



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

**ANA BÁRBARA SOUZA VIANA**

---

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA  
PRÉ-CLÍNICA DE NANOEMULSÃO INJETÁVEL DE  $\beta$ -CARIOFILENO**

---

**Macapá**  
2026

**ANA BÁRBARA SOUZA VIANA**

---

---

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA  
PRÉ-CLÍNICA DE NANOEMULSÃO INJETÁVEL DE  $\beta$ -CARIOFILENO**

---

---

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. Tit. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

**Macapá**  
2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Biblioteca  
Central/UNIFAP-Macapá-AP  
Elaborado por Cristina Fernandes – CRB-2 / 1569

---

V614d Viana, Ana Bárbara Souza.  
Desenvolvimento, caracterização e avaliação da segurança pré-clínica de nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno / Ana Bárbara Souza Viana. - Macapá, 2026.  
1 recurso eletrônico.  
92 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Macapá, 2026.  
Orientador: Prof. Tit. Dr. José Carlos Tavares Carvalho.

Modo de acesso: World Wide Web.  
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Terpenos. 2. Nanotecnologia. 3. Toxicologia. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orientador.  
II. Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD 23. ed. – 615.321

---

VIANA, Ana Bárbara Souza. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da segurança pré-clínica de nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno.** Orientador: Prof. Tit. Dr. José Carlos Tavares Carvalho. 2026. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2026.

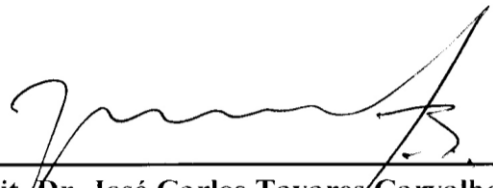
---

**ANA BÁRBARA SOUZA VIANA**


**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA PRÉ-CLÍNICA DE NANOEMULSÃO INJETÁVEL DE  $\beta$ -CARIOFILENO**

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: 14 / 01 / 2026

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Tit. Dr. José Carlos Tavares Carvalho - UNIFAP**

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Dr. Helison de Oliveira Carvalho - UNIFAP**

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Dra. Rosemary de Carvalho Rocha Koga - UNIFAP**

*Aos meus pais, que dedicaram suas vidas a me educar e a transmitir a grandiosidade de sua  
sabedoria...*

---

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, pela força, proteção e pelas oportunidades concedidas ao longo desta caminhada acadêmica, sustentando-me nos momentos de insegurança e encorajando-me a perseverar. À Nossa Senhora da Conceição, por me acolher com suas graças e amparar meus passos com ternura e sabedoria.

À minha mãe, Rosa Maria de Almeida Souza, pelo amor, apoio emocional e incentivo diário. Seus pequenos gestos de cuidado, que considero grandiosos, sempre foram essenciais para que eu alcançasse mais esta etapa da minha vida. É a minha verdadeira fonte de inspiração para o que sou e para tudo o que desejo construir.

Ao meu pai, Luiz Viana da Silva, pela inspiração e pelo incentivo ao ensino, à aprendizagem e ao meu aperfeiçoamento pessoal e profissional. Por me ensinar que a humildade e a honestidade são atitudes primordiais e, por demonstrar, a importância do autocuidado, exemplo que sigo admirando e aprendendo desde a infância.

Aos meus irmãos, Ana Luíza e Bruno Diego, pela paciência nos momentos de ausência e pelos gestos que me acolheram quando o cansaço insistia em permanecer. Este trabalho também é de vocês.

Ao meu orientador, José Carlos Tavares Carvalho, que sempre acreditou no meu potencial, mesmo quando eu mesma duvidava. Agradeço profundamente pela confiança depositada, pela orientação científica e pelas contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua dedicação, paciência e disponibilidade foram determinantes para minha formação, assim como sua generosidade, sensibilidade e empatia nos momentos difíceis e nas trocas sinceras que tanto me ensinaram e me fortaleceram a ser quem eu sou hoje.

Ao Abrahão Victor, que fez este projeto ganhar vida com seu conhecimento tecnológico e de bancada. Aprender sobre a tecnologia farmacêutica sob sua orientação expandiu meus horizontes e abriu portas que eu jamais imaginaria alcançar.

À Natália Gabriely, pela amizade e pelos ouvidos sempre atentos nos momentos de desabafo. Obrigada pelo companheirismo, apoio, afeto e pelas trocas sinceras que tornam nossos dias, dentro e fora do trabalho, mais leves e significativos.

---

À Andressa Meireles, que nunca mediu esforços para oferecer ajuda ou um ombro amigo. Sua lealdade, fraternidade e dedicação representam qualidades admiráveis em sua pessoa e são sempre lembradas com muito carinho.

Ao Sergio Gabriell, que esteve comigo desde o começo e que me apresentou ao Laboratório de Pesquisa em Fármacos. Toda ajuda, companheirismo, sua amizade e a amizade proporcionada com o Tiago Corrêa foram cruciais para o processo.

À Aline Lopes do Nascimento, pela postura acolhedora, sempre disposta a ajudar e orientar no que fosse possível. Sua inteligência, sensibilidade e generosidade inspiram a todos ao redor e tornam o ambiente científico mais humano.

Ao professor Helison Carvalho, por ser um profissional excepcional. Sua forma cuidadosa e assertiva de orientar foi capaz de acalantar qualquer angústia que surgisse, desde o delineamento experimental até a interpretação de dados.

