



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THAMARA DE OLIVEIRA FERRAZ

**ESTUDO COMPARATIVO DA NEUROATIVIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG. E
SUA NANO-EMULSÃO**

MACAPÁ
2021

THAMARA DE OLIVEIRA FERRAZ

**ESTUDO COMPARATIVO DA NEUROATIVIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG. E
SUA NANO-EMULSÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Caio Pinho
Fernandes

Macapá
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá.
Elaborado por Mário das G. Carvalho Lima Júnior – CRB-2/1451

Ferraz, Thamara de Oliveira.

Estudo comparativo da neuroatividade do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. e sua nano-emulsão / Thamara de Oliveira Ferraz; orientador, Caio Pinho Fernandes. - Macapá, 2021.

126f.

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

1. Plantas medicinais – Catinga de mulata. 2. Saúde – Doenças mentais – Depressão. 3. Farmacologia – Ensaíos. I. Fernandes, Caio Pinho, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD – 615.537 / F381e

THAMARA DE OLIVEIRA FERRAZ

**ESTUDO COMPARATIVO DA NEUROATIVIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG. E SUA
NANO-EMULSÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal
do Amapá, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Data de Aprovação: ____/____/____

Dr. Caio Pinho Fernandes

Orientador – Presidente da banca

Dr. José Luiz Martins do Nascimento – UFPA

Primeiro avaliador

Dra. Samanta Cardozo Mourão – UFF

Segunda avaliadora

Em memória de Vanilda Longuinha dos
Santos, minha "vó" Vanda, a quem devo tudo
o que sou de bom e apesar dela todo o resto.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica pela disponibilização de toda a estrutura necessária para o desenvolvimento das nano-emulsões e à equipe pelo companherismo durante todo o meu trabalho, é uma honra e um prazer fazer parte desse grupo de pesquisadores de excelência.

Ao Laboratório de Pesquisa em Fármacos e à Plataforma Zebrafish pela disponibilização da estrutura necessária para a caracterização das nano-emulsões e realização dos ensaios *in vivo* com zebrafish. E ao Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal pela colaboração com os estudos *in silico*.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Caio Pinho Fernandes, pela oportunidade de escolhermos e delinearmos um projeto que tivesse elementos tão caros à mim, por ter ao longo de toda a execução do trabalho estado ao meu lado ensinando e aprendendo de forma simultânea e, principalmente, por emprestar suas habilidades tão opostas as minhas que tornaram esta dissertação possível, no formato como ela é. Caio, Essa dissertação é tão sua quanto minha. Muito obrigada.

Aos colegas de laboratório que me emprestaram seu tempo e conhecimento que tanto ajudaram na condução deste trabalho, Bruna, Mikaela, Lisset, Diego, Maria Helena e Márcio.

Ao meu pai, Itamar de Oliveira, pelo apoio e interesse genuíno em tudo o que desenvolvo. Por nunca deixar de demonstrar amor, carinho e orgulho independente das minhas escolhas. E à minha mãe, Ana Maria Ferraz, por ser exemplo de força, por me mostrar sempre que eu sou capaz de mais e melhor.

Aos meus familiares e amigos, em especial, Izabel, Brazilino, Rogério, Francineide, Taís, Oton, Ana Aparecida e Diego.

Aos meus amigos Juliana, João Paulo e Priscila que me acompanharam à distância e não me deixaram ser só mesmo em uma nova cidade. Vocês ofereceram seus olhos para ler e ouvidos para me ouvir e me apoiar.

E aos meus amigos Maíra, Emerson, Gisele, Rodrigo, Raquel, Tássia, Natália, Bianca e Aline, que me acolheram em Macapá e compartilham tantos momentos alegres e oferecem colo quando necessário.

"A doença é uma zona noturna da vida, uma cidadania mais onerosa. Todos que nascem têm dupla cidadania, no reino dos sãos e no reino dos doentes. Apesar de todos preferirmos só usar o passaporte bom, mais cedo ou mais tarde nos vemos obrigados, pelo menos por um período, a nos identificarmos como cidadãos desse outro lugar" **(Susan Sontag)**

"Sou como a haste fina que qualquer brisa verga

Mas nenhuma espada corta

Não mexe comigo que eu não ando só" **(Maria Bethânia)**

Introdução: A ansiedade e a depressão são os transtornos mentais mais prevalentes mundialmente. Elas impactam diretamente na qualidade de vida e na produtividade, especialmente pelo seu difícil tratamento com a farmacoterapia disponível atualmente. Podem acompanhar um indivíduo por muitos anos, gerando grande impacto no fardo global de doenças. A busca por plantas medicinais potencialmente ansiolíticas tem sido uma abordagem relevante no desenvolvimento de alternativas terapêuticas. A catinga de mulata (*Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng.), uma planta aromática da família Lamiaceae mostrou-se neuroativa, contando com atividades anticonvulsivante, antidepressiva e sedativa em pesquisas utilizando roedores. Assim, o uso de ensaios comportamentais utilizando *zebrafish* para a avaliação do óleo essencial e sua nano-emulsão visando comparar suas atividades no sistema nervoso central pode fornecer valiosas informações acerca dessa potencial alternativa terapêutica para as doenças mentais comuns. **Objetivo:** Obter uma nano-emulsão a partir do óleo essencial de *A. suaveolens* que seja neuroativa e comparar sua atividade ansiolítica após a nano-emulsificação. **Metodologia:** o óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e a partir dele as nano-emulsões foram preparadas por um método de baixo aporte energético. Foram avaliados fatores de influência na geração e estabilização das nano-emulsões, bem como a influência do tempo e temperatura na nano-emulsão selecionada. Ensaios de toxicidade foram realizados utilizando embriões e adultos de *zebrafish* e a dose letal mediana do óleo essencial foi determinada por análise PROBIT. A comparação da neuroatividade do óleo essencial e sua nano-emulsão foi realizada a partir do ensaio do tanque novo e estudos *in silico* das substâncias majoritárias foram realizados a fim de prever os potenciais mecanismos de ação sedativos. **Resultados e discussões:** Foram obtidas nano-emulsões com aspecto translúcido e azulado pronunciado, associado ao efeito Tyndall evidente apresentando tamanho médio de diâmetro de gotícula de 70 nm e índice de polidispersão abaixo de 0,2. Esse fitocoloide, utilizada nesse estudo como nano-emulsão selecionada para os ensaios biológicos, não apresentou alterações nos primeiros dias de armazenamento. O teste de performance utilizando embriões de *zebrafish* permitiu sugerir o aumento da atividade biológica da nano-emulsão comparativamente a atividade observada para o óleo essencial não nano-emulsificado. Em estudos de toxicidade preliminar aguda, a neuroatividade e a intensificação a ação promovida pela nano-emulsificação foi visualizada a partir da indução de hipnose no grupo tratado com a nano-emulsão e apenas sedação no grupo tratado com o óleo essencial não nano-emulsificado. A dose letal mediana total foi de 502,808 mg.kg⁻¹. Aumento semelhante do comportamento exploratório, relacionado à efeito tipo-ansiolítico, foi observado em dose da nano-emulsão selecionada 10 vezes inferior ao óleo essencial não-nanoemulsionado. No entanto, possíveis interferências de agregados de colóides que afetam curvas sigmóide clássicas, efeito sedativo com tendência à hipnose próximo a altas doses e outros fatores podem estar influenciando. **Conclusão:** Esse estudo abre perspectivas para uso de inibidores da Maturação de Ostwald, incluindo associados ao β -farneseno, considerado um dos possíveis constituintes bioativos, bem como verificação da atuação desses sob a forma livre ou absorção via fusão das nanogotículas com as membranas, com modificação do *n* e/ou novos aprimoramento do modelo em *zebrafish*. A mudança do par de tensoativos e redução drástica do tamanho de

gotícula, através de técnica amigável ao meio ambiente, contribui para o estado da arte da nanobiotecnologia fitofarmacêutica e desenvolvimento de novos nanofitoterápicos.

Palavras-Chave: Efeito ansiolítico. teste do tanque novo. *zebrafish*.

Agradecimentos: CAPES, INCT-Rennofito, Propesg-PAPESQ.

ABSTRACT

Introduction: Anxiety and depressions are the most prevalent mental disorders worldwide. They impair life quality and productivity, especially due to the available pharmacotherapy. Individuals can face these diseases for years, being a great impact globally. Searching for potentially anxiolytic medicinal plants have been a promising approach in the development of therapeutic alternatives. *Catinga de mulata* (*Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng.) is an aromatic plant that belongs to the Lamiaceae family, considered neuroactive and confirmed as anticonvulsant, antidepressant and sedative in studies with rodents. Thus, the utilization of behavioral studies using *zebrafish* aiming to compare its essential oil and nano-emulsion in the central nervous system may provide valuable information about the potential therapeutic of this natural product for common mental disorders.

Objectives: Obtaining a nano-emulsion based on the essential oil of *A. suaveolens*, being neuroactive, and comparing the anxiolytic activity after the nano-emulsification.

Material and Methods: the essential oil was obtained by hydrodistillation and the nano-emulsions were prepared by a low energy method. Factors of influence in the generation and stabilization of the nano-emulsions, such as influence of time and temperature, were examined in the selected nano-emulsion. Toxicity assays were performed in *zebrafish* embryo and adults. Lethal median dose of the essential oil was determined by PROBIT analysis. The comparison of the neuroactivity of the essential oil and its nano-emulsion was performed through the novel tank test and the *in silico* study of the major compounds was performed in order to predict the potential desative mechanism of action. **Results and discussion:** Nano-emulsões with translucent and pronounced bluish reflect were obtained, being the last associated to the Tyndall effect. Size diameter was 70 nm and polydispersity index was below 0.2. This phytoemulsion, used in the present study as selected nano-emulsion for the biological assays, did not present alterations in the first days of storage. The performance assay using *zebrafish* embryo suggest enhancement of biological activity, comparing nano-emulsion to the activity of non-nanoemulsified essential oil. Preliminary acute toxicity assay showed intensification of action and neuroactivity after nano-emulsification, since hypnosis was observed in the group treated with nano-emulsion, while only sedation was observed in the group treated with non-nanoemulsified essential oil. The median lethal dose was 502,808 mg.kg⁻¹. Similar augmentation of exploratory behavioral, related to anxiolytic-type effect, was observed in a dose of the selected nano-emulsion 10x lower of the essential oil. However, possible interference of aggregate of colloids that affect classical sigmoidal curve, sedative effect with tendency to hypnosis at high dose and other factors may be influencing. **Conclusions:** This study opens perspectives to the utilization of Ostwald ripening inhibitors, including associated to β -farnesene, considered one of the possible bioactive constituents. Also verification of the action in the free form or absorption through fusion of the nanodroplets with the membranes, through modification of the *zebrafish* model. The change in the surfactant pair and dramatic reduction of droplet size, through an ecofriendly technique, contributes to the state of the art of phytopharmaceutical nanobiotechnology and development of nanophytotherapies.

Keywords: Anxiolytic effect. novel tank test. *zebrafish*.

Acknowledgements: CAPES, INCT-Rennofito, Propeg-PAPESQ.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas químicas dos neurotransmissores	27
Figura 2 -	Aspectos neurofisiológicos do modelo cognitivo de ansiedade de Beck	30
Figura 3 -	Estrutura química do monoterpeneo linalol	35
Figura 4 -	Excerto da obra Flora Brasiliensis contendo menção à <i>Aeollanthus suavis</i>	37
Figura 5 -	Excerto da obra Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e à direita, fotografia do autor Pio Corrêa	38
Figura 6 -	Estruturas químicas do <i>E</i> - β -farneseno, δ -decen-2-lactona e acetato de linalila	40
Figura 7 -	Rota biossintética de alguns terpenóides de importância para a <i>Aeollanthus suaveolens</i>	41
Figura 8 -	Estruturas químicas da massoiolactona e δ -lactona	43
Figura 9 -	Representação esquemática de protocolo para preparação de nano-emulsões a partir do método de determinação do EHLr de óleos	55
Figura 10 -	Representação esquemática da Maturação de Ostwald e <i>Compositional Ripening</i>	57
Figura 11 -	Representação esquemática do aparato utilizado no teste do tanque novo	67
Figura 12 -	Fotografia do aparato utilizado no teste do tanque novo	67
Figura 13 -	Representação esquemática de todo delineamento experimental utilizado neste estudo	71
Figura 14 -	Desenvolvimento embrionário nas primeiras 72 horas pós-fertilização e larva após 7 dias	91
Figura 15 -	Fotografias seqüenciais de <i>zebrafish</i> apresentando paralisia logo após a administração da NES na (A) superfície, (B) meio, (C-E) fundo do aquário. Por fim, após aproximadamente 1 minuto, em (F) o mesmo animal consciente.	93
Figura 16 -	Representação das interações entre as moléculas de <i>A. suaveolens</i> e GABA-AT	108

Figura 17 -	Representação das interações entre as moléculas de <i>A. suaveolens</i> e 5HT _{3A}	110
Figura 18 -	Representação das interações entre as moléculas de <i>A. suaveolens</i> e 5HT _{1A}	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Manifestações sintomáticas e potenciais biomarcadores da depressão	25
Tabela 2 -	Comparação de parâmetros que podem ser avaliados em roedores e <i>zebrafish</i> em ensaios comportamentais baseados na novidade, como o teste do campo aberto e o teste do tanque novo	49
Tabela 3 -	Desenho experimental do teste do tanque novo utilizado neste estudo	66
Tabela 4 -	Valores padrão para os descritores farmacocinéticos	69
Tabela 5 -	Componentes do óleo essencial de <i>A. suaveolens</i>	74
Tabela 6 -	Distribuição do tamanho de gotícula da fase aquosa saturada com OE de <i>A. suaveolens</i>	76
Tabela 7 -	Distribuição do tamanho de gotícula (dia 0) das nano-emulsões preparadas com OE de <i>A. suaveolens</i> e polissorbato 85	77
Tabela 8 -	Distribuição do tamanho de gotícula (dia 0 e dia 1) das nano-emulsões diluídas preparadas com OE de <i>A. suaveolens</i> e polissorbato 80/monooleato de sorbitano (EHL 13)	78
Tabela 9 -	Variação das gotículas entre 0 e 24h das gotículas da nano-emulsões diluídas preparadas com OE de <i>A. suaveolens</i> e polissorbato 80/monooleato de sorbitano (EHL 13)	78
Tabela 10-	Distribuição do tamanho de gotícula (dia 0) das nano-emulsões preparadas com OE de <i>A. suaveolens</i> e polissorbato 80/trioleato de sorbitano (EHL 13)	79
Tabela 11-	Distribuição do tamanho de gotícula das nano-emulsões concentradas e diluídas preparadas com OE de <i>A. suaveolens</i> e polissorbato 80/trioleato de sorbitano (EHL 13)	80
Tabela 12-	Comparação de variação de gotícula ($VG_{0,1}^*$) entre as nano-emulsões preparadas com OE de <i>A. suaveolens</i> e dois pares de tensoativos (EHL 13) em diferentes fases aquosas e RTO	81
Tabela 13-	Distribuição do tamanho de gotícula das nano-emulsões	84

preparadas com OE de *A. suaveolens* dois pares de tensoativos não-iônicos

Tabela 14-	Análise PROBIT do OE não nano-emulsificado de <i>A. suaveolens</i> frente a adultos de <i>zebrafish</i>	97
Tabela 15-	Resultados de predição de atividade <i>in silico</i>	104
Tabela 16-	Resultados de predição farmacocinética	105
Tabela 17-	Resultados de predição toxicidade <i>in silico</i>	106
Tabela 18-	<i>Docking</i> molecular entre GABA-AT e as três moléculas estudadas	107
Tabela 19-	<i>Docking</i> molecular entre 5HT _{3A} e as três moléculas estudadas	109
Tabela 20-	<i>Docking</i> molecular entre 5HT _{1A} e as três moléculas estudadas	111

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição de tamanho de gotícula da NES no dia do preparo (A), após 24 horas (B) e após 48 horas (C). A direita fotografia do aspecto macroscópico da NES no dia do preparo (concentrada e diluída)	83
Gráfico 2 -	Dados de diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão da NES ao longo do tempo	85
Gráfico 3 -	Influência da rampa linear de incremento da temperatura em função da distribuição do tamanho de gotícula	86
Gráfico 4 -	Influência da rampa linear de incremento da temperatura em função do índice de polidispersão no dia do preparo (A), após 14 dias (B), 21 dias (C) e 28 dias (D)	88
Gráfico 5 -	Modelo ajustado com intervalos de confiança de 95%	96
Gráfico 6 -	Resultados de diferentes parâmetros avaliados no ensaio do tanque novo	99
Gráfico 7 -	Resultados de proporção topo/fundo pós ensaio comparativo entre OE não nano-emulsificado e NES	101
Gráfico 8 -	Resultados de entradas no topo pós ensaio comparativo entre OE não nano-emulsificado e NES	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Aumento de gotícula
ANOVA	Análise de variância de uma nova via
APA	Sociedade Americana de Psicologia
AVC	Acidente vascular cerebral
BBB	Penetração na barreira hematoencefálica
CDDI	<i>Cortellis Drug Discovery Intelligence</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
DG	Diminuição de gotícula
DL ₅₀	Dose letal mediana
DSM-5	Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição
EDL	Espalhamento Dinâmico da Luz
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EHLr	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico requerido
E-value	Valor esperado
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA-AT	GABA-aminotransferase
GCEM	Grupo Conquista de Ervas Medicinais
HIA	Absorção intestinal humana
iMAO	Inibidores da monoamina oxidase
IP	Índice de polidispersão
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
MAO	Inibidores da monoaminaoxidase
MCT	Triglicerídeos de cadeia média
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney cells</i>
MES	Convulsão por máximo eletrochoque
NE	Nano-emulsão
NES	Nano-emulsão selecionada
NMDA	N-metil D-Aspartato
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde

PA	Probabilidade de atividade
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDMA	Pirofosfato de dimetialila
PF	Pirofosfato de farnesila
PF sintase	Pirofosfato de farnesila sintase
PG	Pirofosfato de geranila
PG sintase	Pirofosfato de geranila sintase
PI	Probabilidade de ser inativa
PIP	Pirofosfato de isopentenila
PPB	Ligação a proteínas plasmáticas PPB
PTZ	Pentilenotetrazol
RTO	Relação-tensoativo-óleo
SEA	<i>Similarity ensemble approach</i>
SNC	Sistema nervoso central
T3	Tiroxina
TC	Terapia cognitiva
TCC	Terapia cognitivo comportamental
TMC	Transtornos mentais comuns
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
VG	Variação de gotícula

1 INTRODUÇÃO	19
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS: DEPRESSÃO E ANSIEDADE	23
3.2 TRANSTORNOS DEPRESSIVOS	24
3.3 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	28
3.4 PRODUTOS NATURAIS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS	32
3.5 <i>AEOLLANTHUS SUAVEOLENS</i> MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE)	36
3.6 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS COMPORTAMENTAIS PARA INVESTIGAR ATIVIDADE ANSIOLÍTICA	46
3.7 <i>ZEBRAFISH</i>	48
3.8 NANO-EMULSÕES	52
3.8.1 FATORES DE INFLUÊNCIA NA FORMAÇÃO E COMPORTAMENTO DE NANO-EMULSÕES	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 MATERIAL VEGETAL	58
4.2 ÓLEO ESSENCIAL	58
4.2.1 EXTRAÇÃO	58
4.2.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	58
4.3 NANO-EMULSÕES	59
4.3.1 MÉTODO DE NANO-EMULSIFICAÇÃO	59
4.3.2 DESENVOLVIMENTO DA NANO-EMULSÃO	59
4.3.2.1. Fatores de influência na geração e estabilização das nano-emulsões	59
4.3.3 CARACTERIZAÇÃO	61
4.3.3.1. Espalhamento Dinâmico da Luz (EDL)	61
4.3.3.2. Potencial zeta	61
4.3.4 NANO-EMULSÃO SELECIONADA	61
4.3.4.1 Influência do tempo	62
4.3.4.2. Influência da temperatura	62
4.4 <i>ZEBRAFISH</i>	62
4.4.1 ASPECTOS ÉTICOS	62
4.4.2 ACLIMATAÇÃO	62
4.4.3 OBTENÇÃO DOS OVOS DE <i>ZEBRAFISH</i>	63
4.4.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXES	63
4.4.5 ENSAIO PRELIMINAR DE TOXICIDADE AGUDA COMPARATIVA	63
4.4.6 TOXICIDADE ORAL AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL	64
4.4.7 TESTE DO TANQUE NOVO	64

4.5 ESTUDOS IN SILICO	68
4.5.1 PREDIÇÃO DE ATIVIDADE	68
4.5.2 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS	69
4.5.3 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS	70
4.5.4. <i>DOCKING</i> MOLECULAR	70
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 ÓLEO ESSENCIAL	73
5.2 NANO-EMULSÕES	75
5.2.1 NANO-EMULSÃO SELECIONADA	85
5.3 ZEBRAFISH	89
5.3.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXES	90
5.3.2 ENSAIO PRELIMINAR DE TOXICIDADE AGUDA COMPARATIVA	91
5.3.3 TOXICIDADE ORAL AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL	95
5.3.4 TESTE DO TANQUE NOVO	98
5.4 ESTUDOS IN SILICO	102
5.4.1 PREDIÇÃO DE ATIVIDADE	102
5.4.2 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS	104
5.4.3 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS	105
5.4.4 <i>DOCKING</i> MOLECULAR	107
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	113
REFERÊNCIAS	114
LISTA DE APÊNDICES	122
APÊNDICE 1 – VARIAÇÃO DE GOTÍCULA ENTRE 0 E 48 HORAS DAS NANO-EMULSÕES PREPARADAS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE A. SUAVEOLENS E POLISORBATO 80/TRIOLEATO DE SORBITANO (EHL = 13) ARMAZENADAS CONCENTRADAS E DILUÍDAS	122
LISTA DE ANEXOS	123
ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAP)	123
ANEXO 2 – RESUMO APRESENTADO EM FORMATO DE PÔSTER NO EVENTO 22ND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROENCAPSULATION	124
ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO	125

1 INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais comuns (TMC) são a ansiedade e a depressão, elas recebem essa denominação por serem as doenças emocionais mais prevalentes, afetando a qualidade de vida e o desempenho laboral de milhões de pessoas no mundo todo. A frequência de comorbidade é grande e a prevalência dos TMC é maior em mulheres. A ansiedade está relacionada a uma resposta ao medo e a preocupação frente a ameaças de forma desproporcional, gerando prejuízos das atividades normais. A depressão pode ser caracterizada pela presença de uma avaliação negativa de si mesmo, pessimismo, tristeza e a falta de prazer em atividades antes consideradas prazerosas por períodos maiores que duas semanas e em casos mais graves as ideações suicidas. O tratamento eficaz das TMC possui grande complexidade e envolve o acompanhamento multiprofissional, destaca-se especialmente a necessidade de psicoterapia e um adequado esquema farmacoterapêutico.

A farmacoterapia da depressão é baseada na teoria das monoaminas que considera que o cérebro adoecido apresenta baixas concentrações dos principais neurotransmissores envolvidos nas sinapses químicas: noradrenalina, dopamina e serotonina. Esse estado pode acontecer por deficiência na síntese, expressão diminuída dos receptores na fenda sináptica ou, ainda, aumento da degradação desses. Logo, os antidepressivos disponíveis hoje atuam como inibidores da recaptação de um (seletivos) ou mais (não seletivos) neurotransmissores ou como inibidores da monoaminooxidase (MAO), em ambos os casos, o efeito é a elevação desses neurotransmissores na fenda sináptica. As altas taxas de falha da terapia na primeira escolha do fármaco sugerem que outros fatores estejam envolvidos no desenvolvimento dos sintomas depressivos e que outros agentes mais eficazes são necessários.

Na ansiedade, a farmacoterapia desempenha um papel coadjuvante no tratamento em longo prazo. Os fármacos sedativos e hipnóticos da classe dos benzodiazepínicos podem ser utilizados para a melhora rápida dos sintomas e auxiliarem na insônia, muito comum nos transtornos de ansiedade, no entanto, não são considerados como primeira escolha, pois, além de diversos efeitos adversos relacionados ao prejuízo da concentração e memória, também causam tolerância e dependência. A estratégia farmacoterapêutica de primeira linha utilizada são os

antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e o agonista de receptores de serotonina buspirona. Assim como no tratamento farmacológico da depressão, a baixa eficácia terapêutica dessa abordagem suscita a necessidade da investigação de novas alternativas para o tratamento desses transtornos.

Adicionalmente, o uso de plantas medicinais com finalidades para o alívio dos sintomas relacionáveis aos TMC consiste em uma prática tradicional, podendo ser citadas, por exemplo, a Erva-de-São-João (*Hypericum perforatum* L.) indicada para o tratamento de estados leves de depressão, a camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e o maracujá (*Passiflora incarnata* L.) utilizada como calmante e ansiolítico leve e a raiz de Valeriana (*Valeriana officinalis* L.) para de casos de insônia, entre outras. Neste contexto, a realização de esforços direcionados para a busca de plantas medicinais com potencial atividade ansiolítica mostra-se uma estratégia relevante.

A *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng., popularmente chamada de catinga de mulata é uma planta aromática pertencente à família Lamiaceae tradicionalmente utilizada em rituais mágico-religiosos, no tratamento de males espirituais e como anticonvulsivante. As atividades anticonvulsivantes, antidepressivas e sedativas da *A. suaveolens* foram estudadas em roedores e relacionadas aos constituintes majoritários do seu óleo essencial, destacando-se o linalol, o β -farneseno e a massoialactona.

Métodos de estudos translacionais utilizando-se o teleósteo *zebrafish* vêm ganhando destaque na pesquisa neuropsiquiátrica. Sua alta homologia genética com os humanos e por se tratar de um modelo alternativo que utiliza-se de um vertebrado menos senciente, de baixo custo de manutenção e rápida reprodução, os ensaios com esse modelo permitem a avaliação toxicológica e farmacológica de novas substâncias em consonância com os princípios de bem-estar animal.

As nano-emulsões são dispersões coloidais em que as diminutas gotículas da fase interna encontram-se em escala nanométrica, geralmente menores que 200 nm. Elas são cineticamente estáveis e termodinamicamente instáveis e podem proporcionar vantagens quanto a modificação de propriedades físico-químicas e de propriedades biológicas, como a potencialização dos efeitos no sistema nervoso central.

Isto posto, objetiva-se nesta dissertação o emprego de técnicas de nano-emulsificação de baixo aporte de energia para a veiculação de compostos bioativos

lipofílicos do óleo essencial de *A. suaveolens* e a comparação de sua neuroatividade com o óleo essencial não nano-emulsificado por meio de ensaios *in vivo* comportamentais usando *zebrafish*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter uma nano-emulsão neuroativa a base do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* e comparar sua atividade ansiolítica com sua forma não-nanoestruturada em modelo experimental utilizando-se *zebrafish*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver a nano-emulsão a base do óleo essencial;
- Caracterizar a nano-emulsão obtida quanto à espalhamento dinâmico da luz;
- Avaliar o comportamento da nano-emulsão selecionada frente à variação de temperatura e ao armazenamento;
- Realizar ensaio de performance da nano-emulsão selecionada para verificação de possível incremento de atividade biológica;
- Realizar ensaio de toxicidade aguda do óleo essencial e sua nano-emulsão selecionada em *zebrafish* adulto;
- Avaliar a atividade ansiolítica do óleo essencial e sua nano-emulsão selecionada em *zebrafish* adulto;
- Realizar estudo in silico para predição de atividade, propriedades farmacocinéticas e toxicológicas e *docking* molecular.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS: DEPRESSÃO E ANSIEDADE

Os transtornos depressivos e de ansiedade são altamente prevalentes na população mundial e, por isso, são chamados de transtornos mentais comuns. Segundo a última estimativa da Carga Global de Doenças, realizado em 2019 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) os transtornos de depressão atingiram a marca de 2º maior número de anos vividos com a doença, enquanto os transtornos de ansiedade ocupam o oitavo lugar nessa lista. A depressão e a ansiedade geralmente se iniciam na vida produtiva e causam prejuízos importantes na qualidade de vida das pessoas e na sua capacidade de realizar atividades comuns como trabalho, convívio social e lazer. Os dados referentes aos transtornos depressivos mostram uma taxa de prevalência (a cada 100.000 pessoas) de 4.158,4 mulheres e 2.713,3 homens e número de anos vividos com a doença de 702,1 para mulheres e 452,2 para homens. Já os dados para os transtornos de ansiedade indicam uma taxa de prevalência (a cada 100.000 pessoas) de 4.694,7 mulheres e 2.859,8 homens e número de anos vividos com a doença de 444,9 para mulheres e 275,2 para homens. A prevalência de transtornos de ansiedade nas Américas é de 7,7% para mulheres e de 3,6% para homens. Na mesma região, ocorreram 15% do total de casos de depressão.

A maior proporção desses transtornos se concentra em mulheres, chegando a 2:1 e é consolidada na literatura. Ela parece ser explicada por predisposição genética e fatores sociais (DSM-5, 2013). Na verdade, estudos de associação de genoma completo relatam que um *score* genético para depressão foi associado com transtornos de ansiedade, sugerindo fatores de risco genéticos em comum. Este fato pode explicar a alta taxa de comorbidade entre os distúrbios (SHIMADA-SUGIMOTO; OTOWA; HETTEMA, 2015). Purves e colaboradores (2020) encontraram robustas associações entre *loci* significativos em todo genoma que foram previamente relacionados à depressão e neuroticismo também foram relacionados com a ansiedade. A metilação do DNA também foi relacionada como um mecanismo epigenético que favorece o desenvolvimento de distúrbios ansiosos após a adolescência em indivíduos que foram expostos à situações estressoras na infância (SHIMADA-SUGIMOTO; OTOWA; HETTEMA, 2015).

A depressão na sua forma grave pode levar ao suicídio, que entrou para a lista das vinte causas de morte mais frequentes no mundo em 2015, chegando a 1,5% das mortes. Já em 2016, foi considerada a segunda principal causa de morte entre jovens de 15 a 29 anos em todo o mundo. Esta é uma causa de morte que pode ser prevenida por estratégias de baixo-custo, no entanto, alguns obstáculos como a estigmatização e a falta de informações de qualidade prejudicam o planejamento e a implementação dessas estratégias (OMSa, 2021). Em contraste à prevalência de distúrbios de ansiedade e depressivos, mais homens cometem suicídio do que mulheres. Os dados mais recentes da OMS mostram que, no Brasil, a cada 100.000 habitantes 10,3 homens e 2,8 mulheres tiraram a própria vida em 2019 (OMSb, 2021). Este fato pode ser associado ao estigma social enfrentado por homens em sofrimento psíquico que pode levar a ainda menor busca por ajuda, quando comparado à mulheres.

