antimicrobianas .

Estudos científicos evidenciaram que o ORO possui atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,

Proteus vulgaris, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* comparativamente com os seus compostos majoritários 1,8-cineol e α -pineno (JIANG et al., 2011).

As propriedades antiproliferativas do ORO foram descritas em modelos celulares de câncer de mama humano e fibroblastos, observou-se inibição no crescimento dessas duas linhagens celulares. Em outro estudo mais recente a atividade anti-câncer do ORO também foi relatada, com potencial antioxidante atuando principalmente sobre a peroxidação lipídica, relacionados com 1,8-cineol e outros monoterpenos presentes na fitoquímica do ORO (HUSSAIN et al., 2010; WANG et al., 2012; GEZICI et al., 2017; BOUYAHYA et al., 2018).

As propriedades anti-inflamatórias têm sido atribuídas principalmente ao 1,8 cineol e cânfora (TAKAYAMA et al., 2016; SELMI et al., 2017; BORGES et al., 2017). Takaki et al., (2008) demonstram a ação anti-inflamatória do ORO em estudo induzindo edema de pata em ratos e atribui a atividade à presença de 1,8 cineol, sugerindo efeito sinérgico com mircenol. A literatura também descreve o efeito analgésico do ORO, em teste de placa quente, observou-se o aumento do tempo de latência em resposta a dor em grupos de animais tratados com ORO. Este estudo também avaliou a composição química do ORO isolado das partes aéreas da planta, e revelou que os compostos majoritários são 1,8-cineol, a cânfora e o α -pineno (RASKOVIC et al., 2015).

O potencial antioxidante também é uma das atividades biológicas que têm sido reportadas tanto para o óleo essencial como para os seus compostos isolados. (WANG et al., 2008). De acordo com Rašković et al., (2014) que estudou a atividade antioxidante do óleo essencial *in vitro* e *in vivo*, além do óleo essencial ter potencial antioxidante, este é igualmente capaz de modular o estado oxidativo hepático pela ativação de mecanismos de defesa fisiológicos. Desta forma, o ORO é um antioxidante natural que poderá ser utilizado para tratar várias condições patológicas hepáticas. Takayama et al., (2016) sugerem que os monoterpenos presentes no ORO podem estar entre os princípios ativos responsáveis pela atividade antioxidante demonstrada em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol *in vivo*, com uma inibição significativa da lesão da mucosa gástrica, provavelmente modulando as atividades das enzimas (superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e aumentando ou mantendo os níveis de glutathione.

O ORO também foi efetivo contra dano no sistema reprodutivo de ratos diabéticos, em modelo induzido por aloxana. Resultados demonstraram que a administração de aloxana causou um estresse oxidativo avaliado pelo aumento das enzimas antioxidantes nos testículos, epidídimos e espermatozoides. Por outro lado, a administração de ORO

apresentou efeitos sobre o dano oxidativo, exercendo fator protetor sobre a função reprodutiva (SEBAI et al., 2015).

1.2 NANOEMULSÃO CONTENDO PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL

Hoje em dia, os recentes desenvolvimentos alcançados pela nanotecnologia estão sendo considerados em várias áreas de pesquisa, uma vez que a manipulação da matéria em escala nanométrica oferece inúmeras oportunidades. Além disso, a utilização de produtos com origem natural tem crescido nos últimos anos, e há uma busca para alcançar métodos mais eficazes entre as diversas finalidades, sejam elas na indústria farmacêutica, cosmética, alimentar, entre outras. Entre os produtos estudados atualmente, destaca-se os óleos essenciais, presentes principalmente em algumas plantas medicinais, e que são reconhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas (XUE 2015).

Os óleos essenciais são substâncias bioativas presentes em produtos de origem natural, formados principalmente por moléculas voláteis, insolúveis em água, o que dificulta a penetração dos seus compostos através da membrana biológica (KANG et al., 2018). Desta forma, novas maneiras para otimização desses óleos foram desenvolvidas e entre elas, se destacam as nanoemulsões, que estão sendo cada vez mais usadas nas indústrias alimentícias, cosmética e farmacêutica para encapsular, proteger, e entregar componentes bioativos (DIZAJ et al., 2016).

Uma nanoemulsão é um sistema coloidal que consiste principalmente em óleo, surfactante e água, com alta estabilidade cinética, baixa viscosidade, e é opticamente transparente, o que é muito benéfico em várias indústrias. São estruturas extremamente pequenas (até 200 nm) e gotículas de tamanho formal (HARWANSH et al., 2011). O pequeno tamanho das gotículas, associado às características conferidas pelos componentes e o método de preparo, estabelece boa resistência à força gravitacional e é capaz de prevenir fenômenos de instabilidade, como floculação e cremação, sua alta estabilidade cinética resiste separação de fases ou sedimentação (SETYA et al., 2014). Portanto, estas propriedades são muito apreciadas na indústria farmacêutica, devido à excelente estabilidade, melhor solubilidade e minimização da degradação do fármaco

(TANG et al., 2012; Da COSTA et al., 2014; ACEVEDO-FANI et al., 2017; MUSTAFA et al., 2017; RAHMAN et al., 2018).

Entre os métodos de preparação de nanoemulsões, alguns utilizam alta energia como homogeneização a alta pressão e microfluidização, e outros envolvem baixa energia, como emulsificação espontânea (SUGUMAR et al., 2015).

As nanoemulsões de origem vegetal vêm sendo utilizadas para diversos fins, tais como: inseticida e repelente, antimicrobianos e aditivos alimentares (PASCUAL-VILLALOBOS et al., 2017).

Os sistemas carreadores de nutrientes e nutracêuticos, especialmente aqueles que apresentam substâncias com baixa solubilidade em água, vem se expandindo e algumas dessas tecnologias já estão sendo incorporadas em produtos alimentícios. Existem muitos componentes hidrofóbicos ou pouco solúveis e compostos bioativos de alimentos que são essenciais para a saúde humana. Estes incluem vitaminas insolúveis em água, compostos fenólicos, ácidos graxos, óleos essenciais, aromas e componentes aromáticos. Vários fatores limitam a aplicação desses ingredientes em alimentos. Neste contexto, diferentes estudos sobre o encapsulamento de bioativos alimentares hidrofóbicos mostraram que, ao incorporá-los em nanocarreadores sofisticados, resultados promissores e favoráveis podem ser alcançados, tais como melhoria na solubilidade em água, propriedades antioxidantes e outras promotoras de saúde, perfil de liberação gastrointestinal, e melhor proteção contra o processo e ambiente sob condições adversas, como luz, oxigênio, altas temperaturas e umidade (MOSTAFA et al., 2017; HARWANSH et al., 2011; OSTERTAG et al., 2012).

Diversos estudos vêm sendo viabilizados para desenvolvimento de nanoemulsões, bem como para avaliação de sua estabilidade e potenciais atividades. Observa-se inúmeras vantagens entre as diferentes áreas empregadas. Duarte et al., (2015) e Osanloo et al., (2017) sugerem a atividade larvicida da nanoemulsão a base do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e *Artemisia dracunculus*, observando níveis potenciais de mortalidade em larvas do vetor *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*, respectivamente, destacando principalmente que o desenvolvimento de controles de vetores de origem natural diminuem o impacto ambiental causado pelos sintéticos, uma vez que o uso contínuo de larvicidas químicos causa resistência em muitas espécies de vetores em todo o mundo. Além disso, estudos comprovam que óleos essenciais apresentam compostos químicos com potencial larvicida, inseticida e repelente, mas por se tratar de substâncias voláteis podem ser inapropriadas para esta finalidade, reportando as nanoemulsões como uma abordagem para estabilizar e aumentar a eficácia.

Do ponto de vista farmacológico, o emprego de nanoemulsões a base de óleos de plantas aromáticas em agentes bioativos e terapêuticos podem aumentar sua eficiência, capacidade de direcionamento e especificidade (REZAEI et al., 2018). Borges et al.,(2017) desenvolveram uma nanoemulsão à base do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* para avaliação de sua atividade anti-inflamatória e antialgica em teste de edema de pata induzido por carragenina, observou-se uma inibição do edema com uma dose 600 vezes menor que a dose aplicada ao óleo essencial, possivelmente pelo fato de que nanoemulsões são capazes de aumentar a biodisponibilidade de princípios ativos de drogas vegetais e melhorar sua ação sobre determinados alvos terapêuticos.

O efeito anti-hiperalgésico prolongado pela nanoemulsão a base do óleo essencial de *Hyptis pectinata* em modelo animal de fibromialgia foi observado. Em um estudo anterior demonstrou o efeito analgésico de *Hyptis pectinata*, porém, por um curto espaço de tempo. A administração desta nanoformulação apresentou efeito sobre o comportamento hiperalgésico por um tempo prolongado, sugerindo-se, desta forma, melhora na biodisponibilidade dos componentes responsáveis (QUINTANS et al., 2017).

Em outro estudo recente o óleo essencial e a nanoemulsão a base de *Rosmarinus officinalis* também foi avaliado sobre *Trichomonas vaginalis*, apresentaram efeito positivo sobre tricomoníase, observou-se a inibição do crescimento deste patógeno (JARIBI et al., 2017).

Nanoemulsões contendo óleo essencial de *Lavandula angustifolia* e *Rosmarinus officinalis* foram testadas sobre Leishmania, estudo demonstrou que as nanoformulações foram mais eficazes do que o óleo essencial (SHOKRI et al., 2017).

O emprego de nanoformulações de polifenóis presentes em algumas plantas como catequinas e antocianinas tem sido descrita para tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares e desordens metabólicas, para melhorar principalmente suas propriedades farmacocinéticas e potencializar sua atividade antioxidante sobre oxidação lipídica (NANKAR et al., 2016).

Também podem ser desenvolvidas nanoemulsões de uso tópico. Foi realizada a avaliação antimicrobiana de uma nanoemulsão a base do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., esta formulação mostrou efeitos superiores de cicatrização e antimicrobianos, principalmente sobre *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis*, as principais bactérias associadas à acne, em comparação com o antibiótico de referência, sendo considerado um potencial agente antiacne e a superação da resistência aos antibióticos (LAMBERT et al., 2001; TALEB et al., 2018).

Nanoemulsões a partir dos óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis*, avaliaram a ação antinoceptiva em modelo de osteoartrite em ratos. A administração de forma tópica aumentou de forma significativa a resposta comportamental aos estímulos mecânicos e térmicos e a histopatologia dos tecidos do joelho confirmou os resultados do teste comportamental (MOHAMMADIFAR et al. 2018).

Neste contexto, o emprego da nanotecnologia associada aos produtos de origem naturais tem se tornado crescente, uma vez que tem sido de interesse à comunidade científica o desenvolvimento de sistemas que permitam a exposição dos compostos biotivos com maior disponibilidade aos alvos terapêuticos e melhorar a ação dos princípios ativos presentes nos vegetais.

1.3 METABOLISMO LIPÍDICO

Dos pontos de vista fisiológico e clínico, os lípideos biologicamente mais relevantes são os fosfolípideos, o colesterol, os triglicerídeos (TG) e os ácidos graxos (AG). Os fosfolípídios formam a estrutura básica das membranas celulares. O colesterol é precursor dos hormônios esteroidais, dos ácidos biliares e da vitamina D. Além disso, como constituinte das membranas celulares, o colesterol atua na fluidez destas e na ativação de enzimas aí situadas. Os TGs são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energéticos mais importantes no organismo, depositados nos tecidos adiposo e muscular. Os ácidos graxos podem ser classificados como saturados (sem duplas ligações entre seus átomos de carbono), mono ou poli-insaturados, de acordo com o número de ligações duplas na sua cadeia. Os AGs saturados mais frequentemente presentes em nossa alimentação são: láurico, mirístico, palmítico e esteárico (que variam de 12 a 18 átomos de carbono) (XAVIER et al., 2013; FALUDI et al., 2017). As gorduras monoinsaturadas têm sido relacionadas com diminuição nos níveis de TG, CT e LDL, bem como ao aumento nos níveis de HDL no plasma, característica importante no contexto da redução dos riscos cardiovasculares (FAGHERAZZI et al., 2008; SANTOS et al., 2013). Entre os AGs monoinsaturados, o mais frequente é o ácido oléico, que contém 18 átomos de carbono. Quanto aos AGs poli-insaturados, podem ser classificados como ômega-3 (eicosapentaenoico, docosaexanoico e linolênico), ou ômega-6 (linoleico), de acordo com

a presença da primeira dupla ligação entre os carbonos, a partir do grupo hidroxila (MAHAN et al., 2013).

A digestão das gorduras compreende: absorção, emulsificação, digestão, metabolismo e degradação. Assim, uma pequena quantidade de lipídios é digerida na boca pela lipase lingual e no estômago pela lipase gástrica, mas a digestão propriamente dita dos lipídios ocorre no duodeno, por ação da bile que emulsifica os glóbulos de gordura aumentando sua superfície de contato com as enzimas, e também pela ação lipase pancreática que age quebrando as moléculas grandes de gordura em ácidos graxos livres e monoglicerídeos. Esses ácidos graxos livres e monoglicerídeos formam complexos com os sais biliares, denominados micelas, que atuam facilitando a passagem dos lipídios através do ambiente intestinal aquoso até as células da borda em escova, onde são absorvidos, reagrupados em triglicerídeos e transportados (junto com fosfolipídios, colesterol e lipoproteínas – formando os quilomícrons) até o fígado. (XAVIER et al., 2013).

1.3.1 Mecanismo de transporte dos principais lipídeos no organismo

Os principais lipídios são transportados no plasma em complexos conhecidos como lipoproteínas, que são insolúveis em meio aquoso. As lipoproteínas são partículas esféricas cuja superfície é constituída majoritariamente por fosfolipídios, colesterol livre e proteínas e o seu interior é composto por triglicerídeos e ésteres de colesterol (BEVILACQUA et al., 2006). Estes complexos são constituídos por quantidades variáveis de colesterol e seus ésteres, triglicerídeos, fosfolipídios e apoproteínas, sendo solúveis no plasma devido à natureza hidrofílica da parte proteica (MAHAN et al., 2013).

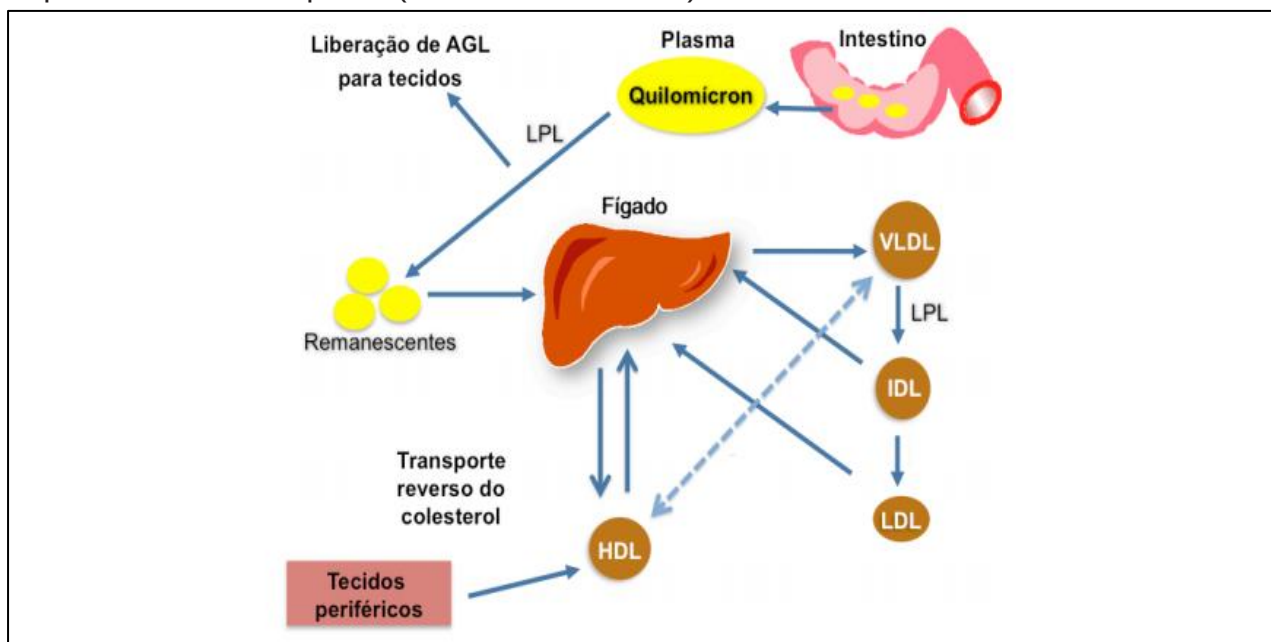
As lipoproteínas são distribuídas em quatro principais grupos e classificadas de acordo com a sua composição, densidade, tamanho e mobilidade eletroforética. São as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa (VLDL), de origem hepática; e as ricas em colesterol, incluindo as Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) e as de Alta Densidade (HDL) (FALUDI et al., 2017; BEVILACQUA et al., 2006). A VLDL é sintetizada no fígado e depois convertida em LDL, sua síntese é regulada pela dieta, por hormônios e pela captação de quilomícrons remanescentes no fígado. No indivíduo saudável, a maior parte do colesterol é transportada pela LDL, a qual é captada pelo fígado para ser metabolizada. Depois de ligada ao seu receptor membranar, a LDL é internalizada e

degradada. O catabolismo da LDL promove inibição da atividade da HMG-CoA redutase, enzima indispensável à síntese endógena de colesterol (BEVILACQUA et al., 2006).

Existe ainda uma classe de Lipoproteínas de Densidade Intermediária (IDL) e a Lipoproteína (a) (Lp(a)), que resulta da ligação covalente de uma partícula de LDL à Apo (a). A função fisiológica da Lp(a) não é bem conhecida, mas, em estudos mecanísticos e observacionais, ela tem sido associada à formação e à progressão da placa aterosclerótica (GHOSH et al., 2017).

As lipoproteínas participam de três ciclos básicos de transporte de lípidos no plasma (**Figura 3**): o primeiro é ciclo exógeno, no qual as gorduras são absorvidas no intestino e chegam ao plasma, sob a forma de quilomícrons, e, após degradação pela lipase lipoproteica (LPL), ao fígado ou a tecidos periféricos; o segundo é o ciclo endógeno, em que as gorduras do fígado se direcionam aos tecidos periféricos; a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) é secretada pelo fígado e transforma-se em lipoproteína de densidade intermediária e, posteriormente, em LDL, a qual carrega os lípideos, principalmente o colesterol, para os tecidos periféricos; e o terceiro é transporte reverso do colesterol, em que as gorduras, principalmente o colesterol dos tecidos, retorna para o fígado. Consiste na remoção do colesterol dos tecidos para o fígado pela HDL, condição que promove a redução da quantidade do colesterol do sangue. Trata-se do movimento oposto do colesterol, o qual é transferido das células periféricas para o fígado através do compartimento plasmático. Este colesterol deve ser utilizado para atender as demandas metabólicas ou ser excretado nas fezes através da bile (MINEO et al., 2012).

Figura 3: Ciclos de transporte de lipídeos no plasma. Ciclo exógeno, endógeno e transporte reverso. Adaptado (FALUDI et al., 2017).



Dentro deste contexto, é de grande relevância a preponderância que as lipoproteínas têm na aterosclerose, visto que quando há uma desregulação nos níveis de lipídeos no plasma pode se iniciar a retenção do LDL na parede das artérias e uma vez na parede arterial, a LDL é oxidada levando à recruta de monócitos para a artéria. Os monócitos transformam-se em macrófagos que vão acelerar o processo de resposta inflamatória, promovendo aumento da coagulação devido ao aumento dos níveis de oxidação do LDL e alterar a captação do mesmo pelos seus receptores, que desencadeando plasminogênio, induz a produção de endotelina que causa vasoconstrição e inibe a síntese de óxido nítrico (vasodilatador e inibidor plaquetário) (FARIA E SOUZA 2017).

1.4 DISLIPIDEMIA E USO DE PLANTAS MEDICINAIS

A dislipidemia definida como modificações nos níveis circulantes dos lipídeos em relação a parâmetros estabelecidos para uma determinada amostra populacional, como consequência de distúrbios ocorridos em qualquer fase do metabolismo lipídico, que resultam na alteração dos níveis séricos das lipoproteínas e estão associadas à incidência

de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, hipertensão arterial e esteatose (BEZERRA et al., 2011). Trata-se de fator chave na promoção da síndrome metabólica, encontrada em indivíduos magros e obesos, uma vez que a obesidade por si só não é considerada como responsável pelo desenvolvimento da dislipidemia (IPSEN et al., 2016).

É caracterizada por alterações metabólicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico que ocasionam repercussão nos níveis séricos das lipoproteínas, moléculas que transportam os lipídios no meio aquoso plasmático (SOC. BRAS. CARDIOLOGIA, 2001; SOC. BRAS. CARDIOLOGIA, 2007; BEZERRA et al., 2011).

Segundo Jallinger et al., (2002) e Bevilacqua et al., (2006), podem ser primária ou secundária. A primária diz respeito às alterações genéticas e ambientais, a secundária pode ter origem em outra situação patológica, como o hipotireoidismo, obesidade ou Diabetes mellitus, ou ser uma consequência da utilização de determinados fármacos que elevem os níveis lipídicos, como por exemplo, glucocorticóides, isotretinoína, ciclosporina, mirtazapina, progestinas, diuréticos tiazídicos, bloqueadores β , estrogênios e antifúngicos azólicos (DIPIRO et al., 2008).

O excesso de lipídios séricos é reconhecido como um dos mais significantes fatores de risco para DCVs. Isoladamente, as alterações lipídicas são responsáveis por 56% das doenças cardíacas e 18% dos casos de infarto, sendo ainda associadas a um terço dos casos de mortalidade no mundo (HOFFMAN et al., 2012).

A proeminência da hiperlipidemia como problema de saúde pública está na sua relação com as DCVs, principalmente o acidente vascular cerebral (AVC) e a doença aterosclerótica coronariana - razões importantes de morte e incapacidade física em nosso meio, com repercussões importantes nos custos da assistência médica no Brasil (BEVILACQUA et al., 2006).

Para Chlaudhary e Brocks (2013), a hiperlipidemia é uma condição em que o colesterol total (CT), os triglicerídeos (TG) e a LDL encontram-se elevados no sangue, tornando-se os maiores fatores de risco para aterosclerose, infarto do miocárdio (IM) e AVC.