Aos técnicos de laboratório e aos demais profissionais que colaboraram nas análises, preparações, manutenções e procedimentos necessários para este estudo. Agradeço pelo profissionalismo, paciência e comprometimento.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho. A parceria, a cooperação e o apoio durante as etapas experimentais tornaram o processo mais leve e produtivo. Conviver em um ambiente acadêmico harmonioso foi fundamental, sou grata por toda troca de conhecimentos, pelas vivências diárias e pela amizade construída ao longo dessa jornada.

Aos professores e à equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, pela fundamentação teórica, pelas discussões enriquecedoras e pelo ambiente de aprendizado que contribuíram significativamente para minha trajetória acadêmica.

Aos membros da banca examinadora Rosemary Koga e Helison Carvalho, minha admiração por vocês é imensurável. Agradeço pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que certamente enriquecerão esta pesquisa.

À Universidade Federal do Amapá e às instituições parceiras, pelo apoio logístico, infraestrutura e ambiente científico adequado para o desenvolvimento desta dissertação.

Às minhas amigas, Isis Paranhos, Jordana Alves e Taynah Freitas, cuja presença foi luz nos dias difíceis e celebração nos dias de conquista. Agradeço pelo apoio incondicional, pela compreensão expressa, pelos conselhos sempre certos e pela alegria genuína que cada uma trouxe para esta caminhada. Cada gesto, cada palavra de motivação e cada instante compartilhado deixaram marcas profundas e tornaram esta trajetória mais bonita e possível.

---

A todos os meus amigos, pela leveza dos momentos de descontração, pelas conversas e companhia sempre oportunas, pelo humor que renovam os ânimos e pelas gargalhadas que suavizaram o peso dos dias mais exigentes. A presença de vocês tornou o percurso mais equilibrado, acolhedor e genuinamente agradável.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta pesquisa, deixo aqui minha sincera gratidão.

---

*A verdadeira transformação começa quando a coragem de ser quem é supera o medo do caminho — Ouro de Tolo, Raul Seixas.*

---

**Introdução:** O  $\beta$ -cariofileno, um sesquiterpeno bicíclico com reconhecido potencial terapêutico, apresenta desafios de formulação devido à sua natureza lipofílica e baixa solubilidade aquosa. Este estudo teve como objetivo desenvolver, caracterizar aspectos físico-químicos e a avaliar a segurança pré-clínica de uma nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno para administração intramuscular. **Material e métodos:** Para isso, foram desenvolvidas cinco nanoemulsões de  $\beta$ -cariofileno (NBCP1 a NBCP5) utilizando o método de baixa energia, variando-se o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL). **Resultados e discussão:** A formulação NBCP1, com EHL 10, demonstrou superioridade em relação as outras formulações, apresentando tamanho de partícula de 102,39 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,27, potencial zeta de -27,5 mV e alta eficiência de encapsulação (96,46%), mantendo-se estável após testes de estresse (centrifugação e ciclos de temperatura). A identidade e pureza do  $\beta$ -cariofileno foram confirmadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Subsequentemente, a NBCP1 foi submetida a um estudo de toxicidade subcrônica em ratos Wistar machos, administrada por via intramuscular nas doses de 5 e 15 mg/kg durante 14 dias. A avaliação não revelou alterações comportamentais (screening hipocrático), no consumo de água e ração, ou na evolução do peso corporal. Os parâmetros hematológicos (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas) e bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase) permaneceram dentro dos limites fisiológicos, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratados. A análise histopatológica dos músculos, fígados e rins também não indicou sinais de inflamação, lesão tecidual ou qualquer alteração morfológica relevante. **Conclusões:** Os resultados, em conjunto, demonstram que a nanoemulsão NBCP1 é uma plataforma estável e segura para a administração parenteral do  $\beta$ -cariofileno, não induzindo toxicidade local ou sistêmica nas condições avaliadas, o que a qualifica como uma promissora candidata para futuros estudos de eficácia.

**Palavras-chave:** Terpenos; Nanotecnologia; Toxicologia; Parenteral; Fármacos e medicamentos; Segurança de medicamentos.

**Agradecimentos:** CNPq.

---

## ABSTRACT

---

**Introduction:**  $\beta$ -Caryophyllene, a bicyclic sesquiterpene with recognized therapeutic potential, presents formulation challenges due to its lipophilic nature and low aqueous solubility. **Objectives:** This study aimed to develop and characterize the physicochemical properties and to evaluate the preclinical safety of an injectable  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsion intended for intramuscular administration. **Material and Methods:** Five  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsions (NBCP1 to NBCP5) were prepared using a low-energy method, varying the hydrophilic–lipophilic balance (HLB). **Results and discussion:** Among them, the NBCP1 formulation, with an HLB value of 10, demonstrated superior performance compared to the other formulations, exhibiting a mean particle size of 102.39 nm, a polydispersity index (PDI) of 0.27, a zeta potential of  $-27.5$  mV, and high encapsulation efficiency (97.16%), while maintaining stability after stress tests (centrifugation and temperature cycling). The identity and purity of  $\beta$ -caryophyllene were confirmed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS). Subsequently, NBCP1 was subjected to a subchronic toxicity study in male Wistar rats, administered intramuscularly at doses of 5 and 15 mg/kg for 14 days. No behavioral alterations were observed (Hippocratic screening), nor were there changes in water and food intake or body weight progression. Hematological parameters (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, leukocytes, and platelets) and biochemical markers (urea, creatinine, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase) remained within physiological limits, with no statistically significant differences between control and treated groups. Histopathological analysis of muscle, liver, and kidney tissues also revealed no signs of inflammation, tissue injury, or relevant morphopathological alterations. **Conclusions:** Collectively, these findings demonstrate that the NBCP1 nanoemulsion represents a stable and safe platform for the parenteral administration of  $\beta$ -caryophyllene, without inducing local or systemic toxicity under the evaluated conditions, supporting its potential as a promising candidate for future efficacy studies.