3.2 TRANSTORNOS DEPRESSIVOS

Transtornos depressivos são um grupo de transtornos que podem ser caracterizados por humor triste, vazio ou irritável. Eles podem ser sub-divididos em transtorno de depressão maior, uma forma episódica que pode ocorrer uma ou mais vezes ao longo da vida e a distímia, uma forma mais crônica de depressão (DSM-5, 2013). A depressão é um distúrbio psiquiátrico multifatorial (CZÉH et al., 2016) comum caracterizado por sentimento de tristeza e falta de interesse em atividades outrora consideradas prazerosas pelo indivíduo, geralmente acompanhada de incapacidade de realização de atividades rotineiras por 14 dias ou mais (OMS, 2017). Dentre os fatores que podem predispor o desenvolvimento da doença, podemos citar: status socioeconômico, hábitos alimentares não-saudáveis, excesso de ingestão de bebidas alcoólicas, tabagismo, histórico familiar com casos de depressão, traumas na infância, abuso, estresse crônico, episódios negativos na vida, co-morbidade com outras doenças neurodegenerativas ou doenças crônicas (CZÉH et al., 2016). O indivíduo deprimido pode apresentar sintomas que se manifestam de maneiras diversas. Dentre as possíveis manifestações sintomáticas, salientam-se aquelas que são consideradas critérios diagnósticos pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5). Essas e outros sintomas são apresentados na **tabela 1**.

Tabela 1. Manifestações sintomáticas e potenciais biomarcadores da depressão.

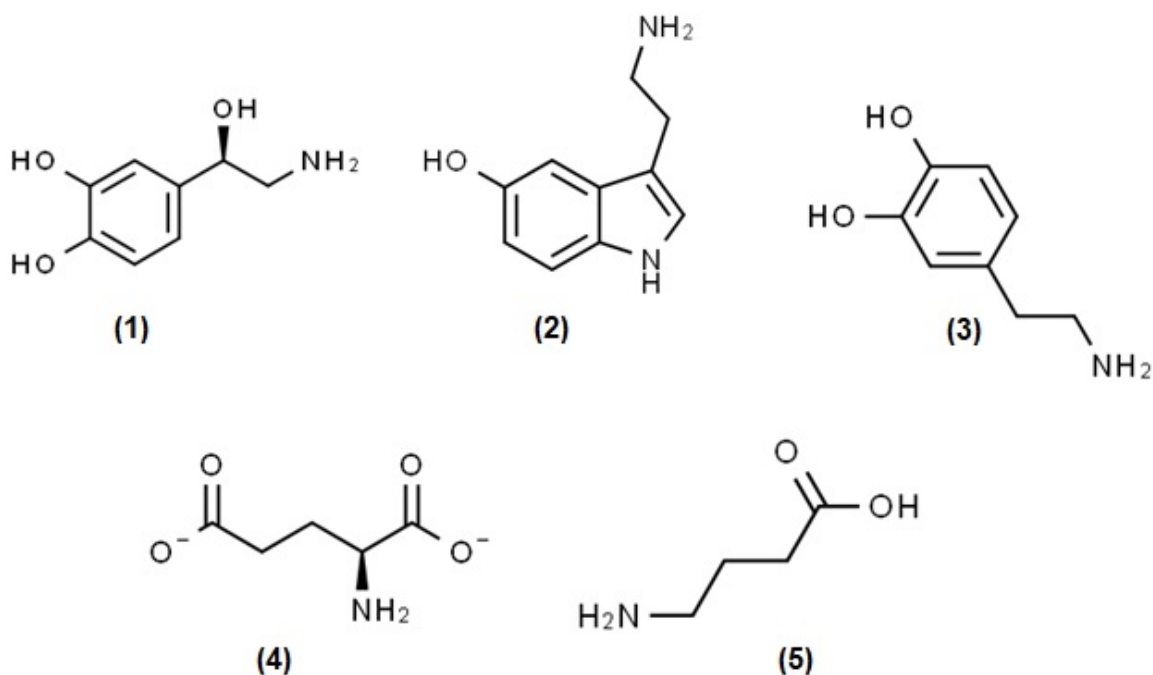
Critérios do DSM-V⁺	Outros sintomas	Potenciais biomarcadores
Humor deprimido	Ansiedade, agitação ou cansaço	Disfunções na regulação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
Diminuição do interesse ou prazer em atividades	Comportamento social disfuncional, explosões de raiva, irritabilidade, frustração mesmo sobre eventos de pequena importância	Volume Hipocampal diminuído
Significante perda de peso ou ganho de peso	Problemas físicos sem causa definida (não-explicados)	Marcadores inflamatórios
Insônia ou Hipersônia		
Agitação ou retardação psicomotora		
Fatiga ou perda de energia		
Sentimento de inutilidade ou		
Sentimento de culpa		
excessiva ou inapropriada		
Habilidade de pensar		
diminuída ou dificuldade de		
concentração ou Sentimento		
de indecisão		
Pensamento recorrente em		
morte, recorrente ideação		
suicida		

⁺: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª Edição.
(Adaptado de Czéh et al., 2016)

A teoria melhor aceita para explicar as alterações disfuncionais que ocorrem na patogênese da depressão é a teoria das monoaminas, que se baseia no pressuposto de que as concentrações dos neurotransmissores noradrenalina (1), serotonina (2) e dopamina (3) (monoaminas) encontram-se diminuídos na depressão. A hipótese das monoaminas surgiu entre as décadas de 1960 e 1970, quando foi observado que o anti-hipertensivo reserpina possuía como efeito colateral, em muitos usuários, a ocorrência da depressão. Tal efeito foi atribuído a capacidade desse fármaco de depletar as monoaminas no cérebro. Além disso, os fármacos disponíveis para o tratamento da depressão, na época, tinham como propriedade o aumento dos níveis de serotonina e noradrenalina (JAYANTHI; RAMAMOORTHY, 2008; LOONEN; IVANOVA, 2016).

Ainda hoje, a terapêutica da depressão se mantém baseada nesta teoria. No entanto, apesar dos fármacos utilizados no tratamento apresentarem efeito agudo *in vitro* de aumento dos níveis das monoaminas, na prática, a farmacoterapia demora em média duas semanas para que seja possível observar melhora clínica. Tal observação sugere que provavelmente outros mecanismos estão envolvidos na neurobiologia desta patologia (JAYANTHI; RAMAMOORTHY, 2008; LOONEN; IVANOVA, 2016). Chávez-Castillo et al. (2019) sumarizou em seu estudo a influência de outros neurotransmissores e também a participação do sistema neuroendócrino na manifestação dos sintomas depressivos. São abordados os neurotransmissores glutamato (4) e o ácido gama-aminobutírico (GABA) (5) e diversos hormônios, como os da tireóide (T3 – tiroxina), os sexuais, especialmente os estrógenos e os hormônios envolvidos na sinalização do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Figura 1 – Estruturas químicas dos neurotransmissores



(1) Noradrenalina (2) Serotonina (3) Dopamina (4) Glutamato (5) GABA

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

No que tange a farmacoterapia da depressão, muitos fármacos estão disponíveis. No entanto, os mecanismos de ação podem ser classificados em dois grandes grupos: os antidepressivos inibidores da recaptação das monoaminas (seletivos ou não) e os inibidores da monoamina oxidase (iMAO). Embora, os fármacos pertencentes à classe dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) sejam os mais amplamente utilizados, os critérios de escolha não são bem estabelecidos na psiquiatria. Como consequência da falta de conhecimento que norteie a eleição do tratamento de maneira racional, além da ocorrência de efeitos colaterais que prejudicam a aderência ao tratamento e a ausência de efeitos terapêuticos satisfatórios, estima-se que 40% dos casos de depressão tratados com farmacoterapia não são exitosos na primeira escolha (KISS, 2008).

3.3 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Os principais sintomas que caracterizam os transtornos de ansiedade são o medo e a ansiedade excessivos. O DSM-5 (2013) diferencia o medo como um sentimento que se manifesta diante de uma ameaça real ou percebida iminente, já a ansiedade é um sentimento de antecipação de uma ameaça. Diversos transtornos partilham de sintomas associados ao medo, ansiedade e preocupação, e por isso, eles foram agrupados como transtornos de ansiedade. São eles: o transtorno de ansiedade de separação, o mutismo seletivo, as fobias específicas e a fobia social, o transtorno de pânico, a agorafobia, o transtorno de ansiedade generalizada e o transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento (DSM-5, 2013). O transtorno de ansiedade generalizada é o mais prevalente na população (OMS, 2017). Ele é caracterizado por um sentimento persistente e excessivo de ansiedade acerca de diversos aspectos da vida, gerando perturbação na produtividade e desempenho no trabalho e vida escolar, além de prejuízos nas esferas sociais e emocionais. Além do grande impacto na qualidade de vida, este transtorno também tende a se manifestar de forma crônica, acompanhando o indivíduo por anos, o que o torna de grande importância para a saúde pública (DSM-5, 2013; OMS, 2017).

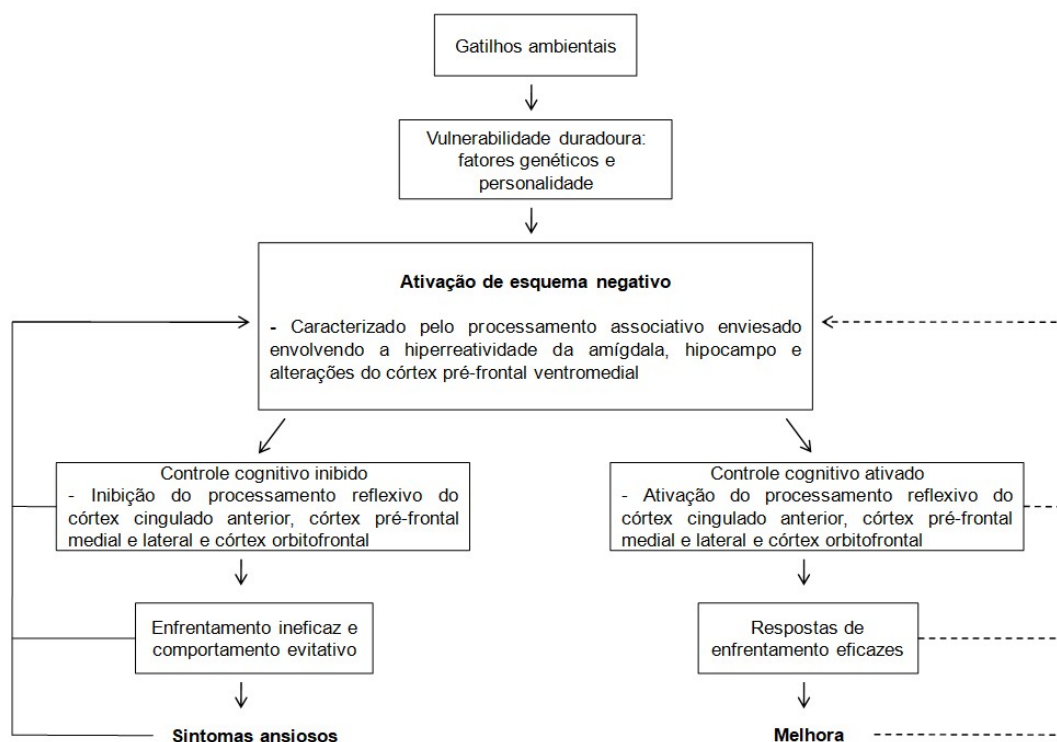
Os critérios diagnósticos para a ansiedade generalizada são a presença da ansiedade e preocupação frequentemente excessivas por múltiplos motivos (maioria dos dias) por pelo menos seis meses, cujo controle desse sentimentos é julgado como difícil pelo indivíduo e seguido por alguns dos sintomas descritos a seguir: inquietação ou sensação de nervos à flor da pele, fadigabilidade, dificuldade de concentração ou sensações de branco, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono. Estes sintomas devem causar prejuízos no funcionamento da vida e devem ser excluídos outros diagnósticos. A presença desses sintomas pode levar a dificuldade de realização de atividades corriqueiras de forma ágil, pois a pessoa não se satisfaz com os resultados a menos que estejam perfeitos (DSM-5, 2013).

Nos anos 60, Aaron Beck criou o modelo cognitivo, em que ele postulou que as pessoas possuem crenças desenvolvidas na infância que, por sua vez, as levam a ter pensamentos automáticos, comportamentos e outros aspectos da personalidade. Quando essas crenças são mal adaptativas o indivíduo tende a desenvolver transtornos psicológicos, pois sua avaliação da realidade é distorcida, ao passo que, alguém bem ajustado tende a avaliar as diferentes situações de

maneira mais realista (BLOCH, 2004). As crenças mais profundas são chamadas de crenças nucleares ou esquemas e, a partir delas, surgem outras crenças derivadas (KNAPP; BECK, 2008).

Segundo este modelo, a etiologia da ansiedade é caracterizada pelo desenvolvimento de esquemas pautados em temas como ameaça, perigo e vulnerabilidade que se formam a partir de eventos adversos durante os anos iniciais de vida. Essas crenças nucleares são ativadas repetitivamente ao longo do tempo por eventos estressores relacionáveis aos eventos que as originaram, de modo que, a ansiedade enquanto distúrbio emocional se desenvolve a partir do momento que eventos de intensidade menores acessam de maneira cada vez mais automática esses esquemas disfuncionais (**Figura 2**). É importante salientar que o processamento de informação fica prejudicado de tal maneira que o controle cognitivo sobre os pensamentos automáticos e sua reavaliação sobre pensamentos e atitudes mais adaptativas fica mais difícil (CLARK; BECK, 2010).

Figura 2 – Aspectos neurofisiológicos do modelo cognitivo de ansiedade de Beck



Fonte: adaptado de Clark & Beck, 2010.

Achados neurofisiológicos utilizando exames de imagem evidenciaram que a aplicação da terapia cognitiva (TC) foi capaz de reduzir a atividade da região subcortical amígdalo-hipocampal, responsável pelo processamento primitivo, associativo e sem esforço de informações e aumentou a ativação da região do córtex frontal, relacionada à reestruturação e reavaliação cognitiva e maior controle de emoções negativas (CLARK; BECK, 2010). Esse processo terapêutico cria um sistema de feedback positivo que pode contribuir para a melhoras dos sintomas ansiosos, conforme ilustrado na **Figura 2**.

Neste sentido, a Divisão 12 da Sociedade Americana de Psicologia (APA) confere a terapia cognitivo comportamental (TCC) o status de possuir fortes evidências científicas de eficácia no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (2021). Adicionalmente, alguns estudos indicam que a TC/TCC foi mais efetiva no tratamento de transtornos de ansiedade que a terapia farmacológica. Ela se trata uma abordagem psicoterapêutica que tem como objetivo reestruturar e corrigir essas crenças distorcidas e possui caráter limitado no tempo e é baseada no

desenvolvimento de soluções pragmáticas para queixas apresentadas no presente. Em casos de ansiedade ou depressão não complicados estima-se que o tratamento leve entre 12 e 16 sessões (KNAPP; BECK, 2008).

A farmacoterapia ocupa um papel adjuvante na terapia dos transtornos de ansiedade, devendo ser considerado sempre em associação a psicoterapia. Neste contexto, a classe de farmacológica de primeira linha para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada são os antidepressivos paroxetina e a venlafaxina, e o ansiolítico buspirona, um agonista de receptores de serotonina (BOERNER; MOLLER, 2001). Historicamente, os primeiros fármacos a serem utilizados para o tratamento de ansiedade foram os barbitúricos, seguido pelos, mais seguros, benzodiazepínicos (ABRAMOWITZ; DEACON, 2010). Ambos atuam nos receptores de GABA levando a um estado de sedação induzido pela hiperpolarização dos neurônios, diminuindo assim sua excitabilidade. Apesar de os benzodiazepínicos apresentarem efeito ansiolítico agudo, seu uso deve ser considerado com cautela devido aos efeitos adversos e o risco de abuso e dependência (PLAG; SIEGMUND; STRÖHLE, 2009).

Uma outra abordagem a ser considerada na farmacoterapêutica é o aumento da serotonina nas fendas sinápticas mediado pelos antidepressivos inibidores da recaptação desse neurotransmissor, no entanto, afirma-se que há poucas evidências do papel da sinalização serotoninérgica na etiologia da ansiedade (ABRAMOWITZ; DEACON, 2010).

Adicionalmente, tem-se a pregabalina aprovada para o tratamento de transtorno de ansiedade generalizada e a moclobemida para o tratamento de transtorno de ansiedade social (PLAG; SIEGMUND; STRÖHLE, 2015).

Tempesta e colaboradores (2013), em um estudo controlado mostrou que pacientes jovens com diagnóstico de transtorno de ansiedade generalizada em tratamento com antidepressivos ISRS apresentam prejuízos cognitivos consideráveis quando comparados ao grupo controle saudável. Apesar de que é reconhecido que a própria patologia origina tais disfunções, o uso dos ISRS parece ter acentuado os déficits relacionados à memória e atenção.

3.4 PRODUTOS NATURAIS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS

Plantas medicinais são historicamente utilizadas na medicina tradicional para diversas enfermidades, entre elas, o tratamento de transtornos mentais comuns. Muitas delas já possuem eficácia comprovada por meio de ensaios clínicos e sua prescrição é respaldada pelos princípios da medicina baseada em evidências, uma vez que estão catalogadas em compêndios oficiais, como por exemplo, o memento fitoterápico.

O uso da cimicífuga (*Actaea racemosa* L.), para o tratamento da síndrome do climatério e sintomas associados, tais como as alterações do humor, ansiedade e depressão exemplifica uma dessas indicações terapêuticas. Seu efeito foi relacionado à presença de triterpenos do tipo-acteína no extrato, que possuem atividade GABAérgica (ANVISA, 2016). O extrato de *A. racemosa* provavelmente desempenha uma ação benéfica na melhora dos sintomas menopausais devido a presença de substâncias que atuam pelas vias serotoninérgicas, noradrenérgicas, dopaminérgicas e GABAérgicas, não sendo ligado a efeitos estrogênicos (WUTTKE; SEIDLOVA-WUTTKE, 2015). Esses achados despertam a discussão para a relação entre as mudanças hormonais experimentadas no climatério e o aumento de sintomas depressivos e ansiosos que ocorrem frequentemente nesse período.

A espécie *Hypericum perforatum* L., popularmente conhecida como hipérico ou Erva-de-São-João, é uma planta medicinal com indicação terapêutica para o tratamento de transtornos depressivos leves e moderados. Seu mecanismo de ação parece ser uma sinergia de diversas ações no sistema nervoso central (SNC), como expressão de receptores serotoninérgicos, a modulação de citocinas e do eixo hipotálamo-hipófise- adrenal (ANVISA, 2016). Tradicionalmente o uso de hipérico para o tratamento de transtornos comuns mentais é consolidado por uma grande e robusta variedade de estudos acerca de sua eficácia terapêutica e mecanismos envolvidos.

A Kava-Kava, como é popularmente conhecida a *Piper methysticum* G. Forst apresenta efeitos ansiolíticos e induz melhora na ansiedade relacionada à síndrome do climatério, sem prejuízo da concentração e desempenho cognitivo. Além disso, mostrou-se eficaz em melhorar a qualidade do sono mesmo não havendo alterações na capacidade de reação. O bloqueio da recaptação de noradrenalina por três

kavalactonas, principais substâncias químicas encontradas no rizoma de *P. methysticum*, é o mecanismo de ação sugerido para essa planta (ANVISA, 2016).

A camomila (*Matricaria chamomilla* L.) pode ser indicada para estados de ansiedade ou como sedativo leve. Além do chá preparado com as inflorescências de 3 a 4 vezes ao dia, o uso do extrato fluido ou seco padronizados em apigenina também são indicados para o tratamento desses distúrbios. Assim como a camomila, o maracujá (*Passiflora incarnata* L.) também possui flavonoides como substâncias químicas importantes para sua atividade ansiolítica e sedativa leve. Estudos *in vitro* utilizando o extrato hidroetanólico seco de *P. incarnata* sugeriram a modulação dos receptores GABA_A e GABA_B e também inibição da recaptação do GABA, enquanto estudos clínicos utilizando tanto *M. chamomilla* como a *P. incarnata* evidenciaram melhoras nos sintomas de ansiedade nos grupos tratados (ANVISA, 2016).

Um dos sintomas comuns à ansiedade é a insônia, nesse sentido, é bastante comum a utilização de plantas medicinais com efeito sedativo ou indutor de sono. Este é o caso da *Valeriana officinalis* L., cujas raízes são ricas monoterpênicos e sesquiterpênicos, estes últimos chamados de ácidos valerênicos. O uso de cápsulas ou comprimidos de valeriana é indicado até três vezes ao dia para ansiedade leve ou em dose única no início da noite para insônia. Os mecanismos envolvendo a ação sedativa e hipnótica da *V. officinalis* são relacionados à inibição da recaptação do GABA e aumento da sua secreção na fenda sináptica. Além disso, o extrato é rico no aminoácido precursor do GABA, a glutamina, que pode ser utilizada pelo SNC para a síntese desse neurotransmissor (ANVISA, 2016).

Algumas espécies, apesar do uso tradicional consolidado na terapia de distúrbios emocionais, com atividades muitas vezes citadas como calmantes, tônico para os nervos, para ansiedade leve e insônia, não foram estudadas clinicamente frente a sua atividade no SNC ou ainda não foram incluídas na literatura oficial. Apesar disso, elas mantêm sua importância dada a sua ampla utilização popular e baixa toxicidade.

O capim-limão ou capim-cidreira (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.) é uma planta perene originária da Índia, que ocorre espontaneamente em quase todo o território brasileiro, sendo adaptada ao clima quente e úmido. Suas folhas são aromáticas possuindo odor agradável característico. Ele é muito utilizado

popularmente na forma de chás calmantes e indutor de sono, também conhecido por suas propriedades de relaxamento (HERBARIUM, 2014).

O estresse e o aumento dos distúrbios psicológicos associados a ele, como o aumento dos casos *burnout* como é conhecida a Síndrome de esgotamento profissional e ansiedade tem levado o uso de fitoterápicos da classe dos adaptógenos ganhar maior visibilidade. Eles atuam melhorando a resistência do organismo aos danos provocados por agentes estressores de forma a diminuir a fadiga e melhorar o desempenho cognitivo. A *Rhodiola rosea* L. é uma espécie adaptógena capaz de modular níveis de neurotransmissores, a performance para o trabalho, melhorando o estado de alerta mental e a resistência ao estresse. Sua ação parece ser relacionada à sua atividade antioxidante oriunda dos compostos fenólicos de seu extrato, atuando principalmente na modulação do estresse oxidativo (CARVALHO, 2016).

Diversas outras espécies vegetais também são mencionadas frequentemente na literatura de fitoterápicos com outras indicações que não apenas para o tratamento de ansiedade ou estados depressivos leves. São recomendadas devido a atividade calmante e para o tratamento de casos de insônia, podendo ser citadas a *Melissa officinalis* L., o *Crataegus oxyacantha* L., o *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., a *Citrus aurantium* L. (GONÇALVES, 2019; CARVALHO, 2016), a *Griffonia simplicifolia* (Vahl ex DC.) Baill. e a *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & Wilson, P. (GONÇALVES, 2019).

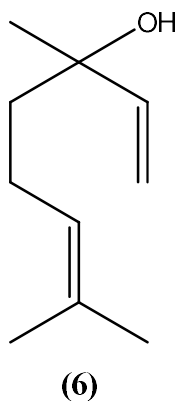
Em outros, muitas vezes é difícil correlacionar os termos populares com os termos médicos, com possíveis implicações etnofarmacológicas. Plantas potencialmente antidepressivas ou ansiolíticas podem ser negligenciadas nos estudos farmacológicos motivados pelo uso tradicional. Por exemplo, em um estudo recente, o termo até então desconhecido “panema”, que seria um estado de má-sorte e insucesso, foi correlacionado hipoteticamente do com a depressão. Nesse contexto, uma série de espécies puderam ser sugeridas para futuros estudos experimentais que visem a comprovação da atividade antidepressiva e ansiolítica (PAGANI; DE SANTOS; RODRIGUES, 2017; PEREIRA et al., 2007).

Durante o século 19, diversos naturalistas europeus estiveram no Brasil obtendo informações relacionadas a plantas nativas do nosso país e seus usos benéficos. Um estudo que compilou as descrições provenientes de diferentes obras do célebre botânico alemão von Martius mostrou que o guaraná (*Paullinia cupana*,

Sapindaceae) era indicado para “dor de cabeça dos nervos” (do inglês “nervous headache”), dentre os usos tradicionais listados na obra “Systema de Materia Medica”, de 1843. Os autores indicaram ainda que dentre os estudos relacionados, foi observada a comprovação da atividade ansiolítica e antidepressiva dessa planta (BREITBACH et al., 2013).

Em um estudo etnofarmacológico recente em uma região da Amazônia, no estado do Amapá, o fator de consenso do informante observado para distúrbios do sistema nervoso, como epilepsia, convulsão e depressão foi de 0,77. Nesse mesmo estudo, o maracujá-do-mato (*Passiflora tholozanii*) apresentou uso tradicional para depressão, enquanto a espécie *Aeollanthus suaveolens*, popularmente conhecida como catinga-de-mulata, foi relatada como útil para a irritação dos nervos (SARQUIS et al., 2019).

Figura 3 – Estrutura química do monoterpeneo linalol



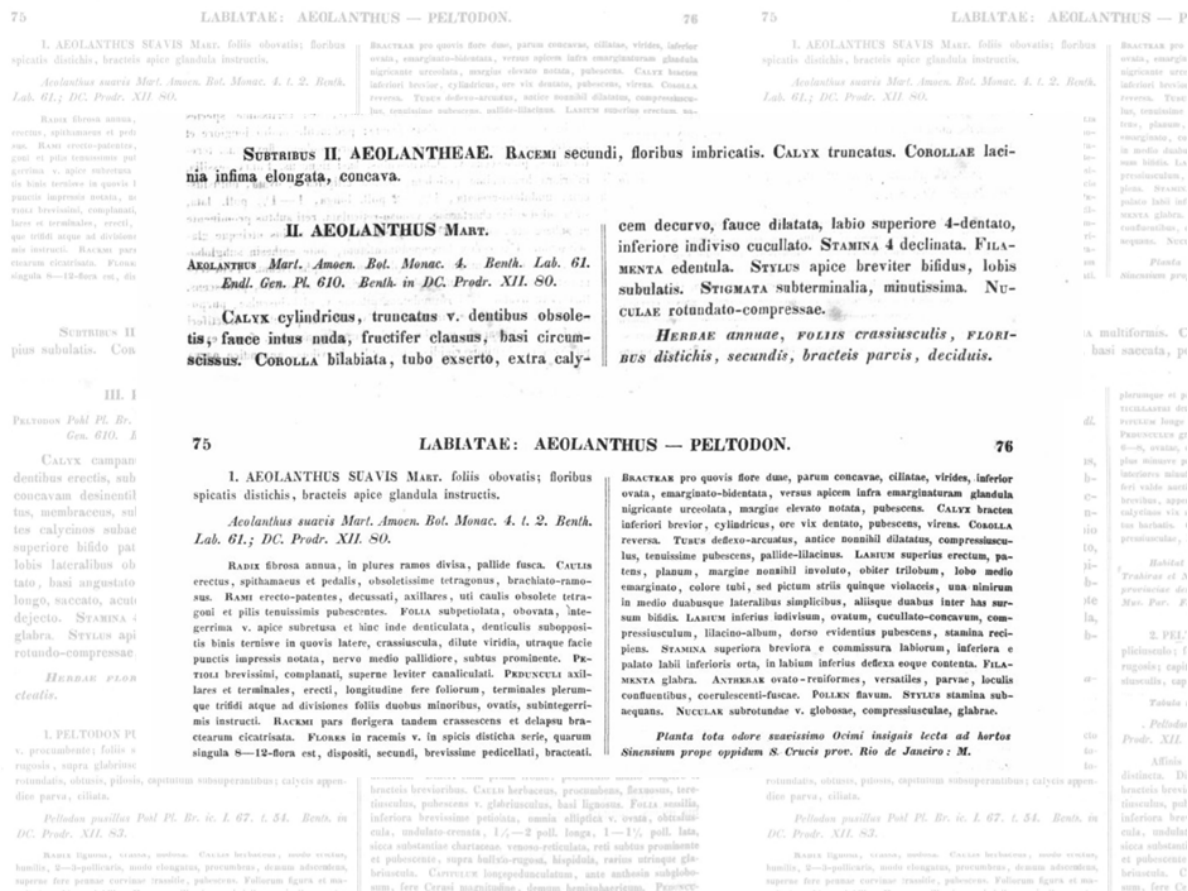
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

O potencial de óleos essenciais (OEs) têm sido evidenciado em ensaios para avaliação de atividade anti-depressiva. Santos e colaboradores (2018) investigaram algumas espécies e dentre elas, *A. suaveolens*, evidenciando efeitos tipo anti-depressivo. A atividade foi ao menos parcialmente relacionada ao monoterpeneo linalol (6), constituinte majoritário do OE.

3.5 *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE)

Aeollanthus suaveolens Mart. ex Spreng. [= *Aeollanthus heliotropioides* Oliv.] (Lamiaceae) é uma planta aromática originária do sul africano (RYDING, 1980) e domesticada no Brasil. Se apresenta como sub-arbusto ereto, herbáceo, semi-suculento de hábito anual (RYDING, 1980; VAN JAARSVEL; VAN WYK, 2005). Popularmente é conhecida como catinga-de-mulata (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2003; MAIA; ANDRADE, 2009; PEREIRA; COELHO-FERREIRA, 2017), catinga de mulata (MARTINS et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2020), caatinga de mulata (NASCIMENTO et al., 2020), catinga da mulata (TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 2001), chegadinha, mangericão-miúdo (MAIA, ZOGHBI, ANDRADE, 2003), macassar (LINS, 2013; TUCKER, MACIARELLO, ALKIRE, 2001), macassá (MAIA, ZOGHBI, ANDRADE, 2003; TUCKER, MACIARELLO, ALKIRE, 2001). Consta na célebre obra *Flora Brasiliensis* (**Figura 4**), iniciada por Carl Friedrich Philipp von Martius, e também no *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, uma extensa obra realizada por Pio Corrêa (**Figura 5**).

Figura 4 – Excerto da Obra Flora Brasiliensis contendo menção à *Aeollanthus suavis*



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Figura 5 – Excerto da obra Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e a direita, foto do autor Pio Corrêa.