O tratamento de dislipidemia se dá frequentemente pelo uso de fármacos sintéticos como estatinas, por outro lado, algumas espécies de plantas medicinais são bastante utilizadas entre a população. Estudo de Tian et al., (2013), realizado com ratos utilizando a espécie vegetal *Camellia sinensis*, diminuiu os níveis de colesterol total, LDL e concentrações séricas de triglicérides em animais obesos, além de reduzir a gordura abdominal. Em outro trabalho, o extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* foi capaz de

reduzir o peso corporal de ratos obesos, com hipelipidemia tratados por 16 semanas, também melhorando a resposta de glicose no sangue, além da diminuição dos níveis séricos de triglicerídeos e LDL (GAMBOA-GÓMEZ et al., 2015).

Vários estudos relatam o efeito da *R. officinalis* para promover a perda de peso. Harach et al. (2010) utilizou o extrato de folhas de *R. officinalis* administrados por 50 dias em doses de 200 mg/kg de peso corporal em camundongos alimentados com dieta rica em gordura, foi evidenciado que o tratamento induziu de forma significativa o peso e gordura abdominal. Estudos *in vitro* demonstram efeito inibitório sobre a enzima lipase, responsável pela quebra de gordura no pâncreas. (BUSTANJI et al., 2010). Estudos indicaram que as sementes de *Medicago sativa* têm efeitos hipocolesterolêmicos e podem prevenir doenças associadas. (SEDIGHI et al., 2017)

O extrato etanólico de algumas plantas como *Syzygium cumini*, pode melhorar a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase, que tem um papel potencial na regulação do perfil lipídico sérico. Também foi demonstrado que o efeito hipolipemiante desse agente pode ser devido à presença de flavonóides, saponinas, glicosídeos e triterpenóides em seu extrato (ROUHI-BOROUJENI et al., 2015).

Muitas plantas com potencial hipolipemiantes são frequentemente utilizadas na culinária como *Ocimum basilicum*, o manjerição, os principais mecanismos envolvidos na redução dos níveis de lipídios e oxidação lipídica são descritos pela literatura. O extrato de *Vaccinium myrtillus* atua inibindo o acúmulo de lipídios durante a adipogênese, particularmente através da melhoria do catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (BRAVO et al., 2008; SUZUKI et al., 2011).

O *ginseng* é uma poderosa erva que atua através da inibição dos aumentos do colesterol total, LDL e triglicérides e também a diminuição do HDL, regulando o acúmulo de lipídios e aumentando a expressão de adiponectina nas células adipocitárias (ALIZADEH-NAVAEI et al., 2008).

Desta maneira, diversas plantas oferecem potencial para atuarem sobre as condições de dislipidemia, isso inclui seus fatores de risco, como doenças cardiovasculares, hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, por meio de uma variedade de mecanismos, como ações antioxidantes, antiplaquetárias, fibrinolíticas, antiateroscleróticas, antihiperlipidêmicas, antiarrítmicas e vasodilatadoras.

1.5 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença multifatorial, lenta e progressiva e a hiperlipidemia um dos fatores potenciais no desenvolvimento de doenças cardíacas ateroscleróticas. Dessa forma, as DCVs são causa crescente e relevante de óbitos em todo o mundo e as hiperlipidemias constituem importantes fatores de risco para seu desencadeamento, uma vez que não são passíveis de monitoramento direto pelo paciente, as complicações das dislipidemias surgem de forma insidiosa (CELESKI et al., 2013). A literatura evidência que seu desencadeamento pode ocorrer na infância (PEREIRA, et al., 2010; SILVA; SOUZA, 2014).

Por outro lado, o desequilíbrio homeostático ocasionado por tabagismo, hipertensão, diabetes, obesidade e hipercolesterolemia contribuem para a disfunção hemodinâmica e fatores de risco cardiovascular. Devido à magnitude de seus efeitos, grandes esforços vêm sendo realizados pela comunidade médica para prevenir e controlar esse quadro metabólico, e as estratégias terapêuticas recomendadas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e adotadas pelos especialistas da área englobam o estímulo à adoção de uma alimentação saudável, o aumento da prática de exercícios físicos e a prescrição de medicamentos (BONFIM et al., 2014).

1.5.1 Mecanismos da patogênese

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica iniciada pela retenção subendotelial de lipoproteína de baixa densidade (LDL) seguido pela sua subsequente oxidação. O endotélio normal ajuda a manter a homeostase vascular, secretando óxido nítrico vasodilatador (ON). A secreção de ON, em particular, inibe a inflamação, proliferação e trombose (WANG et al., 2017).

A hiperlipidemia é um importante fator de risco para a aterosclerose. Sabe-se há algum tempo que os altos níveis plasmáticos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são aterogênicos, enquanto lipoproteínas de alta densidade (HDL) parecem ser antiaterogênicas. Isso se deve à função das HDLs no transporte reverso do colesterol, que leva o colesterol da periferia para o fígado para degradação. Estatinas funcionam através da redução de LDL pela inibição da HMG-CoA redutase, uma enzima envolvida na síntese do colesterol. As estrias gordurosas resultam de concentrações aumentadas de trações e insidação lipídica da íntima, particularmente da LDL (WANG et al., 2017).

Colesterol e fosfolipídios dentro dessas primeiras acumulações são suscetíveis à oxidação por enzimas como mieloperoxidases, lipoxigenases, NADPH oxidases e óxido nítrico sintase e espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em LDL oxidadas, o que induzem disfunção endotelial, inflamação e aumento da permeabilidade vascular. A modificação química de LDL induz a expressão de moléculas de adesão, tais como molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), nas células endoteliais e células do músculo liso que, uma vez ativadas, levam à secreção de citocinas e contribuem para o recrutamento de monócitos e Células T para a camada íntima da artéria. O fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) induz a entrada de monócitos no endotélio vascular para se diferenciar em macrófagos. Ocorre a sub-regulação subsequente de moléculas de adesão leucocitária pelo endotélio, incitando ainda mais a migração de linfócitos e macrófagos. Macrófagos absorvem LDL-oxidada por via endocitose e, em seguida, transportam para lisossomos para ser degradadas, mas LDL-oxidada são menos suscetíveis à degradação. A incorporação de LDL modificada em um processo que não é regulado o conteúdo lipídico intracelular, leva a formação de células espumosas (RAGGI et al., 2018).

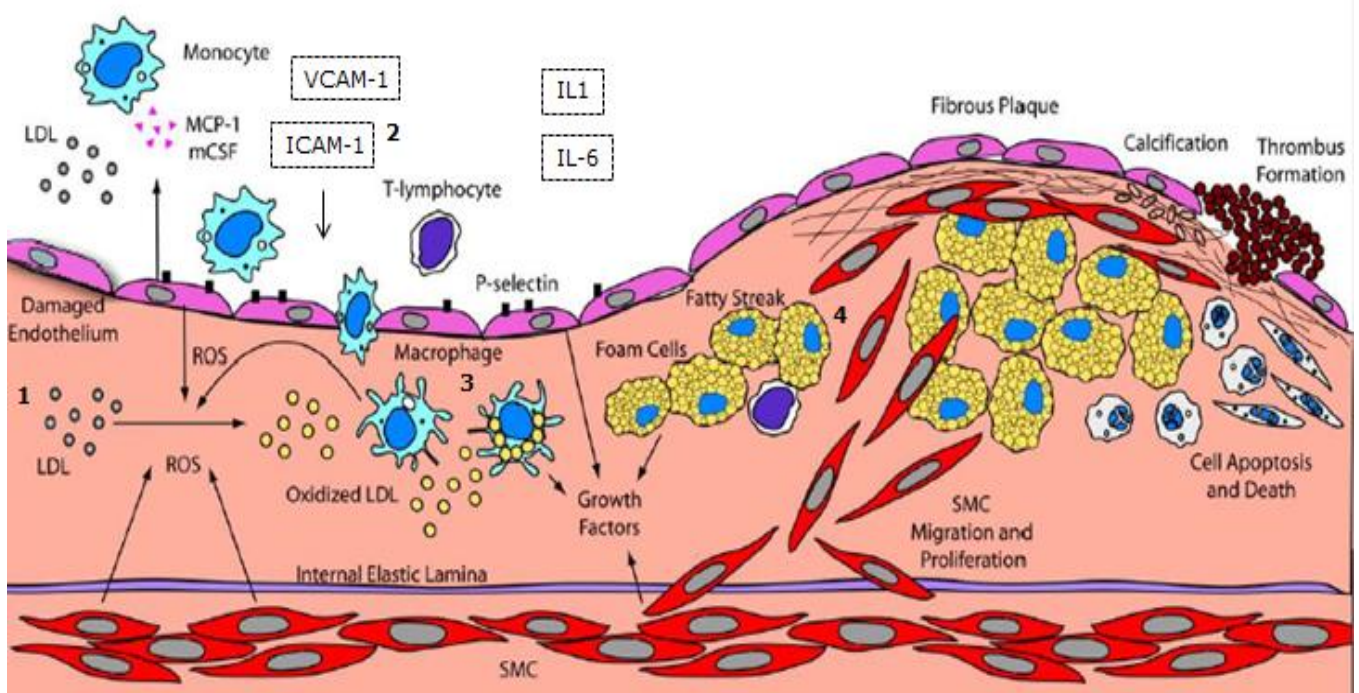
A disfunção endotelial e o metabolismo lipídico anormal levam a liberação de muitas moléculas pró-inflamatórias. Uma vez que os monócitos entram no espaço subendotelial, eles podem amadurecer em macrófagos e absorver LDL-oxidada para transformar em células espumosas. No entanto, os macrófagos promovem ativamente a inflamação, ativação de linfócitos T e macrófagos adicionais, migração através da secreção de citocinas como interleucina 1 (IL1), IL-6, IL-12. A família IL-1 de citocinas aumenta a expressão VCAM-1 e regula a ativação de macrófagos e linfócitos. IL-6 tem sido implicado em angiogênese, revascularização e indução de proteína C reativa (PCR). IL-12 foi implicada na ativação de células T. Macrófagos também produzem metaloproteinases de matriz, que pode remodelar a matriz extracelular e potencialmente enfraquecer a estabilidade da placa (LEOPOLD et al., 2009; MOSS et al., 2017; MORIYA et al., 2018).

Portanto, o estresse hemodinâmico e o acúmulo de lipídios inicia um processo inflamatório na parede da artéria. Além disso, o acúmulo de colesterol na eritometria, leucócitos, plaquetas e células endoteliais podem levar a um aumento na concentração e uma redução na defesa antioxidante sistemas como a catalase (CAT) glutational peroxidase (GPx) e enzimas superóxido dismutase (SOD) . Esta condição favorece a interrupção do equilíbrio redox, contribuindo para o estabelecimento do estresse oxidativo, e está envolvida em vários distúrbios metabólicos. Por outro lado, células endoteliais

expostas a turbulência de fluxo induzem a ativação do pró-inflamatório NF- κ B (AFONSO et al., 2013).

Nesse contexto, a lesão aterosclerótica frequentemente decorre inicialmente de dois processos básicos (**Figura 4**): acúmulo de colesterol e a proliferação de células musculares lisas na túnica íntima, desenvolvendo-se, portanto sobre um substrato formado por células, leucócitos derivados do sangue, e de uma quantidade variável de tecido conectivo, formando uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen, modificando a túnica média e levando a uma série de complicações circulatórias (TSIOUFIS et al., 2017).

Figura 4: Mecanismo da patogênese da aterosclerose. 1- A lesão aterosclerótica se inicia a partir da hiperlipidemia e disfunção endotelial. Ocorre a retenção de colesterol LDL na camada íntima da artéria, onde a mesma sofre oxidação através de ROS. 2- LDL oxidada induz a expressão de moléculas de adesão celular- vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular (ICAM-1) nas células endoteliais, o que levam a secreção de citocinas, como interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), iniciando o processo inflamatório. 3- O processo inflamatório induz a entrada de monócitos, que posteriormente irão se diferenciar em macrófagos. 4- Macrófagos absorvem LDL oxidada, o que leva a formação de células espumosas, que formam a placa aterosclerótica. Adaptado de SKEOCH et al., 2015)



1.5.2 Utilização de produtos de origem vegetal sobre aterosclerose

A aterosclerose é uma importante causa de mortalidade. Muitos esforços estão sendo realizados pelas indústrias farmacêuticas para desenvolver medicamentos mais eficientes. O uso de plantas medicinais ainda é bem aceito pela população mundial. Desta forma, diversas pesquisas vêm sendo introduzidas para avaliação dos efeitos de determinadas plantas para prevenção e tratamento desta patologia. Em geral, as plantas medicinais facilitam o tratamento da aterosclerose através de uma variedade de mecanismos que incluem a regulação da expressão de fatores inflamatórios, estimulação de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs), inibição da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) e atividade antioxidante (GHOLIPOUR et al., 2018).

Desta forma, estudar e introduzir esses ingredientes alimentares e compostos à base de plantas com potenciais propriedades antioxidantes, anti-inflamatórios e com efeito sobre hipercolesterolemia, aterosclerose, doenças cardiovasculares e isquemia são de grande importância. Compostos fenólicos e polifenólicos, flavonóides, antocianina, catequina, quercetina, esterol, carotenóides, ácido cafeico, beta-caroteno e ácido gálico e algumas substâncias presentes em óleos essenciais são os compostos ativos mais importantes com essas propriedades (GHOLIPOUR et al., 2018).

Foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico de *Valeriana officinalis* exerce efeitos relaxantes nas células musculares lisas da parede do endotélio vascular. Eles podem, portanto, servir para tratar doenças causadoras de disfunção endotelial, como aterosclerose, hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão. Estudo sugere que este extrato age na via do Óxido nítrico, que é a principal causa da dilatação vascular (CROPLEY et al., 2002).

Gholipour et al., (2018), descreve a atividade antioxidante e os efeitos cardiovasculares do *Quercus robur*, agem impedindo a oxidação do LDL, prevenindo a aterosclerose. Os compostos de *Sesamum indicum* (Gergelim) diminuem o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, os níveis de triglicérides e colesterol plasmáticos e o LDL. Propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do *S. indicum* e o efeito positivo dessa planta medicinal sobre a lipoproteína pode contribuir potencialmente para o processo de desenvolvimento de placas ateroscleróticas. Além disso, exercem

efeitos inibitórios na peroxidação lipídica da membrana e oxidação de LDL (SEDIGHI et al., 2017).

O *Allium ampeloprasum* aumenta algumas enzimas como superóxido dismutase, catalase, peroxidase e glutathione peroxidase. As plantas da família *Alliaceae* podem prevenir o desenvolvimento e a progressão das complicações neurológicas e cardiovasculares do diabetes por conterem um potente inibidor da aldose redutase. Este composto pode produzir prostaglandina I₂, que exerce efeitos dilatatórios nos vasos e na aorta. *A. ampeloprasum* tem efeitos antioxidantes consideráveis por conter vários flavonoides (WAKASUGI et al., 1991). Outra planta com potencial antioxidante é o *Origanum vulgare*, popularmente conhecida como manjerona e é utilizada na culinária. Um estudo atribuiu os efeitos antioxidantes do óleo essencial de *Origanum vulgare* à alta concentração de compostos fenólicos como carvacrol e timol. Esses compostos causam o equilíbrio entre sistemas produtores de radicais livres, que estão ligados ao estresse oxidativo e desenvolvimento de células espumosas em vasos ateroscleróticos (ALMA et al., 2003).

A fruta *Morus nigra*, amoreira, é uma rica fonte de antocianinas. Muitos estudos demonstraram atividades antioxidantes e benefícios à saúde das antocianinas encontradas em diferentes frutas e vegetais. Diminuir o índice angiogênico e os níveis de triglicérides e ácidos graxos livres é outra propriedade farmacológica das antocianinas. Por causa do exercício de propriedades anticancerígenas, antioxidantes, anti-angiogênicas, anti-ateroscleróticas e anti-inflamatórias, as antocianinas ajudam o corpo a manter-se saudável. O *L*-butanol presente na folha de *M. nigra* diminuiu as placas ateroscleróticas das artérias, além de diminuir a concentração sérica de lipídios e a densidade ateromatosa da íntima das artérias em coelhos hipercolesterolêmicos (DOI et al., 2000; ROSSI et al., 2003).

Estudos conduzidos por Kabiri et al., (2012), em modelo de indução da aterosclerose por hipercolesterolemia em coelhos, demonstraram que *Hypericum perforatum* apresenta efeitos sobre doenças cardiovasculares e ajuda a diminuir as lesões ateroscleróticas. Isso devido apresentarem certos flavonóides, como flavonol, flavonas, catequinas, compostos fenólicos, óleos essenciais, ácidos, óleos voláteis, carotenóides, beta-sitosteróis e fitoesteróis. Estes compostos podem exercer efeitos antioxidantes eficientes e destruir os radicais livres. Os autores ainda descrevem que a prevenção da progressão está associada a uma redução dos fatores inflamatórios e o mecanismo antioxidante pode induzir a regressão da lesão aterosclerótica.

O *Allium sativum* causa inibição da ciclo-oxigenase e da lipoxigenase e previne o acúmulo de trombócitos. Além disso, grandes quantidades de flavonóides, com propriedades antioxidantes, antidiabéticas e protetoras do sistema cardíaco e da corrente sangüínea, têm sido demonstradas neste estudo. A administração do extrato bruto de *A. sativum* causa diminuição nos níveis de marcadores de peroxidação lipídica, reduzem o colesterol e o triglicerídeos, além de possuírem propriedades anti-hipertensivas, vasodilatadoras, e sobre enzimas protetoras teciduais e aterosclerose (SEDIGHI et al., 2007).

Estudos anteriores descobriram que as folhas de *Olea europaea*, contém um composto, chamado oleuropeína, que previne a oxidação de LDL, e como a oxidação de LDL é o principal estágio de desenvolvimento de placas ateroscleróticas. A oleuropeína é considerada um agente importante no tratamento da aterosclerose, pois tem sido demonstrado que podem agir como hipotensor, hipolipidêmico, vasodilatador e também antioxidante (GUINDA et al., 2006; DIMITRIOU et al., 2016).

A avaliação da propriedade antioxidante do óleo essencial de *Punica granatum*, conhecido popularmente como Romã, demonstrou que sua propriedade antioxidante é aproximadamente igual à de um agente antioxidante comercial. Esses potentes compostos antioxidantes também são úteis no tratamento de aterosclerose e doenças vasculares. Em um estudo randomizado com pacientes, observou-se efeitos benéficos aos grupos de pessoas hipertensas que consumiram suco de romã, os autores indicam como um suplemento cardioprotetor benéfico para indivíduos hipertensos (ASGARY et al., 2014).

Coriandrum sativum possui propriedades hipocolesterolêmicas e antioxidantes que podem ser devidas a compostos fenólicos e carotenóides presentes nesta planta. Os compostos fenólicos servem como doadores de ferro e, provavelmente, neutralizam as reações induzidas pelos radicais livres no organismo. Os antioxidantes podem, portanto, causar diminuição no risco de adquirir doenças cardiovasculares, aterosclerose e infarto do miocárdio (GHORBANI et al., 2011).

Um estudo recente demonstrou que a combinação de extratos de *Hordeum vulgare* e *Avena sativa*, cevada e aveia respectivamente, podem reduzir a hiperlipidemia e os fatores de coagulação. Apresentam um efeito substancial na hiperlipidemia, especialmente no LDL, também aumenta o HDL, portanto, se trata de uma boa alternativa para pacientes com hiperlipidemia (ARSHADI et al. 2014).

Neste contexto, os produtos naturais utilizados para tratar diversas patologias, estão tendo um crescimento exponencial entre as pesquisas científicas. As plantas

medicinais, especificamente, apresentam compostos eficazes sobre a prevenção e tratamento de dislipidemias e patologias relacionadas, como aterosclerose e síndrome metabólica. Estudos relacionando os mecanismos de ação dos componentes bioativos sobre a patogênese e alvos terapêuticos podem contribuir com o tratamento de diversos pacientes, além de prevenir em muitos casos o desenvolvimento dessas patologias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação do óleo essencial (ORO) e da nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* L. (NEORO), sobre a dislipidemia induzida por Triton e Gordura Saturada de *Cocos nucifera* (GSC) em ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química do óleo essencial de *R. officinalis* L. e seus componentes majoritários;
- Investigar possíveis alterações no perfil bioquímico dos animais que apresentaram a dislipidemia induzida por GSC e Triton e que foram tratados com ORO e NEORO;
- Verificar os parâmetros de peso e gordura abdominal entre os grupos que apresentaram dislipidemia induzida por GSC;
- Avaliar a estabilidade e a ação da NEORO sobre a dislipidemia induzida por Triton e GSC;
- Determinar o índice aterogênico entre os grupos que apresentaram dislipidemia induzida por GSC;
- Investigar a ação do ORO e NEORO sobre o processo aterogênico na artéria dos animais com dislipidemia induzida por GSC através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi do tipo experimental controlado, no qual utilizou-se o método quantitativo do tipo ensaio não clínico e randomizado. O estudo foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, situado no prédio das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, localizada na Rodovia Juscelino Kubitschek, Km-02, s/n, bairro do Zerão, município de Macapá, estado do Amapá, Brasil.

Por se tratar de um estudo que envolveu a utilização de animais, este trabalho realizou seus procedimentos de acordo com as recomendações dispostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais, pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e com as resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária e demais leis vigentes que estabelecem normas práticas didático-científica de conduta de pesquisa experimental em animais. Este estudo foi encaminhado à Comissão de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) para a apreciação e emissão do parecer consubstanciado para condução das atividades. Sendo aprovado sob Parecer No. 017/2017.

3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (ORO)

O óleo essencial foi adquirido da empresa Florien – Flores e ervas comércio Farmacêutico Ltda. Localizada na estrada Vicente Bellini, 175, Piracicaba, São Paulo, Brasil. O óleo de alecrim foi extraído das partes aéreas, possuindo identificação botânica como *Rosmarinus officinalis* L. e lote: 056757.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO ORO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA (GC-EM).

A análise da composição química do ORO foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM). Foram realizadas em equipamento Shimadzu / GC 2010, auto-injetor Shimadzu / AOC-5000 e detector de massa (Shimadzu MS2010 Plus) com impacto eletrônico (70 eV) equipado com uma coluna de sílica fundida de DB-5MS (Agilent Advanced J & W; 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Os parâmetros foram os seguintes: relação de divisão 1:30; Hélio como gás de arraste (65 kPa); volume de injeção de 1,0 µl; Temperatura do injetor em 250 ° C; temperatura do detector, 250 ° C; temperatura inicial da coluna, 60 ° C durante 1 min; taxa de aquecimento, 3 °C min⁻¹ a 290 ° C. O tempo de análise total foi de 36,67 minutos. A identificação dos compostos foi realizada através do cálculo dos índices de retenção (RI) através da interpolação para os tempos de retenção com base em uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C9-C30) analisados nas mesmas condições. O padrão de fragmentação dos compostos também foi comparado com a biblioteca de espectro de massa contida no equipamento (NIST 5.0).