**Keywords:** Terpenes; Nanotechnology; Toxicology; Parenteral; Drugs and medicines; Drug safety.

**Acknowledgements:** National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

AC	Adenilato ciclase
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
BCP	$\beta$ -cariofileno
CB1	Receptor canabinoide tipo 1
CB2	Receptor canabinoide tipo 2
CBD	Canabidiol
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG	Cromatografia gasosa
CG-FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CK	Creatinoquinase
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase-2
DL <sub>50</sub>	Dose letal mediana
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EHLA	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico do tensoativo A
EHLB	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico do tensoativo B
EHLr	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico requerido
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio

---

FDA	Food and Drug Administration
FPP	Farnesil difosfato
H&E	Hematoxilina e eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HO-1	Heme oxigenase-1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPP	Pirofosfato de isopentenila
JNK	Quinase N-terminal de c-Jun
LDH	Desidrogenase láctica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MasR	Receptor Mas
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCS	Tamanho corpuscular médio
MDA	Malondialdeído
NBCP	Nanoemulsão de $\beta$ -cariofileno
NBCP1–NBCP5	Formulações de nanoemulsão de $\beta$ -cariofileno
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX2	NADPH oxidase 2
NOX4	NADPH oxidase 4
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PDI	Índice de polidispersidade
PGE2	Prostaglandina E2
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPAR- $\alpha$	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
PPAR- $\gamma$	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
SEC	Sistema endocanabinoide

---

SIM	Selected Ion Monitoring
SNC	Sistema nervoso central
Span 80	Monooleato de sorbitano
STZ	Estreptozotocina
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TG	Triglicerídeos
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV1	Receptor potencial transitório vaniloide 1
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
Tween 80	Polissorbato 80
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV-VIS	Ultravioleta-visível
VCM	Volume corpuscular médio
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VPM	Volume plaquetário médio

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

$\beta$	Letra grega beta
$\Delta$	Letra grega delta
$\Delta^9$ -THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
$\times$	Operador de multiplicação
$\pm$	Mais ou menos
$^\circ$	Grau
$\mu\text{m}$	Micrômetro
m/z	Razão massa/carga
$R^2$	Coefficiente de determinação

---

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
3.1	$\beta$ -CARIOFILENO: FONTE E POTENCIAL FARMACOLÓGICO.....	17
<b>3.1.1</b>	<b>Estrutura química.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Sistema endocanabinoide e aplicações terapêuticas.....</b>	<b>22</b>
3.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO $\beta$ -CARIOFILENO.....	26
<b>3.2.1</b>	<b>Efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e analgésicos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Efeitos metabólicos e neuroprotetores.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Efeitos gastroprotetores e imunomoduladores.....</b>	<b>28</b>
3.3	NANOEMULSÕES COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARENTERAL DE FÁRMACOS.....	28
<b>3.3.1</b>	<b>Toxicidade e biocompatibilidade de formulações parenterais.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Métodos de avaliação toxicológica <i>in vivo</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Importância da avaliação da compatibilidade intramuscular.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1	MATERIAL.....	35
<b>4.1.1</b>	<b>Aquisição do <math>\beta</math>-cariofileno.....</b>	<b>35</b>
4.2	MÉTODOS.....	35
<b>4.2.1</b>	<b>Desenvolvimento e caracterização da nanoemulsão de <math>\beta</math>-cariofileno.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico das nanoemulsões (EHLr).....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Preparo das nanoemulsões.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Eficiência de encapsulação (EE%).....</b>	<b>36</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Caracterização do estudo.....</b>	<b>38</b>

---

4.2.6	Animais utilizados.....	38
4.2.7	Estudo da toxicidade aguda e compatibilidade intramuscular da nanoemulsão injetável de $\beta$ -cariofileno.....	39
4.2.8	Análises histopatológicas.....	40
4.2.9	Análise bioquímica e hematológica.....	40
4.2.10	Análise estatística.....	41
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
5.1	DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES (NBCP).....	42
5.1.1	Determinação do valor de EHL requerido para o $\beta$ -cariofileno.....	41
5.1.2	Caracterização das nanoemulsões.....	43
5.1.3	Estabilidade fisico-química das nanoemulsões.....	46
5.1.4	Eficiência de encapsulação.....	47
6.1	ESTUDO DA TOXICIDADE SUAGUDA.....	49
6.1.1	Avaliação comportamental.....	50
6.1.2	Consumo de água, ração e peso corporal.....	51
6.1.3	Avaliação do peso dos órgãos.....	53
6.1.4	Avaliação hematológica.....	55
6.1.5	Avaliação bioquímica.....	57
6.1.6	Avaliação dos marcadores de lesão muscular.....	59
6.1.7	Análise histopatológica.....	62
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	70
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	72
	<b>LISTA DE ANEXOS.....</b>	81