DICIONÁRIO DAS PLANTAS ÚTEIS DO BRASIL 219

CHEGADINHA = *Acalypha suaveolens* M., da família das Labiadas. — Herva pequena, até 45 cts. de altura, ramos pubescentes e folhas sesseis, obovado-oblongas, até 54 m/m de comprimento, obtusas, inteiras ou levemente dentadas e com punctuações visíveis na pagina inferior; flores lilacinas reunidas em espigas e estas dispostas em racimos. — Ornamental e fortemente aromática, fornece óleo essencial próprio para a industria da perfumaria, o qual, a 13°C, tem o peso específico de 1,028 : a elle se devem certamente as propriedades medicinaes reconhecidas á planta, como valioso excitante diffusivo e emmenagogo; a infusão é antispasmodica. — Embora não tenha ainda sido encontrada na Africa, attribue-se-lhe origem africana porque ao continente negro pertencem todas as demais especies do genero; o certo é que o sabio Martius foi quem primeiro a collectou em Santa Cruz, immediações do Rio de Janeiro; Caminhoá estendeu a sua distribuição geographica até S. Paulo e Warming encontrou-a em Minas Geraes. — **Syn. :** MANGERICO MIÚDO.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Essa espécie é amplamente cultivada para fins medicinais e ritualísticos (PISTRICK, 2006). É utilizada para o tratamento de febre (COELHO-FERREIRA, 2009; PEREIRA; COELHO-FERREIRA, 2017), dor de cabeça, gripe com muco amarelo e tosse, hemorragia menstrual, tonturas (COELHO-FERREIRA, 2009), quebranto, (um tipo de mau olhado que afeta principalmente crianças) (COELHO-FERREIRA, 2009; PAGANI; DE SANTOS; RODRIGUES, 2017), inflamação da pele e ouvidos ou como gotas para o olho (“eye drops”) (TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 2001), “ramo de ar” um mal caracterizado por convulsões, paralisia e enrijecimento muscular (PEREIRA; COELHO-FERREIRA, 2017), controle de convulsões epiléticas (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2003; TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 2001), acidente vascular cerebral (AVC) (NASCIMENTO et al., 2020; COELHO-FERREIRA, 2009), uso profilático para trombose (LINS, 2013).

Albuquerque et al. (2007) cita *A. suaveolens* como uma das ervas mais requisitadas para o preparo de rituais mágico-religiosos. Esses rituais possuem objetivos de curar males de origem energética e as plantas além das propriedades terapêuticas atuam também como agentes de transferência, recebendo as energias ruins que estão nas pessoas.

A. suaveolens pode ser considerada como uma planta mágica, estando envolvida sozinha ou em misturas em diversos rituais místicos com a finalidade de limpeza e proteção espiritual. Para o preparo de um banho de Oxum (banho de cheiro) indica-se um molho de macassá e um molho de alevante miúda. O método de preparo sugerido é a maceração em 500 mL e adição de água até o volume final

de 4 litros. Os banhos devem ser tomados as terças por 3 a 6 semanas. Ela também é utilizada em manifestações culturais e naturais, como no dia 31 de dezembro em que a autora sugere a utilização como ritual para “purificar-se e renovar as esperanças”, banhos de descarrego, seguidos de banhos de axé, sendo o último composto por manjerona, alecrim e macassá. Descreve que “o ritual do banho tem como simbologia coletiva a sua virtude purificadora e transformadora”. Os banhos de axé são indicados para as questões do coração e autoestima (ALMEIDA, 2011)

Essa espécie compõe a complexa mistura para banhos comercializada na véspera do dia 24 de junho, em que se comemora o dia de São João. Os banhos são realizados à meia noite do dia 23 para 24 na região Norte do Brasil. A função atribuída culturalmente a essa prática consiste em atrair coisas boas e afastar más energias (FONSECA; ARAÚJO-NETO; COSTA, 2018).

Outras indicações também são: tirar quebranto (COELHO-FERREIRA, 2009), quebranto de criança e panemeira (FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017), que seria uma condição que leva ao insucesso nas atividades produtivas ou uma espécie de má-sorte (PEREIRA et al., 2007). Para o descarrego, espantar maus espíritos e mau-olhado, limpeza do corpo e alma, doença do ar (FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017) e proteção pessoal (COELHO-FERREIRA, 2009).

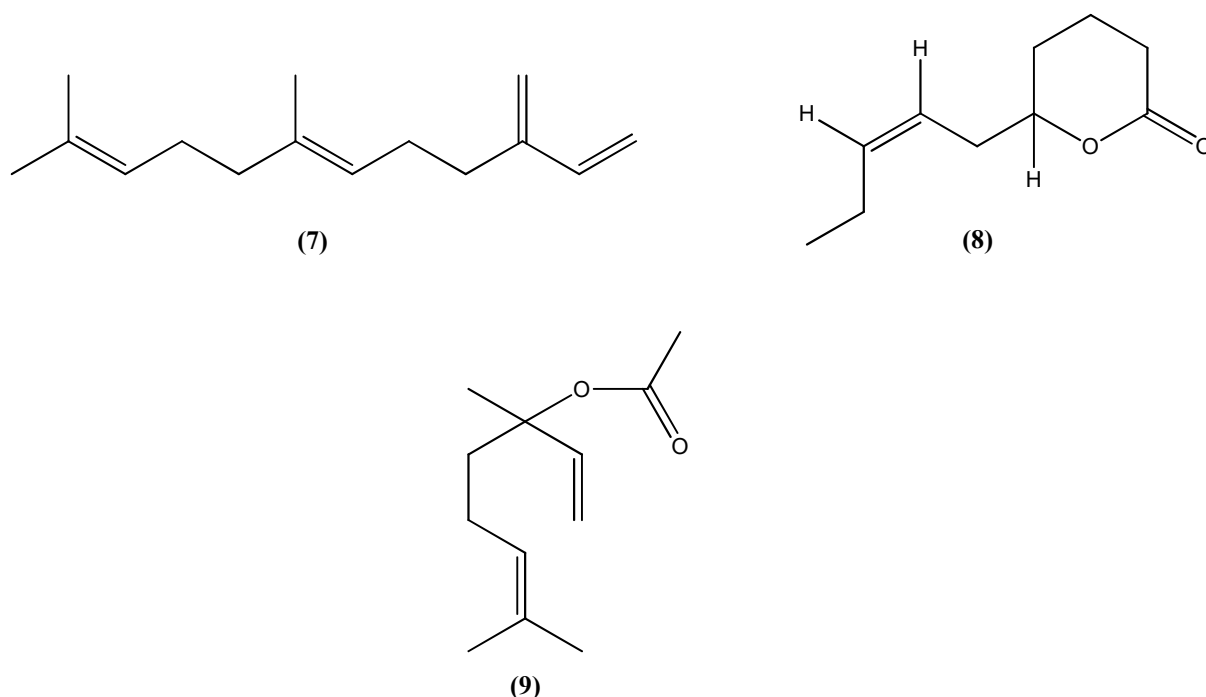
Ela também é usada como parte de misturas com propósito anticonvulsivante (ELISABETSKY, 2007). As partes utilizadas são as folhas e galhos e as formas de preparo são diversas, como banhos, chá, fresca/*in natura*, macerados, garrafadas e banhos com água de coco (COELHO-FERREIRA, 2009)

Entre outras aplicações, essa erva também mostra potencial atividade inseticida contra a praga de cereais *Spodoptera frugiperda*, tendo o extrato aquoso de *A. suaveolens* levado a resultados de 74% $\pm$ 2,44 de mortalidade dessa praga de cereais (NASCIMENTO; LOPES; SOUSA, 2016). O OE de *Aeollanthus heliotropioides* Oliv. [= *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng.] também apresentou boa atividade antifúngica contra diferentes cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* isoladamente ou associado com timol (NGO MBACK et al., 2016).

É uma planta extremamente aromática e cujo OE já foi estudado quanto a sua composição química. de COELHO-DE-SOUZA et al., (1997) indicaram o *E*- β -farneseno (**7**) (37,75%), δ -decen-2-lactona (**8**) (20,6 – 44,3%), acetato de linalila (**9**)

(11,32 %) e linalol (10,49%) como constituintes majoritários, enquanto Martins et al. (2016) indicaram o *E*- β -farneseno (37,6 %) e linalol (33,3%) como majoritários. Em outro estudo, o linalol (49,3%) foi o constituinte majoritário, seguido do *E*- β -farneseno (34,9%) (SANTOS et al., 2018).

Figura 6 – Estruturas químicas do *E*- β -farneseno, δ -decen-2-lactona e acetato de linalila.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

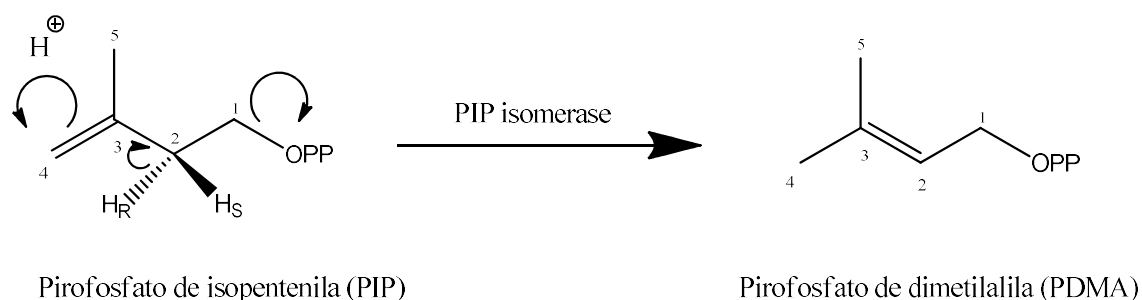
Os terpenoides são originados de unidades isoprênicas a partir de suas unidades bioquimicamente ativas, o pirofosfato de isopentenila (PIP) e pirofosfato de dimetialila (PDMA). Elas são originadas da via do ácido mevalônico ou via do metileritritolfosfato, sendo que o PIP é isomerizado ao PDMA por ação de uma enzima capaz de incorporar um próton da água em C-4 e de forma estereoespecífica remover o próton H_R em C-2 (DEWICK, 2009). A combinação de PIP e PDMA mediada pela enzima pirofosfato de geranila sintase (PG sintase) e seguida novamente pela remoção estereoseletiva de H_R permite a obtenção de uma unidade bioquimicamente ativa com nova dupla ligação com configuração trans (*E*) denominada, pirofosfato de geranila (PG), precursor de uma subclasse de terpenos com 10 átomos de carbono (monoterpenos). A adição ao PG de um PIP mediada pela enzima pirofosfato de farnesila sintase (PF sintase) leva a formação da unidade

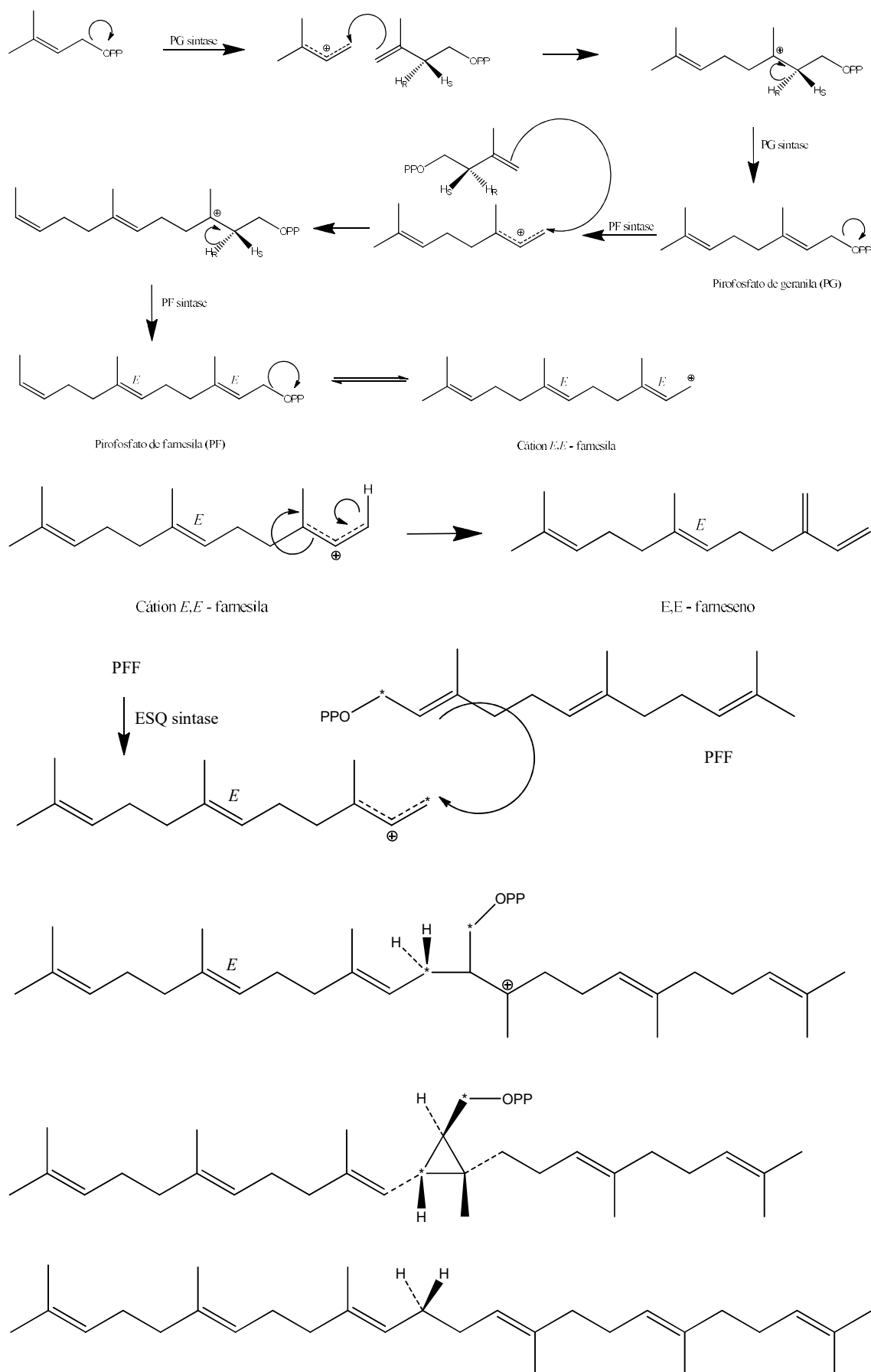
bioquimicamente ativa chamada pirofosfato de farnesila (PF), agora com 15 átomos de carbonos e precursor uma subclasse de terpenos denominada sesquiterpenos. A perda do grupo pirofostato leva a formação do cátion *E,E* – farnesila, que após perda de prótons leva a formação do *E,E* – farneseno. Note que a dupla ligação próxima ao pirofosfato pode assumir configuração *E* ou *Z* (DEWICK, 2009), *A. suaveolens*, sintetiza o trans-farneseno ou β -farneseno, que também é precursor do esqualeno, que por hidrogenação é utilizado para a síntese do esqualano, conhecido inibidor da Maturação de Ostwald o esquema a seguir ilustra a via sintética desses importantes terpenoides (CROCK et al., 1997). (**Figura 7**).

Os terpenoides são originados de unidades isoprênicas a partir de suas unidades bioquimicamente ativas, o PIP e o PDMA. Elas são originadas da via do ácido mevalônico ou via do metileritritolfosfato, sendo que o PIP é isomerizado ao PDMA por ação de uma enzima capaz de incorporar um próton da água em C-4 e de forma estereoespecífica remover o próton H_R em C-2 (DEWICK, 2009).

O PF também participa na formação do esqualeno. Uma adição eletrofílica ao cátion alílico gera um cátion terciário. A perda de próton forma então ciclopropano (pré-esqualano). A perda do difosfato e uma série de modificações leva ao esqualano através da junção cauda-cauda de duas unidades bioquimicamente ativas de farnesila.

Figura 7. Rota Biosintética de alguns terpenoides de importância para *A. suaveolens*



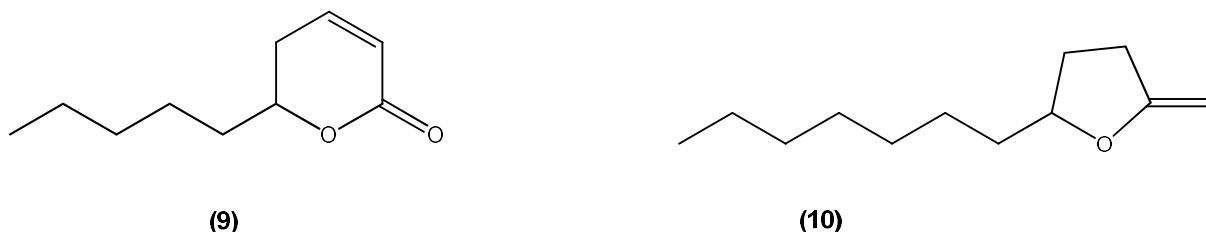


Fonte: Adaptado de Crock et al, 1997 e Dewick, 2009.

A. suaveolens adquirida em Belém (Brasil) foi submetida à extração de diferentes partes: a planta *in natura*, a planta seca, o OE extraído por arraste a vapor e o resíduo dessa extração. Após microextração em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) o linalol e o (*E*)- β -farneseno foram detectados como substância majoritárias na planta seca e OE. A massoiolactona foi a substância mais abundante no resíduo (82,3%)(LUPE et al., 2007).

Segundo Tucker, Maciarello, Alkire (2001) em seu estudo comparativo entre a planta florida e a planta em estágio vegetativo, cultivada em Camden (Alemanha), o rendimento de OE pelo método de hidrodestilação foi maior na amostra florida (0,11%) do que na amostra vegetativa (0,07%). Os componentes majoritários foram o linalol, o acetato de linalila, o (*E*)- β -farneseno e a massoiolactona (**10**), esta última com potencial irritante e por isso, o uso do OE de *A. suaveolens* em fragrâncias deve ser feito com precaução.

Figura 8 – Estruturas químicas da massoiolactona e γ -decalactona.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

O OE dessa espécie, bem como algumas lactonas com estruturas químicas análogas as encontradas nessas misturas complexas, foram avaliadas em modelo animal quanto a sua atividade anticonvulsivante. A γ -decanolactona apresentou ação no sistema nervoso central de forma dose-dependente, apresentando efeitos hipnóticos, anticonvulsivantes e hipotérmicos (COELHO-DE-SOUZA et al., 1997). A avaliação dos efeitos neurocomportamentais do OE de *A. suaveolens* foi realizada em ratos Wistar machos através da utilização de modelos relacionados a atividade de locomoção espontânea (*open field test*), atividade tipo-ansiolítica, atividade tipo-antidepressiva e de retenção de memória. Não foi observado efeito depressor e efeito tipo-ansiolítico. A atividade do tipo-antidepressiva e efeito positivo na retenção

de memória foram observadas. Foi sugerido que a última pode ser relacionada a atividade antioxidante e antiapoptótica (SANTOS et al., 2018).

O linalol e a γ -decalactona, quando testados nas concentrações de 400 ou 500 mg/kg (i.p) e 2000 mg/kg (p.o) em camundongos albinos nos modelos de indução química por pentilenotetrazol (PTZ) e teste de convulsão por máximo eletrochoque (MES) mostraram boa atividade anticonvulsivante (ELISABETSKY; BRUM; SOUZA, 1999; KUMAR et al., 2012).

O linalol modula a ativação do glutamato *in vitro* e *in vivo* em modelos de N-metil D-Aspartato (NMDA) e ácido quinolínico, tendo atuado com comportamento competitivo. No entanto, em modelos induzidos por PTZ apesar de aumentar o tempo de latência de ligação do glutamato a membranas do SNC diminui com o aumento das concentrações de linalol. Essa inibição ocorre de forma dose-dependente e de natureza competitiva. A administração de linalol em modelo de convulsões induzidas por NMDA aumentou o tempo de latência (atraso do início da convulsão), mas não foi capaz de proteger a ocorrência das convulsões. Já em modelo de convulsões induzidas por ácido quinolínico a administração de linalol foi capaz de, na maior dose testada, inibir 100% a ocorrência das convulsões. Em modelo de PTZ-*kindling* foi observado tanto o comportamento como a ligação de glutamato as membranas. Após o tratamento, a administração do linalol parcialmente inibiu e atrasou a ocorrência das convulsões, mas após a quarta administração de PTZ, 60% dos animais foram *kindled*. O linalol não foi capaz de inibir a ligação do glutamato as membranas nesse modelo (ELISABETSKY; BRUM; SOUZA, 1999; KUMAR et al., 2012).

Os efeitos anticonvulsivantes do linalol podem ser atribuídos tanto a inibição da liberação de glutamato estimulada por potássio e o antagonismo aos receptores NMDA (ELISABETSKY; BRUM 2003). Elisabetsky; Marschner; Onofre Souza (1995) relacionaram os efeitos sedativos do linalol com a sua capacidade de inibição da ligação do glutamato aos receptores NDMA, kainato, AMPA, quisqualato e ACDP. Em outras palavras, o linalol foi capaz de inibir a transmissão glutamatérgica no SNC. Esse mecanismo pode ser relacionado à atividade anticonvulsivante de plantas ricas em linalol, como é o caso de *A. suaveolens*, mas também, abre perspectivas para estudos de atividade ansiolítica e sedativa, visto que a via excitatória do SNC é mediada por glutamato. Notavelmente, as fisiopatologias da

ansiedade e da epilepsia envolvem hiperexcitabilidade do SNC e diminuição da capacidade normal de inibição.

3.6 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS COMPORTAMENTAIS PARA INVESTIGAR ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

O uso de animais tem sido estratégico para a elucidação da fisiopatologia envolvida na depressão e ansiedade. Eles também são utilizados em testes farmacológicos e toxicológicos como ferramentas para o desenvolvimento de novos tratamentos. Os sentimentos de tristeza, desesperança e ideias suicidas não são possíveis de se mimetizar em modelos animais e, por isso, é virtualmente impossível estabelecer um modelo experimental que seja completamente comparável ao quadro clínico depressivo (NGUYEN; STEWART; KALUEFF, 2014). Historicamente, roedores têm sido utilizados como modelos para diversos ensaios, dentre as quais destacam-se os ensaios comportamentais de campo aberto (*open field test*), nado forçado (*forced swimming test*) e teste de suspensão da cauda (*tail suspension test*). Além dessas abordagens, outras também têm sido empregadas nos estudos de desordens psiquiátricas, tais como a utilização de animais de linhagens genéticas específicas com genes *knock-down* ou *knock-out*, o emprego de ferramentas optogenéticas e outras (CZÉH et al., 2016).

Muitas vezes os modelos animais não são capazes de diferenciar comportamentos específicos da depressão ou da ansiedade. Por isso os resultados observados devem ser conter a partícula “tipo” antes dos efeitos, sendo denominados tipo-antidepressivo ou tipo-ansiolítico. No entanto, muitos modelos têm sido apresentados nos últimos anos como potencialmente úteis nos ensaios relacionados a ansiedade/depressão (NGUYEN, STEWART, KALUEFF, 2014)

SANTOS e colaboradores (2018) avaliaram a atividade tipo-antidepressiva de diferentes OEs ricos em linalol, um dos constituintes majoritários de *A. suaveolens*, sendo essa uma das espécies avaliadas. Dentre os modelos utilizados podemos citar:

- Labirinto em cruz elevado: baseado na avaliação do comportamento de preferência pelos braços abertos ou fechados do labirinto e avaliação de outros parâmetros de comportamento exploratório.
- *Splash* teste: baseado na observação de comportamento motivacional de autolimpeza e considerado oposto à apatia, após borrifação de

solução de solução de sucrose no dorso do animal. A latência para início e tempo da autolimpeza são mensurados;

- Teste do nado forçado: baseado na inserção dos animais em aparato cilíndrico com água suficiente, de forma que não possam colocar os pés na base. Permanecem no aparato por 5 min. e após 2 min. considerados de reconhecimento do ambiente, é mensurada a imobilidade e o número de tentativa de escalada (fuga) do aparato nos 3 min. finais;
- Teste de esquiva inibitória: baseado em estímulos que geram medo, avaliando. Pode ser avaliado, por exemplo, tempo de retenção em uma plataforma segura, cuja descida para outra levará a choque elétrico, tendo sido essa uma situação vivenciada previamente;
- Teste do campo aberto: baseado na atividade de locomoção espontânea dos animais em uma arena, mensurando-se o número de quadrantes percorridos em período pré-determinado

Nesse estudo, os autores concluíram que todos os OEs (*Aniba roseodora*, *A. parviflora*, e *A. suaveolens*), bem como o linalol, apresentaram atividade.

O teste do campo aberto (do inglês “*open field test*”) é historicamente utilizado em estudos de biopsicologia em roedores, baseados em fatores envolvem exploração, intrinsecamente associada a busca por novidade (curiosidade) e aversão ao estímulo. Paradigmas baseados em exploração e fundamentados na conservação de fatores evolucionários similares permitiram a extrapolação para outros modelos experimentais (p. ex. ensaio do campo aberto: roedores x *zebrafish*) (STEWART et al., 2010).

3.7 ZEBRAFISH

Danio rerio é um pequeno peixe teleósteo pertencente à família Cyprinidae e é popularmente conhecido como na aquariofilia como paulistinha, sendo denominado na experimentação animal como *zebrafish*. Em condições ideais vive até 5 anos e em idade adulta pode chegar a medir aproximadamente 4 cm (COLLIN; MARTIN, 2017). O crescente interesse pela utilização de *zebrafish* como organismo modelo pode ser explicado por inúmeras vantagens que ele apresenta em relação a outros animais. Esses organismos são pequenos vertebrados de rápida reprodução e desenvolvimento, alta homologia genética com os mamíferos e demandam menor espaço para manutenção dos indivíduos e execução dos ensaios. Desse modo, a observação de alterações desde os estágios embrionários e larvais até a sua senescência é possível. Além disso, os custos envolvendo o manejo adequado dos animais são menores quando comparados com os custos de manutenção de roedores. A utilização de vertebrados menos desenvolvidos evolutivamente pode ser considerada uma estratégia para o desenvolvimento de modelos *in vivo* mais éticos, sendo o *zebrafish* considerado um animal de interesse para métodos alternativos (STEWART et al., 2014).

Neste contexto, pesquisas envolvendo o SNC com foco em múltiplas áreas da neurociência e biopsiquiatria têm aderido enormemente a estes modelos, evidenciando uma tendência em se tornar uma prática valiosa em estudos não-clínicos (STEWART et al., 2014). Diversos testes podem ser realizados baseados em diferentes princípios, como os cognitivos, sociais e comportamentais. Os ensaios cognitivos são baseados na capacidade dos animais em realizar escolhas discriminatórias, assimilar memória de longo prazo e se adaptar a situações novas. A submissão desses animais a modelos estressores, como estresse agudo ou estresse crônico imprevisível podem mimetizar estados deprimidos e ansiosos. Dessa forma, permitem a avaliação de alterações da cognição sob tais condições. Os ensaios baseados na capacidade desenvolvida de socialização do *zebrafish* envolvem, por exemplo, a avaliação da velocidade e o tempo de permanência com que os animais voltam junto ao cardume. Além disso, também podem ser avaliadas as relações de dominância, submissão e competição para acasalamento. Os ensaios comportamentais permitem avaliar, a partir da observação de alguns paradigmas nos quais se baseiam cada ensaio, as alterações no comportamento pelas quais os

animais passam ao serem submetidos às condições estressoras (CHANIN et al., 2012; NGUYEN; STEWART; KALUEFF, 2014; FONSEKA et al., 2016).

Dentre os principais ensaios baseados em princípios comportamentais, destaca-se o teste do tanque novo (JENSEN et al., 2018; FERREIRA et al., 2019; DOS SANTOS SAMPAIO et al., 2018 FULCHER et al., 2016). O *zebrafish* apresenta uma tendência comportamental durante a adaptação a um novo ambiente de permanecer mais tempo em áreas próximas ao fundo do aquário e, verticalmente, apresenta padrões de movimentos próximos às bordas. A estes comportamentos dá-se o nome de geotaxia e thigmotaxia, respectivamente. Portanto, o teste do tanque novo consiste na introdução do animal a um novo aquário, permitindo a avaliação qualitativa e quantitativa dos seus comportamentos segundo o paradigma da novidade (FONSEKA et al, 2016; KALUEFF & STEWART, 2012).

Conceitualmente, o teste do tanque novo é análogo ao teste de campo aberto em roedores, de maneira que, os comportamentos que podem ser acessados em ambas as espécies podem ser comparadas, conforme a **tabela 2**, a seguir:

Tabela 2 – Comparação de parâmetros que podem ser avaliados em roedores e *zebrafish* em ensaio comportamentais baseados na novidade, como o teste do campo aberto e o teste do tanque novo

Camundongos	<i>Zebrafish</i>
CAMPO ABERTO	TANQUE NOVO
Thigmotaxia (ficar próximo as paredes)	Preferência pelo fundo do aquário
Proporção centro:periferia	Proporção topo:fundo
Atividade exploratória vertical e horizontal	Nado exploratório
Congelamento	Congelamento
Avaliação do risco	Rápidas visitas a porção superior do aquário
Hiperexcitação em situações perigosas	Movimentos erráticos
Atividade locomotora (distância percorrida)	Atividade locomotora (distância percorrida)
Comportamento vegetativo (micção, defecação)	-

Fonte: Adaptado de Cachat et al. 2012

A execução do ensaio do teste novo consiste em transferir o indivíduo, previamente tratado, para um aquário novo, ao qual ele não é habituado. A análise comportamental geralmente ocorre por 5 a 6 minutos, quando o animal já começa a apresentar sinais de familiaridade com o ambiente e, logo, o estímulo da novidade cessa (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; CACHAT et al., 2012). Nesse sentido, é de suma importância que seja garantido a exposição inédita do animal ao aquário onde será realizado o ensaio para que a indução do comportamento tipo-ansioso seja alcançada com êxito. No estudo de Bencan, Sledge e Levin (2009), os animais que foram mantidos em aquários idênticos àqueles em que foram submetidos ao teste, não foi observada resposta a mudança de aquários.

O uso da cafeína como substância ansiogênica padrão em *zebrafish* foi avaliada por Egan (2009), que mostrou que a administração aguda de cafeína produziu comportamento tipo-ansioso no ensaio do tanque novo. Os animais apresentaram considerável aumento no tempo de latência para entrada no topo, menor número de entradas no topo e mais movimentos erráticos. O efeito ansiolítico da buspirona em *zebrafish* foi comprovado por Becan, Sledge e Levin (2009) em seu estudo que mostrou os efeitos ansiolíticos desse fármaco sem prejuízos da capacidade motora dos animais, mostrando que, portanto, esse fármaco pode ser utilizado como substância ansiolítica padrão em ensaios comportamentais baseados na novidade.