3.4 OBTENÇÃO DA GORDURA SATURADA DE *Cocos nucifera* (GSC)

A GSC foi obtida da Cocos Empire Company — Mercado Municipal de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil. O método de extração da GSC foi realizada por prensagem do endocarpo, seguida da adição de água (1:1 [w / v]) e separação da gordura por aquecimento 80°C, como descrito em Handayani et al., (2009).

3.5 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE ORO (NEORO)

A nanoemulsão foi preparada usando metodologia de baixo aporte de energia descrita previamente por Fernandes et al., (2013). Para uma massa final de 50 g, foi utilizado 90% de água, 5% de ORO e 5% de Tween 20. Inicialmente, uma fase foi preparada adicionando ORO e Tween 20, a mistura foi agitada usando um agitador

magnético (750 rpm) por 30 min. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min com agitação contínua por 60 min. A estabilidade da nanoemulsão foi avaliada no 0, 1º, e 7º dias após a preparação, utilizando análise macroscópica de cor, aspecto visual, separação de fases e sedimentação. O tamanho da partícula e índice de polidispersão foram avaliados segundo a metodologia previamente descrita por Borges et al., (2017). Durante este período, as nanoemulsões foram mantidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) em tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca.

3.6 ANIMAIS UTILIZADOS

Utilizou-se ratos *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, machos, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Animal (CEMIB) da Universidade de Campinas – UNICAMP. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno e alocados em estantes climatizadas com temperatura controlada (25 ± 2 °C) obedecendo ciclo claro/escuro de 12 horas, e recebendo água e ração controlada.

3.7 TRATAMENTO E INDUÇÃO DA DISLIPIDEMIA COM GORDURA SATURADA DE *Cocos nucifera* (GSC)

Os animais foram distribuídos randomicamente em cinco grupos ($n=7$ /grupo), e tratados por via oral de acordo com a metodologia de indução de dislipidemia descrita por Faria e Souza et al., (2017), as doses do ORO e NEORO utilizadas foram as descritas por Borges et al., (2017).

GRUPO 1 (ORO) - Animais tratados com 100 mg/kg/dia de ORO veiculado em 0.5 ml de tween 20 (4 %) durante 40 dias consecutivos;

GRUPO 2 (ORO+GSC) - Animais tratados com 100 mg/kg/dia de ORO veiculado em 0.5 ml de tween 20 (4 %) durante 40 dias, mais 2 ml de GSC a partir do vigésimo dia até o 40º dia ;

GRUPO 3 (VEI+GSC) - Animais tratados com 0.5 ml de solução de tween 20 (4 %) por 40 dias, mais 2 ml de GSC a partir do 20º dia até o 40º dia ;

GRUPO 4 (**NEORO+GSC**) - Animais tratados com 500 µg/kg/dia de Nanoemulsão de ORO, mais 2ml de GSC a partir do 20° dia até o 40° dia ;

GRUPO 5 (**SIN+GSC**) - Tratados com 20 mg/kg de Sinvastatina por 40 dias, mais 2 ml de GSC a partir do 20° dia até o 40° dia.

3.8 TRATAMENTO E INDUÇÃO DA DISLIPIDEMIA POR TRITON

Os animais foram distribuídos em cinco grupos (n= 6/grupo) e tratados durante 5 dias por via oral. No segundo dia foi induzida a dislipidemia por via intraperitoneal com Triton WR1339 (Tyloxapol, Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, EUA), 150 mg/kg dissolvidos em NaCl a 0,9% (SOUZA et al., 2017), com exceção do grupo “Normal”. Os grupos e tratamento foram delineados como se segue:

Grupo **Normal** - Tratado com 0.5 ml de solução de Tween 20 a 4 %.

Grupo **Triton** - Tratado com 0.5 ml de solução de Tween 20 a 4 %.

Grupo **ORO** – Tratado com 100 mg/kg de ORO veiculado em 0.5 ml de tween 20 a 4%.

Grupo **NEORO** - Tratado com 500 µg/kg de Nanoemulsão de ORO;

Grupo **SIN** - Tratado com Sinvastatina (10 mg/kg).

3.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Na indução da dislipidemia por GSC, no 41° dia, os animais foram submetidos ao jejum de 12h e anestesiados com tiopental sódico (Cristália- Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Brasil) na dose de 45 mg/kg por via intraperitoneal. Foram coletados 1,5 ml de sangue através do plexo ocular e as amostras foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm e realizado as análises de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol total e frações, triglicerídeos, uréia e creatinina. Na dislipidemia induzida com Triton, no 5° dia de tratamento, foi realizado a coleta de sangue pelo plexo ocular, o sangue foi centrifugado como descrito anteriormente e realizado as análises de triglicerídeos, colesterol total e

frações. Em todos os testes foram utilizados Kits LabTest, equipamento analisador bioquímico automático modelo BS 380 (Mindray Bio-medical Electronics Co., Ltd.).

3.10 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ATEROGÊNICO

Posteriormente às análises bioquímicas, foi calculado o Índice Aterogênico (IA) dos grupos com dislipidemia induzida por GSC, seguindo o método descrito por Dobiášová (2004), que consiste na aplicação da seguinte fórmula: $IA = (colesterol\ total - HDL-c)/HDL-c$. Este método avalia matematicamente as chances de um indivíduo desenvolver placas ateromatosas.

3.11 ANÁLISE DA ATEROSCLEROSE DA AORTA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Na indução da dislipidemia por GSC, no 41º dia os animais foram submetidos a eutanásia por overdose de Tiopental (100 mg/kg, ip, Cristália- Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Brasil) para remoção dos órgãos (Rins, baço, coração, fígado, pâncreas, pulmões e gordura abdominal) e em seguida pesados em balança analítica eletrônica (Model Bioprecisa FA-2104N). O isolamento da artéria aorta foi realizado a partir do arco aórtico até a bifurcação ilíaca. A região torácica foi dividida em seções de 0.5 cm e analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Hitachi Model-TM3030PLUS), para detectar processos aterogênicos seguindo a técnica descrita por Faria e Sousa et al., (2017).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

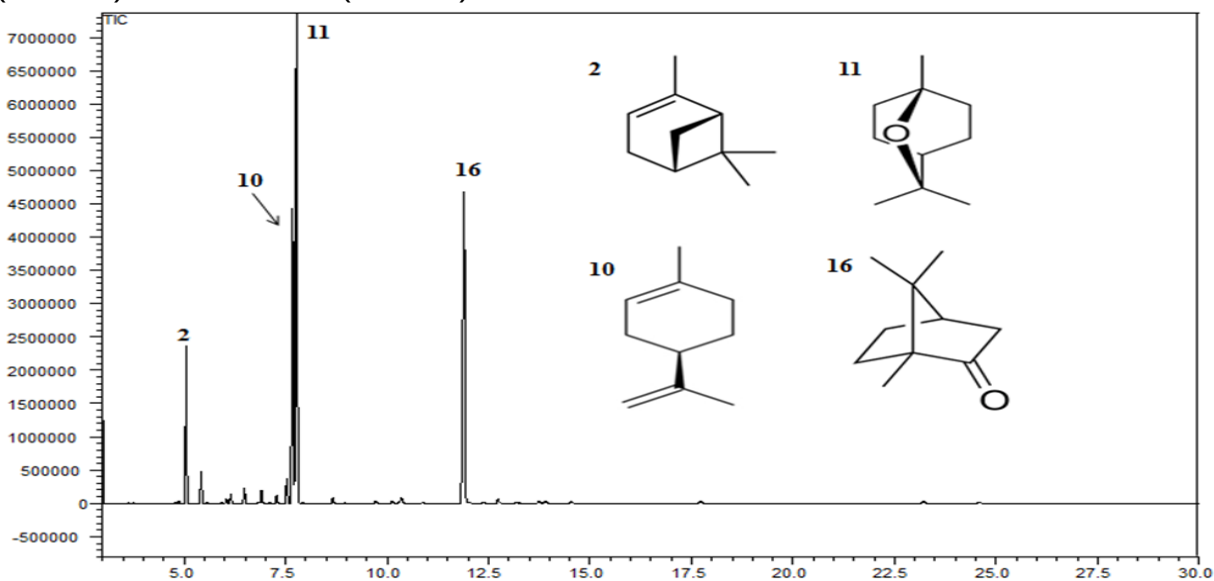
Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism (versão 7.0). Os valores dos resultados obtidos nos diversos experimentos foram apresentados como média e desvio padrão. Foram realizadas Análise de variância (ANOVA One-way) seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações. Resultados que apresentaram diferenças de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos entre os grupos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ORO POR CG-EM

A partir do perfil cromatográfico foi possível detectar 99,5% da composição de terpenos presentes no ORO, permitindo a identificação de 20 compostos com destaque para os monoterpenos majoritários α -pineno (8.13 %), Limoneno (21.99%), 1,8-cineol (33.70%) e cânfora (27.68%) (**Figura 5 e Tabela 1**).

Figura 5. Perfil cromatográfico obtido da análise do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (ORO) por cromatografia gasosa acoplada - espectrometria de massa (GC-EM), onde **2**- α -pineno (8.13%), **10** - Limoneno (21.99%), **11**- 1,8-cineol (33,70%) e **16** - cânfora (27,68%).



Na constituição química, o ORO possui majoritariamente compostos voláteis principalmente monoterpenos (FERNANDES et al., 2013), sendo suas caracterizações realizadas por metodologias cromatográficas e espectroscópicas, que permitem a identificação e quantificação da maioria dos componentes do óleo essencial (CARVALHO et al., 2016). Os resultados da constituição química obtido para o ORO, estão de acordo com os relatados por outros autores, pois em estudos

anteriores já foi demonstrado que o ORO possui como compostos majoritários α -pineno, cânfora, 1,8-cineol, Limoneno (FERNANDES et al., 2013, BORGES et al., 2017).

Tabela 1. Constituintes químicos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (ORO) determinado por análise em CG-EM.

Pico	TR (min)	Composto	(%)	IR Exp.*	IR lit.**
1	4.872	α -thujene	0.11	928	926
2	5.054	α -pineno	8.13	935	939
3	5.424	Canfeno	1.68	950	954
4	6.045	β -phellandrene	0.21	955	1031
5	6.152	β -pineno	0.58	979	979
6	6.482	β -mirceno	0.90	993	990
7	6.911	α -phellandrene	0.77	1007	1002
8	7.282	α -Terpineno	0.45	1018	1017
9	7.532	o-cimeno	1.65	1026	1026
10	7.674	Limoneno	21.99	1030	1031
11	7.773	1,8-cineol	33.70	1033	1033
12	8.666	γ - Terpineno	0.39	1059	1059
13	9.724	Terpinolene	0.20	1091	1088
14	10.128	β -linalol	0.16	1102	1098
15	10.350	***	0.44	1108	-
16	11.897	Cânfora	27.68	1147	1146
17	12.736	Borneol	0.32	1168	1169
18	13.739	α -terpineol	0.12	1193	1188
19	13.899	α -campholenal	0.20	1197	1125
20	14.532	Verbenona	0.18	1213	1205
21	23.220	β -cariofileno	0.14	1421	1427
Percentual Identificação			99.5		

*IR Exp: IR calculado, **IR lit: IR tabelado para o composto

4.2 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA NEORO

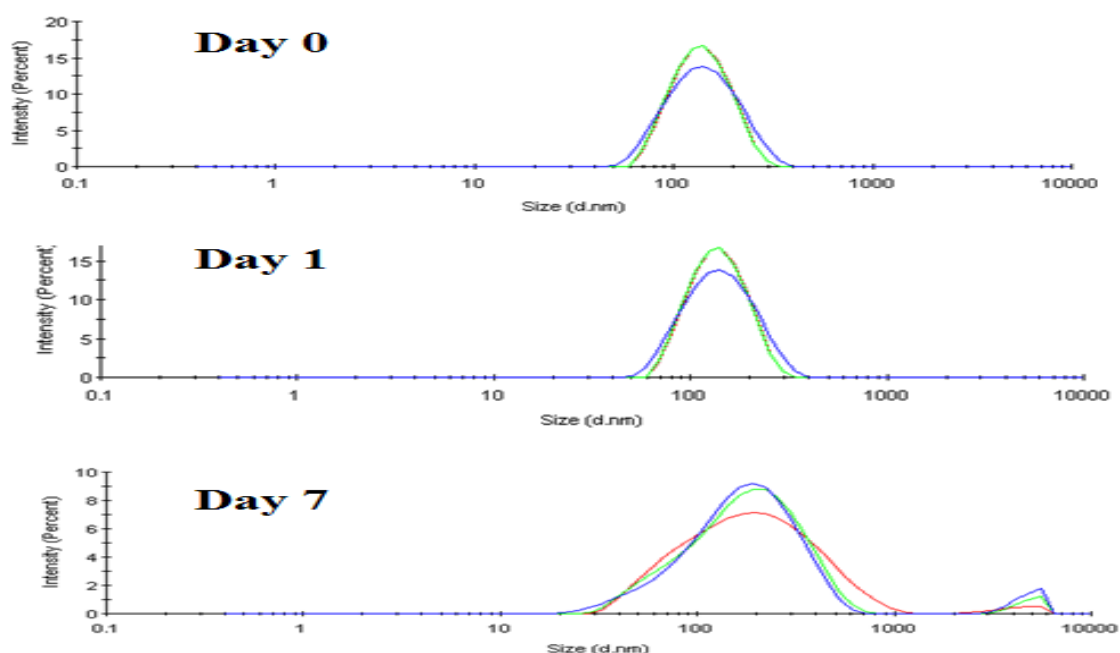
A nanoemulsão (NEORO) preparada a partir do ORO, apresentou coloração branca leitosa com reflexo levemente azulado, não se observou separação de fases ou algum parâmetro que indicasse instabilidade da formulação, como os descritos por Duarte et al., 2015. Quanto a avaliação da estabilidade da NEORO durante os 7 dias (**Tabela 2 e Figura 6**), foi observado que o diâmetro da gota média variou entre 129.1 ± 0.35 a 149.7 ± 0.3786 nm com índice de polidispersão variando entre 0.103 ± 0.023 e 0.376 ± 0.005 . O ORO foi utilizado para o desenvolvimento da nanoemulsão (NEORO), e os resultados demonstraram que a NEORO apresentou estabilidade com diâmetros das gotas abaixo de 150 nm e com uma distribuição monomodal do tamanho das gotas (SOLÉ et al., 2012). Estes resultados estão de

acordo com os obtidos por Duarte et al., 2015 , que desenvolveu nanoemulsão estável do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. com diâmetro de partículas abaixo de 200 nm e polidispersão de 0.281 ± 0.089 .

Tabela 2. Tamanho das partículas e o índice de polidispersão da NEORO avaliada em triplicata durante o período de 0, 1 e 7 dias. Resultados com média $\pm$ desvio padrão (SD).

	Day 0	Day 1	Day 7
Size (nm)	129.1	149.4	146.7
	129.5	149.5	147.9
	128.8	150.1	152.2
Média $\pm$ SD	129.1 ± 0.35	149.7 ± 0.3786	148.9 ± 2.892
Pdl	0,096	0,207	0,376
	0,085	0,187	0,381
	0,129	0,188	0,371
Média $\pm$ SD	0.103 ± 0.023	$0,194 \pm 0.011$	$0,376 \pm 0,005$

Figura 6. Distribuição das partículas da NEORO obtidos por Zetasizer, da nanoemulsão diluída com água para injeção (1:25) e avaliada em triplicata nos dias 0, 1 e 7 dias.

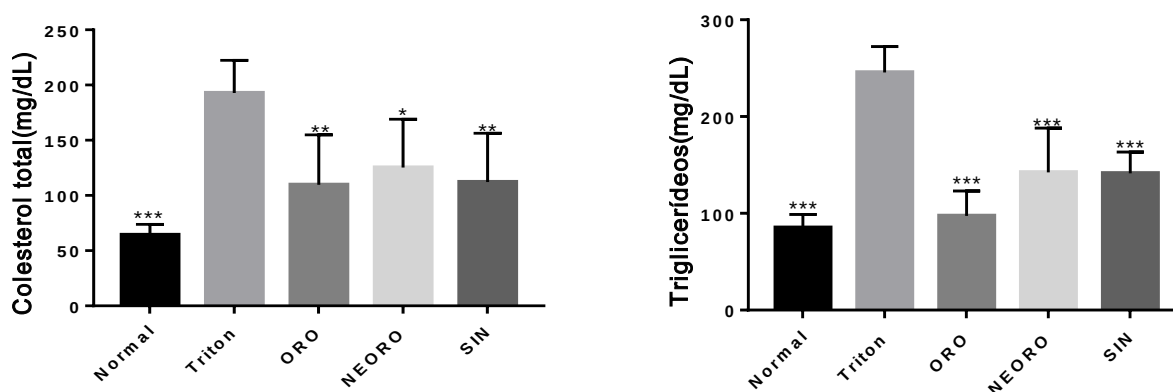


4.3 AÇÃO DO ORO E DA NEORO SOBRE O MODELO DE DISLIPIDEMIA INDUZIDO POR TRITON

Existem diversos modelos utilizando animais para induzir dislipidemia, dentre eles encontra-se o modelo clássico de indução por aplicação intraperitoneal de Triton (Tyloxapol). O Triton é um surfactante não aniônico que induz dislipidemia em animais por mecanismos de ações envolvendo a sua capacidade de inibir a enzima lipoproteína lipase (LPL), responsável pela hidrólise dos triglicerídeos presentes nas lipoproteínas plasmáticas, bem como estimula a enzima hidroximetil glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima intracelular chave para a síntese de colesterol hepático. Desta forma, há um aumento de triglicerídeos (TG) e biossíntese do colesterol (CT) com consequente aumento dos lipídeos plasmáticos (BERTGES et al., 2011, SOUZA et al., 2017).

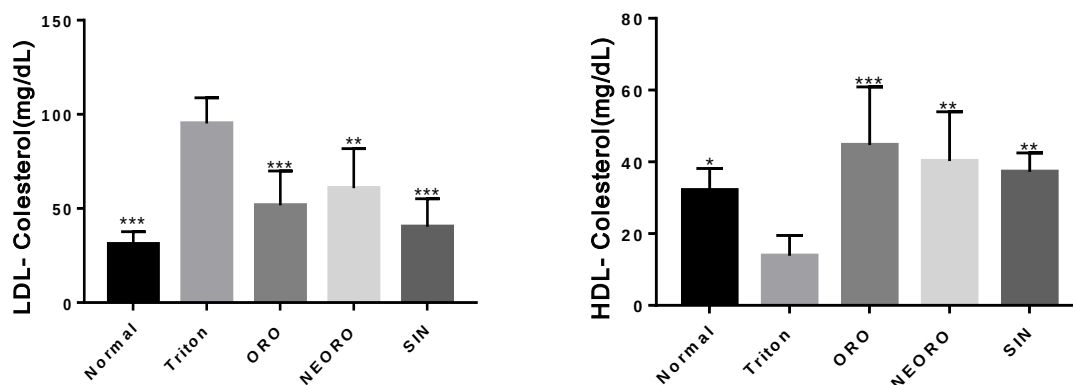
O modelo de indução de dislipidemia por triton foi capaz de aumentar significativamente os níveis de TG (245.7 ± 26.6 mg/dL) e CT (192.8 ± 29.64 mg/dL) em comparação ao grupo Normal (**Figura 7**), observou-se que o grupo tratado com ORO na dose de 100 mg/kg apresentou redução significativa de 68,3 % nos níveis plasmáticos de CT (109.66 ± 45.25 mg/dl, $p < 0,01$) e de 94,8 % nos níveis de TG (97.33 ± 25.82 mg/dl, $p < 0,001$). No grupo tratado com NEORO na dose 500 µg/kg observou-se redução de 55.3 % nos valores de CT de (125.25 ± 43.81 mg/dl, $p < 0,05$) e de 66,8% nos níveis de TG (142.22 ± 45.93 mg/dl. $p < 0,001$). O grupo controle de animais tratados com SIN também apresentou redução significativa dos níveis plasmáticos de TG e CT quando comparado com grupo Triton, com Percentuais de 67.3 % (141.3 ± 22.10 mg/dl) e 65.9% (112.25 ± 44.19 mg/dl) respectivamente.

Figura 7. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* (NEORO) sobre os níveis de colesterol total e triglicerídeos em ratos *Wistar* com dislipidemia induzida por Triton. As Barras representam a média $\pm$ DP (n = 7 / grupo), com * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001) representando resultados estatisticamente significativos em comparação com Grupo Triton. Teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.



Na avaliação dos níveis de LDL e HDL (**Figura 8**), foi possível observar que o grupo Triton apresentou aumento significativo no valor de LDL (95.2 ± 13.6 mg/dL) e redução de HDL (13.8 ± 5.6 mg/dL). Por outro lado, os grupos ORO e NEORO foram capazes de reduzir significativamente os níveis de LDL com percentuais de 67.7% (51.6 ± 18.3 mg/dL) e 53.9 % (60.7 ± 21.03 mg/dL) respectivamente. Nos grupos tratados com ORO e NEORO foi possível observar aumento significativo nos níveis de HDL em comparação com grupo Triton, com percentuais de 109.5% (44.66 ± 16.2 mg / dL) e 90.4 % (40.2 ± 13.7 mg/dL) respectivamente. O grupo SIN também foi capaz de reduzir significativamente (p < 0,001) os níveis de LDL em 84.2 % (40.3 ± 14.9 mg/dL) e aumentou significativamente (p < 0,01) os níveis de HDL em 76.2 % (37.2 ± 5.33 mg/dL).