---

Os compostos bioativos de origem natural têm desempenhado papel fundamental no desenvolvimento das ciências farmacêuticas, constituindo uma fonte historicamente relevante de moléculas com ampla diversidade estrutural e biológica. Ao longo das últimas décadas, a investigação científica tem demonstrado que muitos fármacos utilizados na prática clínica derivam direta ou indiretamente de metabólitos naturais. Esse cenário reforça a importância da biodiversidade como reservatório estratégico de substâncias com potencial terapêutico, especialmente em ecossistemas tropicais, nos quais a complexidade química e a adaptação evolutiva das espécies favorecem a produção de compostos biologicamente ativos.

O bioma amazônico destaca-se como um dos principais centros globais de biodiversidade vegetal, abrigando inúmeras espécies tradicionalmente empregadas na medicina popular. Muitas dessas plantas produzem terpenos e sesquiterpenos, metabólitos secundários associados a propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras. A valorização científica desses compostos tem impulsionado pesquisas voltadas à compreensão de seus mecanismos de ação e ao desenvolvimento de sistemas farmacêuticos que possibilitem sua aplicação terapêutica segura e eficaz. Nesse contexto, a exploração racional da biodiversidade amazônica representa uma estratégia relevante para a inovação em saúde.

Entre os sesquiterpenos de maior interesse farmacológico, o  $\beta$ -cariofileno destaca-se por sua ampla distribuição em diferentes espécies vegetais e por sua presença em óleos essenciais e oleorresinas amplamente utilizadas. Trata-se de um composto lipofílico, estruturalmente classificado como sesquiterpeno bicíclico, cujas características físico-químicas influenciam diretamente seu comportamento em formulações farmacêuticas. Apesar de seu potencial terapêutico, a baixa solubilidade em meio aquoso e a elevada afinidade por fases oleosas representam desafios relevantes para sua incorporação em sistemas convencionais de liberação de fármacos.

Do ponto de vista farmacodinâmico, o  $\beta$ -cariofileno apresenta um perfil diferenciado ao atuar como agonista seletivo do receptor canabinoide tipo 2, predominantemente expresso em células do sistema imune e em tecidos periféricos. Essa seletividade o distingue de outros compostos associados ao sistema endocanabinoide, uma vez que não promove ativação significativa do receptor canabinoide tipo 1 (CB1), evitando efeitos psicoativos. A ativação do receptor canabinoide tipo 2 (CB2) está relacionada à modulação de vias inflamatórias,

metabólicas e oxidativas, o que fundamenta os efeitos biológicos observados em modelos experimentais.

Apesar do perfil farmacológico favorável e das evidências de segurança observadas em estudos por vias convencionais, a aplicação farmacêutica do  $\beta$ -cariofileno ainda enfrenta limitações tecnológicas. A elevada lipofilicidade do composto dificulta sua dispersão em meios aquosos, podendo comprometer a biodisponibilidade e a estabilidade do ativo. Essas limitações tornam-se ainda mais relevantes quando se considera a administração parenteral, que exige sistemas estáveis, biocompatíveis e capazes de apresentar comportamento previsível no organismo, minimizando riscos de reações adversas locais e sistêmicas.

A nanotecnologia aplicada às ciências farmacêuticas se consolida como uma estratégia eficaz para superar desafios associados a compostos lipofílicos. A manipulação de materiais em escala nanométrica permite o desenvolvimento de sistemas capazes de melhorar a solubilidade, a estabilidade e o desempenho biológico de ativos naturais. Entre esses sistemas, as nanoemulsões destacam-se por sua versatilidade, relativa simplicidade de produção e características coloidais favoráveis, sendo especialmente adequadas para a veiculação de substâncias hidrofóbicas em formulações destinadas ao uso parenteral.

A administração intramuscular é amplamente empregada quando se busca liberação gradual do fármaco ou quando a biodisponibilidade oral é limitada, porém requer avaliação criteriosa da compatibilidade tecidual. Formulações inadequadas podem desencadear processos inflamatórios, fibrose ou danos musculares, comprometendo sua segurança. Dessa forma, a caracterização físico-química detalhada e a avaliação toxicológica tornam-se etapas essenciais no desenvolvimento de novos sistemas injetáveis. Nesse contexto, a investigação de uma nanoemulsão injetável contendo  $\beta$ -cariofileno apresenta relevância científica e potencial terapêutico.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a segurança pré-clínica de nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno (BCP).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e avaliar a estabilidade da nanoemulsão de BCP por técnicas físico-químicas;
- Analisar a compatibilidade intramuscular da nanoemulsão injetável de BCP e toxicidade subaguda;
- Avaliar a ação da nanoemulsão injetável através de parâmetros clínicos, bioquímicos e hematológicos;
- Investigar possíveis alterações histopatológicas dos tecidos musculares, hepáticos e renais dos animais.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

---

#### 3.1 $\beta$ -CARIOFILENO: FONTE E POTENCIAL FARMACOLÓGICO

Nas últimas décadas, o interesse por substâncias naturais com potencial terapêutico tem crescido de forma expressiva. Essa tendência está diretamente relacionada à busca por alternativas seguras e eficazes no tratamento de doenças crônicas não transmissíveis. Nesse contexto, observa-se uma expansão significativa dos estudos com nutracêuticos e extratos vegetais, voltados à investigação de seus efeitos em distúrbios como obesidade, diabetes, dislipidemias, esteatose hepática e diversos tipos de cânceres (Waltenberger, 2016).