Um estudo etnofarmacológico utilizando o extrato hidroetanólico de *Spondias mombin* L. avaliou por meio dos ensaios comportamentais do teste do tanque novo, teste de preferência claro/escuro e ensaio social de desenvolvimento em isolamento social, o efeito ansiolítico e antidepressivo dessa planta nativa da Amazônia. Os animais foram submetidos ao modelo de estresse crônico moderado imprevisível com administração da cafeína como ansiogênico e etanol como depressor do SNC. Foi observado que os animais tratados com o extrato de *S. mombin* apresentaram comportamentos comparáveis aos grupos tratados com os fármacos padrão buspirona (ansiolítico) e fluoxetina (antidepressivo) (DOS SANTOS SAMPAIO et al., 2018)

A pesquisa comportamental utilizando *zebrafish* tem crescido e sua importância para a pesquisa translacional vem sendo cada vez mais reconhecida por suas vantagens. Todavia, a descrição dos comportamentos ainda não é completamente consolidada, por isso, os comportamentos observados nesta

dissertação foram descritos de acordo com Kalueff e colaboradores (2013) no Catálogo de Comportamento de *Zebrafish*, conforme a seguir:

Ataxia: perda generalizada da postura corporal normal e/ou coordenação de movimentos;

Geotaxia: preferência ou movimento para o fundo do aquário. É um parâmetro bastante sensível para a mensuração da ansiedade e comportamento evitativo;

Imobilidade: cessação completa de movimento (exceto pelas brânquias e olhos) no fundo do aquário;

Movimentos erráticos: comportamento complexo caracterizado por mudanças bruscas de direção ou velocidade e arremetidas rápidas repetidas;

Paralisia: cessação completa de movimento, incluindo o das brânquias/opérculo, olhos e das barbatanas (similar a ataxia, mas com prejuízo locomotor mais severo);

Perseguição ao reflexo: comportamento caracterizado pela perseguição do próprio reflexo, que pode estar nas paredes do aquário ou como parte das respostas ao estímulo com espelho, pode ser provocado por drogas psicoativas;

Thigmotaxia: preferência por ficar próximo as laterais e rejeição as áreas centrais abertas, geralmente, pode ser útil como parâmetro para medir a ansiedade do *zebrafish*

Os comportamentos acima indicam efeitos sobre o SNC e dentre eles, por exemplo, podemos citar a sedação, a incoordenação motora induzida por neurotoxicidade, entre outros (KALUEFF et al., 2013).

Outros modelos baseados na exploração também têm sido propostos baseados na extrapolação de roedores para *zebrafish*, incluindo uma adaptação do próprio teste do campo aberto sendo utilizado em *zebrafish* e fundamentando-se na capacidade desses animais, de uma vez habituados à arena (comportamento normal), situarem-se na região central da área e consequentemente com maior comportamento exploratório (STEWART et al., 2010).

3.8 NANO-EMULSÕES

Nano-emulsões (NEs) são sistemas coloidais constituídos por gotículas esféricas em escala nanométrica de diâmetro médio em torno de 200 nm. Devido a sua grande área superficial, as NEs podem ter diversas vantagens práticas para produtos naturais, incluindo monoterpenos, como aumento da biodisponibilidade (SEDAGHAT DOOST et al., 2019)

Elas são sistemas em estado de não-equilíbrio (FENG et al., 2020) que permanecem estáveis cineticamente devido ao tamanho diminuto de suas gotículas. A escala nanométrica das nano-emulsões permite, além da prevenção frente à sedimentação e cremagem, que elas se apresentem opticamente como sistemas transparentes ou translúcidos a olho nu (SOLANS et al., 2005). Apesar do fato de que gotículas cujo diâmetro seja inferior ao comprimento de onda da luz tenham tendência à transparência (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018), é importante salientar que outros fatores podem ser determinantes, como por exemplo, a diferença entre índices de refração das fases dispersa e contínua (ZHANG; MCCLEMENTS, 2018).

Os métodos de preparação podem ser divididos basicamente em dois grandes grupos, denominadas de alto aporte de energia e baixo aporte de energia. Os de alto aporte necessitam de equipamentos altamente especializados (p.ex. homogenizadores de alta pressão, ultrasonicadores), porém, apesar de gerar nanogotículas, apresentam alguns inconvenientes. Além do alto custo envolvido, deve ser mencionado o fato de que grande parte da energia aplicada (~99%) é perdida sob a forma de calor, o que torna esses métodos geralmente ineficientes (SOLANS; GARCÍA-CELMA, 2017) não podendo ser considerados promissores em termos de métodos amigáveis ao meio ambiente, uma demanda mundial atualmente.

Nano-emulsões contendo óleos essenciais ricos em linalol foram obtidas por homogeneização de alta pressão. Elas foram obtidas a partir da mistura de 0,5% de polissorbato 80, 5% de fase oleosa que consistia em uma proporção 1:1 de óleo essencial e triglicerídeos de cadeia média (MCT) e 94,5% de tampão fosfato e sua homogeneização à 10000 psi. A nano-emulsão com óleo de tomilho teve tamanho médio de 109,66 nm e a nano-emulsão de óleo de canela 93,07 nm e o teor de linalol de cada OE era de 10,08% e 6,98%, respectivamente (WAN et al., 2019).

No estudo de Prakash e Vadivel (2020) nano-emulsões de misturas de citral e linalol foram obtidas pelo método de ultrasonicação. A formulação contendo apenas linalol e polissorbato 80, ambos 5%, teve tamanho médio de gotículas abaixo de 50

nm, no entanto, com alto IP (maior de 0,4) e ela apresentou sinais de instabilidade após 15 dias de armazenamento. Neste mesmo estudo, a adição de vários inibidores da maturação de Ostwald levou a um discreto aumento no tamanho de gotículas das formulações preparadas com citral e linalol mas foi capaz de controlar o crescimento do tamanho de gotícula e proporcionou formulações mais monomodais.

Uma nano-emulsão de linalol com tamanho de gotículas de $173,59 \pm 4,15$ nm e IP de $0,24 \pm 0,006$ foi preparada usando 10% de uma mistura de linalol e MCT (40/60) e 10% de polissorbato 80 pelo método de emulsificação espontânea e sua atividade antimicrobiana frente a bactérias de importância na indústria de alimentos foi promissora (BALTA et al., 2017).

Por sua vez, os métodos de baixo aporte podem ser subdivididos, basicamente em função da inversão da curvatura espontânea do tensoativo. Em alguns casos específicos pode haver formação de nano-emulsões pela rápida difusão de moléculas do solvente (inclusive sistemas sem tensoativos) e/ou tensoativos hidrofílicos para a fase contínua sem inversão de fases. Esse processo é chamado de auto emulsificação e o método de emulsificação espontânea pode ser utilizado industrialmente a baixos custos. Já quando ocorre inversão de fases, o processo de mudança da curvatura espontânea do tensoativo ocorre usualmente de negativa para positiva, uma vez que a maioria das nano-emulsões que são obtidas são do tipo O/A (nano-emulsões aquosas). Quando ocorre com mudança de temperatura, o método é denominado “*phase inversion temperature*”, já quando ocorre mudança de composição, é denominado “*phase inversion composition*” (SOLANS; SOLÉ, 2012).

3.8.1 Fatores de influência na formação e comportamento de nano-emulsões

Para que as NEs sejam formadas, é necessário que se aplique energia no sistema, que pode ser fornecida mecanicamente (métodos de alto aporte) ou através de mudanças no estado de equilíbrio (métodos de baixo aporte). De acordo com a equação a seguir:

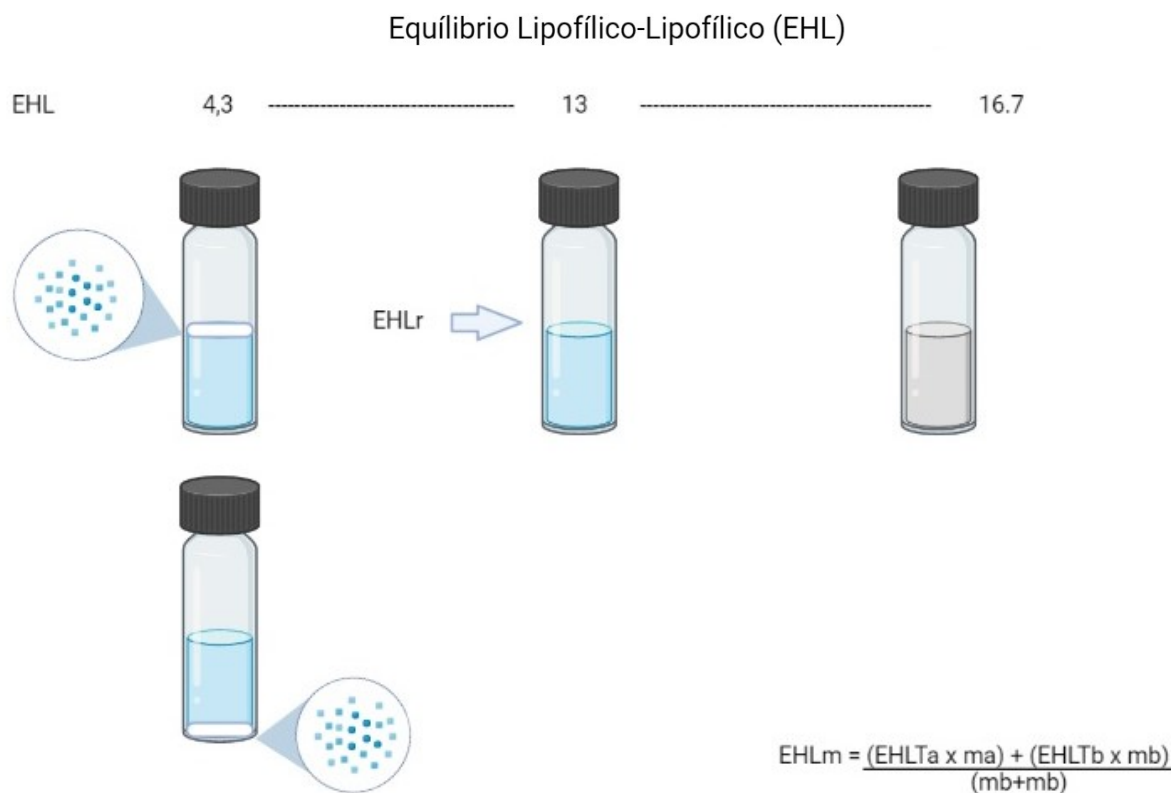
$$\epsilon_{\min} \sim \frac{3\gamma\phi_d^3}{\alpha},$$

onde, $\varepsilon_{\min}$ é o mínimo de *input* de densidade de energia requerida, γ é a tensão interfacial entre a fase dispersa (interna) e a fase contínua (externa) e ϕ_d é a fração de volume da fase dispersa. Portanto, a redução da tensão superficial irá gerar, naturalmente, gotículas de menor diâmetro α (HELGESON, 2016). Por isso, uma das principais estratégias para obtenção de NEs é a utilização de quantidades crescentes de tensoativos em relação ao OE na fase de delineamento experimental.

A influência da relação-tensoativo-óleo (RTO), onde se mantém a concentração de óleo fixa e se aumenta gradativamente a quantidade de tensoativo, obtendo-se uma série de nano-emulsões, é uma abordagem útil e que pode fornecer informações valiosas através da interpretação de gráficos de distribuição de gotícula obtidos por EDL. Outros fatores de influência importantes são o tipo de tensoativo e localização inicial do tensoativo, dentre outros (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2015).

Embora NEs possam ser preparadas sem tensoativos (DUARTE et al., 2020), podendo-se nesse caso variar proporções entre as fases aquosa e orgânica que contém os próprios constituintes do OE capazes de potencialmente reduzir a γ , quando preparadas com tensoativos, esses podem estar presentes individualmente ou sob a forma de misturas (DUARTE, 2019). Quando sob a forma de misturas, é usual se utilizar na proporção correspondente ao valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico requerido (EHLr) do óleo.

Figura 9. Representação esquemática de protocolo para preparação de nano-emulsões a partir do método de determinação do EHLr de óleos.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Experimentalmente, o EHLr de um óleo é determinado a partir da preparação de uma série de sistemas emulsionados com pares de tensoativos, sendo também preparados com os tensoativos individuais que compõe o par (**Figura 9**). A partir da observação do (s) sistemas mais estáveis, pode-se estreitar a faixa até chegar-se ao sistema emulsionado cujo (s) tensoativo (s) de EHL conhecido será definido como valor de EHLr do óleo em questão (FERNANDES et al., 2013). A partir dessa estratégia, pode-se em seguida proceder com o método de nano-emulsificação de escolha para obtenção de nano-emulsões finas e potencialmente estáveis (JESUS et al., 2017).

Nano-emulsões a base de OEs são certamente mais complexas do que diversos outros tipos de sistemas coloidais, uma vez que diversos constituintes dos OEs podem possuir propriedades físico-químicas distintas, dificultando seja a geração ou estabilização das nanogotículas.

Alterações moduladas por transferência de massa dos constituintes da fase interna para fase externa (e vice-versa) e consequentemente alterações de tamanho

de gotícula podem reduzir o efeito desejado. Porém, de forma paradoxal, a liberação desses constituintes apolares pode ser necessária para que o efeito seja atingido (GAO; DECKER; MCCLEMENTS, 2019). Ryu e colaboradores (2019) investigaram a difusão molecular de nano-emulsão a base do OE de orégano utilizando tubos de diálise de diferentes poros, sendo um capaz de transportar os componentes do OE através da fase aquosa e o outro (de maior poro), também permitiria também com auxílio de micelas. Nesse modelo, os autores inseriram dentro dos tubos de diálise, nano-emulsões a base de triglicerídeos para mimetizar regiões hidrofóbicas de células microbianas que receberiam os constituintes bioativos. Não foram avaliados pelos autores a influência do contato direto das nano-emulsões frente aos microrganismos.

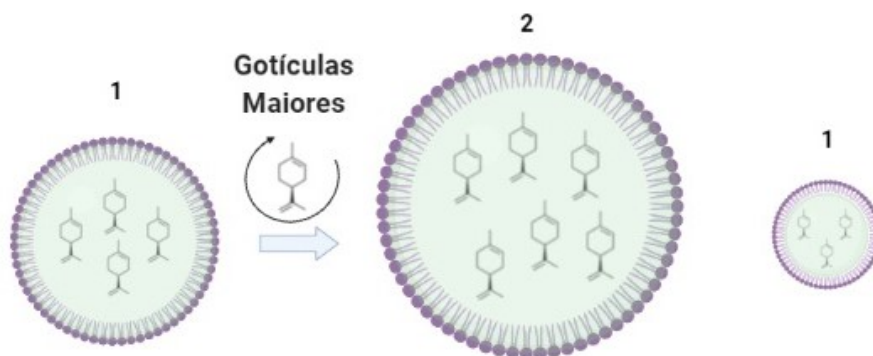
Embora intrinsecamente seja intuitivo pensar que os constituintes de OEs sejam “hidrofóbicos”, é interessante notar que essas misturas complexas podem ser até mesmo consideradas “mais” hidrofílicas do que muitos óleos comumente usados para preparar NEs, como ácidos graxos.

McClements e colaboradores (2012) investigaram o efeito de constituintes de OEs como inibidores “endógenos” da Maturação de Ostwald, o principal mecanismo de desestabilização de NEs. Foram tabuladas e analisadas diversas propriedades físico-químicas e moleculares *in silico* disponíveis na Plataforma online Chempider®. Foram consideradas importantes a solubilidade em água, o LogP, ponto de ebulição, entre outros. Nesses estudos com OEs de limão provenientes de distintos tratamentos e consequentemente com composição química variável, os autores observaram que a inibição da variação de gotícula (VG) foi modulada por substâncias de baixa solubilidade em água presentes na fase interna (RAO; MCCLEMENTS, 2012a).

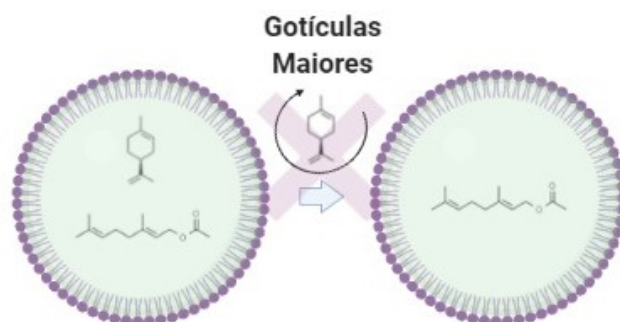
A Maturação de Ostwald se fundamenta na migração de substâncias mais hidrofílicas de gotículas menores para gotículas maiores através da fase contínua. No entanto, foi hipotetizado que, uma vez que esse processo levaria à concentração nas gotículas menores de monoterpenos mais apolares (inibidores endógenos da Maturação de Ostwald), uma outra força termodinâmica devido a entropia de mistura se oporia ao processo de desestabilização (**Figura 10**). Esse fenômeno que favorece que as gotículas tenham composição química constante foi chamada de “*Compositional ripening*” (RAO; MCCLEMENTS, 2012a, 2012b).

Figura 10 – Representação esquemática da Maturação de Ostwald e *Compositional Ripening*

(A) Maturação de Ostwald



(B) "Compositional Ripening"



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

A coleta de *A. suaveolens* foi realizada no período da manhã (8:00 - 9:00), no Grupo Conquista de Ervas Medicinais (GCEM), localizado no bairro da Conquista, Santarém, Pará, (S 02° 26' 59,8''/ W 054° 45' 10,7''). As plantas foram cultivadas em canteiros cobertos com tela que permitia a passagem de 50% da luz incidente e adubadas com terra preta, esterco de gado e ovinos, na proporção de 5:1:1, com espaçamento entre plantas de 30 x 20 cm. Exemplares da espécie encontram-se depositadas no Herbário da EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil, sob o número de registro IAN 184689.

4.2 ÓLEO ESSENCIAL

4.2.1 Extração

O óleo essencial (OE) de *A. suaveolens* foi obtido a partir da biomassa, previamente desidratada em estufa (40°C) com circulação forçada de ar (LICIT LC – E80), sendo extraído pela técnica de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 3000 mL (MING et al., 1996). O tempo de extração foi fixado em 2 horas, contado a partir da verificação primeiro condensado gerado pela ebulição da água contida no balão. Após o processo extrativo foi realizada centrifugação e em seguida filtração com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) para retirada de qualquer resíduo de água presente no OE, que foi armazenado em frascos de vidro âmbar, identificado e mantidos sob refrigeração (5 °C). Foram realizadas três repetições do processo extrativo e o cálculo de rendimento do OE foi realizado de acordo com Santos e colaboradores (2004), utilizando a fórmula da base úmida, por meio da relação entre o volume de óleo obtido e a biomassa vegetal utilizada na extração.

4.2.2 Caracterização química

A identificação dos constituintes químicos do OE foi realizada em um

cromatógrafo em fase gasosa acoplada à detector de espectrometria de massas (CG-EM) modelo GCMS-QP2010 Ultra system (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) equipado com um auto injetor AOC-20i e um software GCMS-Solution contendo as bibliotecas Adams, NIST11 e FFNSC2. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica Rxi-5ms (*Restek Corporation*, Bellefonte, PA, USA) com dimensões de 30m x 0,25mm x 0,25µm. As condições de análise foram: temperatura do injetor (250°C); temperatura do forno (60-240°C, 3°C/min.); gás de arraste (hélio), injeção no modo *split* (1:20); ionização por impacto de elétrons (70 eV); fonte de ionização (200 °C), linha de transferência (250°C). Os espectros de massas foram obtidos através de escaneamento automático a cada 0,3 s, com fragmentos na faixa de 35-400 m/z. Os índices de retenção foram calculados para todos os componentes voláteis do OE utilizando-se uma série homóloga de n-alcanos (C₈-C₄₀) (Sigma-Aldrich), conforme equação linear de Van den Dool e Kratz (1963).

A análise quantitativa foi efetuada por método de normalização utilizando-se um cromatógrafo em fase gasosa acoplada à detector de ionização de chamas (CG-DIC) modelo GC 2010 Ultra System (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), operado sob condições similares as descritas anteriormente, exceto pela utilização de nitrogênio como gás de arraste.

4.3 NANO-EMULSÕES

4.3.1 Método de nano-emulsificação

As nano-emulsões foram preparadas através de método titrimético de baixo aporte de energia (JESUS et al., 2017). Previamente, a fase orgânica foi obtida através da formação de mistura homogênea de tensoativos (s) não iônico(s) e OE. Após essa etapa, a fase aquosa foi adicionada gota a gota sobre a fase orgânica mediante agitação vigorosa utilizando-se vórtex. A massa final das nano-emulsões foi 2 g, a concentração de OE final foi de 2,5%; m/m em todas as formulações e elas foram armazenadas em frascos do tipo vial sob temperatura controlada (25 ± 5 °C).

4.3.2 Desenvolvimento da nano-emulsão

4.3.2.1. Fatores de influência na geração e estabilização das nano-emulsões

- *Saturação da fase aquosa*

Foram avaliadas distintas fases aquosas e seus possíveis impactos no comportamento das nano-emulsões (LEE; MCCLEMENTS, 2010), sendo nesse estudo utilizada fase aquosa constituída de água deionizada pura e fase aquosa saturada com OE. A saturação da fase aquosa foi realizada por meio da preparação de uma dispersão do OE em água deionizada na concentração de 4,5 mg/mL. Para saturação da fase aquosa, após mistura do OE com água deionizada procedeu-se agitação vigorosa em vórtex por 2 min. e em seguida a mistura foi submetida a centrifugações a 3500 rpm por 30 minutos. O procedimento foi repetido por duas vezes e a após a separação da camada orgânica da camada aquosa, a fase aquosa saturada foi recolhida para utilização imediata.

- *Natureza do tensoativo*

As nano-emulsões foram preparadas com distintos tensoativos não iônicos conforme a seguir: polisorbato 85 (EHL = 11) ou pares de tensoativos (polisorbato 80/monooleato de sorbitano e polissorbato 80/trioleato de sorbitano) correspondentes ao equilíbrio hidrófilo lipófilo requerido (EHLr = 13) do OE de *A. suaveolens* (BRITO et al., 2021).

- *Relação tensoativo-óleo (RTO)*

Foi variada a proporção entre tensoativo (s) e OE na preparação das nano-emulsões. Em todas elas, foi mantida a mesma quantidade de tensoativo (s) e o valor da RTO foi calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$RTO = m_t/m_o,$$

Onde m_t é a massa de tensoativo (s) e m_o é a massa de OE (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2015).

- *Diluição*

O efeito da diluição foi avaliado para através do armazenamento das nano-emulsões concentradas e diluídas, após análise inicial por espalhamento dinâmico da luz.

4.3.3 Caracterização

4.3.3.1. Espalhamento Dinâmico da Luz (EDL)

As nano-emulsões foram caracterizadas quanto à distribuição do tamanho de gotícula pela técnica de espalhamento dinâmico da luz utilizando-se um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) equipado com um laser vermelho ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$; 10 mW) e sob um de ângulo de leitura de 173° . Os resultados foram expressos em função de média e desvio padrão do diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersão (IP).

A variação de gotícula (VG) foi calculada para fins de avaliação de mudanças no diâmetro de gotícula entre dias diferentes (GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015; MEHMOOD, 2015) conforme a fórmula a seguir:

$$VG = 100(f-i)/i$$

Onde f é o tamanho médio inicial e i é o tamanho médio final no intervalo ($i \rightarrow f$). Valores positivos indicam aumento de gotícula (AG) e valores negativos indicam diminuição de gotícula (DG).

4.3.3.2. Potencial zeta

A carga superficial foi medida através da motilidade eletroforética, também medidas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK).

4.3.4 Nano-emulsão selecionada

Foram utilizados critérios como: presença de Efeito Tyndall pronunciado, baixo diâmetro de gotícula, baixa VG, baixo IP, potencial zeta satisfatório, entre outros para definição da nano-emulsão selecionada (NES) para ensaios

farmacológicos desse estudo. Adicionalmente, foram realizadas etapas adicionais de verificação da influência de alguns fatores externos frente ao seu comportamento.

4.3.4.1 Influência do tempo

Foram coletadas alíquotas imediatamente após a preparação e após 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. Foram avaliados os parâmetros descritos previamente para distribuição de tamanho de gotícula.

4.3.4.2. Influência da temperatura

As nano-emulsões foram submetidas à uma programação linear de rampa de aquecimento (OLIVEIRA et al., 2017). A temperatura inicial foi de 20°C e a temperatura foi incrementada a uma taxa de 5°/min. até uma temperatura final de 80°C, sendo analisados os parâmetros descritos previamente para distribuição de tamanho de gotícula.

4.4 ZEBRAFISH

4.4.1 Aspectos éticos

Os estudos envolvendo animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá (CEUA-UNIFAP) e registrados sob o n° de protocolo 023/2019.

4.4.2 Aclimação

Os peixes da espécie *Danio rerio* (*Zebrafish*, linhagem selvagem) foram adquiridos (São Caetano Comércio de Animais Aquáticos Ltda. ME – Santo André – SP, Brasil). Os animais foram mantidos na Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos (UNIFAP) em um sistema com circulação constante de água com controle dos seguintes parâmetros: pH entre 6 a 8, temperatura entre 25 e 29 °C, dureza entre 140 e 145 mg/L de CaCO₃. Os animais foram mantidos sob regime claro/escuro de 12/12 horas, alimentados 2 a 3 vezes ao dia com ração comercial

em flocos para peixes ornamentais (Alcon Basic®, Camboriú, Brasil) e foram mantidos sob quarentena por 40 dias.

4.4.3 Obtenção dos ovos de zebrafish

No dia anterior ao teste, os machos e fêmeas foram colocados em aquários de reprodução na proporção de 2:1, antes das luzes serem apagadas. No dia seguinte, 30 minutos após o acendimento da luz e, portanto, após a cópula, desova e fertilização esperados, as armadilhas de desova contendo os ovos fertilizados foram removidas para o ensaio *in vitro*. Para evitar as chances de falha na obtenção dos ovos, outros dois grupos de *zebrafish* também foram colocados em tanques de reprodução e os ovos coletados dos 3 grupos foram homogeneizados gerando uma maior diversidade genética para o ensaio (OECD, 2013; DE OLIVEIRA-FERRAZ et al., 2020).

4.4.4 Teste de toxicidade aguda em embriões de peixes

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo da OECD nº 236 (2013) com modificações. Ovos recém fertilizados de zebrafish foram distribuídos em uma placa de 96 poços em temperatura controlada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Eles foram expostos à NES, a uma dispersão dos tensoativos utilizados na preparação da NES e ao OE não nano-emulsificado nas concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O n por grupo foi de 30 ovos. Os estágios do desenvolvimento larval e suas alterações foram monitorados diariamente até 96 h após a fertilização.

4.4.5 Ensaio preliminar de toxicidade aguda comparativa

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de toxicidade oral aguda: procedimento “*up and down*” (OECD, 2008), com modificações. O teste foi realizado conforme a seguir: um único animal (macho e fêmea) recebeu a dose de 125 mg.kg^{-1} (expresso em concentração de OE) nos grupos tratados com a nano-emulsão ou com o OE não-nanoemulsificado. Os grupos controle foram tratados, respectivamente, com a dispersão de tensoativos utilizados na preparação da NES

ou diluente do OE não-nanoemulsionado (polissorbato 80) em dose equivalente. Para o propósito comparativo da nano-emulsão com o OE não-nanoemulsificado, a dose de 125 mg.kg^{-1} foi escolhida com base na maior concentração possível de ser alcançada com a nano-emulsão. Foi considerado que depois de testar um (1) indivíduo de cada sexo, mesmo se todos animais dos grupos tratados sobreviverem, é possível observar qualquer alteração comportamental e/ou possíveis sinais de efeitos indesejados ou tóxicos com início, duração e severidade sugerindo um padrão diferente de neuroefeitos, administrando-se quatro (4) animais adicionais por grupo, então um total de cinco (5) animais são testados por grupo. O experimento foi realizado por 14 dias e após esse período os animais foram submetidos à eutanásia conforme descrito por Favoretto e colaboradores (2019).

4.4.6 Toxicidade oral aguda do óleo essencial

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de toxicidade oral aguda: procedimento “*up and down*” (OECD, 2008) com modificações. Inicialmente, foi realizado o teste limite no qual um indivíduo de cada sexo recebeu a dose de 2000 mg/kg de OE. Em seguida, seguiu-se o para o teste principal, que consistiu na administração da dose inicial seguida pelas doses sequencialmente ajustadas para cima ou para baixo com base nos resultados prévios observados após 24 horas da administração. Neste trabalho, a dose inicial foi de 175 mg/kg, seguida por uma reversão para cima obedecendo ao fator de 3,2, obtendo-se a dose 550 mg/kg. A partir daí, as reversões foram realizadas obedecendo a fatores médios em torno de 1,2 - 2. Quando as doses foram estabelecidas, mais outros 4 animais de cada grupo foram testados. Ao final do ensaio as doses administradas foram: 650, 550, 475, 350, 175 e 125 mg/kg. Os animais foram observados a cada 30 minutos nas primeiras 4 horas após a administração da dose e depois, diariamente por 14 dias.

4.4.7 Teste do tanque novo

Os animais foram colocados em jejum 24h antes do experimento e foram aclimatados a sala de experimentação 1h antes do início do ensaio. Após a pesagem, as doses individuais foram calculadas em mg.kg^{-1} . Cada animal recebeu 100 mg/kg de cafeína como indutor de ansiedade e 15 minutos depois, receberam a dose do tratamento. Em seguida, foram colocados em um aquário e perseguidos por

1 minuto com uma rede de cor escura. Em seguida foram imediatamente colocados no tanque novo, onde foram filmados individualmente por 6 minutos (EGAN et al., 2009; CACHAT et al., 2012). Os grupos experimentais ($n = 5$) estão mostrados na **tabela 3**.

Os vídeos obtidos foram analisados manualmente por três avaliadoras independentes para acessar os seguintes parâmetros: tempo gasto no topo, tempo gasto no fundo, proporção topo/fundo, latência para entrada no topo e número de entradas no topo (EGAN et al., 2009; CACHAT et al., 2012).

Tabela 3 – Desenho experimental do teste do tanque novo utilizado nesse estudo.