Figura 8. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* (NEORO) sobre os níveis de LDL e HDL colesterol em ratos *Wistar* com dislipidemia induzida por Triton. As Barras representam a média $\pm$ DP (n = 7 / grupo), com * (p <0,05) , ** (p <0,01) e *** (p <0,001) representando resultados estatisticamente significativos em comparação com Grupo Triton. Teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

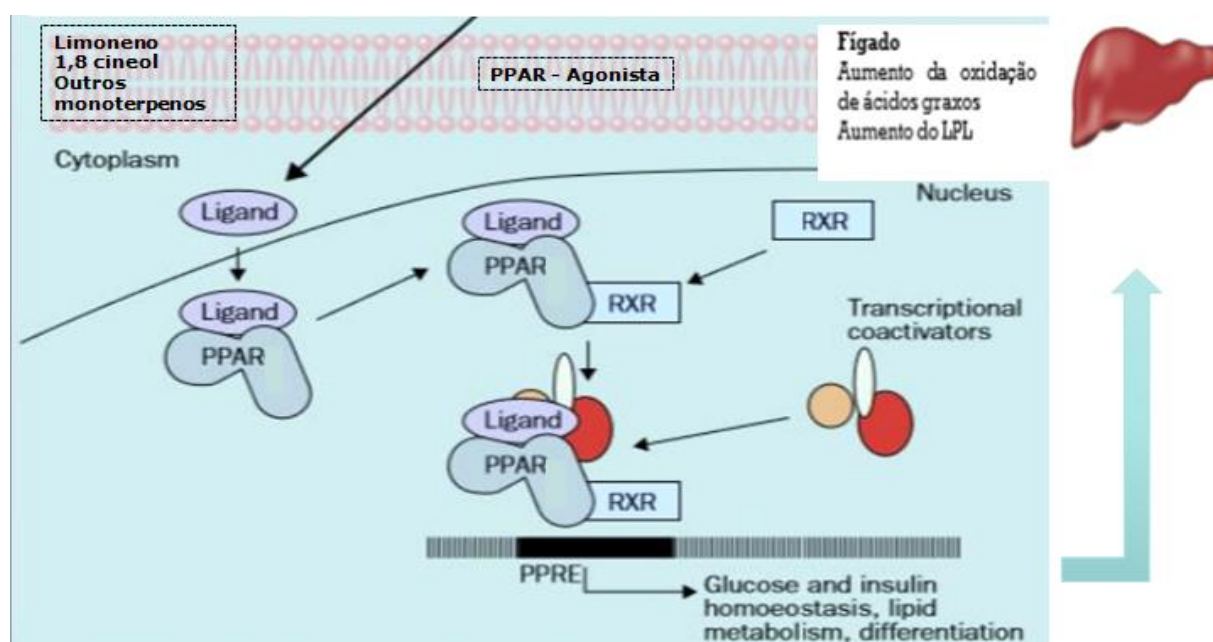


Nos grupos com dislipidemia induzida por Triton e tratado com ORO (100 mg/kg), NEORO (500 μ g/kg) e SIN (10 mg/kg), observou-se redução dos níveis de lipídeos, assim como no estudo conduzido por Lee et al., 2018, que demonstrou o potencial de óleo essencial de *Citrus lemon* na redução do perfil lipídico. Além disso, os resultados dos tratamentos com ORO e NEORO foram capazes de melhorar o perfil das lipoproteínas aumentando significativamente a concentração de HDL e reduzindo os níveis de LDL nos animais.

Pode-se sugerir que estes efeitos na redução da hipercolesteromia, hipertrigliceridemia e melhora nos níveis das lipoproteínas estão relacionadas com limoneno, 1,8-cineol e outros monoterpenos, assim como as estatinas, agem inibindo HMG-CoA redutase, enzima fundamental na biossíntese do colesterol, moderando a sua produção e consequente os níveis plasmáticos circulantes no organismo. Este efeito também pode ser atribuído em parte aos mecanismos complementares, uma vez que estudos demonstram que o limoneno e 1,8-cineol são capazes de atuar na ativação Receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) (JING et al., 2013). Os PPARs desempenham um papel fundamental na melhora da dislipidemia através da regulação do metabolismo dos lipídeos e das lipoproteínas, isso tem sido demonstrado através da ativação de PPAR com agonistas, como fenofibrato que pode reduzir os níveis elevados de lipídeos na circulação e aumentar

os níveis de HDL (YOON et al., 2009). Ao se ligar com seu agonista, os PPARs formam heterodímeros com Receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR) no núcleo, onde se ligam à sequência específica de elementos responsivos (PPER) do PPAR para regular a transcrição de genes alvos, responsáveis por controlar o metabolismo lipídico no fígado (**Figura 9**).

Figura 9: Ativação de Receptores ativados por proliferadores peroxissomais. Linoneno, 1,8-cineol e outros monoterpenos atuam como agonistas de PPAR, para dar início à transcrição de genes responsáveis pela regulação do metabolismo lipídico. Adaptado de Ferreira 2015.



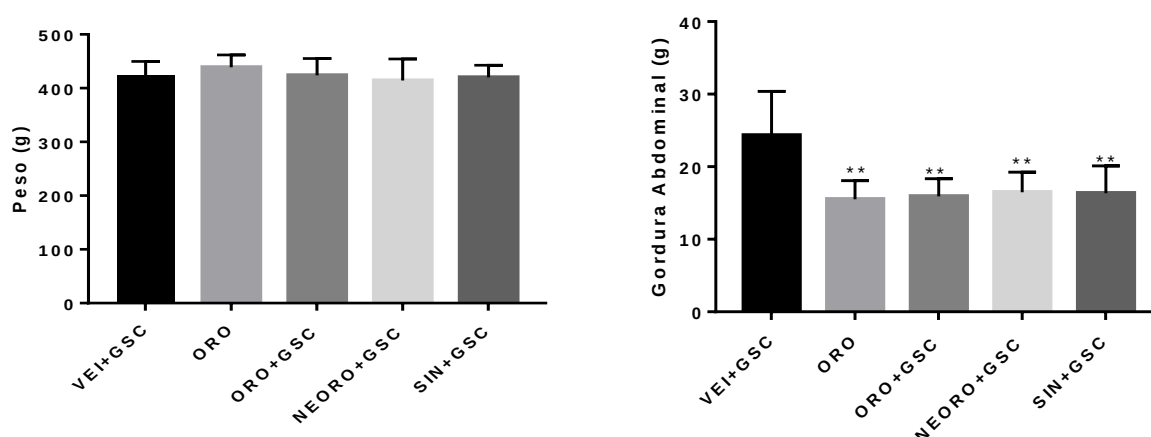
4.4 AÇÃO DO ORO E DA NEORO SOBRE MODELO DE DISLIPIDEMIA INDUZIDO POR GSC

Uma dieta com excesso de lipídios contribui para o aumento de ácidos graxos livres na circulação (AGL), e o aumento plasmático de ácidos graxos saturados (AGS) é um fator importante na instalação da dislipidemia, aterogênese e doenças cardiovasculares. O Modelo de dislipidemia induzida pela administração oral de GSC induz ao aumento dos níveis de lipídeos no sangue devido ao alto teor de gordura saturada, assim pode contribuir para hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia bem

como aumento de LDL e acúmulo de gordura corporal na região abdominal (SOUZA et al., 2017).

Na avaliação do peso corporal e da gordura abdominal dos animais com dislipidemia induzida por GSC (**Figura 10**), foi possível observar que não houve diferença estatística significativa entre o peso corporal dos grupos, no entanto quando realizou-se a mensuração da gordura abdominal, observou-se que o grupo VEI+GSC apresentou valor elevado em relação aos demais grupos. Os grupos tratados com ORO, NEORO, SIN, nas doses de 100 mg/kg, 500 µg/kg, 10 mg/kg, respectivamente, foram capazes de reduzir o acúmulo de gordura abdominal de forma significativa ($p < 0,01$) comparados com o grupo VEI+GSC. Na avaliação do peso dos órgãos internos (**Tabela 3**), também não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos.

Figura 10. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão (NEORO) de *Rosmarinus officinalis* sobre peso corporal e gordura abdominal de ratos *Wistar* com dislipidemia induzida por GSC. As Barras representam a média $\pm$ DP ($n = 7$ / grupo), com **($p < 0,01$) representando resultados estatisticamente significativos em comparação ao Grupo VEI+GSC. Teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.



Em estudo realizado por Faria e Souza et al., (2017) demonstraram aumento de gordura abdominal no grupo controle não tratado e com dislipidemia induzida por GSC, assim como observado no grupo VEI+GSC, fato que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo. Nos grupos tratados com ORO e NEORO não se

observou aumento de gordura abdominal, sugerindo envolvimento desses tratamentos na redução do acúmulo de gordura nessa região, possivelmente pela ação dos componentes presentes no ORO sobre a adipogênese. O acúmulo de gordura corporal é decorrente de desequilíbrio entre processos lipogênicos e lipolíticos que causam o armazenamento excessivo de gordura na forma de TG principalmente no fígado e tecido adiposo abdominal e predispõe a pessoa ao diabetes e doenças cardiovasculares (DCVs) (LANGIN et al., 2006; HASSANI et al., 2016).

Tabela 3. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão (NEORO) de *Rosmarinus officinalis* sobre o peso dos órgãos dos ratos *Wistar* com dislipidemia induzida por GSC.

Órgãos	VEI+GSC	ORO	ORO+GSC	NEORO+GSC	SIN+GSC
Fígado	17.14±1.11	16.41±0.28	15.90±1.61	16.77±2.38	16.29±1.58
Rim	1.63±0.10	1.83±0.17	1.62±0.14	1.83±0.19	1.64±0.14
Pâncreas	1.15±0.32	1.37±0.33	1.22±0.17	1.48±0.19	1.50±0.31
Coração	1.37±0.12	1.54±0.20	1.42±0.11	1.49±0.15	1.32±0.07
Baço	0.99±0.05	1.11±0.15	0.94±0.09	1.11±0.06	1.08±0.11
Pulmões	1.98±0.17	2.04±0.16	1.93±0.16	2.12±0.12	1.94±0.21

Valores representam a média ± DP (n = 7 / grupo), Teste one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Com relação à avaliação dos parâmetros bioquímicos (**Tabela 4**) dos animais com dislipidemia induzida por GSC, observou-se que não houve diferença significativa nos níveis de transaminases (AST e ALT) entre os grupos. Quanto aos níveis de colesterol total (CT), foi possível observar aumento no grupo VEI+GSC (116.57±7.69 mg/dl), já os grupos tratados apresentaram redução extremamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo VEI+GSC, com percentuais de 36,1% (ORO+GSC), 42,5% (NEORO+GSC), e 50,1% (SIN+GSC). Nos valores de HDL não houve diferença significativa entre os grupos, demonstrando que os tratamentos não apresentaram nenhuma influência sobre esse parâmetro, no entanto, para os valores de LDL foi observado aumento no grupo VEI+GSC (44.71±11.14 mg/dl) e nos grupos tratados com ORO e NEORO observou-se redução significativa ($p < 0,001$) com percentuais de 64,3% (15.71 ± 8.88 mg/dl) e 61,7% 16.85±8.06 mg/dl

respectivamente. O grupo SIN+GSC também apresentou redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de LDL com percentual de 83,9 % (7.10 ± 3.11 mg/dl).

Na avaliação dos níveis de triglicerídeos (TG), foi observado que grupo VEI+GSC apresentou aumento significativo (226.82 ± 36.94 mg/dl), já os grupos tratados com ORO+GSC e NEORO+GSC foram capazes de reduzir significativamente, com percentuais de 38,4% (139.28 ± 29.73 mg/dl, $p < 0,01$) e 41.9% (131.28 ± 40.58 mg/dl, $p < 0,001$) respectivamente. O grupo tratado com SIN+GSC apesar de se observar redução significativa ($p < 0,01$), demonstrou percentual de 31.9 %, sendo inferior aos demais grupos tratados. Em relação aos níveis de creatinina, glicose e uréia, não houve diferença significativa entre os grupos.

Vale ressaltar que observou-se uma melhora significativa no perfil lipídico dos animais no grupo tratado com NEORO, mesmo utilizando uma dose 200 vezes menor que a dose aplicada ao ORO.

Quanto ao índice aterogênico (IA), foi recentemente proposto como um marcador do potencial aterogênico do plasma é definido como o algoritmo da razão entre os níveis de colesterol total no organismo e o colesterol HDL. Foi observado nos resultados deste estudo que os grupos com dislipidemia e tratado com ORO na dose de 100 mg/kg e NEORO na dose de 500 µg/kg, assim como os grupos tratados com SIN na dose de 20 mg/kg apresentaram redução significativa do IA (**Tabela 4**), demonstrando uma menor probabilidade de desenvolvimento de doença aterosclerótica. Em estudos envolvendo cálculos do IA, foi demonstrado que quanto menor o IA, menor a capacidade de eventos cardiovasculares por processos aterogênicos (DOBIÁŠOVÁ, 2004; TAN et al., 2004).

Tabela 4. Efeito dos tratamentos com óleo essencial (ORO) e nanoemulsão (NEORO) de *Rosmarinus officinalis* L. sobre parâmetros bioquímicos e Índice Aterogênico de ratos *Wistar* com dislipidemia induzida por GSC.

Parâmetro	VEI+GSC	ORO	ORO+GSC	NEORO+GSC	SIN+GSC
AST (U/dL)	87.28±12.97	85.08±11.93	70.0±9.52	90.28±23.76	78.71±9.08
ALT (U/dL)	43.28±8.47	28.55±4.61	33.3±13.06	35.71±6.79	34.2±3.91
CT (mg/dL)	116.57±7.69	59.1±8.20#	74.28±9.72#	66.71±15.61#	58.14±6.79#
HDL (mg/dL)	31.0±10.66	34.16±9.84	31.14±6.56	26.28±10.15	32.5±5.32
LDL (mg/dL)	44.71±11.14	9.5±6.18#	15.71±8.88#	16.85±8.06#	7.10±3.11#
Creatinina (mg/dL)	0.22±0.04	0.27±0.03	0.24±0.03	0.20±0.02	0.20±0.01
Glicose (mg/dL)	134.85±18.67	131.88±12.42	149.57±21.35	144.57±22.95	144.1±15.08
TG (mg/dL)	226.82±36.94	113.25±28.38#	139.28±29.73**	131.28±40.58#	154.2±49.62**
Úreia (mg/dL)	38.71±3.14	42.18±6.32	37.28±5.73	40.71±6.71	40.14±4.33
IA	2.74±1.11	0.73±0.30#	1.39±0.96*	1.56±0.88*	0.81±0.45#

Valores representam a média ± DP (n = 7 / grupo), com ** (p <0,01) e # (p <0,001) representando resultados estatisticamente significativos em comparação ao Grupo VEI+GSC. Teste one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Em estudo realizado por Selmi et al., (2017) avaliando a ação do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em ratos diabéticos, foi demonstrado que o ORO foi capaz de reduzir significativamente os níveis de CT, TG e LDL, e não apresentou efeito sobre os níveis de HDL. Esses resultados corroboram com os resultados deste estudo, pois nos grupos tratados com ORO e NEORO, foi observado redução dos níveis de CT, TG e LDL, além de não apresentar influencia na redução de HDL. Outro estudo utilizando óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. contendo principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, demonstrou redução sobre o perfil lipídico principalmente sobre os níveis de CT, TG e LDL e também estão relacionados com a ação dos compostos majoritários presentes no ORO como limoneno, 1,8-cineol, α -pineno e cânfora que atuam sobre a biossíntese do colesterol inibindo a enzima HMG-CoA redutase e como agonistas para PPARs (SUANARUNSAT et al., 2010; DICKMANN et al., 2012).

4.4.1 Ação do ORO e da NEORO sobre a aterosclerose

Na determinação da formação de placas de ateroma na artéria aorta analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), constatou-se a formação de processos aterogênicos no grupo tratado com VEI+GSC (**Figura 11 e 12**). Nas análises dos grupos tratados com ORO, NEORO e SIN foi observado ausência de formação de processos aterogênicos no endotélio vascular.

Figura 11: Imagem por Microscopia Elettronica de Varredura (MEV) de corte transversal da aorta torácica. **1)** ORO; **2)** ORO + GSC; **3)** VEI+ GSC; **4)** NEORO + GSC; **5)** SIN + GSC. Seta branca indica a formação da placa de ateroma no endotélio vascular da artéria aorta.

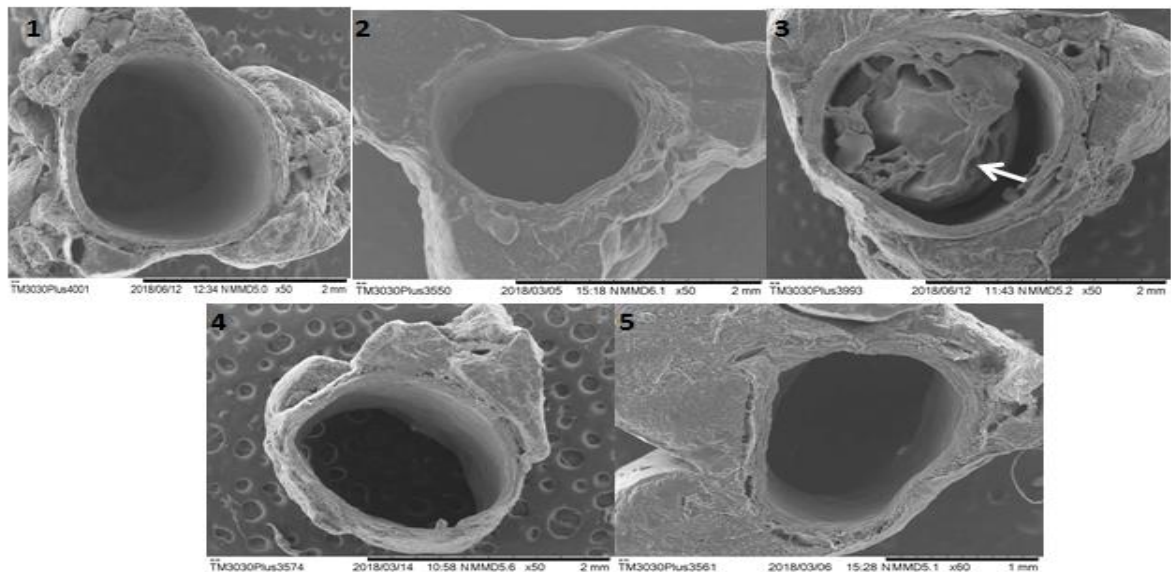
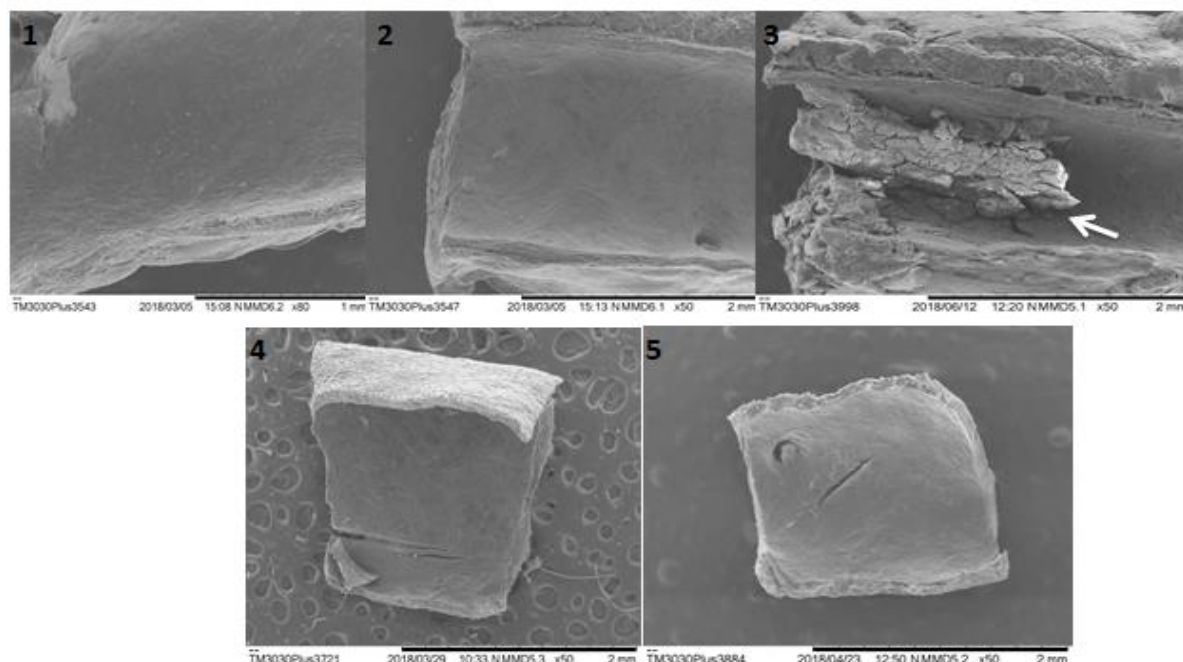


Figura 12: Imagem por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de corte longitudinal da aorta torácica. **1)** ORO; **2)** ORO + GSC; **3)** VEI+ GSC; **4)** NEORO + GSC; **5)** SIN + GSC. Seta branca indica a formação da placa de ateroma no endotélio vascular da artéria aorta.

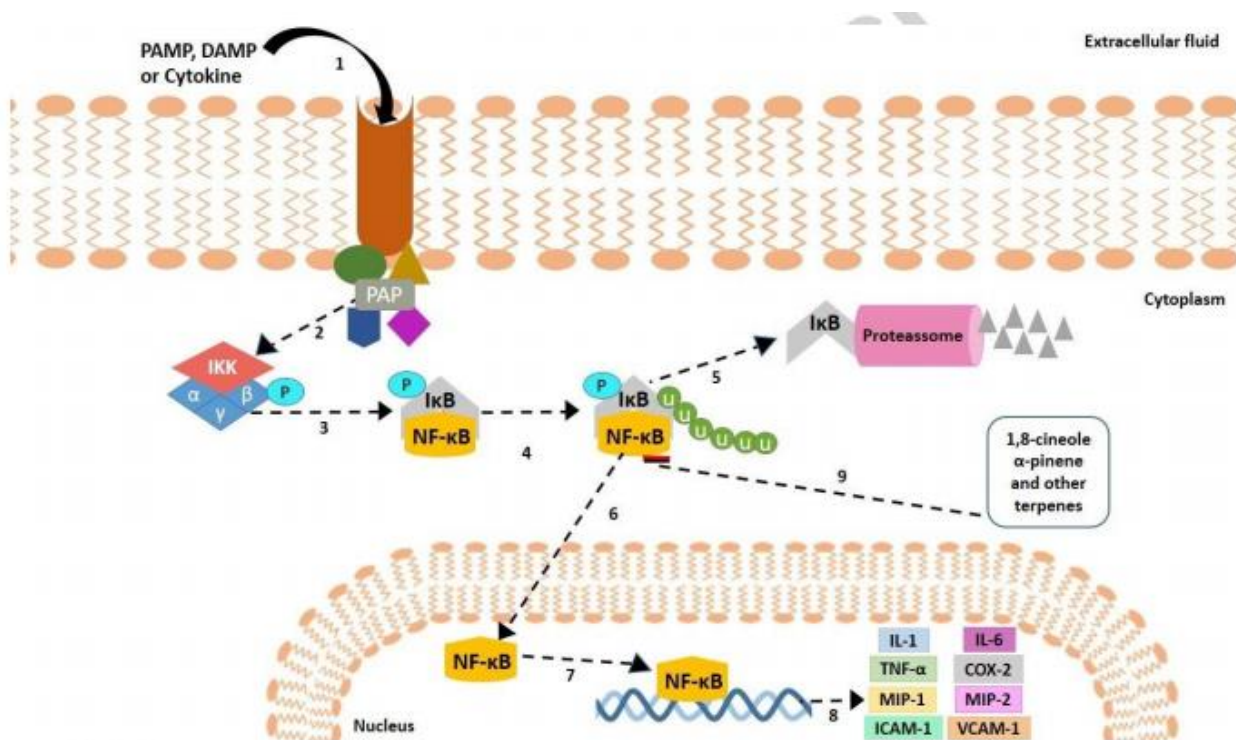


Estudos evidenciam que a melhora no perfil lipídico, principalmente a redução da hipercolesterolemia está associada à redução da incidência da aterosclerose (RIBEIRO et al., 2008). A formação das placas ateroscleróticas começa com a agressão contra o endotélio vascular devido ao aumento nas concentrações plasmáticas de LDL, que translocam-se para a camada íntima das artérias e sofrem oxidação em ambiente pró-oxidante desencadeando inflamação e recrutamento de células imunitárias, particularmente monócitos (FARIA E SOUZA et al., 2017). A migração de células imunes para o espaço subendotelial promove a diferenciação em macrófagos e a captura de LDL-oxidado, originando células preenchidas de lipídeos chamadas de células espumosas, que constituem o principal componente da matriz gordurosa do ateroma (ARAÚJO et al., 2007; BLASI et al., 2008).