Entre os compostos bioativos de maior destaque, o  $\beta$ -cariofileno (BCP) figura como um sesquiterpeno bicíclico amplamente distribuído no reino vegetal, especialmente presente nos óleos essenciais de inúmeras espécies. Estima-se que sua ocorrência se dê em mais da metade das famílias de angiospermas, o que evidencia sua relevância ecológica e funcional nas plantas (Maffei, 2020). O BCP apresenta uma diversidade de atividades farmacológicas, com ênfase em suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras do metabolismo lipídico (Wang *et al.*, 2023).

Do ponto de vista ecológico, o BCP atua como um importante mediador na defesa das plantas contra microrganismos patogênicos, além de exercer papel na atração de polinizadores. Contribui ainda para o perfil aromático característico de muitos óleos essenciais (Scandiffio *et al.*, 2020). Fitoquimicamente, sua presença já foi identificada em espécies de uso comum tanto na medicina tradicional quanto na alimentação, como *Ocimum spp.* (manjeriço), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Syzygium aromaticum* (cravo), *Humulus lupulus* (lúpulo), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Origanum vulgare* (orégano), *Piper nigrum* (pimenta-do-reino) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Também está presente em espécies como *Cannabis sativa*, *Copaifera spp.*, *Artemisia spp.*, *Croton spp.* e *Annona cherimola* (Machado *et al.*, 2018; Sharma, 2016).

Nos últimos anos, o  $\beta$ -cariofileno tem sido amplamente investigado em virtude de sua interação seletiva com os receptores canabinóides do tipo 2 (CB2), componentes do sistema endocanabinóide (SEC). Esse sistema desempenha um papel central na regulação de diversos processos fisiológicos, como inflamação, homeostase energética, dor e resposta imunológica (Gertsch *et al.*, 2008). A ativação dos receptores CB2, predominantemente expressos em tecidos

periféricos e células imunes, está associada a efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores. Diferentemente dos canabinóides clássicos, o BCP não ativa os receptores CB1, evitando, assim, os efeitos psicoativos comumente associados à *Cannabis sativa* (Francomano *et al.*, 2019).

Além de sua afinidade pelos receptores CB2, estudos indicam que o BCP interage com receptores nucleares da família dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR), especialmente os subtipos PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$ . Esses receptores são envolvidos na regulação do metabolismo lipídico, da glicose e de processos inflamatórios, o que amplia ainda mais o potencial terapêutico do composto (Irrera *et al.*, 2019).

Evidências experimentais reforçam a aplicabilidade farmacológica do  $\beta$ -cariofileno. Em modelos murinos de diabetes induzida por estreptozotocina (STZ), a administração oral crônica de BCP promove a redução da glicemia, a melhora do comportamento depressivo e o alívio da dor neuropática. Também são observados efeitos protetores sobre as células  $\beta$ -pancreáticas, com aumento da secreção de insulina e redução do estresse oxidativo e inflamação no tecido pancreático (Aguilar-Ávila, 2019; Basha, 2016).

No que se refere à segurança, o  $\beta$ -cariofileno apresenta um perfil toxicológico favorável. Estudos de toxicidade aguda e subcrônica demonstraram a ausência de efeitos adversos relevantes, mesmo em doses elevadas, sendo classificado como uma substância com baixa toxicidade (DL<sub>50</sub> superior a 2000 mg/kg). Esses dados sustentam sua aplicabilidade tanto na área farmacêutica quanto em produtos alimentares, sem riscos evidentes à saúde, o que possibilita sua utilização em formulações farmacêuticas e produtos alimentares sem riscos evidentes à saúde humana. Assim como, reforçam sua aplicabilidade e sustentam o crescente interesse científico e industrial pelo composto, motivando o desenvolvimento de formulações inovadoras que potencializem sua biodisponibilidade e estabilidade (da Silva Oliveira *et al.*, 2018).

Diante do exposto, o  $\beta$ -cariofileno revela-se um fitocanabinóide de notável potencial terapêutico, reunindo propriedades farmacológicas amplas, seletividade para alvos moleculares específicos e um elevado índice de segurança. Sua ação não psicoativa e sua versatilidade de aplicações o tornam uma alternativa promissora ao uso de derivados da *Cannabis*, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas ao tratamento de doenças crônicas e inflamatórias (Dhopeswarkar *et al.*, 2014; Katsuyama *et al.*, 2013).