GRUPO EXPERIMENTAL		TRATAMENTO	DOSE (mg.kg ⁻¹)*
1			75
2			25
3	OE Nano-emulsificado	NES	7,5
4			2,5
5			0,8
6	Branco	Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano	0,0
7			75
8			25
9	OE não nano-emulsionado	OE	7,5
10			2,5
11			0,8
12	Branco	P80	0,0
13	Controle positivo ou padrão	Buspirona	25
14	Controle negativo	Água (Veículo)	-

*Doses expressas em mg.kg⁻¹ de OE

OE – óleo essencial de *A. suaveolens*

NES – nano-emulsão selecionada (preparada com P80 e trioleato de sorbitano – EHL = 13)

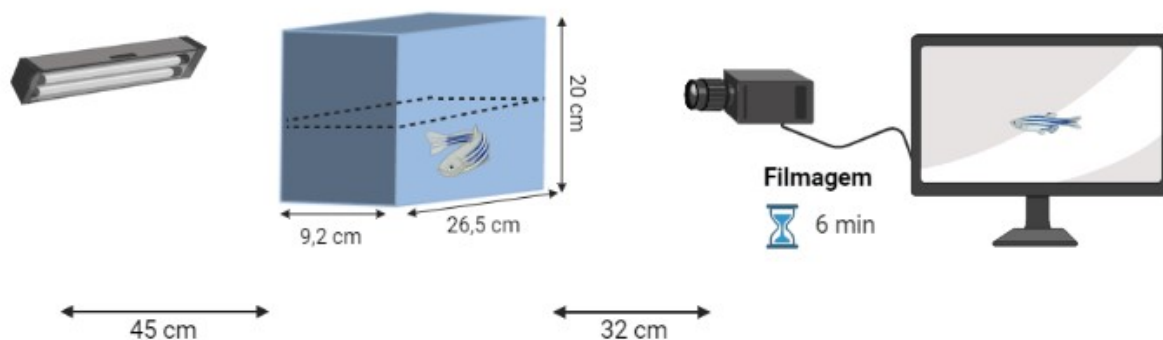
P80 – polisorbato 80

○ **Aparato**

O teste comportamental foi realizado usando um tanque preenchido com água do aquário até o nível de 16 cm (3,9 L). O tanque possuía o formato retangular de vidro transparente (20 cm de altura x 9,2 cm de largura x 26,5 cm de comprimento). As laterais e o fundo foram cobertos com material branco opaco para diminuir o contato visual do peixe com o exterior e o reflexo de luz nas paredes do tanque. A parede posterior foi coberta com uma folha de poliuretano como difusor de luz entre a fonte de luz e o tanque. As gravações foram realizadas frontalmente, a uma

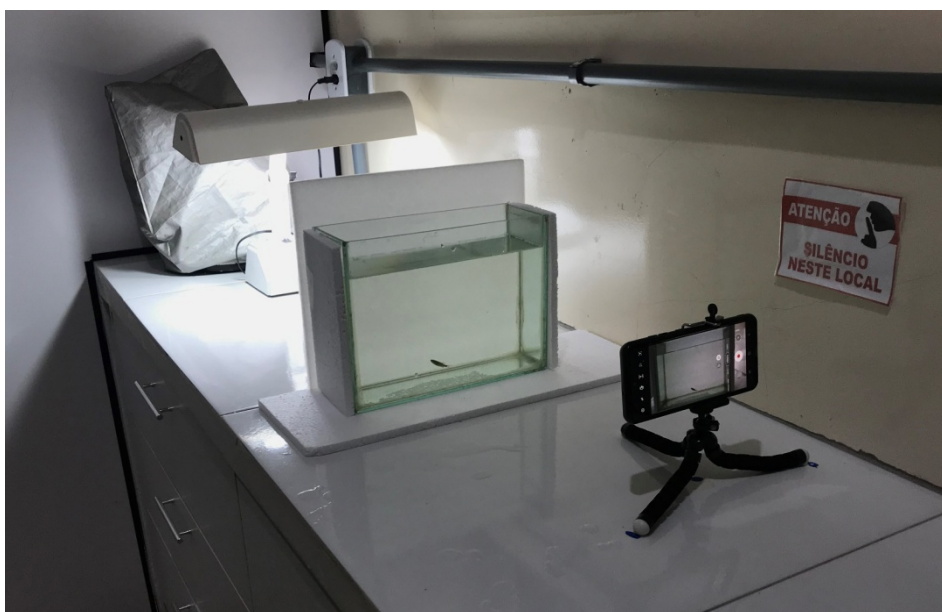
distância de 34 cm e a fonte de luz foi colocada posteriormente ao aquário a uma distância de 45 cm, conforme mostrado na **figura 11** e na **fotografia 1**.

Figura 11 – Representação esquemática do aparato utilizado no teste do tanque novo



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Figura 12 – Fotografia do aparato utilizado no teste do tanque novo.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

4.5 ESTUDOS IN SILICO

4.5.1 Predição de atividade

A predição de atividade, por modelo *in silico*, foi realizada através da submissão de três moléculas presentes no OE de *A. suaveolens* (linalol, farneseno e massoialactona) no web servidor PASS (<http://way2drug.com/PassOnline/index.php>), onde é possível realizar a predição de até 2000 tipos de atividades biológicas, utilizando a forma estrutural de moléculas utilizadas no trabalho com uma comparação à estrutura de compostos com atividades biológicas já bem estabelecidas, baseando-se na relação estrutura atividade. As moléculas ativas usadas para comparação são resgatadas de pesquisas abertas, patentes, quimiotecas públicas e de algumas empresas, além de outros. Apenas resultados que demonstram probabilidade de atividade (PA), sendo maior que a probabilidade de ser inativa (PI), foram levados em consideração.

Para se definir melhor a atividade dos compostos discutidos, foi utilizado também o web servidor *Similarity Ensemble Approach* (SEA) (<https://sea.bkslab.org/>), que fornece seus resultados com o mesmo princípio básico utilizado no servidor anterior. Seu foco é relacionado a geração de resultados de atividade em alvos farmacológicos e a estatística da comparação entre a molécula submetida e o banco de dados do SEA se dá através do coeficiente de tanimoto, onde valores mais próximos de 1 serão mais similares. Além disso, é calculado o valor esperado (E-value), que diz respeito à aleatoriedade do resultado exibido. E-values menor que 1×10^{-10} são considerado essenciais para dizer que o resultado não foi aleatório.

Assim como o SEA foi utilizado para tornar a busca por um alvo de possível potencial, o web servidor SwissTarget (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) também foi utilizado para gerar tais respostas. Este trabalha de forma similar ao SEA, entretanto seus valores de confiabilidade são expressos em porcentagem da probabilidade daquele alvo ser de fato sensível a estrutura molecular que foi submetida.

Por último, as moléculas foram avaliadas de acordo com a literatura disponível no *Cortellis Drug Discovery Intelligence* (CDDI) acerca dos estudos farmacológicos que estão realizando com estas moléculas, para levar em

consideração o efeito a qual estão abordando e o mecanismo de ação avaliado. Todos os resultados advindos do PASS, SEA, SwissTarget e CDDI foram voltados para mecanismos envolvidos em transtornos de humor.

4.5.2 Predição de propriedades farmacocinéticas

Para a predição de propriedades farmacocinéticas utilizou-se o web servidor PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>), avaliando os seguintes descritores farmacocinéticos: absorção intestinal humana (HIA), permeabilidade em células Caco2 e *Madin-Darby Canine Kidney cells* (MDCK), ligação a proteínas plasmáticas (PPB) e penetração na barreira hematoencefálica (BBB). Este web servidor gera os resultados baseado em comparação de descritores moleculares com os das moléculas em análise, sejam eles constitucionais, topológicos, lipofílicos, geométricos, eletrônicos, termodinâmicos, entre outros, e os compara com diversos banco de dados. Os valores padrão para levar em consideração a análise dos resultados estão demonstrados na **tabela 4** e são fornecidos pelo próprio PreADMET.

Tabela 4 – Valores padrão para os descritores farmacocinéticos.

Descritores	Valores
HIA	> 70 Boa absorção < 20 Má absorção
Permeabilidade em células Caco-2	> 70 Alta < 4 Baixa
Permeabilidade em células MDCK	> 500 Alta < 25 Baixa
PPB	> 90 Alta < 90 Baixa
BBB	> 2 Alta absorção < -1 Baixa absorção

4.5.3 Predição de propriedades toxicológicas

Para alinhar um perfil toxicológico *in silico* para as 3 moléculas, foram utilizados dois web servidores diferentes. O primeiro foi o mesmo utilizado para o perfil farmacocinético – PreADMET – e o segundo foi o ProTOX-II (https://tox-new.charite.de/protox_II/). Este último citado trabalha através de similaridade estrutural, análises de fragmentos, características mais frequentes e aprendizado de máquina para a validação das comparações.

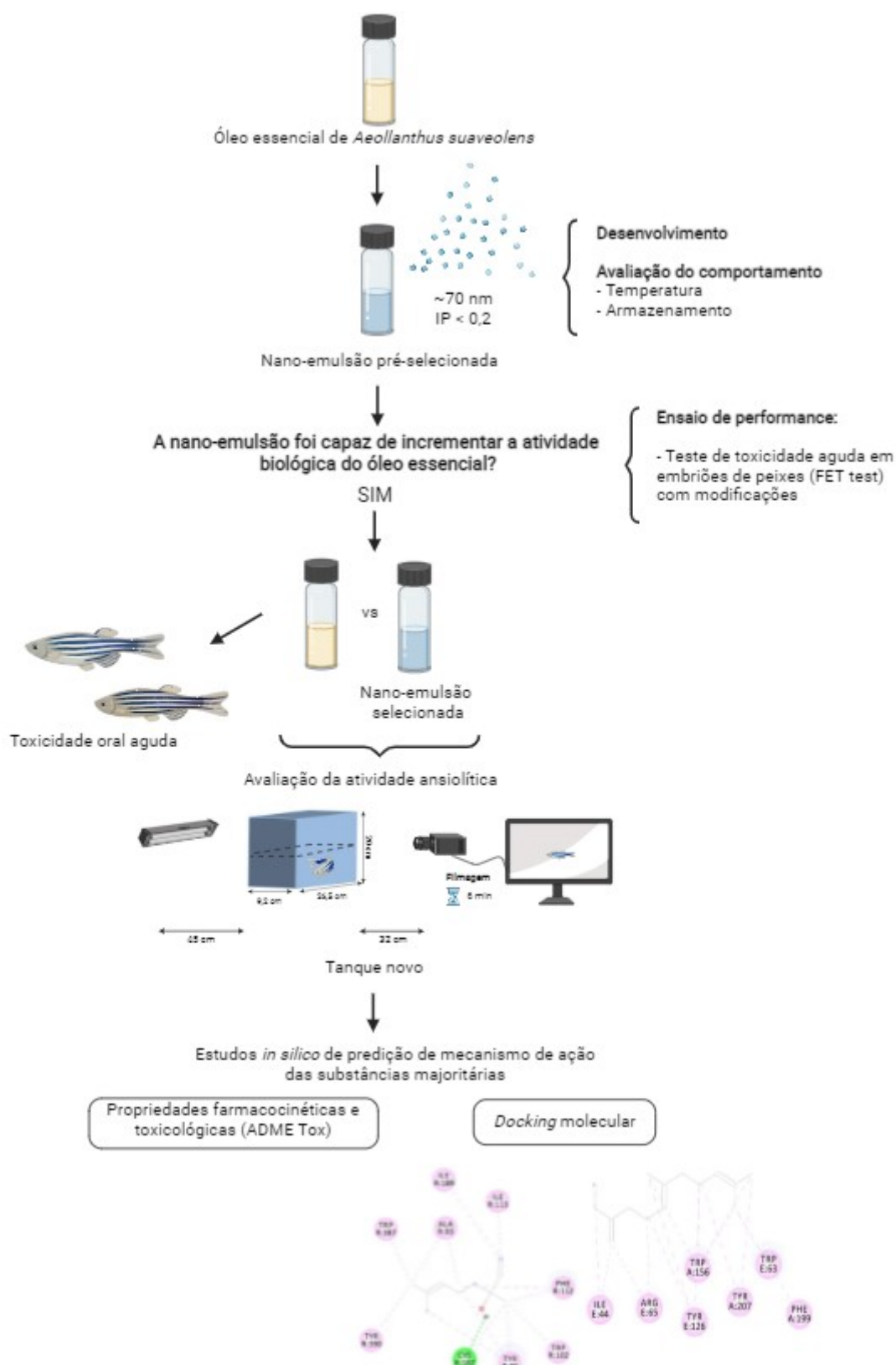
Os pontos toxicológicos avaliados no PreADMET foram probabilidade de ser tóxico pelo teste Ames, inibição do canal HERG e carcinogenicidade. Já no ProTOX-II foram avaliados hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunogenicidade, mutagenicidade e citotoxicidade.

4.5.4. Docking Molecular

O método de docking molecular foi realizado utilizando o software GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking), baseado em algoritmo genético e possibilita realizar um ensaio com os resíduos do sítio ativo flexíveis. Este método foi realizado para três alvos farmacológicos diferentes, baixados no protein data bank (PDB): GABA-aminotransferase (PDBID: 4Y0I) e mais dois receptores de serotonina, 5HT_{1A} (PDBID: 7E2Z) e 5HT_{3A} (PDBID: 6W1J), co-cristalizadas com as seguintes moléculas: PSZ, aripiprazol e alosetron, respectivamente. Estas proteínas foram limpas previamente, retirando os átomos de água e outros ligantes que não fossem os citados anteriormente e em seguida, foram submetidas ao GOLD, adicionando-se átomos de hidrogênio. Foram retirados seus respectivos inibidores co-cristalizados, para poder dar prosseguimento ao encaixe das moléculas em estudo. Todos os parâmetros do GOLD foram mantidos dentro dos padrões, com exceção do tamanho da região da proteína no encaixe, definida em 10Å. A função de pontuação escolhida foi ChemPLP e foram geradas 10 soluções de pose para cada molécula, elencando a melhor através do GoldScore.

Para validar o processo e ter conhecimento das coordenadas do sítio ativo de cada uma das 3 proteínas, foi realizado o redocking. Vale ressaltar que para a validação do método para a proteína 5HT_{3A}, foi colocada rigidez na molécula do aripiprazol.

Representação esquemática de todo delineamento experimental utilizado nesse estudo



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os parâmetros obtidos no ensaio do tanque novo foram analisados utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste *post-hoc* de Tukey e, para confirmação de tendências observadas entre alguns grupos, análises pareadas utilizando o teste T foram realizadas. O software utilizado foi o GraphPad Prism 9.1.0.221 (San Diego, EUA).

A dose letal mediana (DL₅₀) foi calculada por análise PROBIT com intervalo de confiança de 95% utilizando o software Statgraphics Centurion XVIII versão 18.1.12. (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, EUA).

5.1 ÓLEO ESSENCIAL

O rendimento da extração do óleo essencial (OE) em função da biomassa desidratada foi $1,20 \pm 0,42$ (m/m). A sua composição química encontra-se apresentada na **tabela 5**. O sesquiterpeno β -farneseno (36,3%) e o monoterpeneo linalol (33,6 %) foram os constituintes majoritários, correspondendo a aproximadamente 70% do OE. Também foi detectada em quantidade considerável ($> 10\%$ da abundância relativa do OE) de outra substância característica, a massoialactona. Esses resultados estão de acordo com o relatado na literatura para essa espécie (SANTOS et al., 2018; MARTINS et al., 2016). Em amostras de *Aeollanthus heliotropioides* Oliv. [= *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng.] coletadas na região central de Camarões, o OE extraído por hidrodestilação das suas partes aéreas apresentou composição semelhante, contando com as seguintes substâncias majoritárias: linalol (25,67%), farneseno (13,20%), β -cariofileno (6,02%), terpineol (4,88%) e germacreno-D (4,14%) (NGO-MBACK et al., 2020). Em um estudo comparativo entre o OE obtido da planta fresca e da planta seca, foi mostrado que as substâncias majoritárias são linalol (49,3%) e (*E*)- β -farneseno (34,9%) para a planta fresca e (*E*)- β -farneseno (32,8%), 2-decen-5-olídeo (15%), linalol (31,6%) e acetato de linalila (8,5%) para a planta fresca. O autor sugere que a variação quantitativa de 2-decen-5-olídeo e Δ -decalactona são artefatos que aparecem no óleo por ciclização do ácido 5-hidroxi-2-decenóico existente na planta fresca e outras variações ocorrem devido ao processo de secagem e extração (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2003).

Tabela 5 – Componentes do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens*

CONSTITUINTES	IR _{CALC.}	IR _{LIT.}	%
Canfeno	947	946	0,1
β -pineno	975	974	0,54
Limoneno	1027	1024	0,51
(<i>E</i>) β -Ocimeno	1042	1044	0,63
Linalol	1100	1095	33,59
Terpinoleno	1082	1086	0,13
Borneol	1169	1165	0,27
α -Terpineol	1192	1186	2,52
Nerol	1221	1227	0,32
Acetato de Linalila	1246	1254	4,22
Acetato de Bornila	1280	1287	0,12
Formiato de Geranila	1294	1298	0,12
Eugenol	1351	1356	0,09
Acetato de Nerila	1360	1359	0,33
Acetato de Geranila	1380	1379	0,62
α - <i>cis</i> -Bergamoteno	1413	1411	0,39
α - <i>trans</i> -Bergamoteno	1433	1432	0,9
α -Santaleno	1419	1416	1,87
β -Santaleno	1446	1445	0,09
β-Farneseno	1456	1454	36,27
Massoialactona	1476	1471	12,95
Germacreno-D	1480	1484	0,34
Isobutanoato de Nerila	1484	1490	0,25
Δ -decalactona	1490	1493	0,25
Δ –amorfenol	1517	1511	0,15
Nerolidol	1561	1561	0,1
α -Cadinol	1653	1652	0,14
Total			97,81

5.2 NANO-EMULSÕES

O OE foi utilizado para preparação de uma solução saturada para obtenção das nano-emulsões, com a finalidade de avaliar a influência da saturação da fase aquosa na formação e estabilização das nano-emulsões. A transmitância ($\lambda = 600$ nm) média foi de 99,3%, evidenciando a transparência da solução. Essa solução saturada também foi submetida à análise pela técnica de EDL para verificação da distribuição de possíveis gotículas autonanoestruturadas. Os valores obtidos encontram-se apresentados na **tabela 6**. Nanogotículas com diâmetro médio abaixo de 250 nm e IP em torno de 0,350 foram observadas no dia de sua preparação. Após 48 h, o tamanho médio foi superior a 500 nm e o IP foi ligeiramente inferior a 0,500. A verificação desse aumento indica a necessidade de utilização da solução recém preparada nos estudos de avaliação da influência da saturação da fase aquosa na geração das nanoestruturas.

Rao e McClements (2012a) classificam as substâncias presentes nos OE com base nas suas propriedades *in silico* como de baixa solubilidade em água (<0,05 mg/L) e de alta solubilidade em água (> 5 mg/L). Enquanto esses autores concluíram que uma relativa alta concentração (> 14%) de substâncias de baixa solubilidade em água em alguns OEs de limão foram capazes de inibir a Maturação de Ostwald por um mecanismo denominado de “*Compositional ripening*” (RAO; MCCLEMENTS, 2012a, 2012b), quando o OE tinha limoneno como constituinte majoritário, cuja solubilidade em água (4,581 mg/L) fica próxima do limite e sendo portanto considerado pelos autores de solubilidade intermediária, uma distribuição bimodal foi observada e atribuída ao fenômeno clássico de Maturação de Ostwald (RAO; MCCLEMENTS, 2012b).

No presente trabalho, observa-se que o OE de *A. suaveolens* possui relativa alta concentração de β -farneseno, cuja solubilidade em água é baixa (0,009022 mg/L). Por outro lado, o outro constituinte majoritário apresenta alta solubilidade em água (683,7 mg/L). Nesse sentido, a saturação da fase aquosa, seguida da medição por EDL pode indicar alguma formação de nanogotículas por mecanismo emulsificação espontânea (SOLANS; SOLÉ, 2012), como por exemplo migração de linalol para a fase externa e atuação do β -farneseno de uma Maturação de Ostwald no tempo inicial da formação das nanogotículas, com posterior desestabilização do sistema.

Tabela 6 – Distribuição do tamanho de gotícula da fase aquosa saturada com OE de *A. suaveolens*.

Horas	Tamanho médio (nm)	IP
0	230,9 ± 6,1	0,349 ± 0,040
48	569,5 ± 77,5	0,492 ± 0,051

$$VG_{0,48} = 146,6\%$$

Foram preparadas nano-emulsões com polisorbato 85 (EHL 11), sendo obtidos tamanhos de gotícula (> 300 nm) e IP relativamente altos (> 0,450) (**Tabela 7**). Em um estudo realizado com o mesmo tensoativo não iônico, a nano-emulsão a base de sucupira-branca constituída por grande percentual de β -cariofileno apresentou baixo tamanho de gotícula (< 180 nm) e IP (<200). Porém, o constituinte da fase interna foi um oleoresina (OLIVEIRA et al., 2017), que difere dos OEs por apresentarem material não-volátil e matéria graxa, o que pode ter contribuído para esses menores valores via inibição de mecanismos de rápida desestabilização na geração das nanogotículas que podem ter contribuído para de maiores gotículas e IP logo após a formação. No entanto, foi possível observar que a nano-emulsão preparada na RTO 1 e com fase aquosa saturada, apresentou menor tamanho médio (312,1 ± 4,546 nm). Nesse caso, para esse tensoativo, pode-se sugerir que a fase aquosa saturada talvez atue inibindo a maturação de Ostwald pelo bloqueio da solubilização seletiva dos componentes mais hidrofílicos do OE, uma vez que a fase aquosa já estaria previamente esgotada quanto a sua capacidade de solubilização devido a etapa de saturação prévia. No caso da RTO 2, a maior quantidade de tensoativo pode estar gerando um efeito solubilizante e contribuindo para migração dos constituintes hidrofílicos para a fase externa. Essas nano-emulsões não foram armazenadas em sua forma diluída devido aos valores obtidos, considerados altos.

Tabela 7 – Distribuição do tamanho de gotícula (dia 0) das nano-emulsões preparadas com o OE de *A. suaveolens* e polisorbato 85.

	Tamanho médio (nm)	IP
RTO 1	423,5 ± 12,0	0,839 ± 0,016
RTO 1 _{Sat}	312,1 ± 4,5	0,483 ± 0,029
RTO 2	434,5 ± 34,9	0,696 ± 0,162
RTO 2 _{Sat}	504,3 ± 8,7	0,474 ± 0,034

As nano-emulsões preparadas com o par de tensoativos polisorbato80/monoleato de sorbitano no EHL 13 na RTO 1 apresentaram tamanho e IP satisfatórios. O aumento da RTO levou ao aumento do tamanho médio (> 200 nm) e IP (> 0,300) das nano-emulsões preparadas com água ou água saturada. As nano-emulsões concentradas apresentaram indícios de instabilidade após 24h e portanto, apenas as armazenadas diluídas foram avaliadas quanto a distribuição do tamanho de gotícula (**Tabela 8**). Foi observada uma maior manutenção do perfil de distribuição de gotículas na RTO 1 ao longo do tempo, possivelmente porque o aumento da quantidade de tensoativos (RTO2) levou ao aumento da solubilidade do OE na fase externa, levando conseqüentemente a um rápido aumento das gotículas logo após a preparação. Efeitos termodinâmicos direcionam a movimentação de componentes das gotículas da fase interna para micelas. Essas possuem uma redução da energia livre devido a proteção das partes apolares dos tensoativos frente à água (fase contínua), podendo acomodar essas moléculas da fase interna (RAO; MCCLEMENTS, 2012b). Os diferentes valores de VG encontram-se apresentados na **tabela 9**.

Tabela 8 – Distribuição do tamanho de gotícula (dia 0 e dia 1) das nano-emulsões diluídas preparadas com o OE de *A. suaveolens* e polissorbato 80/monoleato de sorbitano (EHL = 13).

	Dia 0		Dia 1	
	Tamanho médio (nm)	IP	Tamanho médio (nm)	IP
RTO 1	176,7 ± 0,755	0,265 ± 0,011	170,8 ± 1,250	0,262 ± 0,014
RTO 1 _{Sat}	172,6 ± 1,436	0,247 ± 0,006	171,0 ± 2,515	0,261 ± 0,003
RTO 2	218,3 ± 2,291	0,421 ± 0,009	209,8 ± 2,926	0,453 ± 0,031
RTO 2 _{Sat}	203,7 ± 5,600	0,331 ± 0,043	199,8 ± 4,011	0,320 ± 0,036

Tabela 9 – Variação entre 0 e 24 horas das gotículas das nano-emulsões diluídas preparadas com o OE de *A. suaveolens* e polissorbato 80/monoleato de sorbitano (EHL = 13).

	VG _{0,1} *
RTO 1	- 3,34%
RTO 1 _{Sat}	- 0,93%
RTO 2	- 3,89%
RTO 2 _{Sat}	- 1,91%

Na RTO 1 não houveram maiores diferenças na formação e estabilização das gotículas, quando comparadas as nano-emulsões preparadas com água ou água saturada. Possivelmente, a alta quantidade de tensoativo de maior EHL, como o polissorbato 80 (EHL = 15), quando comparado ao polissorbato 85 (EHL = 11), gera um efeito solubilizante capaz de superar a capacidade da fase aquosa saturada de prevenir a migração de substâncias mais hidrofílicas e tornando menos efetivo esse mecanismo de saturação, especialmente na geração (comparação das distribuições de tamanho de água x água saturada). Nesse caso específico, a formação de um filme interfacial rígido ao redor das gotículas por um par de tensoativos de distintos valores de EHL pode estar associado à estabilização do sistema (ORTIZ-ZAMORA et al., 2020).

A análise de distribuição de tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas utilizando o par de tensoativos polissorbato 80/trioleato de sorbitano

indica que, com uma maior RTO, há um aumento do tamanho de gotícula e aumento do IP. No dia da preparação, não foram observadas maiores diferenças no perfil de distribuição de gotícula, quando comparadas nano-emulsões preparadas em uma mesma RTO e com distintas fases aquosas, embora um ligeiro aumento de diâmetro médio de gotícula foi notado para a RTO 2 (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Distribuição do tamanho de gotícula (dia 0) das nano-emulsões preparadas com o OE de *A. suaveolens* e polisorbato 80/trioleato de sorbitano (EHL = 13).

	Tamanho médio (nm)	IP
RTO 1	68,16 ± 0,7	0,205 ± 0,016
RTO 1 _{Sat}	71,74 ± 0,4	0,224 ± 0,008
RTO 2	86,56 ± 0,08	0,521 ± 0,005
RTO 2 _{Sat}	117,0 ± 0,9	0,453 ± 0,008

Tabela 11 – Distribuição do tamanho de gotícula das nano-emulsões concentradas e diluídas preparadas com o OE de *A. suaveolens* e polisorbato 80/trioleato de sorbitano (EHL = 13).

		Dia 1		Dia 2	
Armazenamento		Tamanho médio (nm)	IP	Tamanho médio (nm)	IP
Concentrada	RTO 1	68,7 ± 0,1	0,167 ± 0,010	68,9 ± 0,1	0,153 ± 0,006
	RTO 1 _{Sat}	72,7 ± 0,1	0,184 ± 0,010	73,1 ± 0,3	0,185 ± 0,002
	RTO 2	84,9 ± 0,6	0,299 ± 0,007	88,1 ± 0,3	0,265 ± 0,008
	RTO 2 _{Sat}	107,4 ± 1,7	0,378 ± 0,059	111,8 ± 0,5	0,288 ± 0,003
Diluída	RTO 1	64,6 ± 0,2	0,196 ± 0,003	62,6 ± 0,3	0,204 ± 0,006
	RTO 1 _{Sat}	68,1 ± 0,3	0,218 ± 0,003	65,4 ± 0,02	0,220 ± 0,002
	RTO 2	85,6 ± 0,7	0,513 ± 0,004	86,0 ± 1,0	0,494 ± 0,034
	RTO 2 _{Sat}	121,7 ± 4,4	0,379 ± 0,044	120,1 ± 2,2	0,406 ± 0,058

Foi observada a manutenção do perfil de distribuição de gotícula das nano-emulsões preparadas na RTO 1, seja na forma armazenada concentrada ou diluída (**Tabela 11**). A variação de gotícula (**Apêndice I**) indica que, as nano-emulsões armazenadas concentradas apresentam menor variação, sendo observada uma ligeira tendência a menores mudanças de diâmetro para a nano-emulsão preparada com água deionizada. Foi possível também observar que as nano-emulsões na RTO 2 armazenadas concentradas, de ambas as fases aquosas, tiveram ligeira redução dos IP. Esse comportamento não foi observado durante o armazenamento diluído, possivelmente pelo fato de que o processo de aumento da fase contínua levou, nesse caso, à dissolução de parte de população de gotículas.

A comparação das nano-emulsões preparadas com polisorbato 80/ trioleato de sorbitano e polisorbato 80/monooleato de sorbitano, ambas com água saturada e no RTO 1 (EHL 13), permitiram observar baixos valores de VG entre o dia da preparação e o dia 1 (**Tabela 12**). No entanto, um menor tamanho de gotícula foi observado para a nano-emulsão preparada com a polisorbato 80/ trioleato de sorbitano (~70 nm e 0,205), quando comparada a nano-emulsão preparada com o polisorbato80/monooleato de sorbitano (~172 nm e 0,250).

Ela também obteve baixa VG entre o dia do preparo e 48h (1,14%), e entre 24h e 48h a VG foi de 0,30%, evidenciando uma baixa tendência para o AG para esta formulação.

Tabela 12 – Comparação de variação de gotícula ($VG_{0,1}^*$) entre as nano-emulsões preparadas com OE de *A. suaveolens* e dois pares de tensoativos (EHL 13) em diferentes fases aquosas e RTO.

	P80/MS	P80/TS
RTO 1	- 3,34%	0,85%
RTO 2	- 3,89%	-1,89%
RTO 1 _{Sat}	- 0,93%	1,34%
RTO 2 _{Sat}	- 1,91%	-8,20%

O trioleato de sorbitano é um tensoativo com características mais lipofílicas, quando comparado ao monooleato de sorbitano, devido à presença de três grupos oleato. Essa característica pode ter favorecido um menor tamanho de gotícula e IP. A utilização de dois tensoativos, sendo um mais hidrofílico e outro mais lipofílico é uma estratégia bem estabelecida para a estabilização de emulsões e nano-emulsões. O uso de um componente na fase interna que é insolúvel na fase contínua e/ou co-tensoativos que adsorvem firmemente na interface óleo-água são alternativas para a prevenção da maturação de Ostwald, o principal mecanismo de instabilização e quebra de nano-emulsões (TADROS et al., 2004). Nós hipotetizamos que este tensoativo pode estar influenciando na formação e estabilização da formulação por meio das duas formas (OLIVEIRA-FERRAZ et al., 2020). Em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, foram preparadas nano-emulsões a base do OE de *A. suaveolens* com polisorbato 80/monooleato de

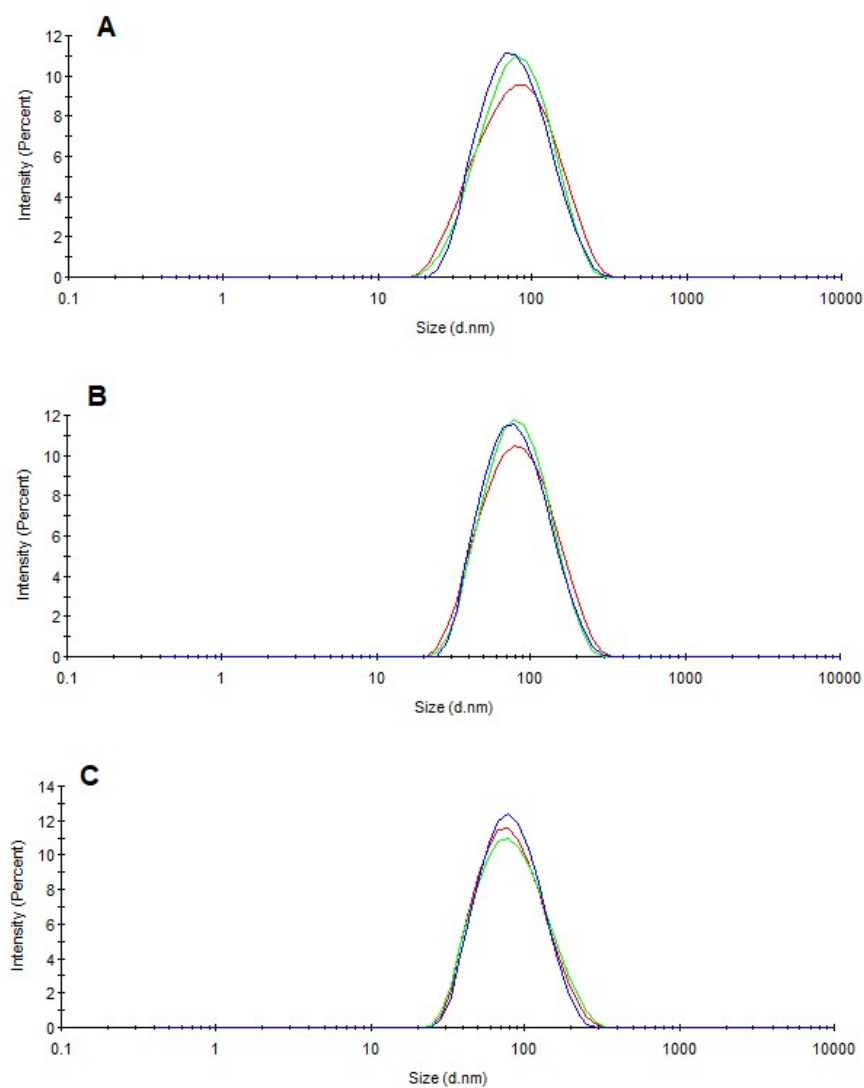
sorbitano na RTO 1 com resultados similares (BRITO et al., 2021). No entanto, a mudança do par de tensoativo, mediante troca do monooleato de sorbitano pelo trioleato de sorbitano permitiu que a VG fosse reduzida no mínimo por volta de 7x após 48 h de monitoramento.