Em estudos sobre aterosclerose em animais, é demonstrado que dieta rica em ácidos graxos saturados contribui para acelerar a formação da aterogênese e que principalmente a artéria aorta na região abdominal é uma região propensa a formação de placas (JACKSON et al., 2007; FARIA E SOUZA et al., 2017). Estes resultados estão de acordo com os observados neste estudo.

Na avaliação de processos aterogênicos na artéria aorta, foi demonstrado que o ORO possivelmente possui propriedades antiaterogênicas. Esse efeito é evidenciado pela ausência de formação de placas ateromatosas no endotélio vascular dos grupos tratados com ORO, NEORO e SIN. Essa propriedade antiaterogênica pode ser explicada pela capacidade do ORO em reduzir significativamente os níveis de CT, TG e principalmente LDL, lipoproteína chave na aterogênese. Borges et al., (2017) demonstrou a ação anti-inflamatória dos compostos químicos presentes no óleo essencial e na nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* L., esse efeito pode contribuir na inibição inflamatória da cascata inicial principalmente pela via de sinalização de NF-KB, que estimula migração de células inflamatórias para a região subendotelial. Estudos atribuem seu efeito anti-inflamatório principalmente pela presença de 1,8-cineol, cânfora e α -pineno, que atuam impedindo a formação de mediadores pró-inflamatórios impedindo o NF-KB de se translocar para núcleo e consequentemente inibindo a migração de monócitos para o espaço subendotelial (**Figura 13**).

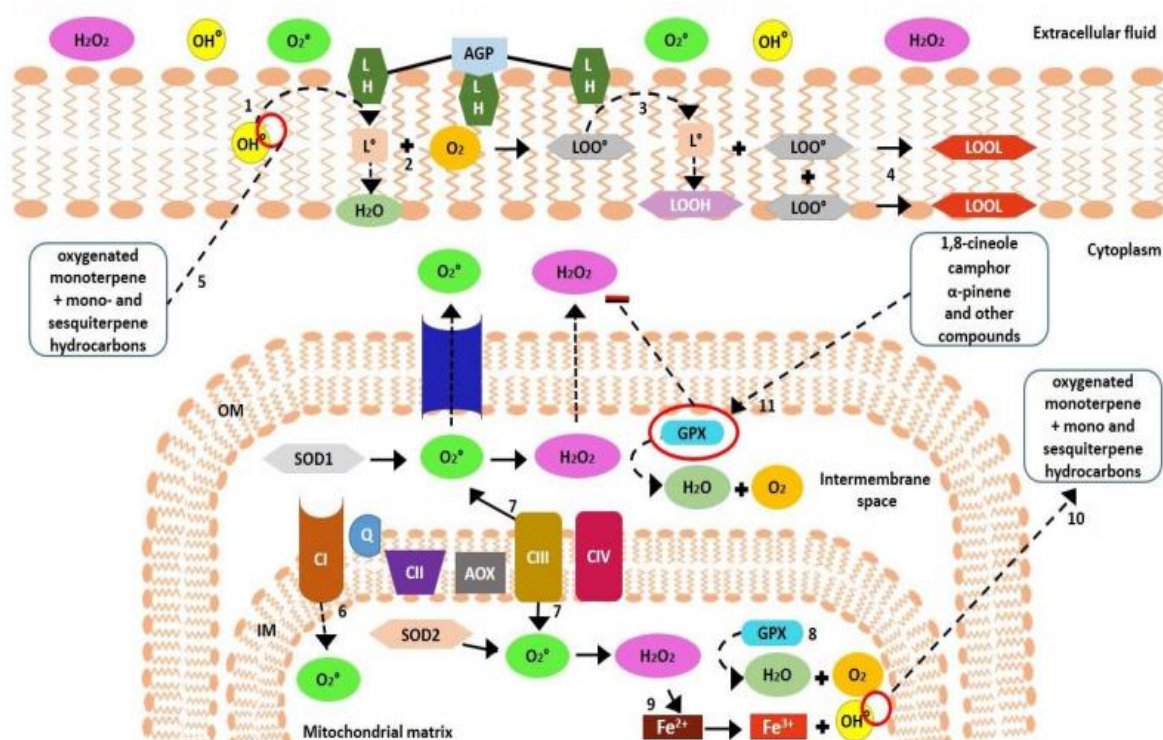
FIGURA 13: Mecanismo de sinalização NF- κ B. 1- O padrão molecular associado ao patógeno (PAMP), associado a danos padrão molecular (DAMP) ou receptor de citocina é ativado por sua molécula agonista correspondente; 2 - O estímulo de ativação do receptor é transduzido pela proteína adaptadora proximal acoplada (PAP), que por sua vez ativa a I κ B-quinase (IKK) por fosforilação. 3 - A IKK ativada fosforila o inibidor de κ B (I κ B), limitado ao fator nuclear- κ B (NF- κ B); 4 - A fosforilação do I κ B sinaliza sua consequente poliubiquitinação (u); 5 - A poliubiquitinação I κ B causa sua degradação pelo proteassoma; 6 - Sem o seu inibidor, o NF- κ B é capaz de translocar para o núcleo; 7 - No núcleo, o NF- κ B liga-se ao DNA, atuando como fator de transcrição de vários mediadores pró-inflamatórios; 8 - Os produtos de transcrição de NF- κ B incluem, entre outros, IL-1, IL-6, TNF- α , COX-2, MIP-1, MIP-2, ICAM-1 e VCAM-1; 9 - O 1,8-cineol, α -pineno e outros terpenos, agem impedindo a translocação de NF- κ B para o núcleo e consequente formação de mediadores pró-inflamatórios que agem na patogênese da aterosclerose. Adaptado de Borges et al., 2018.



Outro efeito farmacológico importante do ORO que pode contribuir na inibição da formação da aterogênese é o seu potencial antioxidante que possivelmente pode atuar na inibição da via de oxidação do LDL evitando sua captura pelos macrófagos e assim impedindo a formação das células espumosas no endotélio (RASKOVIC et al., 2014). Produtos da peroxidação lipídica ocasionam alterações na membrana que levam à transtornos na permeabilidade, ocasionando a oxidação de LDL. 1,8-cineol,

cânfora e α -pineno e outros terpenos evitam a deterioração da membrana, aumentando os níveis de glutathione e outras enzimas antioxidantes, evitando assim a peroxidação lipídica e consequentemente a oxidação de LDL, fator primordial na patogênese da aterosclerose (**Figura 14**).

Figura 14: Mecanismo antioxidante dos componentes do ORO na peroxidação lipídica e formação de ROS. 1 - Hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) elimina um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPLH) da membrana celular, formando radical lipídico ($\text{L}^\bullet$) e água (H_2O); 2 - $\text{L}^\bullet$ reage com oxigênio (O_2) resultando em radical peroxila ($\text{LOO}^\bullet$); 3 - O $\text{LOO}^\bullet$ seqüestra outro hidrogênio do AGP-LH formando um novo radical $\text{L}^\bullet$ e hidroperóxido (LOOH); 4 - O $\text{L}^\bullet$ e o $\text{LOO}^\bullet$ formam o radical estável (LOOL), que também é formado por dois $\text{LOO}^\bullet$; 5 - Os compostos ORO (monoterpenos oxigenados e hidrocarbonetos mono- e sesquiterpênicos) têm a capacidade de neutralizar o $\text{OH}^\bullet$, evitando a deterioração da membrana; 6 - Na membrana interna (IM) do complexo I (CI) das mitocôndrias libera elétrons que geram radicais superóxido ($\text{O}_2^\bullet$) para as regiões mitocondriais matriz; 7 - Complexo III (CIII) libera elétrons gerando $\text{O}_2^\bullet$ na matriz e intermembrana mitocondrial espaço, o $\text{O}_2^\bullet$ sofre superóxido dismutase 1 (SOD1) no espaço intermembrana e superóxido dismutase 2 (SOD2) na matriz formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2); 8 - A enzima glutathione peroxidase (GPX) reduz o H_2O_2 para H_2O e O_2 ; 9 - O íon Fe^{2+} reage com o H_2O_2 para formar Fe^{3+} e $\text{OH}^\bullet$ (reação de Fenton); 10 - Os compostos ORO (monoterpenos oxigenados e hidrocarbonetos mono- e sesquiterpênicos) reagem com $\text{OH}^\bullet$, evitando a peroxidação lipídica e consequentemente a oxidação de LDL; 11. Compostos ORO (1,8-cineol, cânfora, α -pineno e outros componentes) aumentam a quantidade de glutathione, resultando na diminuição dos níveis de H_2O_2 pela ação de GPX. (Borges et al., 2018)



5 CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Tradicionalmente plantas medicinais são utilizadas como alternativa terapêutica no tratamento de diversas patologias. Desta forma, várias espécies vêm sendo estudadas para avaliação de suas atividades biológicas. O *Rosmarinus officinalis* L. é conhecido por apresentar muitas propriedades benéficas aos usuários. Diversos estudos tem demonstrado o potencial farmacológico do seu óleo essencial, com principalmente propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi demonstrado que o ORO e a NEORO apresentaram propriedades capazes de reduzir de forma significativa os níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL nos modelos de indução de dislipidemia por Triton e por GSC. Além disso, observou-se a eficiência da NEORO na redução do perfil lipídico com uma dose 200 vezes inferior à dose do ORO, demonstrando a otimização da ação antihipercolesterolêmica e antihipertrigliceridêmica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em nanoformulação. Nesse sentido, também foi demonstrado que tanto o ORO quanto a NEORO apresentaram propriedades antiaterogênicas, inibindo a formação de placas de ateromas na artéria aorta analisadas por MEV. Essa ação antiaterogênica em parte se deve aos mecanismos farmacológicos já descritos para os monoterpenos majoritários identificados no ORO, principalmente a ação redutora dos níveis de colesterol LDL, antioxidante e anti-inflamatória.

Sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos para melhor elucidação dos mecanismos de ação envolvidos nas reações descritas.

REFERÊNCIAS

ABDELHALIM, A; KARIM, N; CHEBIB, M; ABURJAI, T; KHAN, I; JOHNSTON, G. A; HANRAHAN, J. Antidepressant, anxiolytic and antinociceptive activities of constituents from *Rosmarinus officinalis*. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2015.

ACEVEDO-FANI, A; SOLIVA-FORTUNY, R; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanoemulsions as edible coatings. **Current Opinion in Food Science**, v. 15, p. 43-49, 2017.

AFFHOLDER, M.C; PRUDENT, P; MASOTTI, V; COULOMB, B; RABIER, J. B. NGUYEN-THE, I. Laffont-Schwob. Transfer of metals and metalloids from soil to shoots in wild rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growing on a former lead smelter site: Human exposure risk. **Science of the Total Environment**, v. 454, p. 219-229, 2013.

AFONSO, M.S.; MANCINI, J.F.; SANTANA, L.S. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.**, v. 35, n. 1, 2010.

AFONSO, M. S; SILVA, A. M; CARVALHO, E. B; RIVELLI, D. P; BARROS, S. B; ROGERO, M. M; MANCINI-FILHO, J. Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Nutrition & metabolism**, v. 10, n. 1, p. 19, 2013.

ALMA, M. H., MAVI, A., YILDIRIM, A., DIGRAK, M; HIRATA, T.. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 12, p. 1725-1729, 2003.

ALMELA, L., SÁNCHEZ-MUÑOZ, B., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., ROCA, M., & RABE, V. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography**. v. 1120, n. 1, p. 221-229, 2006.

AL-SEREITI, M. R., ABU-AMER, K. M., & SEN, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, p.124–130.1999

ALIZADEH-NAVAEI, R., ROOZBEH, F., SARAVI, M., POURAMIR, M., JALALI, F., & MOGHADAMNIA, A. A.. Investigation of the effect of ginger on the lipid levels. A double blind controlled clinical trial. **Saudi Med J**, v. 29, n. 9, p. 1280-4, 2008.

AMARAL, G. P., DOBRACHINSKI, F., DE CARVALHO, N. R., BARCELOS, R. P., DA SILVA, M. H., LUGOKENSKI, T. H.; SOARES, F. A. A. Multiple mechanistic action of *Rosmarinus officinalis* L. extract against ethanol effects in an acute model of intestinal damage. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 454-459, 2018.

AMAR, Y; MEDDAH, B; BONACORSI, I; COSTA, G., PEZZINO, G; SAIJA, A; MEDDAH, A. T. Phytochemicals, antioxidant and antiproliferative properties of *Rosmarinus officinalis* L. on U937 and CaCo-2 cells. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 16, n. 1, p. 315, 2017.

AOUADI, D., Luciano, G., Vasta, V., Nasri, S., Brogna, D. M., Abidi, S; Salem, H. B. The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of *Artemisia herba alba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Meat science**, v. 97, n. 2, p. 237-243, 2014.

ARAUJO, A.L. Correlação entre dieta lipídica poliinsaturada e aterogenese. **Rev Angiol Cirur Vasc**; 5:15–22, 2007.

ARSHADI, A., TALEBI, E; TAHERY, E. Effect of barley and oats on high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides in rats. **Journal of Jahrom University of Medical Sciences**, v. 12, n. 2, 2014.

ASGARY S., SAHEBKAR, A., AFSHANI, M. R., KESHVARI, M., HAGHJOOYJAVANMARD, S; RAFIEIAN-KOPAEI, M.. Clinical evaluation of blood pressure lowering, endothelial function improving, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of pomegranate juice in hypertensive subjects. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 2, p. 193-199, 2014.

BEGUM, A; SANDHYA, S; ALI, S. S; VINOD, K. R., REDDY, S; BANJI, D. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria**, v. 12, n. 1, 2013.

BENINCÁ, J. P; DALMARCO,J.B.;PIZZOLATTI,M.G.;FRÖDE,T.S. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 468-475, 2011.

BEZERRA, A.C.; SAMPAIO, H. A. de C.; MELO, M. L. P. de.; MAIA, C. S. C.; ALMEIDA, P. C. de. Associação entre Dislipidemia e excesso de peso de crianças e adolescentes atendidos em uma Unidade de Saúde. **Revista Baiana de Saúde Publica**. V.35, n.2, p. 348 – 362 abr./ jun.2011.

BERNARDES, W. A; Lucarini, R; Tozatti, M. G; Flauzino, L. G. B; Souza, M. G; Turatti, I. C; Cunha, W. R. Antibacterial activity of the essential oil from *rosmarinus offi cinalis* and its major components against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, n. 9-10, p. 588-593, 2010.

BEVILACQUA, M. R. et al. Hiperlipidemias e fatores dietéticos: estudo transversal entre nipobrasileiros. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 4, p. 547- 558, 2006.

BERTGES, L.C; MOURÃO JR, C.A; SOUZA, J.B; CARDOSO, V.A.C. Hyperlipidemia induced by Triton WR1339 (Tyloxapol) in Wistar rats, *Rev. Bras. Cien. Med. Saúde* (1) 29–31, 2011.

BLASI, C. The autoimmune origin of atherosclerosis. ***Atherosclerosis***; 201:17 –32, 2008.

BONFIM, M.R; OLIVEIRA, A.S.B; AMARAL, S.L; MONTEIRO, H.L. Tratamento das Dislipidemias com Estatinas e Exercícios Físicos: Evidências Recentes das Respostas Musculares. ***Arq Bras Cardiol*** 104, 324-332, 2015.

BOUYAHYA, A., DAKKA, N., LAGROUH, F., ABRINI, J; BAKRI, Y. In vitro Antiproliferative and Antidermatophyte Activities of Essential Oils from Three Moroccan Medicinal Plants. ***Journal of Biologically Active Products from Nature***, v. 8, n. 3, p. 144-153, 2018.

BORGES, R.S; LIMA, E.S; KEITA, H; FERREIRA, I.M; FERNANDES, C.P; CRUZ, R.A.S; DUARTE, J.L; VELAZQUEZ-MOYADO, J; ORTIZ, B.L.S; CASTRO, A.N; FERREIRA, J.V; HAGE-MELIM, L.I.S; CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. ***Inflammopharmacology***, p. 1-13, 2017.

BORGES, R. S., ORTIZ, B. L. S., PEREIRA, A. C. M., KEITA, H., CARVALHO, J. C. T. *Rosmarinus officinalis* Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. ***Journal of ethnopharmacology***, 2018.

BRAVO, E., Amrani, S., Aziz, M., Harnafi, H., & Napolitano, M. Ocimum basilicum ethanolic extract decreases cholesterol synthesis and lipid accumulation in human macrophages. ***Fitoterapia***, v. 79, n. 7-8, p. 515-523, 2008.

BUSTANJI, Y; ISSA, A; MOHAMMAD, M; HUDAIB, M; TAWAH, K; ALKHATIB, H; AL-KHALIDI, B. Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents. ***Journal of Medicinal Plants Research***, v. 4, n. 21, p. 2235-2242, 2010.

CARVALHO, H.O; FARIAS E SOUZA, B.S; SANTOS, I.V.F; RESQUE, R.L; KEITA, H; FERNANDES, C.P; CARVALHO, J.C.T. Hypoglycemic effect of formulation containing hydroethanolic extract of *Calophyllum brasiliense* in diabetic rats induced by streptozotocin. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***; 26:10–18, 2016.

CELESKI, I. C.; FERGUTZ, J. K.; PEREIRA, E. M.; ZÉTOLA, M.; BAZZO, G. C.; PEZZINI, B. R. Avaliação da indução de hiperlipidemia em ratos por dexametasona e óleo de coco. ***Infarma***, v. 25, n. 3, p. 126-131, 2013.

CHAUDHARY, H.R.; BROCKS, D. R. The single dose poloxamer 407 model of hyperlipidemia; systemic effects on lipids assessed using pharmacokinetic methods, and its effects on adipokines. ***Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences***, v. 16, n. 1, p. 65-73, 2013.

CLEFF, M. B; MEINERZ, A.R.M; MADRID, I; FONSECA, A.O; ALVES, G.H; MEIRELES, M.C.A; RODRIGUES; M.R.A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Rev Bras Plantas Med**, v.14, n.1, p.43-49, 2012.

CROPLEY, M., CAVE, Z., ELLIS, J; MIDDLETON, R. W. Effect of kava and valerian on human physiological and psychological responses to mental stress assessed under laboratory conditions. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 1, p. 23-27, 2002.

DALMARCO, Juliana Bastos. Estudo das propriedades químicas e biológicas de *Rosmarinus officinalis* L. Tese de doutorado. 2012.

DA COSTA, S; BASRI, M; SHAMSUDIN, N; BASRI, H. Formation of Stable Palm Kernel Oil Esters Nanoemulsion System Containing Hydrocortisone. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 10, 2014.

DE MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.

DOI, K., KOJIMA, T; FUJIMOTO, Y. Mulberry leaf extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 9, p. 1066-1071, 2000.

DICKMANN, L.J; VANDENBRINK, B.M; LIN, Y.S. In vitro hepatotoxicity and cytochrome P450 induction and inhibition characteristics of carnosic acid, a dietary supplement with antiadipogenic properties. **Drug Metab Dispos** 40:1263–1267, 2012.

DIMITRIOU, M., RALLIDIS, L. S., THEODORAKI, E. V., KALAFATI, I. P., KOLOVOU, G; DEDOUSSIS, G. V. Exclusive olive oil consumption has a protective effect on coronary artery disease; overview of the THISEAS study. **Public health nutrition**, v. 19, n. 6, p. 1081-1087, 2016.

DIPIRO, J. T.; TALBERT, R. L.; YEE, G. C.; MATZKE, G. R.; WELLS, B. G.; POSEY, L. M. PHARMACOTHERAPY 3RD, A. **A pathophysiologic approach**. The McGraw-Hill Companies. Inc. New York, 2008.

DIZAJ, S. M.; YAQOUBI, S; ADIBKIA, K.; LOTFIPOUR, F. Nanoemulsion-based delivery systems: preparation and application in the food industry. In: **Emulsions**. p. 293-328, 2016.

DOBIÁŠOVÁ, M. Atherogenic index of plasma [log (triglycerides/HDL-cholesterol)]: theoretical and practical implications. **Clinical Chemistry** v. 50, No. 7, 2004.

DONG, Z; SHI, H; ZHAO, M.; ZHANG, X; HUANG, W ; WANG, Y; ZHENG, L; XIAN, X; LIU, G. Loss of LCAT activity in the golden Syrian hamster elicits pro-atherogenic dyslipidemia and enhanced atherosclerosis. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 83, p. 245-255, 2018.

DOWLA, S; ASLIBEKYAN; S; GOSS, A; FONTAINE, K; ASHRAF, A. Dyslipidemia is associated with pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Clinical Lipidology**, 2018.

DUARTE, J.L; AMADO, J.R.R; OLIVEIRA, A.E.M.F.M; CRUZ, R.A.S; FERREIRA, A.M; SOUTO, R.N.P; FALCÃO, D.Q; CARVALHO, J.C.T; FERNANDES, C.P.Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Rev Bras Farmacogn** 25:189–189, 2015.