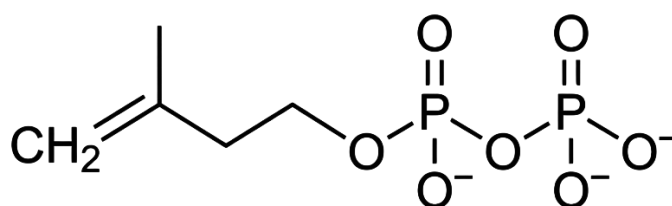
Apesar de seu potencial terapêutico promissor, o  $\beta$ -cariofileno apresenta limitações para a aplicação clínica devido à sua elevada lipofilicidade e à baixa solubilidade em meios aquosos, o que reduz a absorção e a biodisponibilidade em formulações convencionais. Diante

dessas limitações, o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, como nanoemulsões injetáveis, surge como uma estratégia tecnológica relevante para superar barreiras farmacotécnicas e otimizar a eficácia terapêutica do composto, estabelecendo a transição para as próximas etapas de estudo (Mödinger *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2013).

### 3.1.1 Estrutura química

Os terpenos constituem uma ampla classe de compostos orgânicos naturalmente presentes em diversos organismos, desempenhando papéis biológicos fundamentais. Produzidos por bactérias, fungos, algas, plantas e animais, participam de processos de defesa, sinalização e comunicação química (Gershenzon; Dudareva, 2007; Paduch, 2007). Estruturalmente, derivam do pirofosfato de isopentenila (IPP), precursor do isopreno, por meio da via biossintética do mevalonato, resultando em compostos com a fórmula geral  $(C_5H_8)_n$ . De acordo com o número de unidades de isopreno, classificam-se em monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (Ruzicka, 1953; Oldfield; Lin, 2012).

**Figura 1** – Representação da molécula de pirofosfato de isopentenila, equivalente biológico do isopreno.



**Fonte:** Autora (2025).

Dentro dessa ampla classe de compostos, destaca-se o  $\beta$ -cariofileno, um sesquiterpeno natural presente em uma variedade de óleos essenciais, como de canela, cravo e pimenta-do-reino. Sua estrutura química, caracterizada pela presença de um anel ciclopropano, confere-lhe propriedades únicas, como a capacidade de interagir com os receptores do sistema endocanabinoide, o que tem atraído a atenção para seus potenciais efeitos terapêuticos. A diversidade estrutural dos terpenos e suas possíveis modificações químicas posteriores, como as que ocorrem na formação de esteroides e saponinas, ilustram a flexibilidade dessa classe de

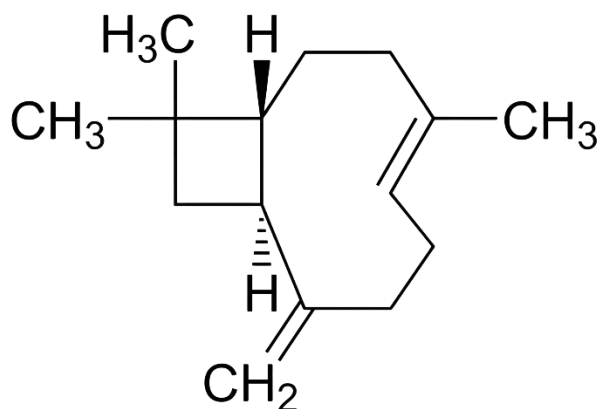
compostos para se adaptar a múltiplas funções biológicas e interações com o organismo (Abegaz; Kiefe, 2020).

O  $\beta$ -cariofileno é um composto pertencente à classe dos sesquiterpenos, caracterizado por sua estrutura química peculiar que incorpora um sistema bicíclico. Seu esqueleto estrutural apresenta um anel ciclobutano, característica rara entre terpenoides naturais, o que confere a esse composto propriedades físico-químicas únicas. A versatilidade do  $\beta$ -cariofileno como unidade estrutural é reforçada pelo interesse despertado entre as décadas de 1970 e 1990, período em que numerosos esforços sintéticos foram direcionados para a modificação de compostos baseados em  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, buscando a obtenção de terpenoides bi e tricíclicos de elevada diversidade estrutural (Dev, 1989).

Este panorama sintetiza não apenas a importância intrínseca da estrutura química do  $\beta$ -cariofileno, mas também sua relevância como progenitor em síntese orgânica. A complexidade da molécula é atribuída à presença de ligações duplas conjugadas e ao arranjo espacial dos grupos funcionais, que influenciam diretamente sua reatividade e interação com alvos biológicos.

O  $\beta$ -cariofileno de fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$ , é um sesquiterpeno bicíclico cuja arquitetura incorpora anéis de ciclobutano e de cicloexeno, contendo ligações duplas conjugadas. Essa conformação tridimensional particular resulta em um peso molecular aproximado de 204,35 g/mol e um  $\log P \approx 4,5$ , valores que evidenciam seu caráter altamente lipofílico e justificam a necessidade de sistemas de entrega coloidais, como as nanoemulsões, para aprimorar sua dispersão em meios aquosos (Mödinger *et al.*, 2022).

**Figura 2** – Estrutura molecular do  $\beta$ -cariofileno ( $C_{15}H_{24}$ ), sesquiterpeno bicíclico formado por anéis de ciclobutano e cicloexeno, caracterizado pela presença de ligações duplas conjugadas.



Peso molecular: 204,35 g/mol. LogP:  $\approx 4,5$ .

Fonte: Autora (2025).