Para verificação da repetibilidade do processo e confirmação da escolha da nano-emulsão selecionada (NES) foi realizado o preparo em triplicata dessas duas nano-emulsões, conforme apresentado na **tabela 13**.

O IP é um parâmetro que reflete a homogeneidade da distribuição de uma população de colóides. Portanto, é de se esperar que uma baixa VG seja acompanhada de manutenção do IP. Isso pode ser observado pela visualização dos gráficos de distribuição de gotícula da nano-emulsão preparada com polissorbato80/ trioleato de sorbitano e água deionizada na RTO 1 (EHL 13), que manteve seu perfil de distribuição homogênea (**Gráfico 1**). Os valores de potencial zeta, que também foi utilizado para confirmação da escolha da NES dentre essas duas nano-emulsões, também foram mais negativos no período analisado (**tabela 13**).

É importante salientar que nano-emulsão preparada com polissorbato80/ trioleato de sorbitano e água deionizada na RTO 1 (EHL 13) também apresentou reflexo azulado mais acentuado, típico de sistemas coloidais e atribuído ao efeito Tyndall. Com base nessas observações e atendimento aos critérios pré-estabelecidos, a nano-emulsão preparada com polissorbato80/ trioleato de sorbitano e água deionizada na RTO 1 (EHL 13) foi pré-definida como NES para continuidade da avaliação de fatores de influência externa sobre comportamento do colóide e ensaios farmacológicos desse estudo.

Gráfico 1 – Distribuição de tamanho de gotícula da NES no dia do preparo (A), após 24 horas (B) e após 48 horas (C). A direita fotografia do aspecto macroscópico da NES no dia do preparo (concentrada e diluída)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Tabela 13 – Distribuição de tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas com óleo essencial de *A. suaveolens* e dois pares de tensoativos não-iônicos.

(h)	Nano-emulsões								
	P80/SM			P80/TS			P80/TS*		
	Tamanho (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)
0	176,7 ± 0,8	0,265 ± 0,011	- 12,5 ± 0,100	68,16 ± 0,7	0,205 ± 0,016	- 18,2 ± 0,153	70,65 ± 2,8	0,225 ± 0,018	- 17,5 ± 1,21
24	170,8 ± 1,3	0,262 ± 0,014	-16,4 ± 1,44	68,7 ± 0,1	0,167 ± 0,010	- 20,7 ± 0,902	70,42 ± 3,3	0,201 ± 0,027	- 19,2 ± 1,29
48	n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	n.m	72,23 ± 3,6	0,195 ± 0,032	- 24,6 ± 3,51

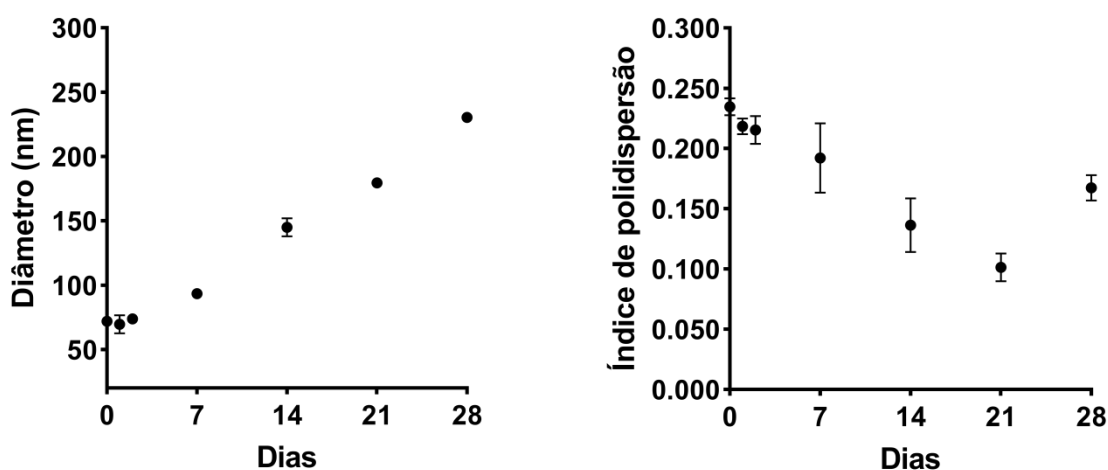
*Nano-emulsão selecionada, valores médios representando três preparos independentes das nano-emulsões

n.m não medido

5.2.1 Nano-emulsão selecionada

O estudo de influência do tempo no comportamento da NES foi realizado por 28 dias. Duas réplicas independentes foram preparadas e armazenadas em temperatura controlada ($25 \pm 3^\circ\text{C}$). Os valores médios de diâmetro e IP mensurados por EDL estão apresentados no **gráfico 2**.

Gráfico 2 – Dados de diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão da NES ao longo do tempo.



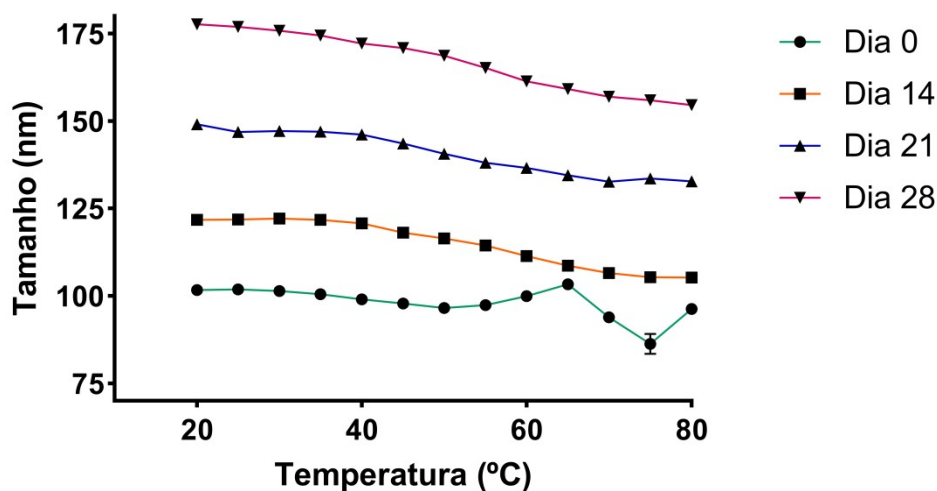
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Houve uma tendência para a uniformidade de tamanho em torno de 70 nm e IP médio de 0,2 no dia do preparo, após 24 horas e 48 horas. Nas semanas seguintes é possível observar um aumento do diâmetro das gotículas, chegando à 230 nm ao final de 28 dias. É interessante observar que no fenômeno de Maturação de Ostwald, a migração de substâncias mais hidrofílicas de gotículas menores para gotículas maiores não deveria gerar diminuição do IP. Por outro lado, o IP diminuiu para valores médios de 0,16. A adição de esqualano, um triterpeno acíclico biosinteticamente associado a duas unidades bioquimicamente ativas de farneseno pode ser uma boa estratégia para prevenir essa variação observada principalmente a partir de 48h -7 dias de armazenamento. O esqualano é considerado um efetivo inibidor da liberação de variação de gotícula (PUIGVERT, 2015) e concomitantemente ao uso do trioleato de sorbitano, além dos próprios mecanismos

de “*compositional ripening*” associados ao β -farneseno, pode ser útil para que a NES exiba futura longa estabilidade cinética.

A influência da temperatura na NES também foi verificada ao longo de 28 dias de armazenamento. Ela foi submetida a uma rampa de aquecimento, iniciada na temperatura de 20 °C com incremento de temperatura de 5°C chegando até 80°C. A nano-emulsão apresentou tendência para aumento do tamanho de gotícula ao longo do tempo de armazenamento sem alterações no IP. No dia do preparo houve um aumento de tamanho na temperatura de 65°C seguida de um decréscimo em 75°C. Nos demais períodos avaliados houve uma sutil tendência para a diminuição do tamanho das gotículas com a elevação da temperatura (**Gráfico 3**). Esse fenômeno pode indicar que o aumento da temperatura da fase externa poderia estar contribuindo para uma maior solubilização dos componentes mais hidrofílicos da fase interna, promovendo a diminuição do tamanho das gotículas.

Gráfico 3 – Influência da rampa linear de incremento da temperatura em função da distribuição do tamanho de gotícula.



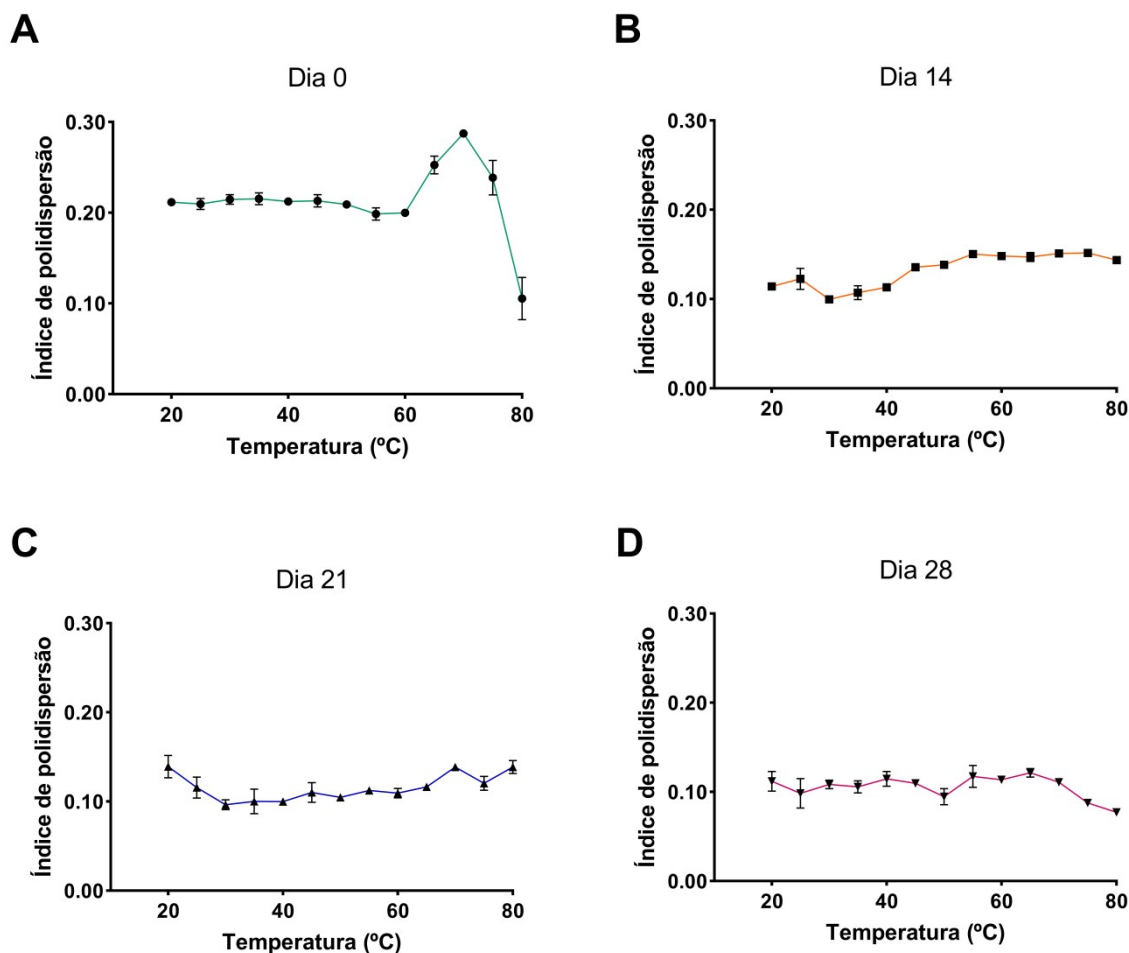
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

A uniformidade de tamanho das populações de gotículas de uma nano-emulsão é dada pelo IP. Este é um parâmetro importante para a estabilidade, já que uma baixa homogeneidade de gotículas favorece a maturação de Ostwald (SOLANS et al., 2005). Valores de IP próximos de 0 (zero) indicam maior uniformidade de distribuição de gotículas, enquanto valores que se aproximam de 1(um) indicam uma amostra polidispersa (TAN et al., 2016). Adicionalmente, um IP desejável pode variar

de acordo com a aplicação, podendo valores maiores serem considerados adequados quando o objetivo é uma via que não a parenteral (p.ex. aplicações na indústria de controle de pragas). Já no primeiro caso, um baixo IP deve ser respeitado, uma vez que o risco de ocorrência de gotículas maiores que o diâmetro dos menores capilares sanguíneos (~ 5 mm) podem levar à embolia pulmonar (AULTON; TAYLOR, 2016). Em nosso estudo os valores de índice de polidispersão considerados aceitáveis variam entre 0 e 0,2.

Ao longo do armazenamento, o IP caiu para aproximadamente 0,1 e permaneceu assim ao longo dos 28 dias (**Gráfico 4**). Apenas a nano-emulsão recém preparada apresentou um aumento para 0,3 na temperatura de 65°C e uma diminuição para 0,1 em 80°C. Nos demais dias analisados não houve alterações nesse parâmetro em função do incremento da temperatura, assim como, na análise de tamanho.

Gráfico 4 – Influência da rampa linear de incremento da temperatura em função do índice de polidispersão no dia do preparo (A), após 14 dias (B), 21 dias (C) e 28 dias (D).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

O estudo de sobre a influência de fatores externos sobre a NES evidencia uma necessidade de otimização de sua estabilidade cinética, uma vez que a manutenção da distribuição do tamanho de gotícula só ocorreu nos primeiros dias de armazenamento. Em nosso grupo de trabalho possuímos a perspectiva de utilizar substâncias fortemente lipofílicas na fase interna como estratégia à prevenção da maturação de Ostwald. A adição do triterpeno esqualeno consideravelmente insolúvel no meio aquoso (Log P = 13,09) foi estudado como estabilizante de nano-emulsões (TADROS et al., 2004). Na verdade, o OE de *A. suaveolens* possui uma substância majoritária que também possui características bastante lipofílicas: o β -farneseno (Log P = 6,62), um sesquiterpeno que poderia ser adicionado em sua

forma purificada à fase interna de forma a melhorar a estabilidade da nano-emulsão a base de OE de *A. suaveolens*.

No entanto, salienta-se que para os objetivos desse trabalho, que visa avaliar a modificação dos efeitos neuroativos do OE de *A. suaveolens* após a sua nano-emulsificação e considerando a estabilidade atingida durante 48h, a NES atende os critérios pretendidos. Um papel decisivo foi dado ao tamanho diminuto da NES, uma vez que quando menor o tamanho, maior a permeabilidade frente às barreiras biológicas em zebrafish (LI et al., 2017). Outras estratégias também podem ser utilizadas em casos em que um sistema nano-emulsionado não se mantém estável. Os sistemas de liberação de fármacos auto nano-emulsionáveis são utilizados na indústria para preparação de nano-emulsões por baixo aporte de energia (SOLANS e SOLÈ, 2012), mas também podem ser alternativas para redispersão imediata e prévia à sua utilização/administração.

5.3 ZEBRAFISH

Ensaio toxicológicos *in vitro* têm sido utilizados para a triagem de produtos naturais como ferramentas preliminares para a seleção de agentes terapêuticos promissores. No passado, alguns invertebrados foram usados na tentativa de correlacionar a toxicidade *in vitro* com os efeitos terapêuticos ou tóxicos, entretanto, a pesquisa translacional avançou desde então para modelos mais adequados, incluindo células e outros organismos.

Até o presente momento, apenas um ensaio preliminar com *Artemia salina* foi realizado para o OE de *A. suaveolens* com indicativo de possível citotoxicidade (MARTINS et al., 2016). No entanto, esses são dados preliminares e que exigem maiores aprofundamentos para correlação com outros organismos. Os estudos *in vivo* foram executados utilizando a NES recém preparada para minimizar possíveis alterações no perfil farmacocinético que poderiam ser originadas devido ao aumento do tamanho das gotículas. Assim como obter os resultados desejados de tamanho e homogeneidade da distribuição de gotícula são parâmetros importantes, uma vez que, essas características influenciam diretamente a estabilidade cinética do sistema, a investigação de uma alteração em alguma propriedade de interesse (SOLANS; SOLÈ, 2012), no caso a atividade biológica da nano-emulsão quando

comparada ao produto natural a não-nanoemulsionado, também desempenha um papel central nas bases conceituais adotadas nesse trabalho.

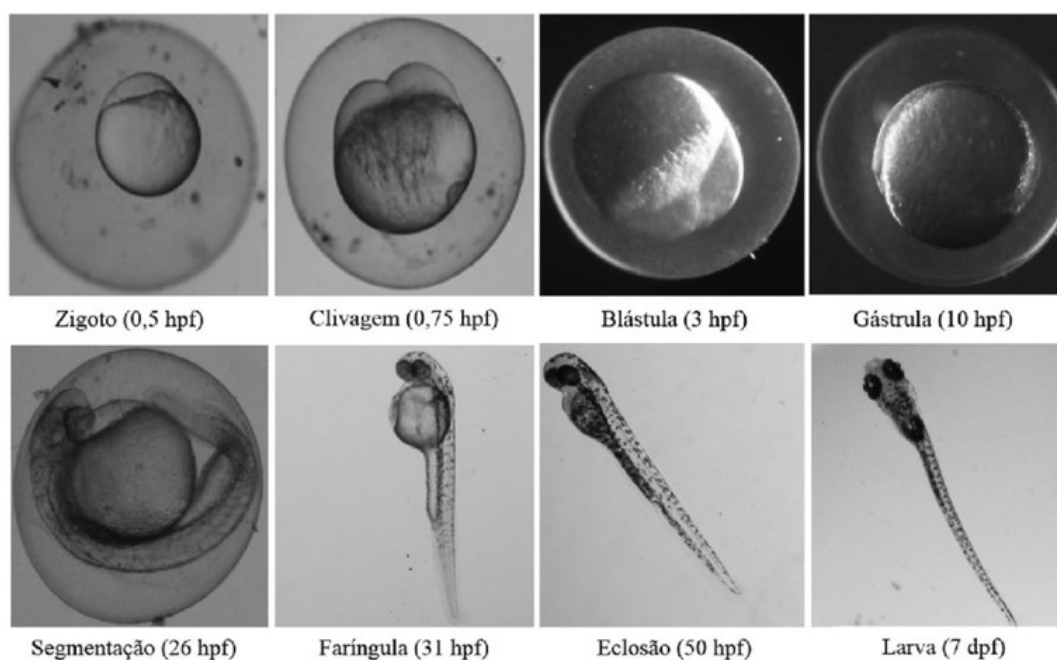
5.3.1 Teste de toxicidade aguda em embriões de peixes

A bioatividade da NES foi testada comparativamente ao OE não-nanoemulsionado utilizando-se o teste de toxicidade aguda embriões com adaptações para que a metodologia se ajustasse aos objetivos de um ensaio de performance. Isto é, um método que fosse capaz de responder se a nano-emulsificação do OE de *A. suaveolens* modificava a sua bioatividade e, no melhor dos casos, se potencializava os efeitos nas mesmas concentrações.

Os embriões de *zebrafish*, em seu desenvolvimento embrionário normal (**Fig.14**), encontravam-se no estágio de segmentação após 24 horas da fertilização. Nesse período, foram observados mais de 90% de embriões coagulados nas concentrações mais altas (100 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) tanto para a nano-emulsão quanto para o OE não nano-nanoemulsionado. Na menor concentração (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a nano-emulsão induziu 70% de coagulações e 30% de gástrula, enquanto o OE não nano-estruturado induziu 20% de coagulações, 50% de gástrula e 30% de embriões segmentados. Um total de 3,33% de embriões coagulados foi observado na menor concentração da dispersão de tensoativos utilizados na preparação da NES (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e os demais estavam no estágio de segmentação, enquanto 100% dos embriões do grupo controle negativo encontravam-se em segmentação. Após 72h de experimento, 100% dos embriões do grupo controle eclodiram, de acordo com o esperado, enquanto 83,33% e 33,33% de eclosões foram observadas no grupo da dispersão de tensoativos da NES a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Esses foram os níveis máximos de sobrevivência e eclosão no experimento. Todos os grupos tratados chegaram a 100% de coagulação depois de 48 h, com exceção da nano-emulsão na menor concentração (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), que estava em 96,67% nesse período e chegou a 100% após 72 h. De acordo com a OECD (2013), a taxa de eclosão no diluente deve ser maior ou igual 80% ao final das 96h de exposição. Esse critério foi atendido para os grupos tratados com diluentes da nano-emulsão e do OE não nano-emulsionado a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Comparativamente, a coagulação de embriões do OE não-nanoemulsionado foi 3,5 vezes menor que o tratamento com a nano-emulsão nessa concentração, sugerindo que a nano-emulsificação aumentou a

toxicidade aguda. No entanto, é importante mencionar que mesmo o OE a granel sendo menos tóxico, ele induziu atraso no desenvolvimento dos embriões quando comparado ao controle.

Figura 14 – Desenvolvimento embrionário nas primeiras 72 horas pós-fertilização e larva após 7 dias



Fonte: Siebel, A. M.; Bonan, C. D.; Silva, R. S. (2015)

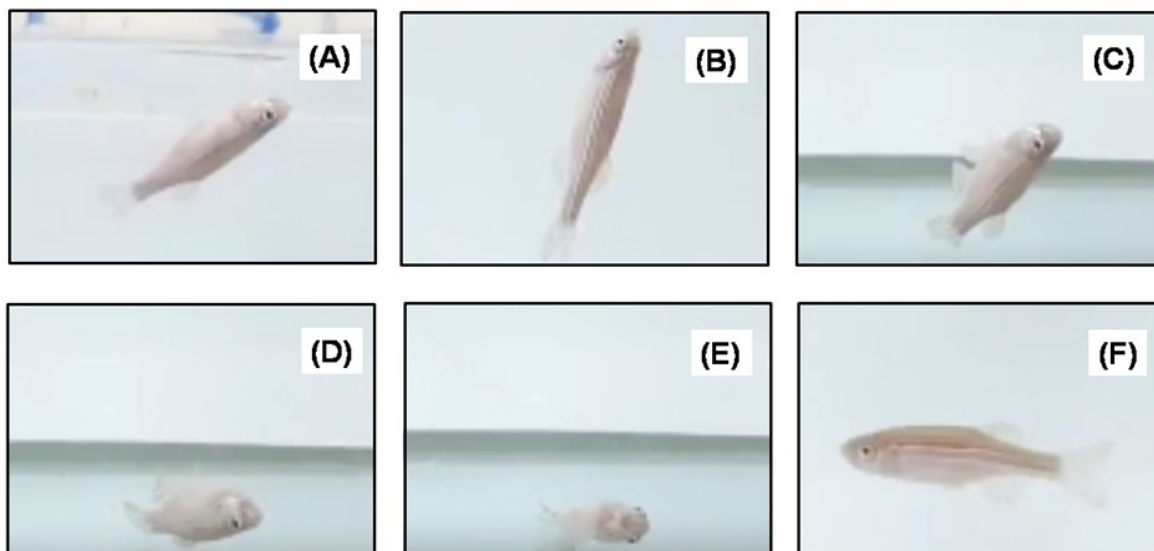
Considerando o crescente interesse nos embriões de *zebrafish* como uma ferramenta valiosa para a avaliação da toxicidade e potencial triagem de alternativas terapêutica de origem vegetal (JAYASINGHE; JAYAWARDENA, 2019), o FET test foi considerado uma estratégia promissora para comparação da bioatividade de nano-emulsões com seus OEs não nanoemulsificados, funcionando como uma racionalidade para a escolha de protótipos que tenham o objetivo de rapidamente atender ao critério de modificação de uma propriedade biológica devido à diminuição do tamanho das gotículas para a escala nanométrica por meio de um ensaio *in vitro* de rápida execução utilizando um organismo multicelular.

5.3.2 Ensaio preliminar de toxicidade aguda comparativa

Diferenças no metabolismo entre os adultos de *zebrafish* e seus embriões são esperadas (OECD, 2013). Assim, após a etapa inicial usando o FET teste como

teste de performance sugestivo de que a NES se encaixava nos critérios almejados para um sistema coloidal de interesse biológico, ela e o OE não nanoemulsionado foram administrados em machos e fêmeas adultos na maior dose possível para a NES de forma a comparar sua neuroatividade. Foi observado em ambos grupos um indicativo de proeminente efeito depressor do SNC. No grupo tratado com a NES, imediatamente após a administração, foi observada paralisia, que permaneceu por aproximadamente 1 minuto em todos animais (**Figura 15 A–E**). Também foi observado nado em um lado, nado na superfície, atividade exploratória (**Figura 15 F**), comportamento de perseguição ao espelho e thigmotaxia. Já no grupo tratado com OE não nano-emulsionado, diferente daqueles animais tratados com a NES, eles apresentaram geotaxia e imobilidade logo após a administração. Também foi observada ataxia, nado no fundo e comportamento de bater-e-deslizar. Após cerca de 8 minutos de administração, os peixes mostraram alguma atividade exploratória, no entanto, de maneira geral, a geotaxia e os movimentos erráticos foram marcantes. Os machos foram mais suscetíveis as alterações, especialmente, no caso do grupo tratado com o OE não-nano-emulsionado, como evidenciado pela imobilidade. As alterações comportamentais observadas foram classificadas de acordo com Kalueff e colaboradores (2013) e sugerem neuroatividade e efeitos sedativos.

Figura 15 – Fotografias seqüenciais de *zebrafish* apresentando paralisia logo após a administração da NES na (A) superfície, (B) meio e (C – E) fundo do aquário. Por fim, após aproximadamente 1 minuto, em (F) o mesmo animal consciente.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Não foram observadas mortes nos grupos tratados (OE e NES) e no grupo controle do OE (polissorbato 80), enquanto um macho morreu após 24h do tratamento com dispersão de tensoativos (polisorbato 80/trioleato de sorbitano, EHL=13), equivalentes a proporção utilizada para a preparação da NES. De acordo com a OECD, ratas fêmeas frequentemente são sutilmente mais sensíveis que machos, e desse modo, quando a espécie tem machos como mais suscetíveis/sensíveis, os ensaios de toxicidade aguda devem ser realizados em indivíduos desse sexo (OECD, 2008). Alguns diluentes amplamente utilizados em ensaios farmacológicos também podem exercer influência, como o propilenoglicol, que pode interferir como um agente ansiolítico (SILVA; ELISABETSKY, 2001). Na verdade, tanto espécimes fêmeas como machos do grupo da dispersão de tensoativos, com sinais mais marcantes no último, apresentaram geotaxia e imobilidade similar aos primeiros sinais do grupo do OE não nano-estruturado, sugerindo possível atividade sedativa. De toda maneira, a notável e pronunciada paralisia do grupo da NES sugere que a esse efeito é devido à diminuição do tamanho de gotícula do OE após a nano-emulsificação, mesmo que outros efeitos

sedativos devido a efeitos sinérgicos dos produtos naturais do OE e tensoativos não-iônicos dispersos na fase aquosa estejam contribuindo para a atividade.

Nesse sentido, ensaios farmacológicos adicionais em testes comportamentais específicos devem ser realizados com essas substâncias, especialmente o pouco testado trioleato de sorbitano, um tensoativo lipofílico, para melhor compreensão dos mecanismos, influência e dose nas quais elas podem exercer atividade.

A dose-dependência de alguns fármacos sedativo-hipnóticos é bem estabelecida. Eles podem induzir diferentes efeitos no SNC em função da dose, logo, efeitos hipnóticos são esperados em um estado de maior depressão do SNC (KATZUNG, 2014). Para nanofitomedicamentos, apesar da liberação controlada por um período estendido de ação e outras vantagens, os sistemas de liberação modificada com tamanho nanométrico também são muito promissores para o aumento da bioatividade. Por exemplo, quando comparados com a mesma dose administrada (expressa em concentração de cumarina), nano-dispersões de guaco induziram 60,38% de redução de dano, enquanto o extrato hidroetanólico convencional dessa espécie não promoveu nenhuma proteção, evidenciando que a diminuição do tamanho para escalas nanométricas potencializou a antimutagenicidade (SANTANA et al., 2019).