ÉVORA, Leisa Nélida Pinto. **Actividades biológicas e citotoxicidade do óleo essencial de Rosmarinus officinalis L.** 2015. Dissertação de Mestrado.

FAGHERAZZI, S; DIAS, R. da L.; BORTOLON, F. Impacto do exercício físico isolado e combinado com dieta sobre os níveis séricos de HDL, LDL, colesterol total e triglicerídeos. **Rev Bras Med Esporte** vol.14 no.4 Niterói July/Aug. 2008.

FALUDI, André Arpad et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose–2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 1-76, 2017.

FARIA E SOUZA, B.S; CARVALHO, H. O; TAGLIALEGNA, T; BARROS, A. S. A; DA CUNHA, E. L; FERREIRA, I. M; KEITA, H; NAVARRETE, A; CARVALHO, J. C. T. Effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) Oil on Dyslipidemia Caused by *Cocos nucifera* L. Saturated Fat in Wistar Rats. **Journal of medicinal food**, v. 20, n. 9, p. 830-837, 2017.

FARIA E SOUZA, Belmira Silva. Estudo da ação do óleo fixo da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre dislipidemia em ratos Wistar. Tese de doutorado. 2017.

FERREIRA, Anna Paula Barros; Efeito do agonista parcial do PPAR γ na viabilidade de células de câncer mamário em cultura. 2015

FERNANDES, C.P; MASCARENHAS, M.P; ZIBETTI, F.M; LIMA, B.G; OLIVEIRA, R.P.R.F; ROCHA, L; FALCÃO, D.Q. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Braz J Pharm** 23(1):108–114, 2013.

FERNÁNDEZ, L. F.; PALOMINO, O. M.; FRUTOS, G. Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 509-516, 2014.

GAMBOA-GÓMEZ, C. I; ROCHA-GUZMÁN, N. E; GALLEGOS-INFANTE, J. A; MORENO-JIMÉNEZ, M. R; VÁZQUEZ-CABRAL, B. D; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.Plants with potential use on obesity and its complications. **EXCLI journal**, v. 14, p. 809, 2015.

GAYA, M., REPETTO, V., TONEATTO, J., ANESINI, C., PIWIEN-PILIPUK, G;MORENO, S. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present

in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPAR γ pathways at the onset of the differentiation program. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1830(6), 3796-3806, 2013.

GEZICI, S., SEKEROGLU, N; KIJJOA, A. In vitro Anticancer Activity and Antioxidant Properties of Essential Oils from *Populus alba* L. and *Rosmarinus officinalis* L. from South Eastern Anatolia of Turkey. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, p. S498-S503, 2017

GONÇALVES, G.A; CORRÊA, R.C.G; BARROS, L; DIAS, M.I; CALHELHA, R.C CORREA, V.G; BRACHT,A; PERALTA, R.M; FERREIRA, I.C.F.R.. Effects of in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation on a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) extract rich in rosmarinic acid. **Food chemistry**, v. 271, p. 393-400, 2018.

GHORBANI, A., RAKHSHANDEH, H., ASADPOUR, E; SADEGHNIA, H. R. Effects of *Coriandrum sativum* extracts on glucose/serum deprivation-induced neuronal cell death. **Avicenna Journal of Phytochemistry**, v. 2, n. 1, p. 4-9, 2011.

GHOLIPOUR S., SEWELL, R. D., LORIGOOINI, Z; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Medicinal plants and atherosclerosis: A review on molecular aspects. **Current pharmaceutical design**, 24 , 3123 – 3131, 2018.

GHOSH, G. C., BHADRA, R., GHOSH, R. K., BANERJEE, K;GUPTA, A.. RVX 208: A novel BET protein inhibitor, role as an inducer of apo A-I/HDL and beyond. **Cardiovascular therapeutics**, v. 35, n. 4, p. e12265, 2017.

GUINDA, Ángeles. Use of solid residue from the olive industry. **Grasas y Aceites**, v. 57, n. 1, p. 107-115, 2007.

HARACH, T; APRIKIAN, O; MONNARD, I; MOULIN, J; MEMBREZ, M; BÉOLOR, J. C; DARIMONT, C. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and liver steatosis in mice fed a high-fat diet. **Planta medica**, v. 76, n. 06, p. 566-571, 2010.

HANDAYANI, R; SULISTYO, J; RAHAYU, R.D. Extraction of coconut oil (*Cocos nucifera* L.) through fermentation system. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 10, n. 3, 2009.

HARWANSH, R. K; PATRA, K. C; PARETA, S. K. Nanoemulsion as potential vehicles for transdermal delivery of pure phytopharmaceuticals and poorly soluble drug. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, n. 2, p. 209-218, 2011.

HASSANI, F.V; SHIRANI, K; HOSSEINZADEH, H. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 389, n. 9, p. 931-949, 2016.

HERNANDO, Á.J.B. Dianas terapéuticas en el tratamiento de las dislipemias: colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad y colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad. **Clínica e investigación en arteriosclerosis**. v. 26, p. 3-6, 2014.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 18-23, 2012.

HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., CHATHA, S. A. S., JABBAR, A., MAHBOOB, S; NIGAM, P. S. Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1070-1078, 2010.

IPSEN, D. H., TVEDEN-NYBORG, P., & LYKKESFELDT, J. Dyslipidemia: Obese or not obese—That is not the question. **Current obesity reports**, v. 5, n. 4, p. 405-412, 2016.

JACKSON, C.L; BENNETT, M.R; BIESSEN, E.A.L; JOHNSON, J.L; KRAMS, R.R. Assessment of unstable atherosclerosis in mice. **Am Heart Assoc**; 27:714–720, 2007.

JING, L; ZHANG, Y; FAN, S; GU, M; GUAN, Y; LU, X; HUANG, C; ZHOU, Z. Preventive and ameliorating effects of citrus D-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. **European Journal of Pharmacology**, 715, 46–55, 2013.

JIANG, Y; WU, N; FU, Y. J; WANG, W., LUO, M.; ZHAO, C. J; LIU, X. L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63-68, 2011.

JELLINGER, P.S.; DICKEY, R.A.; GANDA, O.P.; MEHTA, A.E.; NGUYEN, T.T.; RODBARD, H.W.; SEIBEL, J.A.; SHEPHERD, M.D.; SMITH, D.A. AACE medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of atherogenesis. **Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists**, v. 6, n. 2, p. 162, 2002.

KANG, J.H; SONG, K, B. Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella Typhimurium* on red mustard leaves. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 447-454, 2018.

KABIRI, N; SETORKI, M. Regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by hydroalcoholic extracts of *Hypericum perforatum*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 13, p. 2540-2549, 2012.

LAMBERT, R. J. W., SKANDAMIS, P. N., COOTE, P. J; NYCHAS, G. J . A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 53, n. 6, p. 482-491, 2006.

LEE, H; WOO, M; KIM, M; NOH, J.S; SONG, Y.O. Antioxidative and Cholesterol-Lowering Effects of Lemon Essential Oil in Hypercholesterolemia-Induced Rabbits. **Preventive nutrition and food science**, v. 23, n. 1, p. 8, 2018.

LEOPOLD, J. A; LOSCALZO, J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 12, p. 1673-1706, 2009.

LIN, C.F; CHANG, Y.H; CHIEN, S.C; LIN, Y.H. Epidemiology of Dyslipidemia in the Asia Pacific Region. **International Journal of Gerontology**, v. 12, n. 1, p. 2-6, 2018.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C.; GARCÍA-GARCÍA, P. "The herbs that have the property of healing,": The phytotherapy in Don Quixote. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 429-441, 2006.

MACHADO D.G; CUNHA M.P; NEIS V.B; BALEN, G.O; COLLA A; BETTIO L.E; OLIVEIRA Á; PAZINI F.L; DALMARCO J.B; SIMIONATTO E.L; PIZZOLATTI M.G. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**. Jan 15;136(2):999-1005, 2013..

MAHAN, J.; ESCOTT-STUMP, S.; KATHLEEN, L.; RAYMOND, L. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. **Editora: ELSEVIER**.- 13ª Ed. 2013.

MAY, A; SUGUINO, E; MARTINS, A. N; BARATA, L. E. S; PINHEIRO, M. Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MINEO, C.; SHAUL, P.W. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. **Circ. Res**, v. 8, p. 1079-1090, 2012.

MOHAMMADIFAR, M., TALAEI, S. A., VAKILI, Z., BAHMANI, F., MEMARZADEH, M. R; AARABI, M. H. Evaluation of antinociceptive effect of nano-emulsion gel containing rosemary and peppermint essential oils in a rat model of osteoarthritis. 2018.

MORIYA, J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. **Journal of cardiology**, 2018.

MOSTAFA, D. M; EL-ALIM, S.H; KASSEM, A. A. Nanoemulsions: A New Approach for Enhancing Phytonutrient Efficacy. In: **Nanotechnology Applications in Food**.. p. 107-127, 2017.

MOSS, J. W; RAMJI, D. P. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. **Future medicinal chemistry**, v. 8, n. 11, p. 1317-1330, 2016.

NANKAR, R. P; RAMAN, M; DOBLE, M. Nanoformulations of polyphenols for prevention and treatment of cardiovascular and metabolic disorders. In: **Emulsions**. p. 107-151, 2016.

OMRI, A., HAN, J., YAMADA, P., KAWADA, K., ABDRAHMAN, M. B., ISODA, H. *Rosmarinus officinalis* polyphenols activate cholinergic activities in PC12 cells through phosphorylation of ERK1/2. **Journal of ethnopharmacology**. 131(2), 451-458, 2010.

OSANLOO, M., AMANI, A., SERESHTI, H., ABAI, M. R., ESMAEILI, F; SEDAGHAT, M. M. Preparation and optimization nanoemulsion of Tarragon (*Artemisia dracuncululus*) essential oil as effective herbal larvicide against *Anopheles stephensi*. **Industrial crops and products**. 109, 214-219, 2017.

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

PEREIRA, P. B., et al. Perfil lipídico de escolares de Recife –PE. **Arq Bras cardiol**. v. 95, n.5, p. 606 – 613, 2010.

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J; CANTÓ-TEJERO, M; VALLEJO, R; GUIRAO, P; RODRÍGUEZ-ROJO, S; COCERO, M. J. Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. **Industrial Crops and Products**, v. 110, p. 45-57, 2017.

QUINTANS, L. J., QUINANS, J. S., CAMARGO, Z., ARRIGONI-BLANK, M. F., BRITO, R., OLIVEIRA, M; SLUKA, K. Lasting anti-hyperalgesic effect of nanoemulsion containing essential oil of *H. pectinata* in an animal model of fibromyalgia. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1_supplement, p. 812.4-812.4, 2017.

RAGGI, P., GENEST, J., GILES, J. T., RAYNER, K. J., DWIVEDI, G., BEANLANDS, R. S; GUPTA, M. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. **Atherosclerosis**, v. 276, p. 98-108, 2018.

RAHMAN, M. B. M.B.A; SALIM, N; MASOUMI, H.R; KARJIBAN, R.A; NGAN, C.L; BASRI, M A. Palm-based nanoemulsions for drug delivery systems. In: **Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery**. p. 209-244, 2018.

RAŠKOVIĆ, A; MILANOVIĆ, I; PAVLOVIĆ, N; ĆEBOVIĆ, T; VUKMIROVIC, S. MIKOV, M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 225, 2014.

RASKOVIC, A., MILANOVIC, I., PAVLOVIC, N., MILIJASEVIC, B., UBAVIC, M; MIKOV, M. Analgesic effects of rosemary essential oil and its interactions with codeine and paracetamol in mice. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, n. 1, p. 165-172, 2015.

REZAEI, A., FATHI, M., JAFARI, S. M.. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**. 2018

RIBEIRO, K.C; SHINTAKU, R.C.O. A influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. **ConScientiae Saúde**, v. 3, p. 73-83, 2008.

RIBEIRO-SANTOS, R., CARVALHO-COSTA, D., CAVALEIRO, C., COSTA, H. S., ALBUQUERQUE, T. G., CASTILHO, M. C; SANCHES-SILVA, A. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Trends in Food Science & Technology**. 45(2), 355-368, 2015.

ROUHI-BOROUJENI, H., ROUHI-BOROUJENI, H., HEIDARIAN, E., MOHAMMADIZADEH, F., & RAFIEIAN-KOPAEI, M. Herbs with anti-lipid effects and their interactions with statins as a chemical anti-hyperlipidemia group drugs: A systematic review. **ARYA atherosclerosis**, v. 11, n. 4, p. 244, 2015.

ROSSI, A., SERRAINO, I., DUGO, P., DI PAOLA, R., MONDELLO, L., GENOVESE, T; CUZZOCREA, S. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. **Free radical research**, v. 37, n. 8, p. 891-900, 2003.

SALIDO, S; ALTAREJOS, J; NOGUERAS, M; SAÁNCHEZ, A; LUQUE, P. Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from southern Spain. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 1, p. 10-14, 2003.

SANTOS, H.V; FONSECA, J.M FREITAS; R.R. ROYO, V.A. Caracterização laboratorial das dislipidemias e o uso de fitoterápicos. **Revista Multitexto**, v. 3, n. 1, p. 21-28, 2015.

SANTOS, R.D; GAGLIARDI, A. C. M; XAVIER, H.T et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**. São Paulo. 2013; 100:1-40. Suplemento 3.

SATYAL, P; JONEST, H; LOPEZ, E. M; MCFEETERS, R.L; ALI, N.A.A; MANSI, I; ALKAF, A.G; SETZER; W.N. Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. **Foods**, v. 6, n. 3, p. 20, 2017.

SEBAI, H., SELMI, S., RTIBI, K., GHARBI, N; SAKLY, M. Protective effect of *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 2, p. 241-249, 2015.

SEDIGHI, R; ZHAO, Y; YERKE, A. SANG, S.Preventive and protective properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in obesity and diabetes mellitus of metabolic disorders: a brief review. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 58-70, 2015.

SEDIGHI, M., BAHMANI, M., ASGARY, S., BEYRANVAND, F. RAFIEIAN-KOPAEI, M. A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 22, 2017.

SELMI, S; RTIBI, K; GRAMI, D; SEBAI, H; MARZOUKI, L. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil components exhibit anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects in experimental diabetes. **Pathophysiology**, v. 24, n. 4, p. 297-303, 2017.

SETYA, S; NEGI, P; RAZDAN, B. K; TALEGAONKAR, S. Design, development and in vitro investigation of water in oil nanoemulsion for transdermal delivery. **Wjpps**, v. 3, p. 1495-512, 2014.

SHOKRI, A., SAEEDI, M., FAKHAR, M., MORTEZA-SEMNANI, K., KEIGHOBADI, M., TESHNIZI, S. H; SADJADI, S.. Antileishmanial Activity of Lavandula angustifolia and Rosmarinus Officinalis Essential Oils and Nano-emulsions on Leishmania major (MRHO/IR/75/ER). **Iranian journal of parasitology**, v. 12, n. 4, p. 622, 2017.

SIMÕES, C. M. O et al. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6º edição. Porto Alegre: Editora da UGRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SILVA, B. Q; HAHN, S.R. Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou dislipidemias. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 2, p. 36-40, 2011.

SILVA, F. N; SOUZA, M. C. C. de. Prevalência de dislipidemias em crianças e adolescentes: Revisão sistemática. Interbio. v.8, n.2, Jul – Dez. 2014

SOUZA, B.S.F; CARVALHO, H.O; FERREIRA, I.M; CUNHA, E.L; BARROS, A.S; TAGLIALEGNA, T ; CARVALHO, J.C.T. Effect of the treatment with Euterpe oleracea Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 542-547, 2017.

Sociedade Brasileira de cardiologia. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). **Arq. Bras Cardiol.** 2001; 77 (Suppl.III): 1 – 40.

Sociedade Brasileira de cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). **Arq. Bras Cardiol.** 2007; 88 (Suppl.I): 1 – 19.

SOLÉ, I; SOLANS, C; MAESTRO, AGONZÁLEZ, C. GUTIÉRREZ, J.M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J Colloid Interface Sci* 376:133–139, 2012.

SUANARUNSAWAT, T; AYUTTHAYA, W.D.N; SONGSAK, T; THIRAWARAPAN, S; POUNGSHOMPOO, S. Antioxidant Activity and Lipid-Lowering Effect of Essential Oils Extracted from *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed with a High Cholesterol Die. **J Clin Biochem Nutr.** Jan; 46(1): 52–59, 2010.

SUZUKI R., TANAKA, M., TAKANASHI, M., HUSSAIN, A., YUAN, B., TOYODA, H., & KURODA, M. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte

differentiation via the insulin pathway. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 14, 2011.

TALEB, M., ABDELTAWAB, N., SHAMMA, R., ABDELGAYED, S., MOHAMED, S., FARAG, M; RAMADAN, M. Origanum vulgare L. Essential Oil as a Potential Anti-Acne Topical Nanoemulsion—In Vitro and In Vivo Study. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2164, 2018.

TAKAYAMA , C; FARIA, F.M; ALMEIDA, A.C.A; DUNDER, R. J; MANZO, L. P; SOCCA, E. A. R; BATISTA, L. M; SALVADOR, M. J; SOUZA-BRITO, A. R. M; FERREIRA, A. L. Chemical composition of Rosmarinus officinalis essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 6, n. 8, p. 677-681, 2016.

TAKAKI, I., BERSANI-AMADO, L. E., VENDRUSCOLO, A., SARTORETTO, S. M., DINIZ, S. P., BERSANI-AMADO, C. A; CUMAN, R. K. N. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Rosmarinus officinalis L. essential oil in experimental animal models. **Journal of medicinal food**. 11(4), 741-746, 2008.

TAN M.H; JOHNS D; GLAZER N.B. A pioglitazona reduz o índice aterogênico do plasma em pacientes com diabetes tipo 2. **Clin Chem**, 50 : 1184 -1188, 2004.

TANG, F., LI, L; CHEN, D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. **Advanced materials**, v. 24, n. 12, p. 1504-1534, 2012.

TIAN, C; YE, X; ZHANG, R; LONG, J; REN, W; DING, S; YING, C. Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via erk1/2-PPAR γ -adiponectin pathway. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53796, 2013.

TSIOUFIS, C; MANTZOURANIS, E; KALOS, T; KONSTANTINIDIS, D; TOUSOULIS, D. Risk Factors of Atherosclerosis: Pathophysiological Mechanisms. **Coronary Artery Disease: From Biology to Clinical Practice**, p. 43, 2017.

WAKASUGI, M., NOGUCHI, T., INOUE, M., TAWATA, M., SHINDO, H; ONAYA, T. Effects of aldose reductase inhibitors on prostacyclin (PGI₂) synthesis by aortic rings from rats with streptozotocin-induced diabetes. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 44, n. 4, p. 233-236, 1991.

WANG, W; WU, N; ZU, Y. G; FU, Y. J. Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1019-1022, 2008.

WANG, W., LI, N., LUO, M., ZU, Y; Efferth, T. Antibacterial activity and anticancer activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**, v. 17, n. 3, 2012.

WANG, Tao; BUTANY, Jagdish. Pathogenesis of atherosclerosis. **Diagnostic Histopathology**, 2017.

WU, Y. N., HUANG, J., ZUO, A. L.; YAO, L.. Research on the Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on the Blood Lipids and Anti-lipid Peroxidation in Rats. **Journal of Essential Oil Research**, 23(4), 26-34, 2011.

XAVIER, Hermes T. et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 1-20, 2013.

XUE, Jia. Essential oil nanoemulsions prepared with natural emulsifiers for improved food safety. 2015.

YOON, M. The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions. *Pharmacol.Res.*60,151–159. 2009.

ZIAEI HEZAR JARIBI, NADEALI, N., SAEIDI, M., MOMENI, Z., SOOSARAEI, M., FAKHAR, M., & JORJANI, O. N. In vitro Anti-Trichomonas Effects of the Essential Oil and Nano-emulsion of *Rosmarinus officinalis* on *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Mazandaran University of Medical Sciences**, v. 27, n. 153, p. 118-122, 2017.

ZHAO, Y., SEDIGHI, R., WANG, P., CHEN, H., ZHU, Y; SANG, S. Carnosic acid as a major bioactive component in rosemary extract ameliorates high-fat-diet-induced obesity and metabolic syndrome in mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 19, p. 4843-4852, 2015.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na reunião de 30 de Agosto de 2017, o parecer referente ao protocolo no. **017/2017** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado **"ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus Officinalis* L. SOBRE A DISLIPIDEMIA EM RATOS"** coordenado por **Ana Paula Santos Rodrigues**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 30 August 2017, the final decision about the Protocol **017/2017** and certify that the research project entitled **" ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus Officinalis* L. SOBRE A DISLIPIDEMIA EM RATOS"** coordinated by **Ana Paula Santos Rodrigues**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 12 de Setembro de 2017

Prof. Dra. Clarissa Silva Lima
Vice-presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1734/2014

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 – Campus Marco Zero,
Macapá - AP. 68903-419 email: farmacos@unifap.br
Fone (96)4009-2907

Anexo 2 – Manuscrito submetido para publicação

Effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and it's nanoemulsion on dyslipidemic Wistar rats

Ana Paula S. Rodrigues^{a,b}, Belmira S. Faria e Souza^a, Albenise S. A. Barros^{a,c}, Helison O. Carvalho^{a,c}, Jonatas Lobato^{a,b}, Letícia M. Boettger^b, Robson Barbosa^b, Adriana M. Ferreira^a, Irlon M. Ferreira^{b,c,d}, Caio Pinho Fernandes^b, Clarissa S. Lima^b, Arlindo César M. Pereira^a, José Carlos T. Carvalho^{a,b,c*}

^aLaboratório de Pesquisa em Fármacos, Curso de Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá.

^cPrograma de Pós-graduação em Inovação Farmaceutica, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá

^dLaboratório de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica, Curso de Química, Universidade Federal do Amapá.

*Corresponding author: farmacos@unifap.br

Abstract

Introduction: Dyslipidemias are lipid metabolism alterations which lead to increased serum lipoprotein, cholesterol, and triglycerides levels. These alterations are associated with higher incidence of cardiovascular diseases (CVD), is also a risk factor for atherosclerosis development.

Objectives: This study aimed to evaluate the effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil (EORO) and its nanoemulsion (NEORO) on Triton and saturated fat-induced dyslipidemia in Wistar rats.