O interesse pelo  $\beta$ -cariofileno não se limita a seu potencial como intermediário sintético. Esse sesquiterpeno é amplamente encontrado em extratos vegetais, muitos dos quais são utilizados há milênios pela medicina tradicional. Registros históricos apontam o uso de plantas ricas em compostos terpênicos, como a *Cannabis sativa*, por civilizações antigas como fenícios, egípcios, gregos e chineses, datando de pelo menos de 3.000 a.C. (Mechoulam, 1986). Embora os efeitos terapêuticos da *Cannabis* sejam frequentemente atribuídos aos canabinóides  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) e canabidiol (CBD), estudos mais recentes propõem que outros constituintes da planta, entre eles o  $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno, também exercem papel relevante na atividade farmacológica (Russo, 2011). Dessa forma, a estrutura química do  $\beta$ -cariofileno, além de sua estabilidade e perfil lipofílico, favorece sua interação com sistemas biológicos, complementando e potencializando a ação dos canabinóides clássicos.

A singularidade da estrutura química do  $\beta$ -cariofileno também se manifesta na sua capacidade de ligação seletiva ao receptor canabinóide tipo 2 (CB<sub>2</sub>), sem exercer efeitos psicoativos típicos do  $\Delta$ 9-THC. Essa especificidade de interação está intimamente relacionada à configuração tridimensional da molécula, em especial à disposição de seus centros quirais e às tensões intramoleculares impostas pelo anel de ciclobutano. Considerando sua estrutura robusta e sua afinidade biológica, o  $\beta$ -cariofileno destaca-se como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos voltados à modulação de processos inflamatórios e imunológicos. Estudos de síntese inspirados em sua arquitetura demonstram que pequenas alterações estruturais podem impactar significativamente a atividade biológica, reforçando a necessidade de um entendimento aprofundado de sua conformação molecular (Dev, 1989).

Adicionalmente, a biogênese do  $\beta$ -cariofileno, a partir do farnesil difosfato (FPP), segue uma via enzimática específica que envolve ciclizações e rearranjos complexos, resultando na configuração final do  $\beta$ -cariofileno. Esse processo biogenético reflete a diversidade química possível a partir de precursores comuns no reino vegetal, originando não apenas o  $\beta$ -cariofileno, mas também compostos estruturalmente relacionados que compartilham características funcionais e farmacológicas. A compreensão desses mecanismos biossintéticos não apenas elucida a origem natural do  $\beta$ -cariofileno, como também abre possibilidades para sua produção biotecnológica em larga escala. Assim, seu estudo extrapola a caracterização estrutural e alcança o campo da engenharia metabólica e da produção de bioativos (Dev, 1989).

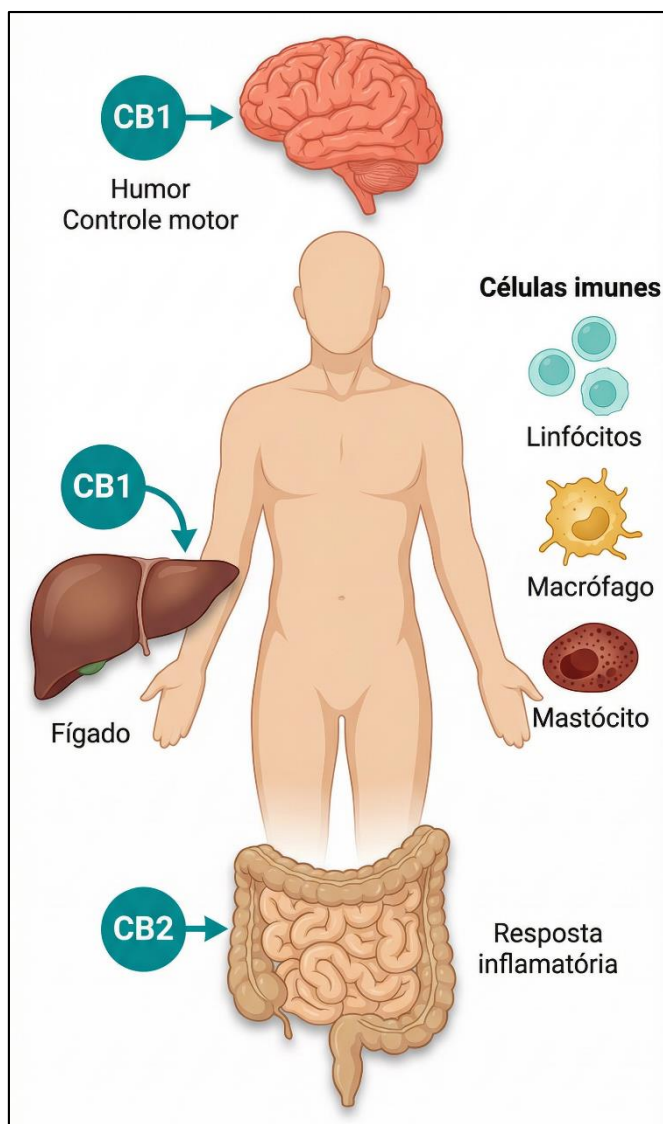
Por fim, cabe destacar que o  $\beta$ -cariofileno, bem como seus derivados, como o óxido de  $\beta$ -cariofileno, exibe uma diversidade de propriedades físico-químicas, como alta lipofilicidade e resistência à oxidação, características atribuídas diretamente à sua estrutura química. Essa estabilidade, aliada à possibilidade de interação sinérgica com outros compostos

da matriz vegetal, torna o  $\beta$ -cariofileno um componente estratégico em formulações farmacêuticas modernas. De acordo com Russo (2011), a interação entre terpenoides e canabinóides resulta em um efeito conjunto que potencializa os benefícios terapêuticos, o que justifica a crescente atenção ao  $\beta$ -cariofileno como alvo de estudos farmacológicos e toxicológicos.