A atividade antidepressiva do OE de *A. suaveolens* e do linalol, um dos seus constituintes majoritários, foi confirmada durante a observação de uma redução do comportamento tipo-depressivo em roedores, após a administração intraperitoneal de doses de 75 e 30 mg.kg⁻¹. Curiosamente, neste estudo citado, os autores não encontraram atividade ansiolítica induzida pelo OE de *A. suaveolens* ou pelo linalol durante a avaliação do comportamento tipo-ansiolítico. Na verdade, foi hipotetizado que a ausência desse efeito poderia ser em função da via de administração intraperitoneal no lugar de outras vias (por exemplo, a via inalatória) ou pelo tratamento agudo, ao invés de tratamentos mais longos, ou também devido a necessidade de maiores doses (SANTOS et al., 2018). A depressão da função do SNC de maneira gradativa e dose-dependente pode diferir em termos de relação dose entre os efeitos diferentes e também grau de depressão do SNC, de acordo com alguns fármacos sedativo-hipnóticos. Seria de esperar que, uma vez que o fármaco atua como um sedativo e, portanto, reduz a ansiedade, se a dose for aumentada, os efeitos hipnóticos poderão ser alcançados. (KATZUNG, 2014)

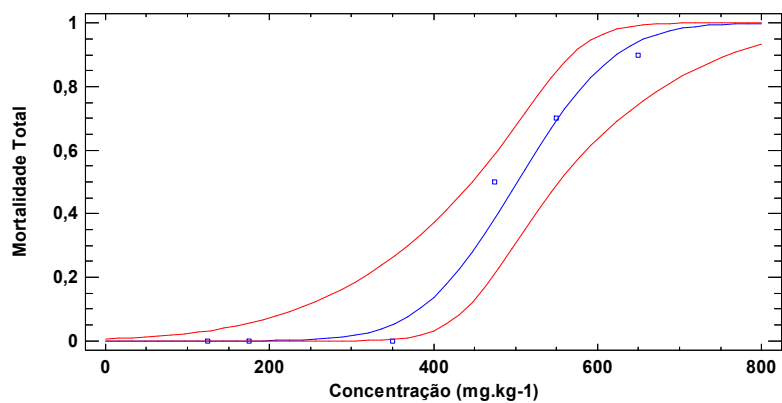
Alguns esforços foram feitos acerca dos mecanismos envolvidos no papel principal dos constituintes fitoquímicos do OE de *A. suaveolens* em uma tentativa de correlacionar aos efeitos psicofarmacológicos desse produto natural/ vegetal, amplamente utilizado na medicina popular. Elisabetsky e colaboradores (1995), depois de um estudo prévio in vivo no qual foi confirmada as atividades sedativa/hipnótica e anticonvulsivante do linalol, revelou que os efeitos sedativos no SNC induzidos por esse terpenoide pode ser pela inibição da transmissão glutamatérgica.

A notável atividade sedativa dose-dependente de uma lactona exógena, estruturalmente relacionada às lactonas endógenas do OE de *A. suaveolens*, também foi observada, revelando efeitos hipnóticos, anticonvulsivantes e hipotérmicos (COELHO-DE-SOUZA et al., 1997). Portanto, nossos resultados sugerem que provavelmente devido a maior absorção e/ou permeação no SNC após a nano-emulsificação, houve uma depressão mais pronunciada do SNC, alcançando um efeito superior ao inicialmente esperado efeito ansiolítico na dose sub-letal administrada, como evidenciada pela paralisia, que é uma alteração sugestiva de hipnose.

5.3.3 Toxicidade oral aguda do óleo essencial

Como não houve mortalidade na NES durante o ensaio preliminar de toxicidade aguda comparativa, não foi possível fazer diluições sucessivas para determinação da CL_{50} , uma vez que não era possível preparar uma “NES” mais concentrada (expressa em função de concentração de OE) sem prejuízo das características físico-químicas já caracterizadas do sistema. Foi realizada análise PROBIT (**Tabela 14, Gráfico 5**) para o OE não nano-nanoemulsionado. A dose letal mediana total calculada considerando-se fêmeas e machos foi de 502,808 mg.kg⁻¹. As DL_{50} também foram calculadas separadamente para cada sexo, respectivamente 447,081 mg.kg⁻¹ para machos e 531,946 mg.kg⁻¹ para fêmeas. Não houve diferença estatística significativa na relação entre a mortalidade e o sexo, no entanto, é possível observar uma tendência para menores valores de DL_{50} em zebrafish machos.

Gráfico 5 – Modelo ajustado com intervalos de confiança de 95%.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Tabela 14 – Análise PROBIT do OE não nano-nanoemulsificado de *A. suaveolens* frente à adultos de *zebrafish*.

Grupo	DL ₅₀	DL ₉₀	DL ₉₉	X ²	P
Machos/Fêmeas	502,808 (447,871 - 553,308)	623,276 (568,731 - 760,081)	793,298 (689,896 - 1101,32)	43,2206	0.0000
Machos	447,081 (334,427 - 526,807)	576,411 (503,463 - 834,164)	758,941 (629,33 - 1380,65)	23,9369	0.0000
Fêmeas	531,946 (433,578 - 654,405)	673,497 (587,236 - 1167,24)	873,273 (712,743 - 1982,38)	17,311	0.0000

5.3.4 Teste do tanque novo

No teste do tanque novo, os vídeos obtidos foram analisados manualmente por três avaliadoras cegas e independentes, a fim de quantificar o índice confiabilidade entre avaliadores (*inter-rater reliability index*), obtendo-se um coeficiente de correlação entre os resultados das análises maior que 0,97

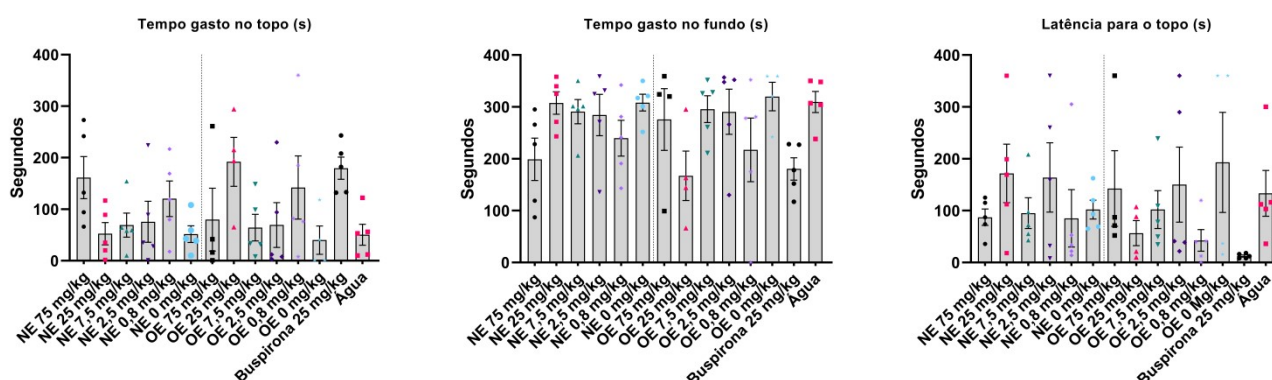
O teste do tanque novo é um ensaio comportamental baseado no paradigma da novidade, no qual, um ambiente novo desperta tanto medo/ansiedade/comportamento evitativo quanto curiosidade/exploração no animal. Os comportamentos exploratórios dependem do medo inibindo a exploração (ARAUJO et al., 2012; CACHAT et al., 2012). Ele é um teste análogo ao teste do campo aberto, amplamente utilizado para acessar comportamentos tipo-ansiosos ou tipo-antidepressivos em roedores, diferenciando-se pela adição de uma terceira dimensão, a vertical, ao comportamento dos peixes, permitindo avaliar a exploração do topo-fundo (STEWART et al., 2010; NGUYEN; STEWART; KALUEFF, 2014). Quando colocados em um ambiente novo, os *zebrafish* naturalmente vão para o fundo do tanque e diminuem a exploração ambiental até que se sintam seguros para nadar por regiões mais superficiais do aquário (CACHAT et al., 2012). Alguns parâmetros comportamentais são utilizados para avaliar se o animal está ou não apresentando comportamento tipo-ansioso ou estresse relacionados. De maneira geral, uma diminuição dos comportamentos exploratórios indica maior ansiedade ao passo que um aumento indica menor ansiedade. A mensuração desses parâmetros pode ser realizada utilizando *softwares* de análise de vídeo automatizados ou manualmente (CACHAT et al., 2012). Neste último caso, é importante que a análise seja realizada de forma cega e por mais de um analista, a fim de eliminar vieses relacionados a subjetividade e imparcialidade.

Dentre os parâmetros que podem ser mensurados manualmente, são de particular importância para este trabalho a latência para entrada no topo, o tempo gasto no topo, o tempo gasto no fundo, o número de entradas no topo e, por último, um parâmetro calculado a partir de anteriores: a proporção topo/fundo. A latência para entrada no topo é definida como o tempo, em segundos, que o peixe levou para atravessar, pela primeira vez, para a porção superior do tanque. Quanto maior a latência, maiores os níveis de ansiedade. O tempo gasto no topo e o tempo gasto no fundo indicam, em segundos, o tempo que o animal permaneceu respectivamente,

no topo e no fundo. Maiores tempos de permanência na porção superior do tanque indicam menores níveis de ansiedade. O número de entradas no topo é o número de vezes que o peixe cruza da porção inferior para a porção superior, quanto maior o número de entradas, menores os níveis de ansiedade. Já a proporção topo/fundo é definida pela razão entre o tempo gasto no topo e o tempo total analisado, que foi de 360 segundos, obtendo-se um valor entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1, menores os níveis de ansiedade (CACHAT et al., 2012).

Os parâmetros de tempo no topo, tempo no fundo e tempo de latência para entrada no topo não apresentaram diferença significativa nos grupos tratados (**gráfico 6**). Embora os resultados quando analisados por ANOVA, indiquem que há diferenças estatísticas, essas diferenças não foram verificadas quando foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey. Ainda assim, informações valiosas podem ser extraídas a partir das tendências que foram obtidas. Possíveis explicações envolvendo a farmacocinética de colóides pode estar relacionada nesses resultados conforme explicitado mais adiante. Houve um tempo de permanência maior na porção inferior do aquário tanto para os grupos tratados com OE não-nanoemulsionado quanto para a NES. O tempo de latência para entrada no topo foram semelhantes. Neste último ensaio (latência), o menor valor observado foi o do controle positivo, enquanto os grupos tratados apresentaram comportamento semelhante ao grupo que recebeu apenas água.

Gráfico 6 – Resultados de diferentes parâmetros avaliados no ensaio do tanque novo.

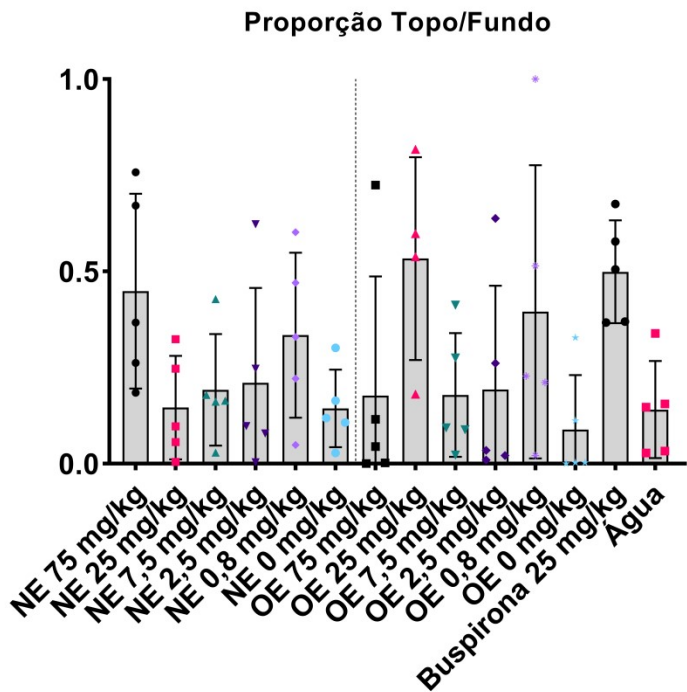


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

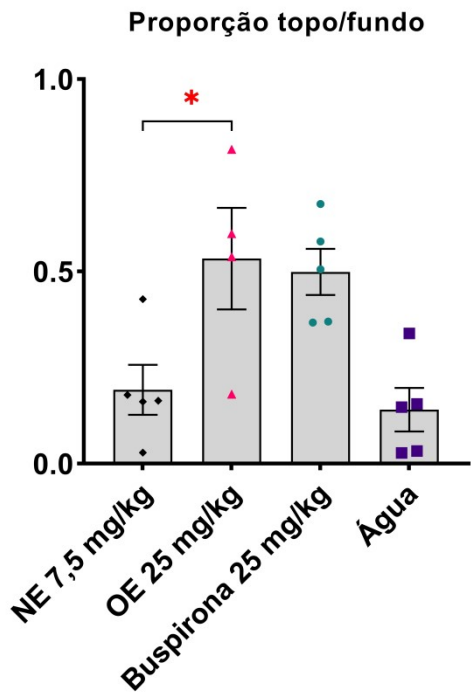
O **gráfico 7a** mostra os resultados de proporção topo/fundo dos grupos tratados e seus respectivos controles. O valor de proporção topo/fundo do grupo tratado com 25 mg.kg⁻¹ do OE não nano-emulsionado foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que o grupo 7,5 mg.kg⁻¹ de NE (**gráfico 7b**). Para preparação das diferentes doses do OE não nano-emulsionado, seu diluente, o polissorbato 80, era necessariamente aumentado, modificando-se diferentes “RTOs”. É possível que um colóide similar aos sistemas de entrega de fármacos auto-nano-emulsionantes tenha sido formado ao entrar em contato com o líquido presente no trato gastrointestinal, da mesma forma que vários tipos de outros sistemas podem ser formados em regiões de um diagrama pseudo-ternário ao se misturar água a misturas de tensoativo (s)/óleo em diferentes proporções. Uma vez formado no trato gastrointestinal do animal, formaria um sistema com gotículas de tamanho diminuto que poderia promover maior permeação aos tecidos e levando a um aumento dos efeitos do OE, tal como o aumento da atividade exploratória evidenciada pela maior proporção topo/fundo. Por outro lado, o efeito da diluição da NE em doses mais baixas com água poderia ter exercido efeito contrário. Pode-se esperar que as gotículas se solubilizaram na fase aquosa tornando o efeito neuroativo menos pronunciado.

Gráfico 7 – Resultados de proporção topo/fundo pós-ensaio comparativo entre OE não nano-emulsificado e NES.

(A)

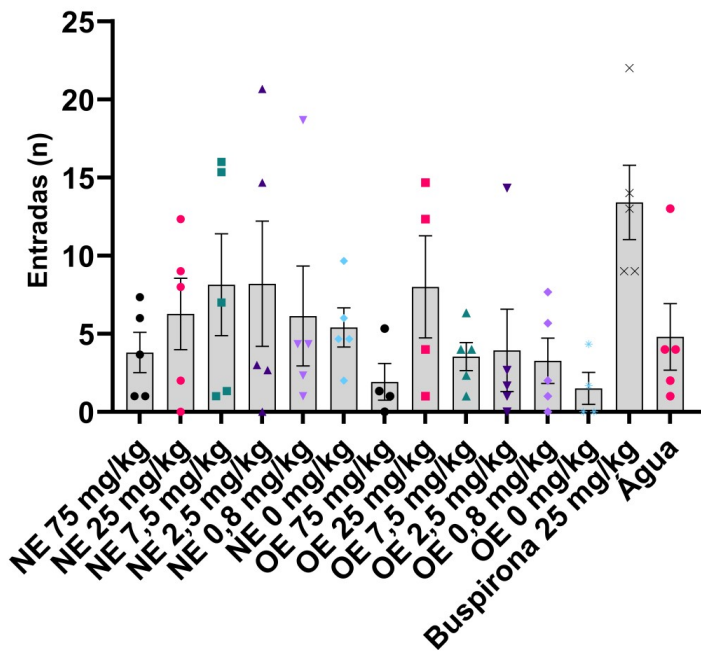


(B)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Gráfico 8 – Resultados de entradas no topo pós-ensaio comparativo entre OE não nano-emulsificado e NES.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

O aumento do comportamento exploratório pôde ser observado nas doses intermediárias da nano-emulsão (7,5 e 2,5 mg.kg⁻¹), como evidenciado no gráfico pelo aumento das entradas na porção superior do aquário (**gráfico 8**). Um efeito semelhante foi obtido na dose de 25 mg.kg⁻¹ no grupo tratado com OE não-nanoemulsionado. Os efeitos da nano-emulsão no parâmetro de entradas no topo são inibidos nas maiores doses, apresentando-se graficamente em forma de sino. Um mecanismo que pode estar influenciando esse comportamento é a possível formação de agregados de gotículas nas maiores concentrações da nano-emulsão, logo, é esperado que o aumento do tamanho diminua a difusão das substâncias através das membranas celulares. É interessante notar que embora seja conhecido que colóides diluídos possam gerar curvas sigmodais quando diluídos, a questão das curvas de sino para doses concentradas estudada com moléculas isoladas (OWEN et al., 2014) certamente abre perspectiva para fitocoloides, potencialmente mais complexos do e que podem sofrer transições de fases inclusive durante processos biológicos (ex. cristais líquidos/microemulsões → nano-emulsões).

No grupo tratado com a dose de 75 mg.kg⁻¹ do OE não nano-estruturado também houve uma importante diminuição das entradas no topo. Isso mostra que além do mecanismo mencionado anteriormente, é provável que outro fator esteja desempenhando influência na redução da atividade exploratória em maiores doses. Nesse sentido, salienta-se o conhecido efeito sedativo do OE de *A. suaveolens*, que se mostrou capaz de provocar hipnose em doses acima das utilizadas neste ensaio, de modo que, algum comprometimento da mobilidade foi observada nas maiores doses administradas. Somado-se a isso, quando olhamos para a dose de 75 mg.kg da NE e de OE não-nanoemulsionado à 25 mg.kg⁻¹, há um menor número de entradas no topo associada à um maior tempo de permanecem nessa região do tanque, mostrando que houveram comportamentos de nado em superfície, que são indicativos de neurotoxicidade (KALUEFF et al., 2013).

5.4 ESTUDOS IN SILICO

5.4.1 Predição de atividade

Os resultados gerados para predição de atividade estão presentes na **tabela 15**. Todos tiveram algum tipo de atividade predita no PASS relacionada,

principalmente, ao GABA e serotonina, estando diretamente relacionada a transtornos de humor. Todas estas ações apresentaram valores de PA maior que Pi, tendo sempre em comum entre as três moléculas o tratamento de fobias em primeiro lugar e a probabilidade de inibir a GABA-aminotransferase (GABA-AT) em segundo, com um Pi muito baixo para tal enzima que não ultrapassa 0,025.

O β -farneseno obteve somente predições no PASS. Entretanto, para o linalol foi possível obter um resultado com ação bloqueadora do receptor de serotonina 5-HT₃. Com a estrutura da massoialactona foi possível predizer possíveis proteínas alvos tanto no SEA quanto no SwissTarget, além dos resultados já obtidos no PASS. Levando a atenção principalmente aos receptores envolvidos no mecanismo fisiológico do ácido glutâmico. A atividade de estimular serotonina e modular GABA, demonstrado no resultado do PASS, é também vista no SwissTarget, apontando como possíveis alvos envolvidos o 5-HT₆ (12,5% de probabilidade) e o canal iônico GABA_A (11,8% de probabilidade).

Tabela 15 – Resultados de predição de atividade *in silico*.

		Predições de Atividade			
Moléculas	PASS	Pa / Pi	SEA	SwissTarget	CDDI
β -farneseno	Tratamento de fobias	0,67 / 0,09			
	Inibidor de GABA-AT	0,49 / 0,02			
	Estimulante de 5-HT	0,29 / 0,12	--	--	--
	Agonista GABA _B	0,19 / 0,07			
	Tratamento de fobias	0,64 / 0,10			
	Inibidor de GABA-AT	0,55 / 0,01	--	--	Relação com o receptor 5- HT ₃
Linalol	Estimulante de 5-HT	0,24 / 0,15			
	Tratamento de fobias	0,67 / 0,09		Receptor 5- HT ₆	
	Inibidor de GABA-AT	0,57 / 0,01	Receptor	Receptor GABA _A	
	Estimulante de 5-HT	0,47 / 0,06	metabotrópico de glutamato		--
	Agonista GABA _B	0,18 / 0,09	2	Receptor metabotrópico de glutamato 5	
	Antagonista receptor NMDA	0,13 / 0,05			

5.4.2 Predição de propriedades farmacocinéticas

As saídas dos parâmetros farmacocinéticos gerados pelo PreADMET estão inseridas na **tabela 16**. Tais resultados foram considerados satisfatórios para todas as três moléculas no que se refere à absorção oral, uma vez que valores máximos foram observados. Em relação à permeabilidade em células Caco-2 e MDCK o webserver realizou a predição dentro dos valores medianos, mostrando um indicativo de média absorção destas substâncias no epitélio intestinal.

O valor insatisfatório é visto para a PPB, tendo em vista que as moléculas que se ligam de maneira muito forte em proteínas plasmáticas não possuem boa disponibilidade para maior efeito biológico. Por fim, o valor de permeabilidade em barreira hemato-encefálica é excelente para β -Farneseno e linalol, ao mesmo tempo que é mediano para massoia lactone. Predição muito satisfatória para drogas com objetivo de atingir o SNC. É interessante notar que esses dados agregam aos estudos relacionados aos fitocoloides, uma vez que as nano-emulsões podem auxiliar na absorção de moléculas bioativas sem a necessidade de modificações estruturais. Uma vez que possuem boa permeabilidade na BBB, substâncias como o linalol e o β -farneseno poderiam atuar tanto na forma livre ou mesmo junto a esses sistemas de entrega de fármacos que podem também permear conjuntamente, sendo um campo de estudo amplo para moléculas até então pouco estudadas devido a limites de solubilidade, como p.ex., o próprio β -farneseno de *A. suaveolens*.

Tabela 16 – Resultados de predição farmacocinética *in silico*.

Substâncias	Absorção			Distribuição	
	HIA	pCaco-2	pMDCK	PPB	BBB
β -farneseno	100	23.405	23.405	100	21.700
Linalol	100	29.355	115.421	100	6.125
Massoialactona	100	37.840	44.882	100	0.9763

5.4.3 Predição de propriedades toxicológicas

Os dados obtidos através dos webserveres PreADMET e ProTOX-II estão apresentados na **tabela 17**. Para a molécula β -farneseno as predições foram satisfatórias, portanto, de baixo risco toxicológico frente aos descritores selecionados e obtendo-se até mesmo bons valores de probabilidade para as saídas do ProTOX-II. O único alerta apresentado é o médio risco de inibir canais hERG.

O monoterpene linalol e a massoialactona demonstraram um perfil *in silico* toxicológico com mais alertas, em comparação ao sesquiterpene previamente mencionado. Substancialmente em relação a carcinogenicidade e mutagenicidade destas duas moléculas, deve-se salientar que para o PreADMET a saída de resultado positivo para carcinogenicidade significa que não há evidências acerca da atividade para tal estrutura, e uma resposta negativa significa que há evidências de

atividade carcinogênica da tal estrutura. Além disso, a probabilidade do linalol ser inativo para carcinogenicidade, perante ao ProTOX-II, não é muito elevada, apesar de ser maior que 50%. A massoialacton apresentou probabilidades não tão altas, além de ter predição ativa para imunotoxicidade com probabilidade de acerto alta.

Vale ressaltar que estas toxicidades não se concluem como concretas na realidade, porém conseguem guiar o pesquisador ao melhor caminho dentro de seus estudos pré-clínicos, fazendo com que este dê atenção redobrada aos alertas preocupantes do que foi predito por modelos *in silico*.

Tabela 17 – Resultados de predição de toxicidade *in silico*.

Molécula	PreADMET	ProTOX-II
β-farneseno	Ames_test = non-mutagen	Hepatotoxicity = Inactive P = 0.79
	hERG_inhibition = medium_risk	Carcinogenicity = Inactive P = 0.73
	Carcino_Mouse = Positive	Immunotoxicity = Inactive P = 0.99
	Carcino_Rat = Positive	Mutagenicity = Inactive P = 0.98
		Cytotoxicity = Inactive P = 0.81
Linalol	Ames_test = mutagen	Hepatotoxicity = Inactive P = 0.76
	hERG_inhibition = Low_risk	Carcinogenicity = Inactive P = 0.64
	Carcino_Mouse = Negative	Immunotoxicity = Inactive P = 0.99
	Carcino_Rat = Negative	Mutagenicity = Inactive P = 0.95
		Cytotoxicity = Inactive

P = 0.82		
Massoialactona	Ames_test = mutagen	Hepatotoxicity = Inactive P = 0.73
	hERG_inhibition = medium_risk	Carcinogenicity = Inactive P = 0.54
	Carcino_Mouse = Positive	Immunotoxicity = Active P = 0.82
		Mutagenicity = Inactive P = 0.90
	Carcino_Rat = Negative	Cytotoxicity = Inactive P = 0.53

5.4.4 Docking molecular

Primeiramente, foi realizado um docking molecular das três moléculas no sítio ativo da GABA-AT seguindo o método de algoritmo genético presente no software GOLD. O número de interações entre as moléculas e os resíduos de aminoácidos mais relevantes estão demonstradas na **tabela 18**. As coordenadas para que estas moléculas fossem encaixadas no local de interação do PSZ (o ligante ativo) são as seguintes: x = 32,44 y = -0,48 e z = 54,44. Estas foram encontradas após feita a validação, que resultou em um RMSD de 0,469 entre a melhor pose gerada para o PSZ e a sua estrutura diretamente advinda do PDBID: 4Y0I. O valor de RMSD (*Root Mean-Square-Deviation*– do inglês) é considerado aceitável entre os ligantes co-cristalizados e a pose gerada pelo GOLD, para estes, menor que 2Å.

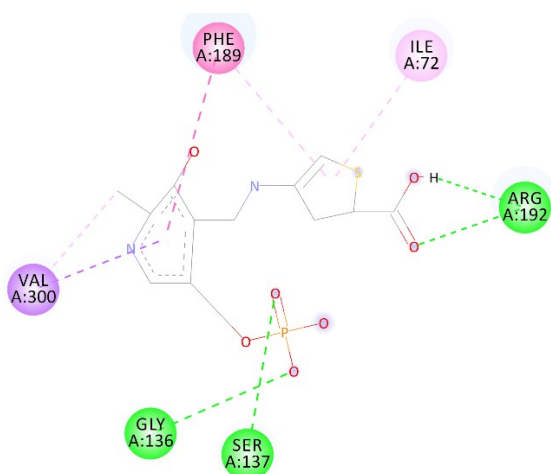
Tabela 18 – Docking molecular entre GABA-AT e as três moléculas estudadas.

Substância	Resíduos de aminoácidos do sítio ativo									Outras informações	
	Ile72	Gly136	Ser137	Phe189	Arg192	Val300	Gln301	Phe351	Thr353	Total Interações	GoldScore
PSZ	1	1	2	2	2	2	--	--	--	10	91,58
β-Farneseno	2	--	--	3	--	2	--	3	--	14	56,68
Linalol	1	--	--	2	1	--	--	2	--	13	44,52
Massoialactona	--	--	--	1	--	--	--	2	1	10	48,22

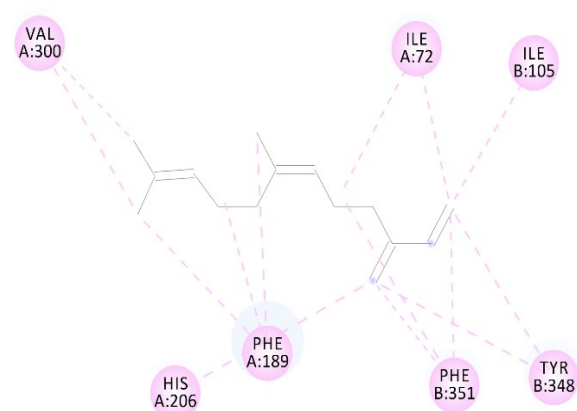
A **figura 15** mostra as interações que as estruturas estudadas realizam, com as interações de hidrogênio sendo representadas pela cor verde e as demais sendo do tipo hidrofóbica, que são até mesmo as mais frequentes devido as características moleculares das estruturas.

Figura 16 – Representação das interações entre as moléculas de *A. suaveolens* e GABA-AT.

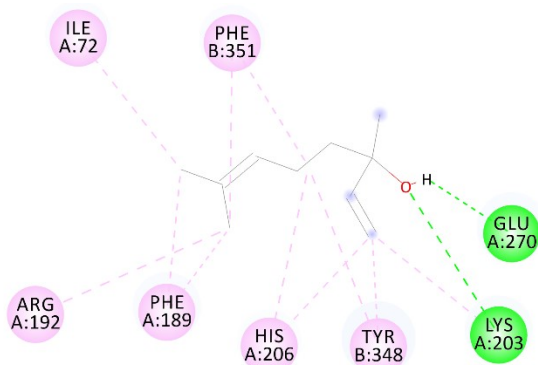
PSZ



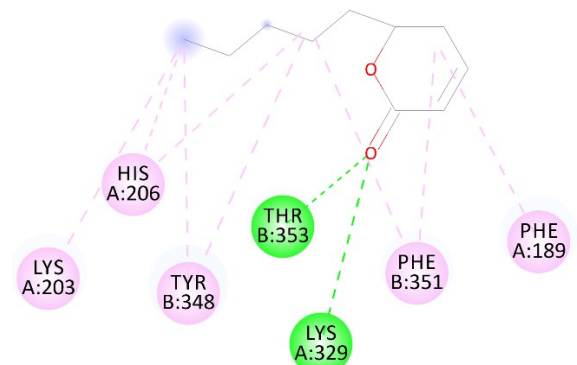
β -Farneseno



Linalol



Massoialactona



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Já para os resultados preditos das estruturas interagindo com o sítio ativo da proteína 5-HT_{3A} é possível visualizar na **tabela 19** os resíduos relevantes que obtiveram algum tipo de interação com as estruturas. Assim como é possível visualizar quais são os tipos de interações na **figura 16** e quais são os outros resíduos que interagiram com as substâncias.

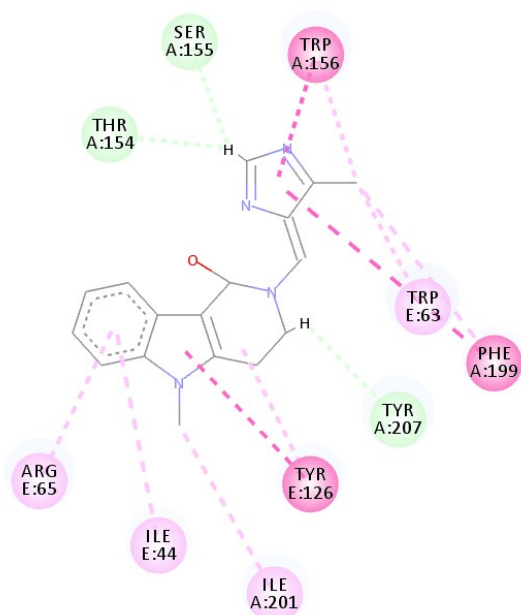
Tabela 19 – Docking molecular entre 5-HT_{3A} e as três moléculas estudadas

Molécula	Resíduos de aminoácidos do sítio ativo									Outras informações	
	Ile44	Trp63	Arg65	Asn101	Tyr126	Trp156	Phe199	Ile201	Tyr207	Total Interações	GoldScore
Alosetron	1	2	1	--	2	3	2	1	1	15	82,27
β-farneseno	2	1	2	--	3	6	1	--	2	17	76,91
Linalol	--	4	1	--	2	5	--	--	2	14	51,42
Massoialactona	--	2	1	--	2	3	1	--	--	10	57,23

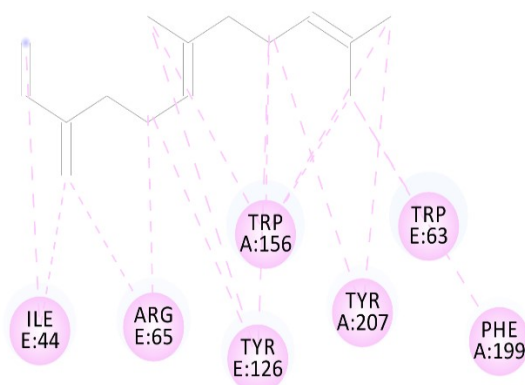
O método empregado para docking neste alvo foi validado pelo GOLD, pois obteve se um valor de RMSD inferior a 2Å, exatamente 0,44Å. Com esta validação foi possível obter as coordenadas da posição do sítio ativo do receptor 5-HT_{3A}, que resultou em: x = 101,57 y = 119,28 e z = 93,39. Com isso, pode realizar o encaixe das substâncias de estudo no local em que a serotonina obtém seu efeito ao interagir com esta proteína.