Key findings: EORO phytochemical evaluation by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) revealed α -pinene (8.13%), limonene (21.99%), 1,8-cineole (33.70%) and camphor (27.68%) as its major compounds. Triton-induced dyslipidemia significantly increased total cholesterol, LDL and triglycerides levels. However, groups treated with EORO and NEORO had significant reduction of total cholesterol, LDL, and triglycerides, as the simvastatin-treated group. Dyslipidemia induced by *Cocos nucifera* L. saturated fat (CSF) led to abdominal fat gain, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, increased LDL levels and atherogenic process formation in aorta artery. Treated groups (EORO+CSF, NEORO+CSF, SIM+CSF) had significantly reduced hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia, besides reduced abdominal fat gain and finally, inhibited vascular endothelium atheromatous plaques formation.

Conclusions: In this manner, results show the anti-dyslipidemic effect by EORO and NEORO in the employed model, besides anti-atherogenic propriety.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, essential oil, nanoemulsion, anti-dyslipidemic, anti-atherogenic.

1. Introduction

Dyslipidemia consists of lipid metabolism alterations which result in increased levels of serum lipoproteins, cholesterol and triglycerides. In its turn, lipoproteins are biomolecules which transport lipids in its core [1,2,3]. In dyslipidemia is mainly observed increased levels of low-density lipoproteins (LDL) and triglycerides, in addition to decreased high-density lipoprotein (HDL) levels [4]. This pathology is linked to increased incidence of cardiovascular diseases (CVD), diabetes, and metabolic syndrome, is also a risk factor for atherosclerosis [5,6]. CVDs represent a main public health issue and every year there is an increase of 12 million people affected; the difficulty of treatment can lead to early death [7].

Atherosclerosis is a progressive inflammatory disease which affects medium and large-caliber arteries, this condition is generated by endothelial injury, followed by lipid deposition, muscular cells migration, and calcification, mainly affecting arteries' *tunica intima* [8].

Species *Rosmarinus officinalis* L., popularly known as “Rosemary” is a plant of Lamiaceae (formerly Labiatae) family. Original of southern Europe, North Africa, and the Mediterranean; *R. officinalis* is nowadays cultivated around the world, and presents several pharmacological activities as anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidant [9,10].

The essential oil of *R. officinalis* (EORO) is a colorless or pale-yellow liquid with the characteristic odor of its plant [11]. Due to its anti-bacterial and anti-oxidant potential, EORO is widely used in pharmaceutical, cosmetics and food industries [12]. EORO chemical composition can differ according to solo and farming factors, and its extraction method [13]. According to Cleff et al [14] and Takayama et al [15], major compounds include 1,8-cineol, α -pinene, and limonene.

Nanotechnology applied to essential oils manage to improve its pharmacological proprieties, which are favored by the nanometric scale of these formulations. Moreover, development of nanoemulsions constituted by immiscible liquids plus a stabilizer enables thermodynamic stability and small droplets formation, with size ranging from 20 to 200 nm [16].

In this context, biodiversity stands out as a source of a great variety of plant species and its bioactive molecules with therapeutic potential for several diseases, including dyslipidemias. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its nanoemulsions on dyslipidemia induced by *Cocos nucifera* L. saturated fat and Triton in Wistar rats.

2. Material and Methods

2.1. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (EORO)

The essential oil was acquired from the company Florien – Flowers and Herbs Pharmaceutical Commerce Ltda. Located on Vicente Bellini road, 175, Piracicaba, São Paulo, Brazil. The oil was extracted from plants' aerial parts, with botanical identification, lot n° 056757.

2.2. Phytochemical characterization of EORO by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS)

EORO chemical composition analysis was performed by gas chromatography-mass spectroscopy using a Shimadzu / GC 2010, self-injector Shimadzu / AOC-5000, mass-detector (Shimadzu MS2010 Plus, 70 eV), DB-5MS fused silica column (Agilent Advanced J & W; 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). GC-MS parameters were: split-ratio 1:30; helium as carrier gas (65 kPa); 1.0 µl injection volume; injector temperature at 250°C; detector temperature at 250°C; column initial temperature at 60°C for 1 minute, heating 3°C min⁻¹ until 290°C. The analysis was performed for 46.67 minutes, and compounds identification was assessed through their retention index (RI), interpolating retention time based on a mixture of aliphatic hydrocarbons (C9-C30) analyzed at same conditions. In addition, compounds' fragmentation pattern was compared to equipment's mass spectrum library (NIST 5.0).

2.3. *Cocos nucifera* saturated fat (CSF)

CSF was obtained from Cocos Empire Company – Municipal Market of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CSF extraction was performed through endocarp pressing, followed by water addition in 1:1 (v/v) proportion. The fat was separated by heating at 80°C as described by [Handayani et al \[17\]](#).

2.4. EORO Nanoemulsion preparation

EORO nanoemulsion (NEORO) was prepared using a low energy load method, described previously by [Fernandes et al \[18\]](#). For a final mass of 50 g, was used water (90%), EORO (5%) and Tween-20 (5%) as a surfactant. A phase was initially prepared by mixing EORO and Tween-20, this mixture was then stirred using a magnetic stirrer (750 rpm) for 30 minutes. Then, the aqueous phase was added at 0.5 mL/min flow under continuous stirring for

60 minutes. Nanoemulsion stability was assessed 0, 1 and 7 days after its preparation for the following parameters: macroscopic color and visual aspect, phases separation and sedimentation. Droplets size analysis and polydispersity index were evaluated according described by [Borges et al \[13\]](#). Nanoemulsions were kept at room temperature (25 ± 2 °C) in capped test tubes.

2.5. *Animals and ethical considerations*

This study was approved by the Ethics Committee in Animals Use – CEUA, of the State University of Amapá – UNIFAP, under the approval report n° 017/2017.

Animals used were male Wistar lineage rats (*Rattus norvegicus albinus*) from the Animal Investigation Multidisciplinary Center (CEMIB) of Campinas University – UNICAMP. The rats were maintained in polyethylene cages placed in a ventilated cabinet at controlled temperature (25 ± 2 ° C) and dark/light cycle (12/12 hours) and received food and water in controlled quantity.

2.6. *Treatment and dyslipidemia inducing with CSF*

Animals were randomly assigned into five groups (n = 7/group) and orally treated according to the dyslipidemia-inducing method described by [Faria e Souza et al \[19\]](#). EORO and NEORO used doses were previously described by [Borges et al \[13\]](#). The groups were treated as follows:

- 1) Animals were treated with 100 mg/kg/day of EORO with Tween-20 as a vehicle (4%) for 40 days; (EORO)
- 2) Animals were treated with 100 mg/kg/day of EORO with Tween-20 as a vehicle (4%) for 40 days, and 2 ml of CSF from the 20th to the 40th day (EORO+CSF);
- 3) Animals were treated with 0.5 ml of Tween-20 solution (4%) for 40 days, and 2 ml of CSF from the 20th to the 40th day (VEI+CSF);
- 4) Animals were treated with 500 µg/kg/day of NEORO for 40 days, and 2 ml of CSF from the 20th to the 40th day (NEORO+CSF);
- 5) Animals were treated with Simvastatin for 40 days, and 2 ml of CSF from the 20th to the 40th day (SIM+CSF).

2.7. *Treatment and dyslipidemia inducing with Triton*

Animals were randomly assigned into five groups (n=6/group) and orally treated for 5 days. At the second day, dyslipidemia was induced in treated groups intraperitoneally with

Triton WR1339 (Tyloxapol, Sigma-Aldrich Chemical Co. St Louis, MO, USA), 150 mg/kg dissolved in physiologic saline [7]. Groups were treated as follows:

Control Group: Treated with 0.5 ml of Tween-20 (4%) solution, did not receive Triton treatment (**Control**);

Triton Group: Treated with 0.5 ml of Tween-20 (4%) solution (**Triton**);

Triton Group: Treated with 100 mg/kg of EORO with 0.5 ml of Tween-20 (4%) as a vehicle (**EORO**);

Triton Group: Treated with 500 µg/kg of NEORO (**NEORO**);

Triton Group: Treated with Simvastatin (10 mg/kg). (**SIM**).

2.8. Biochemical analysis

In CSF-induced dyslipidemia, animals were kept fasting for 12 hours on the 41st day to collect blood samples. For this, they were anesthetized using 45 mg/kg of sodium thiopental (Cristália – Chemical and Pharmaceutical Products Ltda, Brazil) intraperitoneally. Blood samples (1.5 ml) were collected from ocular plexus, then centrifuged for 10 minutes (5000 rpm) for analysis of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC) and fractions (LDL and HDL), triglycerides (TG), urea, glucose and creatinine. In Triton-induced dyslipidemia, animals were treated as previously described but on the fifth day. All tests were performed using LabTest kits and automated biochemical analyzer equipment, model BS 380 (Mindray Bio-medical Electronics Co., Ltd.).

2.9. Organs removal and scanning electron microscopic analysis of aorta

In CSF-induced dyslipidemia, 41st day, animals were euthanized by Thiopental overdose (Cristália – Chemical and Pharmaceutical Products Ltda, Brazil) for organ removal (kidney, spleen, liver, pancreas, lungs and abdominal fat) and weighing using an electronic analytical balance (Model Bioprecisa FA-2104N). Aorta was removed from the aortic arch to the iliac bifurcation, and the thoracic region was divided into 0.5 cm sections for scanning electron microscopic (SEM) analysis (Hitachi Model-TM3030 PLUS) to search for atherogenic processes, as described by [Faria e Souza et al \[19\]](#)

2.10. Statistical Analysis

Raw data values from the experiments were presented as a mean $\pm$ standard deviation. Groups were compared using Analysis of Variance (ANOVA One-Way) followed by Tukey test, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. EORO chemical profile characterization by GC-MS

Chromatographic profile showed 100% of terpenes in EORO composition, with 20 compounds identified. Major compounds were α -pinene (8.13%), limonene (21.99%), 1,8-cineol (33.70) and camphor (27.68%), as shown in Figure 1 and Table 1.

3.2. NEORO characterization and evaluation

Nanoemulsion obtained from EORO (NEORO) showed white colorations and slightly bluish reflect, no phase separation was observed nor any other parameter indicating formulation instability, as described by Duarte et al [20]. Concerning NEORO stability evaluation for 7 days (Table 2 and Figure 2), it was observed that average droplet size ranged from 129.1 ± 0.35 to 149.7 ± 0.3786 nm and polydispersity index ranged between 0.103 ± 0.023 to 0.376 ± 0.005 .

3.3. EORO and NEORO effects on Triton-induced dyslipidemia model

Triton-induced dyslipidemia model significantly increased TG (245.7 ± 26.6 mg/dL) and TC (192.8 ± 29.64 mg/dL) compared to Control group (Figure 3). However, compared to non-treated group, EORO-treated group had a significant reduction of serum TC (68.3%, 109.66 ± 45.25 mg/dl, $p < 0.01$) and TG (94.8%, 97.33 ± 25.82 mg/dl, $p < 0.001$), and so had NEORO-treated group (TC reduction: 55.3%, 125.25 ± 43.81 mg/dl, $p < 0.05$; TG reduction: 66.8%, 142.22 ± 45.93 mg/dl, $p < 0.001$). In addition, simvastatin-treated group (SIM) had also reduction of serum TG and TC levels, as expected (67.3%, 141.3 ± 22.10 mg/dl and 65.9%, 112.25 ± 44.19 mg/dl respectively)

Regarding LDL and HDL evaluation (Figure 4), Triton induced significant increase of both (95.2 ± 13.6 mg/dL and 13.8 ± 5.6 mg/dL respectively). On the other hand, EORO and NEORO-treated groups managed to significantly reduce LDL levels (67.7%, 51.6 ± 18.3 mg/dL and 53.9%, 60.7 ± 21.03 mg/dl respectively) and increase HDL levels (109.5%, 44.66 ± 16.2 mg/dl and 90.4%, 40.2 ± 13.7 mg/dl respectively). As expected, simvastatin-treated group also significantly ($p < 0.001$) reduced LDL levels (84.2%, 40.3 ± 14.9 mg/dl) and increased HDL levels (76.2%, 37.2 ± 5.33 mg/dl).

3.4 EORO and NEORO effects on CSF-induced dyslipidemia model

In CSF-induced dyslipidemia, body weight evaluation showed no statistically significant difference between groups (Figure 5), however, abdominal fat appraisal shows that group VEI+CSF had higher values compared to the other groups. Treated groups EORO+CSF, NEORO+CSF and SIM+CSF managed to significantly reduce ($p < 0.01$) fat accumulation compared to group VEI+CSF. Intern organs weigh (Table 3) showed no statistical difference among groups.

Biochemical parameters assessment (Table 4) of CSF-induced dyslipidemic animals shows no significant differences in transaminases (AST and ALT) levels among groups. However, concerning serum TC levels, increased values were observed in group VEI+GSC (116.57 ± 7.69 mg/dl), while highly significant ($p < 0.001$) reduction was observed in treated groups EORO+CSF, NEORO+CSF and SIM+CSF when compared to VEI+CSF, respectively 36.1%, 42.5%, and 50.1%. In its turn, HDL values showed no statistical differences among groups, evidencing no influence of treatments on this parameter, nevertheless, LDL values showed increase in group VEI+CSF (44.71 ± 11.14 mg/dl) and significant reduction ($p < 0.001$) in EORO and NEORO-treated groups when compared to VEI+CSF, respectively 64.3%, 15.71 ± 8.88 mg/dl and 61.7%, 16.85 ± 8.06 mg/dl. The simvastatin-treated group (SIM+CSF) also had significant reduction ($p < 0.001$) in LDL (83.9%, 7.10 ± 3.11 mg/dl).

In serum triglycerides (TG) levels assessment was noticed increased values in group VEI+CSF (226.82 ± 36.94 mg/dl), while treated groups EORO-CSF and NEORO-CSF managed to significantly reduce ($p < 0.001$) TG levels when compared to VEI+CSF, respectively 38.4%, 139.28 ± 29.73 mg/dl and 41.9%, 131.28 ± 40.58 mg/dl. Simvastatin-treated group SIM+CSF, although significantly reduce ($p < 0.001$) TG levels when compared to VEI+CSF, had a lower reduction (31.9%) compared to former groups. Regarding creatinine, glucose and urea levels, no statistically significant difference among groups was noticed.

Scanning electron microscopy of aorta shows the atherogenic process in group VEI+CSF (Figures 6 and 7). Analysis of treated groups EORO+CSF, NEORO+CSF and SIM+CSF indicates a leak of atherogenic process formation in vascular endothelium.

4 Discussion

EORO chemical composition is based on volatile compounds, mainly monoterpenes [18], its characterization is possible employing chromatographic and spectroscopy techniques which allow identification and quantification of its major compounds [21]. The chemical composition of our essential oil from *Rosmarinus officinalis* are in accordance with those

described by other studies, reporting α -pinene, camphor, 1,8-cineole and limonene as major components [18,13].

EORO was used for development of a nanoemulsion (NEORO), results show NEORO exhibited stability with average droplets size < 150 nm and monomodal distribution of diameter [22]. These results are in accordance with those reported by Duarte et al [20], who developed stable nanoemulsion from the essential oil of *R. officinalis*, with droplets diameter below 200 nm and a polydispersity index of 0.281 ± 0.089 .

There are several animal models of dyslipidemia, among them, the classic method induced by intraperitoneal application of Triton (Tyloxapol). Triton is a non-anionic surfactant that induces dyslipidemia through inhibition of lipoprotein lipase, an enzyme which hydrolyzes triglycerides of serum lipoproteins; in addition, Triton also induces HMA-CoA reductase¹, an intracellular enzyme that plays a key role in hepatic cholesterol synthesis. Hence, there is an increase in triglycerides (TG) concomitantly with cholesterol (TC) synthesis, culminating in increased serum lipid levels [23,7].

In Triton-induced dyslipidemic groups treated with EORO, NEORO, and simvastatin, it was noticed a decrease of serum lipid levels, this is similar with what was reported by Lee et al [24], who demonstrated serum lipid levels reduction by the essential oil of *Citrus lemon*. Moreover, our results show that treatment with EORO and NEORO managed to improve serum lipid profile by increasing HDL levels and decreasing HDL levels in rats.

This effect can be at least partially explained by the high content of limonene, which can act in PPAR α activation [25]. PPAR α has a key role in dyslipidemia improvement through regulation of lipids and lipoproteins metabolism. This has been demonstrated through PPAR α activation by its agonists, like fenofibrate, which can reduce elevated serum lipid levels and increase HDL levels [26].

A lipid-rich diet contributes to increasing free fatty acid levels in the bloodstream, and increased serum saturated fatty acid is an important factor in the development of dyslipidemia, atherogenesis, and cardiovascular diseases. The CSF-induced dyslipidemia model entails increased blood lipids levels due to the high content of saturated fat, contributing to hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, increased serum LDL levels and abdominal fat accumulation [7].

¹ 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase

A study performed by [Faria e Souza et al \[19\]](#) reported increased abdominal fat in a non-treated group with dyslipidemia induced by CSF, just as observed in group VEI+CSF, corroborating this present study results. Groups treated with EORO and NEORO had no increment of abdominal fat, suggesting a link between this treatment and diminution of abdominal fat. Body fat accumulation is due to an imbalance of lipogenic and lipolytic processes, culminating in excessive storage of fat as triglycerides, mainly in the liver and abdominal adipose tissue. This is a risk factor for diabetes and cardiovascular diseases [\[27, 28\]](#).

Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) is an important enzyme involved in TG synthesis and storage in adipocytes. A study performed by [Dickmann et al \[29\]](#) demonstrated the potential of carnosic acid from *Rosmarinus officinalis* to moderately suppress the activity of type 1 DGAT *in vitro* and inhibits intracellular TG synthesis in HepG2 cells. Perhaps this mechanism may be involved in EORO activity in the observed abdominal fat reduction of treated groups EORO+CSF and NEORO+CSF.

Evaluating the effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in diabetic rats, [Selmi et al \[30\]](#) reported that EORO significantly reduced TC, TG, and LDL levels, without effects on HDL levels. This is in accordance with our results, because treated groups EORO+CSF and NEORO+CSF had reduced TC, TG and LDL levels, and no effects on HDL levels were observed. An additional study using essential oil of *Ocimum sanctum* L., whose composition is mainly made of monoterpenes and sesquiterpenes, showed reduction of TC, TG and LDL levels [\[31\]](#).

A study performed by [Ribeiro et al \[32\]](#) evidences that improvement of lipid profile is linked to reduced incidence of atherosclerosis. Atherogenic plaques formation is triggered by vascular endothelium injury, caused by increased concentration of serum LDL, which translocate to arteries' *tunica intima* and undergo oxidation, this leads to inflammation and recruitment of immune system cells, particularly monocytes [\[19\]](#). The influx of inflammatory cells to subendothelial space leads to its differentiation into macrophages, which absorbs the oxidized LDL and became filled with fat, becoming foam cells, the main component of atheroma [\[33,34\]](#).

Atherosclerosis studies performed in animals shows that saturated fat-rich diet speeds up the atherogenic process, especially in abdominal region aorta, which is prone to plaque formation [35, 19]. Our results are also in accord to it.

In atherogenic process assessment of aorta is evidenced a possible anti-atherogenic potential of EORO due to the leak of atherogenic plaque formation in vascular endothelium of treated groups EORO+CSF and NEORO+CSF. This potential can be explained by EORO effect of reducing TC, TG and mainly LDL levels, which is an important lipoprotein in the atherogenesis process. In addition to that, [Borges et al \[13\]](#) demonstrated the anti-inflammatory potential of chemical compounds present in *R. officinalis* essential oil and its nanoemulsion, which also can contribute by inhibiting the inflammatory cascade that triggers inflammatory cells influx into the subendothelial region.

Furthermore, the antioxidant activity of EORO may also contribute to inhibiting atherogenesis process by suppressing LDL oxidizing, preventing its absorption by macrophages and hence preventing foam cells formation [11].

5. Conclusion

Based on these results, it was shown that EORO along with NEORO exhibited propriety to significantly reduce levels of total cholesterol, triglycerides, and LDL in Triton and CSF-induced dyslipidemia models. Besides that, it was noticed that NEORO efficiently reduced lipid profile with a 200 times smaller dose compared to pure EORO, evidencing great improvement of anti-hypercholesterolemic and anti-hypertriglyceridemic activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil in the form of nanoemulsion. The anti-atherogenic propriety of EORO and NEORO was also shown by inhibition of atheroma plaque formation in the aorta, assessed by scanning electron microscopy; this anti-atherogenic potential of EORO can be explained at least partially by pharmacological mechanisms already described by major EORO compounds, like level reducer of LDL, antioxidant and anti-inflammatory.

Acknowledgements

Capes/Fapeap

Referências

1. Silva BQ, Hahn SR . Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou dislipidemias. *Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde* 2011; 2; 36-40.
2. Hernando ÁJB. Dianas terapéuticas en el tratamiento de las dislipemias: colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad y colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad. *Clínica e investigación en arteriosclerosis* 2014; 26; 3-6.
3. Santos HV et al. Caracterização laboratorial das dislipidemias e o uso de fitoterápicos. *Revista Multitexto* 2015;3; 21-28.
4. Dowla S et al. Dyslipidemia is associated with pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Lipidology* 2018.
5. Dong Z et al. Loss of LCAT activity in the golden Syrian hamster elicits pro-atherogenic dyslipidemia and enhanced atherosclerosis. *Metabolism-Clinical and Experimental* 2018;83; 245-255.
6. Lin CF et al. Epidemiology of Dyslipidemia in the Asia Pacific Region. *International Journal of Gerontology* 2018; 12 ;2-6.
7. Souza BSF et al. Effect of the treatment with Euterpe oleracea Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;90; 542-547.
8. Bonfim MR et al. Tratamento das Dislipidemias com Estatinas e Exercícios Físicos: Evidências Recentes das Respostas Musculares. *Arq Bras Cardiol* 2015;1;04 324-332.
9. Sedighi R et al. Preventive and protective properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in obesity and diabetes mellitus of metabolic disorders: a brief review. *Current Opinion in Food Science* 2015;2 ;58-70.
10. Satyal P et al. Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods* 2017; 6; 20.
11. Rašković A et al. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine* 2014 ;14 ;225.
12. Affholder MC et al. Transfer of metals and metalloids from soil to shoots in wild rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growing on a former lead smelter site: Human exposure risk. *Science of the Total Environment* 2013; 454; 219-229.
13. Borges RS et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. *Inflammopharmacology* 2017; 26; 1-13.
14. Cleff MB et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. *Rev Bras Plantas Med* 2012;14; 43-49.