Figura 17 - Representação das interações entre as moléculas de *A. suaveolens* e 5-HT_{3A}.

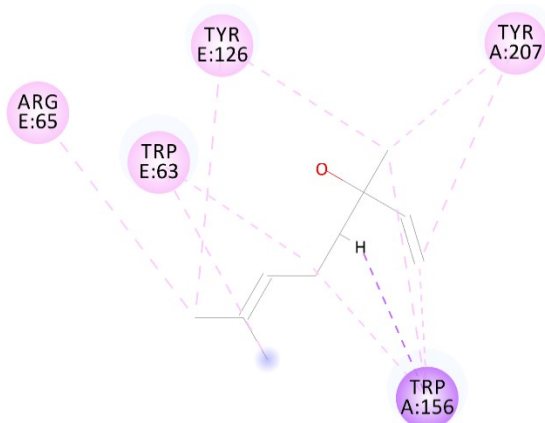
Alosentron



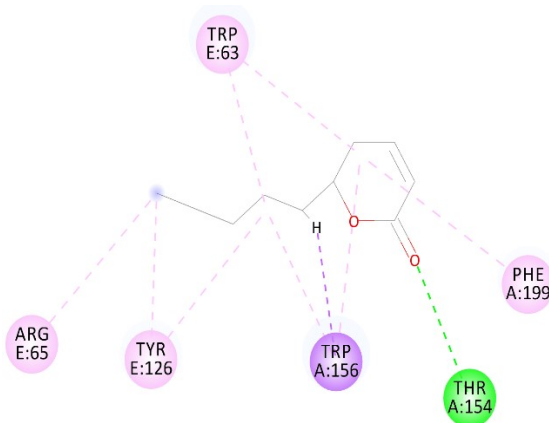
β-Farneseno



Linalol



Massoialactona



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Por último é apresentado o resultado (**tabela 20**) da interação entre as moléculas de β-farneseno, linalol e massoialactona e os resíduos de aminoácidos ativos dentro do bolso de interação do receptor 5-HT_{1A}. Já para os demais resíduos, tipo de interação e a pose melhor avaliada para tal é demonstrada na **figura 17**, tanto para a molécula aripiprazo, o inibidor que foi co-cristalizado com a proteína, quanto para as moléculas de interesse nesta pesquisa.

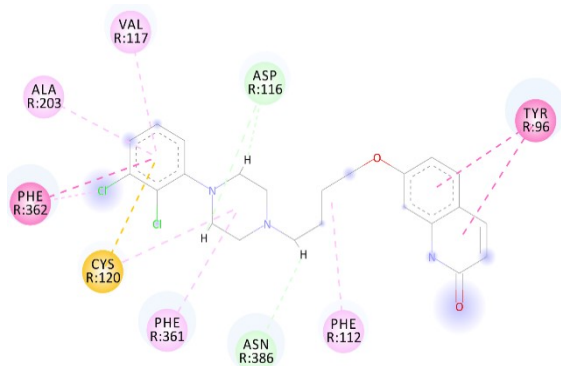
Tabela 20 – Docking molecular entre 5-HT_{1A} e as três moléculas estudadas.

Molécula	Resíduos de aminoácidos do sítio ativo							Outras informações	
	Tyr96	Trp98	Phe112	Trp114	Trp125	Ser199	Ala365	Total Interações	GoldScore
Aripiprazol	2	--	1	--	--	--	--	13	58,99
β-farneseno	--	--	--	--	--	--	3	17	55,04
Linalol	3	--	2	--	--	--	--	15	44,62
Massoialactona	--	--	--	--	--	--	--	8	49,21

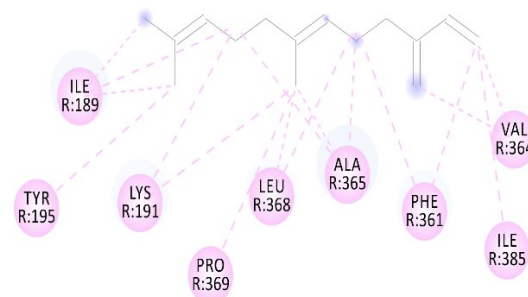
O valor de RMSD calculado entre o aripiprazol do PDBID: 7E2Z e a melhor pose gerada pelo GOLD foi no valor de 0,137Å. E com a validação as coordenadas encontradas para continuar o método com as moléculas de estudo foram x = 101,70 y = 119,30 e z = 115,71. É um bolso de ligação consideravelmente grande, com dificuldades de moléculas pequenas reproduzirem interações muito comparáveis com a molécula de aripiprazol, mesmo assim pode ser avaliado o GoldScore gerado entre os resultados e assim então perceber que dentro dos parâmetros em que o GoldScore é calculado, a estabilidade da conformação da melhor pose gerada para β-farneseno foi próxima ao visto para o aripiprazol.

Figura 18 - Representação das interações entre as moléculas de *A. suaveolens* estudadas e 5-HT_{1A}.

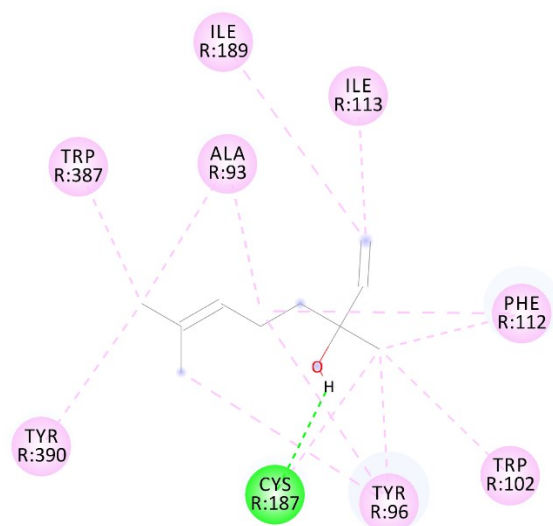
Aripiprazol



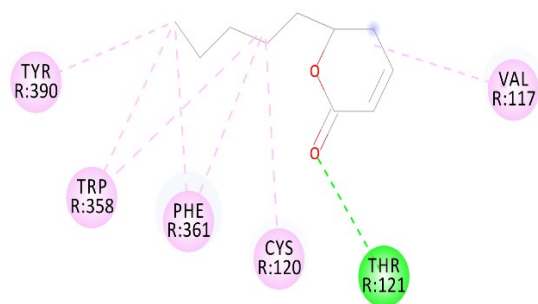
β-farneseno



Linalol



Massoialactona



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Esse estudo permitiu aprofundar interpretações críticas sobre estratégias de baixo aporte de energia na geração de fitocoloides. A troca do monooleato de sorbitano pelo trioleato de sorbitano permitiu a drástica redução do diâmetro médio de gotículas das nano-emulsões (NEs) a base do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens*. Partindo dessa NE selecionada (NES) e de um conceito teórico de que a nano-emulsificação potencialmente incrementa a bioatividade, foi possível até mesmo atingir efeitos sugestivos de sedação em zebrafish. O β -farneseno parece estar envolvido nos mecanismos de ação sedativos investigados *in silico*. A estabilização das NEs com inibidores da maturação de Ostwald, incluindo o próprio β -farneseno e misturas de β -farneseno/esqualano que poderia atuar como inibidor/substância bioativa, é uma estratégia que pode ser utilizada futuramente. O uso de técnica amigável ao meio ambiente e futuro escalonamento abre perspectivas para a continuidade de ensaios não-clínicos e clínicos como nanofitoprodutos, especialmente no tratamento de doenças mentais comuns.

- ABRAMOWITZ, J. S.; DEACON, B. Anxiety and its disorders: Implications for pharmacotherapy. **Clinical Psychology: Science and Practice**, v. 17, n. 2, p. 104–106, 2010.
- ADAMS, R.P., 2007. **Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing, Carol Stream.
- ALBUQUERQUE, U. P. de et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76–91, 2007.
- ALMEIDA, Mara Zélia de. **Plantas medicinais**. 3 ed. Salvador:EDUFBA, 2011.
- AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION - APA. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: **DSM-5**. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- ANVISA. Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 1–114, 2016. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/memento-fitoterapico/memento-fitoterapico.pdf/view>>.
- ARAUJO, J. et al. Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research. **Chemosphere**, v. 66, p. 312–324, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-597-8>>.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4 ed. Elsevier, 2013.
- BALTA, I. et al. Geraniol and Linalool Loaded Nanoemulsions and Their Antimicrobial Activity. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies**, v. 74, n. 2, p. 157, 2017.
- BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 1, p. 75–80, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2009.07.009>>.
- BLOCH, S. A pioneer in psychotherapy research: Aaron Beck. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 38, n. 11–12, p. 855–867, 2004.
- Boerner, RJ; Moller, HJ. Currents standards in the pharmacotherapy of anxiety disorders. **PSYCHOPHARMAKOTHERAPIE**, v. 8, n. 2, p. 50+, 2001
- BREITBACH, U. B. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180–189, 2013.
- BRITO, A. de L. et al. Development of a nano-emulsion prepared with the essential oil of *aeollanthus suaveolens* mart. Ex spreng. potentializes the antibacterial potential. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 40, n. 2, p. 329–333, 2021.
- CACHAT, J. M. et al. Zebrafish Models in Neurobehavioral Research. v. 52, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60761-922-2>>.
- CARVALHO, José Carlos Tavares. **Formulário Médico-Farmacêutico de Fitoterapia**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2016.
- CHANIN, S. et al. **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. [s.l: s.n.].v. 66
- CHÁVEZ-CASTILLO, M. et al. Depression as a Neuroendocrine Disorder: Emerging Neuropsychopharmacological Approaches beyond Monoamines. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2019, p. 1–20, 2019.
- CLARK, D. A.; BECK, A. T. Cognitive theory and therapy of anxiety and depression:

Convergence with neurobiological findings. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 14, n. 9, p. 418–424, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2010.06.007>>.

COELHO-DE-SOUZA, G. P. et al. Anticonvulsant properties of γ -decanolactone in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, n. 3, p. 175–181, 1997.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159–175, 2009.

COLLIN, J.; MARTIN, P. **Zebrafish as a Research Organism**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

CORRÊA, Pio. **Dicionário de plantas úteis no Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 6. Rio de Janeiro, 1926 – 1978.

CROCK, J.; WILDUNG, M.; CROTEAU, R. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)- β -farnesene. Vol. 94, p. 12833–12838, 1997.

CZÉH, B. et al. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293–310, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>>.

DE OLIVEIRA-FERRAZ, T. et al. Nano-emulsification of *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng essential oil modifies its neuroeffects? **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1764–1770, 2020.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3 ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

DOS SANTOS SAMPAIO, T. I. et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 563–578, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.037>>.

DUARTE, J. L. et al. Self-nano-emulsification of chamomile essential oil: A novel approach for a high value phytochemical. **Colloids and Interface Science Communications**, v. 34, n. December 2019, p. 100225, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.100225>>.

DUARTE, J. L. **Obtenção e caracterização de nano-emulsões contendo o óleo essencial de *Matricaria camomila* L.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2019.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2009.

ELISABETSKY, E. Linalool as active component of traditional remedies : anticonvulsant properties and mechanisms of action. **Curare**, n. January, 2003.

ELISABETSKY, E. Phytotherapy and the new paradigm of drugs mode of action. **Scientia et Technica**, v. 1, n. 33, p. 459–464, 2007.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L. F. S.; SOUZA, D. O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, v. 6, n. 2, p. 107–113, 1999.

ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; ONOFRE SOUZA, D. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 20, n. 4, p. 461–465, 1995.

FAVORETTO, S. M. Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa. p. 51, 2019.

FENG, J. et al. Formulation optimization of D-limonene-loaded nanoemulsions as a

natural and efficient biopesticide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 596, n. March, p. 124746, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124746>>.

FERNANDES, C. P. et al. Laboratory evaluation of the effects of *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard extracts and triterpenes on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. **Pest Management Science**, v. 69, n. 2, p. 292–301, 2013.

FERREIRA, L. M. et al. Zebrafish exposure to diphenyl diselenide-loaded polymeric nanocapsules caused no behavioral impairments and brain oxidative stress. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 53, n. 5, p. 62–68, maio 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X18305893>>.

FERREIRA, S. et al. The use of medicinal plants in the riverside community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and ethnopharmacological studies. [s.d.]

FERREIRA, L. R.; TAVARES-MARTINS, A. C. C.; PALHETA, I. C. Aspectos etnofarmacológicos e fitoquímicos de *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng. In: ALFARO, A. T. S.; TROJAN, D. G. **Ciências ambientais e o desenvolvimento sustentável na Amazônia**. v. 1. Curitiba: Atena, 2017. DOI 10.22533/at.ed.165.2302. Acesso em: 20 Ago 2020.

FONSECA, D. J. S.; ARAÚJO-NETO, J. P.; COSTA, J. . Banho de Cheiro de São João no município de Abaetetuba, Pará, Brasil. **Revista África e Africanidade**, n. 27, p. 1–10, 2018.

FONSEKA, T. M. et al. Zebrafish models of major depressive disorders. **Journal of Neuroscience Research**, v. 94, n. 1, p. 3–14, 2016.

FULCHER, N. et al. Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression. **Zebrafish**, v. 14, n. 1, p. 23–34, 2016.

GAO, S.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Molecular exchange processes in mixed oil-in-water nanoemulsions: Impact on droplet size and composition. **Journal of Food Engineering**, v. 250, n. December 2018, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.01.017>>.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE 2019. **Depressive disorders – level 3 cause**. Disponível em: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> Acessado em: 05 Jun 2021.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE 2019. **Anxiety disorders – level 3 cause**. Disponível em: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> Acessado em: 05 Jun 2021.

GONÇALVES, J. D. S. **Manual de prescrição de fitoterápicos pelo nutricionista**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2019.

GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. **Food Chemistry**, v. 171, p. 117–122, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.087>>.

HELGESON, M. E. Colloidal behavior of nanoemulsions: Interactions, structure, and rheology. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 25, p. 39–50, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2016.06.006>>.

HERBARIUM. **Introdução à fitoterapia**. 2. ed. Colombo, 2011

JAYANTHI, L. D.; RAMAMOORTHY, S. Regulation of monoamine transporters: Influence of psychostimulants and therapeutic antidepressants. **Drug Addiction: From Basic Research to Therapy**, v. 7, n. 3, p. 247–264, 2008.

JAYASINGHE, C. D.; JAYAWARDENA, U. A. Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

JENSEN, H. M. et al. Cannabidiol effects on behaviour and immune gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–12, 2018.

JESUS, F. L. M. et al. Preparation of a Nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) Oil by a Low-Energy/Solvent-Free Method and Evaluation of Its Preliminary Residual Larvicidal Activity . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

KALUEFF, A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M. **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. DOI 10.1007/978-1-61779-597-8. 2012

KATZUNG, B. G; MASTERS, S. B; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KISS, J. P. Theory of active antidepressants: A nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 1, p. 34–39, 2008.

KNAPP, P.; BECK, A. T. Fundamentos, modelos conceituais, aplicações e pesquisa da terapia cognitiva. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 30, n. suppl 2, p. s54–s64, out. 2008. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462008000600002&lng=pt&tlng=pt>.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 122–128, 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.003>>.

KUMAR, S. et al. Plants and Plant Products with Potential Anticonvulsant Activity – A Review. **Pharmacognosy Communications**, v. 2, n. 1, p. 3–99, 2012.

LEE, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 6–7, p. 560–569, 2010. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.02.002>>.

LI, Y. et al. Zebrafish as a visual and dynamic model to study the transport of nanosized drug delivery systems across the biological barriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 156, p. 227–235, 2017.

LINS, Francisca Sabrina Vieira. **Levantamento etnobotânico das espécies vegetais cultivadas e utilizadas com fins medicinais no município de Cuité, Paraíba**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de bacharelado em Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande. Cuité, 2009.

LOONEN, A. J. M.; IVANOVA, S. A. Circuits Regulating Pleasure and Happiness—Mechanisms of Depression. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 10, n. November, p. 1–25, 2016.

LUPE, F. A. et al. Fragrant lactones in the steam distillation residue of *aeollanthus suaveolens* mart. ex spreng and analysis by HS—SPME. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 3, p. 271–272, 2007.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. D. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Essential oils of *aeollanthus suaveolens* Matt. Ex Spreng. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 2, p. 86–87, 2003.

MAIA, O. G. S.; ANDRADE, L. H. A. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 595–622, 2009.

MARTINS, A. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 21–30, 2005.

MARTINS, R. L. et al. Chemical composition, an antioxidant, cytotoxic and microbiological activity of the essential oil from the leaves of *Aeollanthus suaveolens* mart. ex spreng. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–10, 2016.

MARTIUS, C. F. P. von . **Flora brasiliensis**. v. VIII, part I, Fasc. 22 Coluna 73 – 76. Publicado em 24 Jul 1858. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/opus> Acesso em 10 Set 2021

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. **General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

MEHMOOD, T. Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 183, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.021>>.

MING, L. C.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* D.C.) tapf.) Poaceae. **Acta Horticulturae**, n. 426, p. 555–559, 1996.

NASCIMENTO, A. M.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H. Bioatividade de inseticidas botânicos para *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 16, n. 2, 2016. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/309920549>>.

NASCIMENTO, J. S. et al. Aspectos Etnobotânicos Da Fitoterapia Popular Na Comunidade Quilombola Conceição De Mirindeua, Moju-Pa. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 92–103, 2020.

NGO-MBACK, M. N. L. et al. Anticandidal and synergistic effect of essential oil fractions from three aromatic plants used in Cameroon. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 2, p. 100940, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.100940>>.

NGO MBACK, M. N. L. et al. Optimisation de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Aeollanthus heliotropioides* oliv et cinétique de mortalité. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 3, p. 233–243, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.04.003>>.

NGUYEN, M.; STEWART, A. M.; KALUEFF, A. V. Aquatic blues: Modeling depression and antidepressant action in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 55, p. 26–39, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.003>>.

OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. **Test**, n. October, p. 1–21, 2008. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-210-fish-early-life-stage-toxicity-test_9789264203785-en%25Cnhttp://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-490-in-vitro-mammalian-cell-gene-mutation-tests-using-the-thymidine-kinase-gene_9789264242241-en%25>.

OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing**, n. July, p. 1–22, 2013. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org>>.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. et al. Essential oil from *Pterodon emarginatus* as a promising natural raw material for larvicidal nanoemulsions against a tropical disease vector. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, n. May, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scp.2017.06.001>>.

OMSb, Organização Mundial da Saúde. **Suicide rate estimates, age-standardized Estimates by country**. Disponível em: <https://apps.who.int/gho/data/view.main.MHSUICIDEASDRv?lang=en>. Acesso em: 05 Jun 2021.

OMSa, Organização Mundial da Saúde. **Suicídio**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/suicide>. Acesso em: 05 Jun 2021

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Let's talk**. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-health-day/2017/en/>. Acesso em: 10 Mai 2019

ORTIZ-ZAMORA, L. et al. Preparation of non-toxic nano-emulsions based on a classical and promising Brazilian plant species through a low-energy concept. **Industrial Crops and Products**, v. 158, n. November, 2020.

OWEN, S. C. et al. Colloidal drug formulations can explain “bell-shaped” concentration-response curves. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 3, p. 777–784, 2014.

PAGANI, E.; DE SANTOS, J. F. L.; RODRIGUES, E. Culture-Bound Syndromes of a Brazilian Amazon Riverine population: Tentative correspondence between traditional and conventional medicine terms and possible ethnopharmacological implications. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, n. October 2016, p. 80–89, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.024>>.

PEREIRA, L. a. et al. Plantas medicinais de uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental: Aspectos utilitários de uma espécie das famílias Piperaceae e Solanaceae. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1385–1388, 2007.

PEREIRA, M. das G. da S.; COELHO-FERREIRA, M. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental, Abaetetuba, Pará. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 57–68, 2017.

PISTRICK, K. Overview of cultivated plant species in the family Labiatae. **Acta Horticulturae**, v. 723, p. 133–141, 2006.

PLAG, J.; SIEGMUND, A.; STRÖHLE, A. Pharmakotherapie bei angsterkrankungen. **Zeitschrift für Psychiatrie, Psychologie und Psychotherapie**, v. 57, n. 3, p. 185–194, 2009.

PRAKASH, A. and; VADIVEL, V. Citral and linalool nanoemulsions: impact of synergism and ripening inhibitors on the stability and antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 1495–1504, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-019-04185-8>>.

PUIGVERT, C. F. Development of multifunctional polymeric nanoparticles by nano-emulsion templating as advanced nanocarriers targeting the blood-brain barrier. **TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)**, 2015.

PURVES, K. L. et al. A major role for common genetic variation in anxiety disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 12, p. 3292–3303, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41380-019-0559-1>>.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 749–757, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.174>>.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 326–334, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.008>>.

RYDING, O. Notes on the *Aeollanthus* (Labiatae) from West Africa. **Bot. Notiser**, v. 133, n. October, p. 229–233, 1980.

RYU, V. et al. Impact of ripening inhibitors on molecular transport of antimicrobial components from essential oil nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 556, p. 568–576, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.08.059>>.

SANTANA, E. A. et al. Simultaneous extraction and obtention of a novel nano-dispersion from *Mikania glomerata* Spreng: Monitoring coumarin content and increasing the biological and industrial potential of a classical cultivated herb. **Industrial Crops and Products**, v. 135, n. July 2018, p. 49–56, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.006>>.

SANTOS, É. R. Q. dos et al. Linalool-rich essential oils from the Amazon display antidepressant-type effect in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, n. 5, p. 43–49, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117322444>>.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; NETO, O. G. R. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Unidade de Biomassa em Laboratório**. Comunicado técnico 99, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2004.

SEDAGHAT DOOST, A. et al. Production of thymol nanoemulsions stabilized using Quillaja Saponin as a biosurfactant: Antioxidant activity enhancement. **Food Chemistry**, v. 293, n. April, p. 134–143, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.090>>.

SHIMADA-SUGIMOTO, M.; OTOWA, T.; HETTEMA, J. M. Genetics of anxiety disorders: Genetic epidemiological and molecular studies in humans. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 69, n. 7, p. 388–401, 2015.

Siebel, A. M.; Bonan, C. D.; Silva, R. S. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. In: Resende, R. R.; Soccol, C. R. **Biotecnologia aplicada à Saúde**. Fundamentos e aplicações. Volume 1. São Paulo, 2015. p. 15 – 55.

SILVA, A. L. Da; ELISABETSKY, E. Interference of propylene glycol with the hole-board test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 4, p. 545–547, 2001.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005.

SOLANS, C.; GARCÍA-CELMA, M. J. Microemulsions and Nano-emulsions for Cosmetic Applications. **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**, p. 507–518, 2017.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2012.07.003>>.

STEWART, A. et al. Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. **Behavioural Processes**, v. 85, n. 2, p. 198–203, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2010.07.009>>.

STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>>.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAN, T. B. et al. Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: The effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. **Food Chemistry**, v. 194, p. 416–423, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.045>>.

TEMPESTA, D. et al. Neuropsychological functioning in young subjects with generalized anxiety disorder with and without pharmacotherapy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 236–241, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.06.006>>.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J.; ALKIRE, B. H. Essential oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 3, p. 198–199, 2001.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.

VAN JAARSVEL, E. J.; VAN WYK, A. E. Notes on African plants. **Bothalia**, v. 35, n. 2, p. 157–153, 2005.

WAN, J. et al. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. **Food Chemistry**, v. 291, n. November 2018, p. 199–206, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.032>>.

WUTTKE, W.; SEIDLOVA-WUTTKE, D. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) is a non-estrogenic alternative to hormone replacement therapy. **Reproductive Endocrinology**, n. 46, p. 72–81, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40816-015-0013-0>>.

ZHANG, Z.; MCCLEMENTS, D. J. **Overview of Nanoemulsion Properties: Stability, Rheology, and Appearance**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – VARIAÇÃO DE GOTÍCULA ENTRE 0 E 48 HORAS DAS NANO-EMULSÕES PREPARADAS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE A. SUAVEOLENS E POLISORBATO 80/TRIOLEATO DE SORBITANO (EHL = 13) ARMAZENADAS CONCENTRADAS E DILUÍDAS

	Concentrada			Diluída		
	VG _{0,1}	VG _{0,2}	VG _{1,2}	VG _{0,1}	VG _{0,2}	VG _{1,2}
RTO 1	0,79%	1,09%	0,29%	-5,22%	-8,16%	-3,10%
RTO 1 _{Sat}	1,34%	1,90%	0,55%	-5,07%	-8,84%	-3,96%
RTO 2	-1,92%	1,78%	3,77%	-1,11%	-0,65%	0,47%
RTO 2 _{Sat}	-8,21%	-4,44%	4,10%	4,02%	2,65%	-1,31%

ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAP)



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 data de 19 de agosto de 2019, o parecer referente ao protocolo no. **023/2019** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**AValiação DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DE UMA NANO-EMULSÃO A BASE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**" coordenado por **Caio Pinho Fernandes**, 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 19 August 2019, the final decision about the Protocol **023/2019** and certify that the research project entitled "**AValiação DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DE UMA NANO-EMULSÃO A BASE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**" coordinated by **Caio Pinho Fernandes**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 03 de setembro de 2019

JOSE CARLOS TAVARES
CARVALHO:20876025220

Assinado de forma digital por JOSE
CARLOS TAVARES
CARVALHO:20876025220
Data: 2019.09.03 11:23:03 -03'00'

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

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 Merão Zero
Macapá - AP - 68903-419 e-mail: tamaros@unifap.br
Fone (96) 4008-2908

NANO-EMULSIFICATION OF *AEOLLANTHUS SUAVEOLENS* ESSENTIAL OIL AFFECTS DEVELOPMENT OF ZEBRAFISH EMBRYO?

Thamara de Oliveira-Ferraz¹, Diego Q. Ferreira¹, Rosa H.V. Mourão², Caio P. Fernandes¹

¹NanoFito, PPGCF, Macapá, 68902-280, Brazil; ²LABBEX, Santarém, 68040770, Brazil.

E-mail: thamara_96@hotmail.com

INTRODUCTION

A. suaveolens (Lamiaceae) is popularly known as catinga-de-mulata (CM). Despite its wide folk-use and the previous studies showing positive neuroeffects, to the best of our knowledge no study regarding its toxicity was carried out. Due to the potential of nano-emulsions (NE) as delivery systems, the CM essential oil (CMEO) was used to develop an optimal NE and to evaluate its impairment on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryo.

METHODS

CMEO was extracted by hydrodistillation and analyzed by GC-MS. The aqueous phase (AP) was added dropwise to the oily phase under vortex stirring (CMEO content of 2.5%). It was changed the “i” surfactant-to-oil ratio (SOR) and “ii” surfactant blend (polysorbate 80/sorbitan monooleate – P80/SM, or polysorbate 80/sorbitan trioleate – P80/ST). The NEs were stored in its concentrated (CNE) and diluted (DNE) form in glass vials at 25 °C. The CMEO content on the dynamic light scattering analysis was the same for the CNE and DNE. The optimal NE, an aqueous dispersion of its surfactant (ASD) and the bulk-CMEO were tested at different concentrations (100, 50 and 25 µg.mL⁻¹) on fertilized eggs of zebrafish. The development was monitored daily until 96h according to different stages or alterations [1].

RESULTS

CMEO yield was 1.2 % and the main compounds were linalool (33.6 %), β-farnesene (36.3%) and massoialactone (13.0%). The increased SOR enhanced droplet size (DS) and polydispersity index (pDI) for both blends. Despite satisfactory DS (176.7±0.76 nm) and pDI (0.265±0.011) were observed for the P80/SM NE (SOR 1), lower size (68.2±0.68 nm) and pDI (0.205±0.016) were observed with P80/ST (SOR 1), which also presented a translucent aspect with a more pronounced bluish reflect. When diluted, the P80/SM NEs at both SOR, did not present major alterations on DS/pDI, when compared to the

initial aforementioned parameters of the CNE. The CNE and DNE prepared with P80/ST (SOR 2) presented a similar DS (~85 nm) along storage. However, despite the pDI of DNE remained constant at a relatively high pDI (~0.500), for the CNE, it decreased to values below 0.300 after storage. Regardless the dilution effect, the P80/ST NEs (SOR 1) presented a DS without major alterations along storage (CNE around 68.16-68.94 nm; DNE around 62.73-64.62 nm). However, the pDI of the CNE presented a slightly tendency for decrease (~0.205-0.153), while the pDI of the DNE remained without major alterations (~0.196-0.204). Therefore, the DNE prepared with P80/ST (SOR 1) was chosen for the further bioassay. After 24h, > 90% of coagulated embryos (CO) were observed at the highest concentrations (100, 50 µg.mL⁻¹) for the NE and bulk-CMEO, while the lowest concentration induced 70% and 20% of CO, respectively. A development delay was observed for these groups, evidenced by the presence of gastrulas, instead of segmentation period. After 48h, all NE or bulk-CMEO groups reached more than 95% of CO, while only 23.3% and 3.3% were observed for the ASD groups (50, 25 µg.mL⁻¹). A total of 30% of eclosed larvae from the ASD group (25 µg.mL⁻¹) presented alterations, such yolk sac edema and cardiac edema. Normal development was observed on the control group.

DISCUSSION & CONCLUSIONS:

Higher SOR affects the DS probably due to a higher solubilization of some partially water-soluble compounds. Maintenance of parameters after dilution of the P80/ST NE (SOR 1) may be triggered by a compositional ripening effect, avoiding the Ostwald ripening [2]. Optimal NE considerably higher affected the zebrafish than the bulk-CMEO, while ASD induced a lower effect. Thus, nanosizing was a key point on the enhancement of CMEO effect.

ACKNOWLEDGEMENTS: CAPES.

REFERENCES

- [1] OECD. 2013;236:1-22. [2] Rao J, McClements DJ. Food Chem. 2012;134:749-757.

Nano-emulsification of Aeollanthus suaveolens Mart. Ex Spreng essential oil modifies its neuroeffects?

Thamara de Oliveira Ferraz, Diego Quaresma Ferreira, Rosa Helena Veras Mourão, Fabio Rocha Formiga, José Carlos Tavares Carvalho, et al.

Drug Delivery and Translational Research
An Official Journal of the Controlled Release Society

ISSN 2190-393X

Drug Deliv. and Transl. Res.
DOI 10.1007/s13346-020-00846-w