15. Takayama C et al. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2016 ;6 ;677-681.
16. Ostertag F et al. Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *J Colloid Interface Sci* 2012;388 ; 95–102.
17. Handayani R et al. Extraction of coconut oil (*Cocos nucifera* L.) through fermentation system. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 2009;10; 3.
18. Fernandes C.P et al. HLB value, an importante parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Braz J Pharm* 2013; 23;108–114.
19. Faria e Souza B.S et al. Effect of Euterpe oleracea Mart.(Açaí) Oil on Dyslipidemia Caused by *Cocos nucifera* L. Saturated Fat in Wistar Rats. *Journal of medicinal food* 2017;20;830-837.
20. Duarte J.L et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Rev Bras Farmacogn* 2015; 25;189–189.
21. Carvalho HO et al. Hypoglycemic effect of formulation containing hydroethanolic extract of *Calophyllum brasiliense* in diabetic rats induced by streptozotocin. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2016;26; 10–18.
22. Solé I et al. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J Colloid Interface Sci* 2012; 376 ;133–139.
23. Bertges LC et al. Hyperlipidemia induced by Triton WR1339 (Tyloxapol) in Wistar rats. *Rev. Bras. Cien. Med. Saúde.* 2011;1; 29–31.
24. Lee H et al. Antioxidative and Cholesterol-Lowering Effects of Lemon Essential Oil in Hypercholesterolemia-Induced Rabbits. *Preventive nutrition and food science* 2018; 23; 8.
25. Jing L et al. Preventive and ameliorating effects of citrus D-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. *European Journal of Pharmacology* 2013;715; 46–55.
26. Yoon M. The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions. *Pharmacol .Res* 2009;60; 151–159.
27. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacological Research* 2006;53; 482-491.
28. Hassani FV et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2016; 389; 931-949.

29. Dickmann L.J et al. In vitro hepatotoxicity and cytochrome P450 induction and inhibition characteristics of carnosic acid, a dietary supplement with antiadipogenic properties. *Drug Metab Dispos* 2012; 40; 1263–1267.
30. Selmi S et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil components exhibit anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects in experimental diabetes. *Pathophysiology* 2017;24; 297-303.
31. Suanarunsawat T et al. Antioxidant Activity and Lipid-Lowering Effect of Essential Oils Extracted from *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed with a High Cholesterol Die. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46; 52–59.
32. Ribeiro KC, Shintaku ORC. A influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. *ConScientiae Saúde* 2008;3; 73-83.
33. Araujo AL. Correlação entre dieta lipídica poliinsaturada e aterogenese. *Rev Angiol Cirur Vasc* 2007;5; 15–22.
34. Blasi C. The autoimmune origin of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008; 201;17-32.
35. Jackson C.L et al. Assessment of unstable atherosclerosis in mice. *Am Heart Assoc* 2007;27; 714–720.

Figure 1. Chromatographic profile obtained from the analysis of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (EORO) by coupled gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS), where 2- α -pinene (8.13%), 10- Limonene (21.99%), 11- 1,8-cineole (33.70%) and 16- camphor (27.68%).

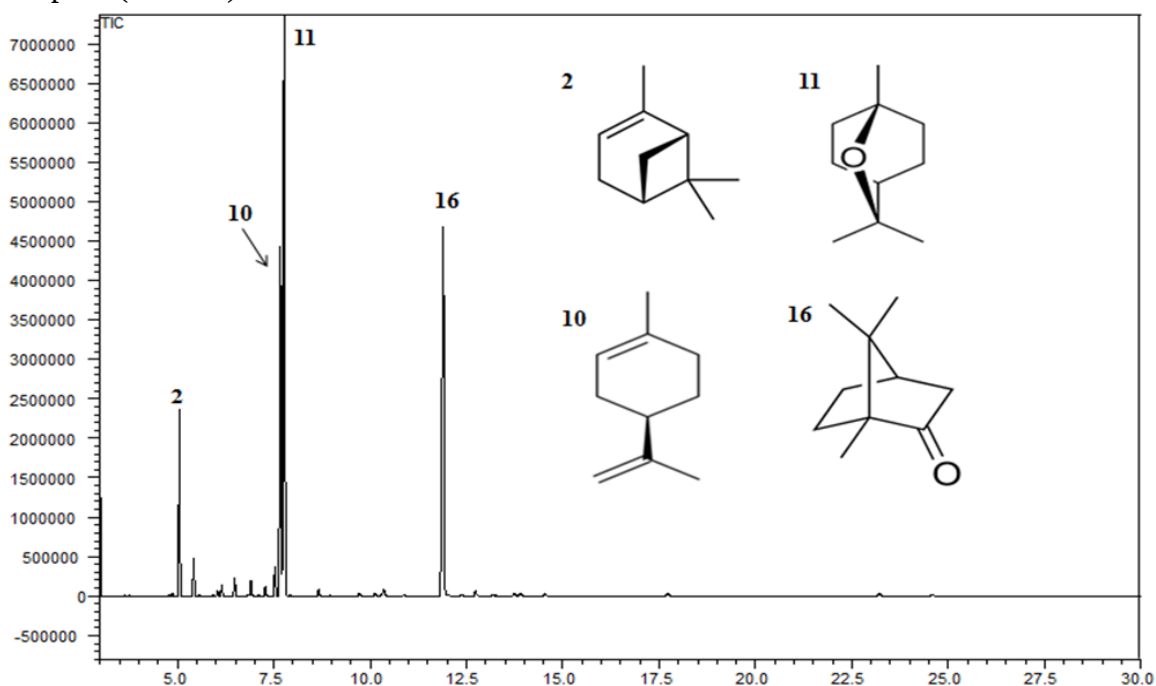


Table 1. Chemical constituents of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (ORO) determined by GC-MS analysis.

Peak	RT (min)	Compound	(%)	RI
1	4.872	α -thujene	0.11	928
2	5.054	α -pinene	8.13	935
3	5.424	Camphene	1.68	950
4	6.045	β -phellandrene	0.21	955
5	6.152	β -pinene	0.58	979
6	6.482	β -myrcene	0.90	993
7	6.911	α -phellandrene	0.77	1007
8	7.282	α -Terpinene	0.45	1018
9	7.532	o-cymene	1.65	1026
10	7.674	Limonene	21.99	1030
11	7.773	1,8-cineole	33.70	1033
12	8.666	γ -Terpinene	0.39	1059
13	9.724	Terpinolene	0.20	1091
14	10.128	β -linalool	0.16	1102
15	10.350	***	0.44	1108
16	11.897	Camphor	27.68	1147
17	12.736	Borneol	0.32	1168
18	13.739	α -terpineol	0.12	1193
19	13.899	α -campholenal	0.20	1197
20	14.532	Verbenone	0.18	1213
21	23.220	β -caryophyllene	0.14	1421
Identification percentage			100	

RT: Retention Time, RI: Index Retention

Table 2. Represents particle size and polydispersity index of the NEORO evaluated in triplicate over the period of 0, 1 and 7 days. Results with mean $\pm$ standard deviation (SD).

	Day 0	Day 1	Day 7
Size (nm)	129.1	149.4	146.7
	129.5	149.5	147.9
	128.8	150.1	152.2
Mean $\pm$ SD	129.1 $\pm$ 0.35	149.7 $\pm$ 0.3786	148.9 $\pm$ 2.892
Polydispersity Index	0,096	0,207	0,376
	0,085	0,187	0,381
	0,129	0,188	0,371
Mean $\pm$ SD	0.103 $\pm$ 0.023	0,194 $\pm$ 0.011	0,376 $\pm$ 0,005

Figure 2. Distribution of the NER particles obtained by Zetasizer, diluted nanoemulsion with water for injection (1:25) and evaluated in triplicate on days 0, 1 and 7 days.

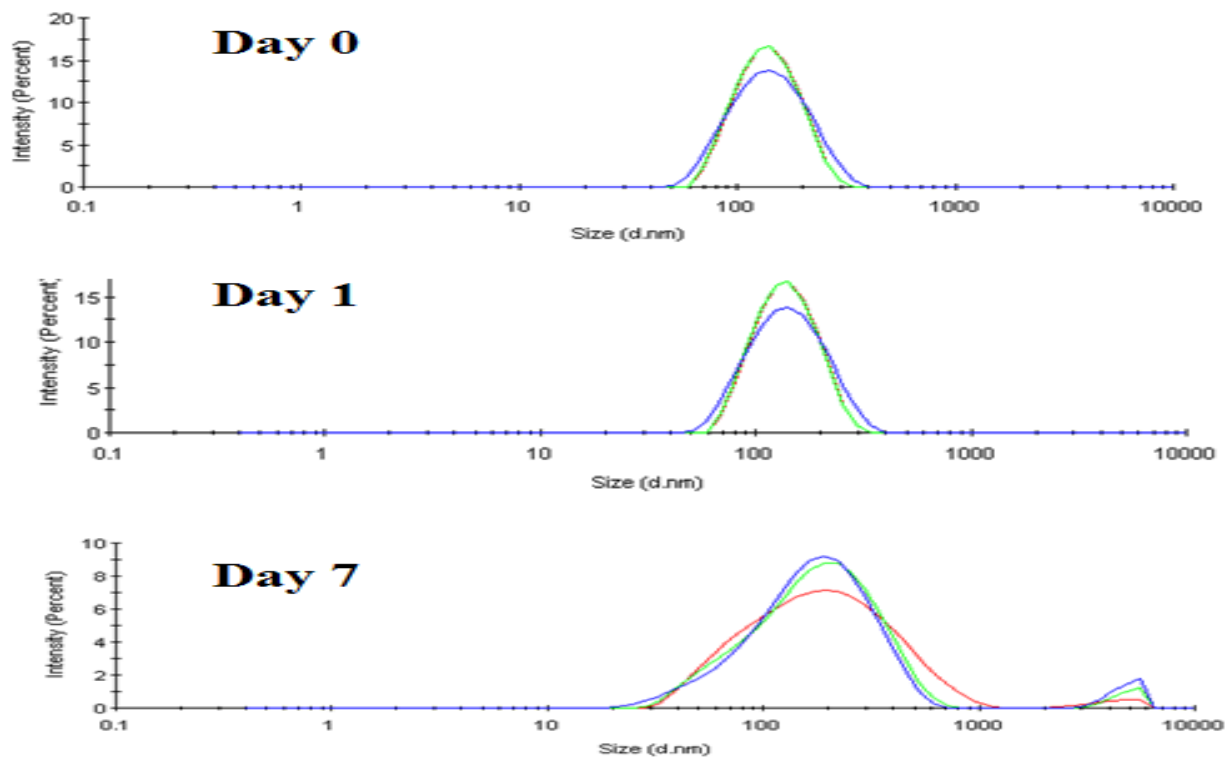


Figure 3. Effect of treatments with essential oil (OERO) and nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* (NEORO) on total cholesterol and triglycerides levels in Wistar rats with Triton-induced dyslipidemia. Bars represent the mean $\pm$ SD (n = 7 / group), with * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e *** (p < 0,01), representing statistically significant results in comparison with Triton Group. One-way ANOVA test followed by Tukey's test

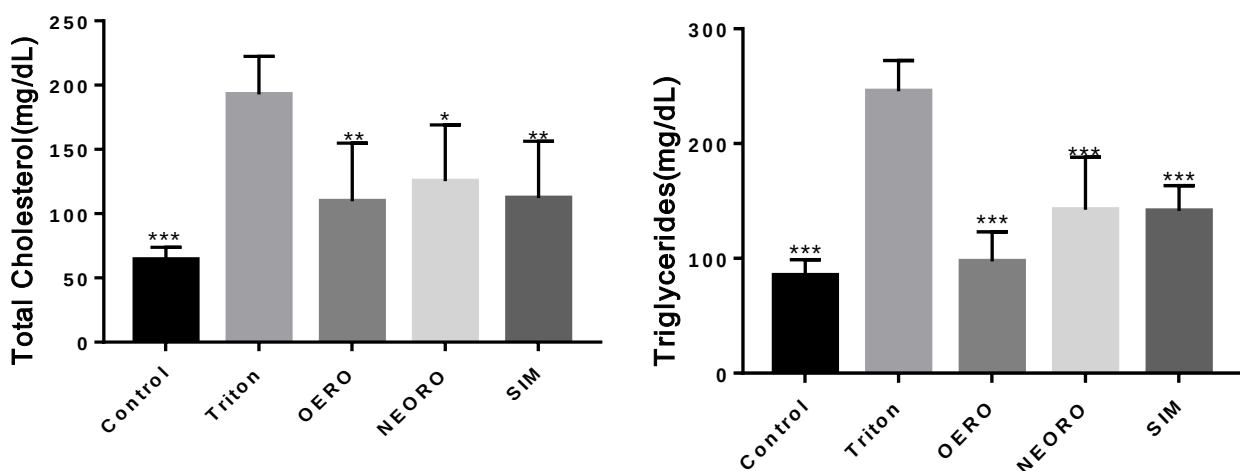


Figure 4. Effect of treatments with essential oil (OERO) and nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* (NEORO) on LDL and HDL cholesterol levels in Wistar rats with Triton-induced dyslipidemia. Bars represent the mean $\pm$ SD (n = 7 / group), with (P <0.01) and *** (p <0.01), representing statistically significant results in comparison with Triton Group. One-way ANOVA test followed by Tukey's test.

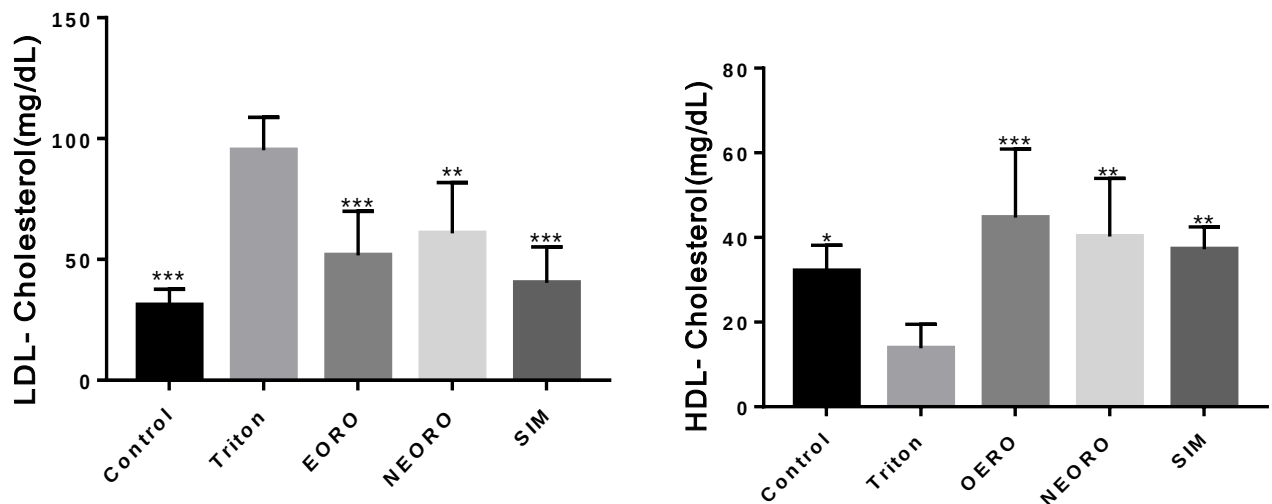


Figure 5. Effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil (EORO) and nanoemulsion (NEORO) treatments on body weight and abdominal fat of Wistar rats with CSF-induced dyslipidemia. Bars represent the mean $\pm$ SD (n = 7 / group), with ** (p <0.01) representing statistically significant results in comparison to the VEI + GSC Group. One-way ANOVA test followed by Tukey's test.

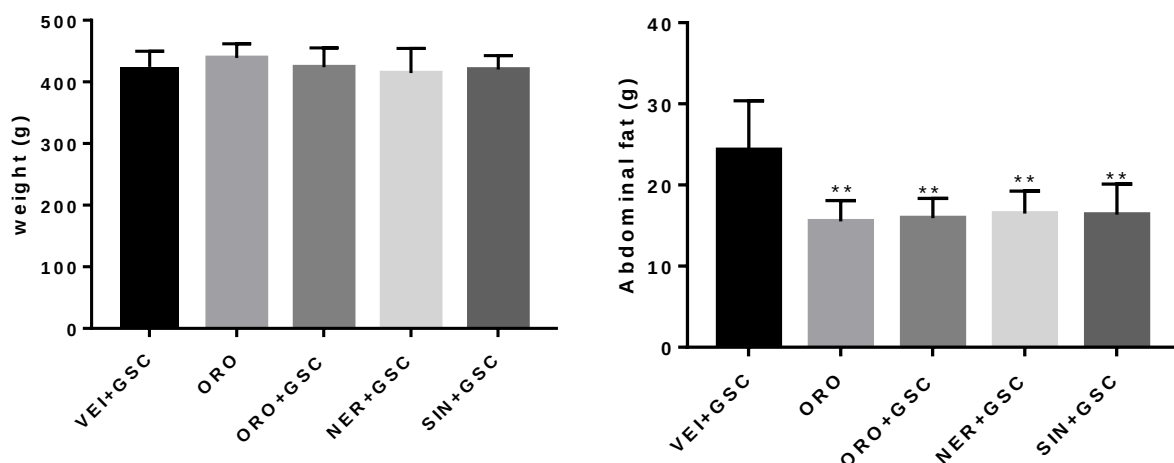


Table 3. Effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil (EORO) and nanoemulsion (NEORO) treatments on Wistar rats' body weight with CSF-induced dyslipidemia.

Organs	VEI+CSF	EORO	EORO+CSF	NEORO+CSF	SIM+CSF
Liver	17.14±1.11	16.41±0.28	15.90±1.61	16.77±2.38	16.29±1.58
Kidneys	1.63±0.10	1.83±0.17	1.62±0.14	1.83±0.19	1.64±0.14
Pancreas	1.15±0.32	1.37±0.33	1.22±0.17	1.48±0.19	1.50±0.31
Heart	1.37±0.12	1.54±0.20	1.42±0.11	1.49±0.15	1.32±0.07
Spleen	0.99±0.05	1.11±0.15	0.94±0.09	1.11±0.06	1.08±0.11
Lungs	1.98±0.17	2.04±0.16	1.93±0.16	2.12±0.12	1.94±0.21

Values represent the mean ± SD (n = 7 / group), one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Table 4. Effect of treatments with essential oil (EORO) and nanoemulsion (NEORO) of *Rosmarinus officinalis* on biochemical parameters of Wistar rats with CSF-induced dyslipidemia.

Parameters	VEI+CSF	EORO	EORO+CSF	NEORO+CSF	SIM+CSF
AST (U/dL)	87.28±12.97	85.08±11.93	70.0±9.52	90.28±23.76	78.71±9.08
ALT (U/dL)	43.28±8.47	28.55±4.61	33.3±13.06	35.71±6.79	34.2±3.91
TC (mg/dL)	116.57±7.69	59.1±8.20#	74.28±9.72#	66.71±15.61#	58.14±6.79#
HDL (mg/dL)	31.0±10.66	34.16±9.84	31.14±6.56	26.28±10.15	32.5±5.32
LDL (mg/dL)	44.71±11.14	9.5±6.18#	15.71±8.88#	16.85±8.06#	7.10±3.11#
Creatinine (mg/dL)	0.22±0.04	0.27±0.03	0.24±0.03	0.20±0.02	0.20±0.01
Glucose (mg/dL)	134.85±18.67	131.88±12.42	149.57±21.35	144.57±22.95	144.1±15.08
TG (mg/dL)	226.82±36.94	113.25±28.38#	139.28±29.73**	131.28±40.58#	154.2±49.62**
Ureia (mg/dL)	38.71±3.14	42.18±6.32	37.28±5.73	40.71±6.71	40.14±4.33

Values represent the mean ± SD (n = 7 / group), with ** (p <0.01) and # (p <0.001) representing statistically significant results compared to the VEI + GSC Group. ANOVA one-way test followed by Tukey's test.

Figure 6: SEM of section transversal of the thoracic aorta. 1) EORO; 2) EORO + CSF; 3) VEI+ CSF; 4) NEORO + CSF; 5) SIM + CSF. White arrow indicates the formation of the atheroma plaque in the vascular endothelium of the aortic artery.

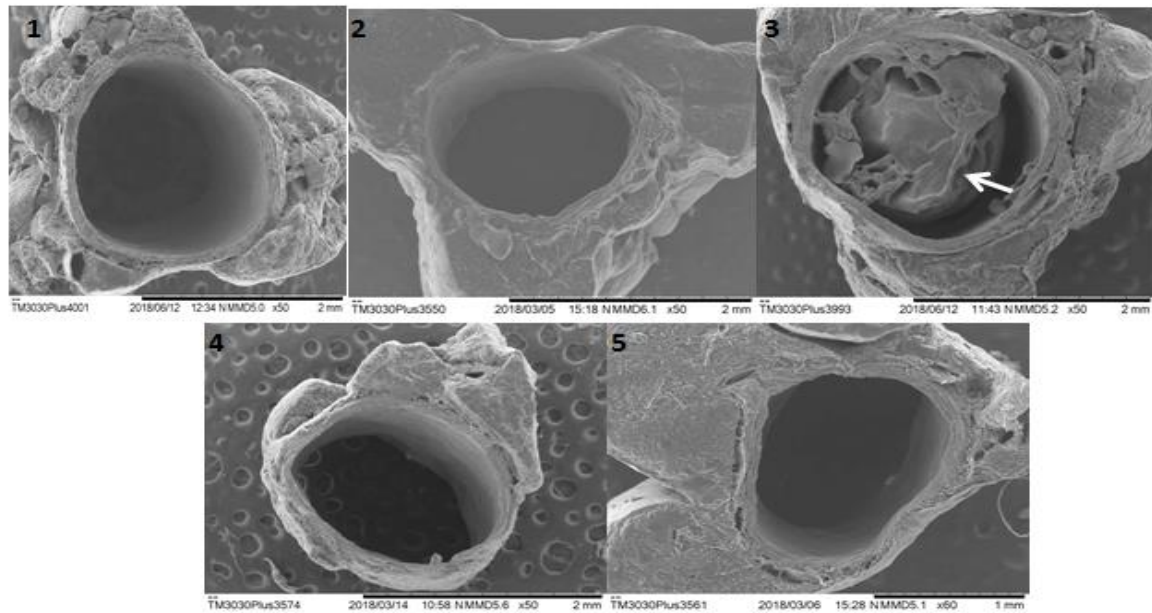


Figure 7: SEM of section longitudinal of the thoracic aorta. 1) EORO; 2) EORO + CSF; 3) VEI+ CSF; 4) NEORO + CSF; 5) SIM + CSF. White arrow indicates the formation of the atheroma plaque in the vascular endothelium of the aortic artery.