### **3.1.2 Sistema endocanabinoide e aplicações terapêuticas**

O sistema endocanabinoide (SEC) constitui uma complexa rede de sinalização envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo a dor, o humor, o metabolismo energético e a resposta imune. O avanço da química e da farmacologia permitiu a caracterização de canabinoides em sua forma pura, com composição e estabilidade conhecidas, possibilitando a investigação sistemática de seus efeitos biológicos. A identificação do SEC e de seus principais receptores, CB1 e CB2, representou um marco para a compreensão dos mecanismos de ação dos canabinoides e para a ampliação de suas aplicações terapêuticas (Pertwee, 2012).

**Figura 3** – Representação esquemática da distribuição das principais funções dos receptores canabinoides CB1 e CB2 no organismo humano.



O receptor CB1 é predominantemente expresso no sistema nervoso central, associado ao humor e ao controle motor, além de ocorrer em órgãos periféricos como o fígado. O receptor CB2 está localizado principalmente em células do sistema imunológico, incluindo linfócitos, macrófagos e mastócitos, estando relacionado à modulação da resposta inflamatória.

**Fonte:** Autora (2025).

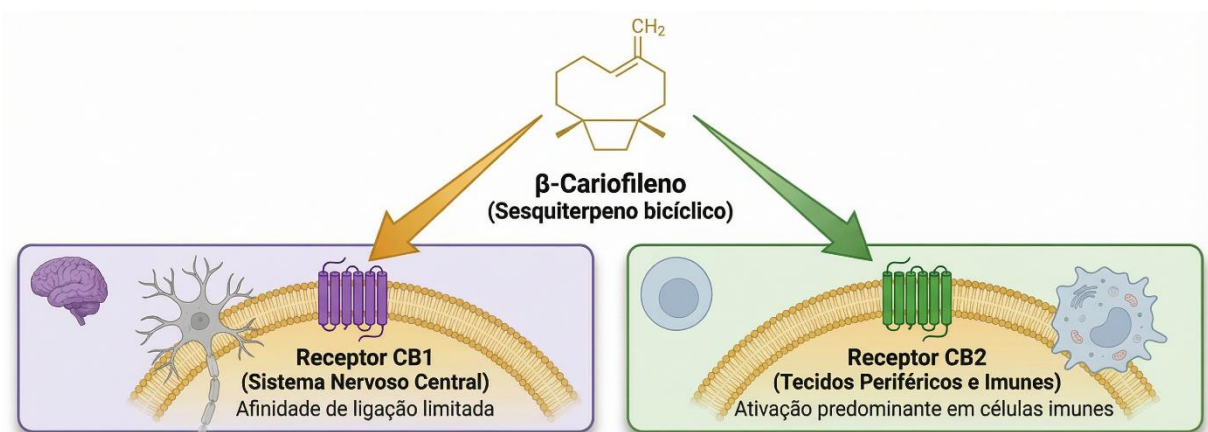
Os receptores canabinoides apresentam distribuição e funções distintas. O receptor CB1 é predominantemente expresso no sistema nervoso central, em regiões associadas ao controle motor, cognição e modulação do humor, como o hipocampo, a amígdala, o cerebelo e o tronco encefálico (Tsou *et al.*, 1998; Jourdan *et al.*, 2011). A ativação de CB1 está relacionada à modulação da liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, o que explica tanto seus efeitos neuroprotetores quanto os efeitos psicoativos observados com alguns canabinoides (Garcia-Arencibia *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2016).

Em contraste, os receptores CB2 são expressos predominantemente em células do sistema imunológico, incluindo linfócitos, macrófagos e mastócitos, além de estarem presentes em tecidos periféricos e, em menor extensão, em regiões específicas do sistema nervoso central (Mackie; Stella, 2006; Piomelli; Sasso, 2014). Essa distribuição confere ao CB2 um papel central na modulação da resposta inflamatória e imunológica, tornando-o um alvo particularmente atrativo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, sem indução de efeitos psicoativos.

A sinalização mediada pelos receptores CB1 e CB2 ocorre por meio do acoplamento a proteínas Gi/o, resultando na inibição da adenilato ciclase, redução dos níveis intracelulares de AMPc e modulação de canais iônicos e cascatas de quinases (Santos et al., 2011; Chiurchiù *et al.*, 2014). Enquanto a ativação de CB1 está principalmente associada à regulação da excitabilidade neuronal, a ativação de CB2 em células imunes regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e a migração celular, evidenciando seu papel na homeostase imunológica.

Nesse contexto, destaca-se o  $\beta$ -cariofileno, um sesquiterpeno amplamente distribuído em óleos essenciais de diversas espécies vegetais, que atua como agonista seletivo do receptor CB2, sem apresentar afinidade funcional significativa pelo receptor CB1. Essa seletividade farmacológica é particularmente relevante, pois permite a ativação do SEC com efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, evitando os efeitos psicoativos associados à ativação de CB1 (Herring *et al.*, 1998; Dhopeswarkar; Mackie, 2014).

**Figura 4** – Seletividade do  $\beta$ -cariofileno pelos receptores canabinoides.

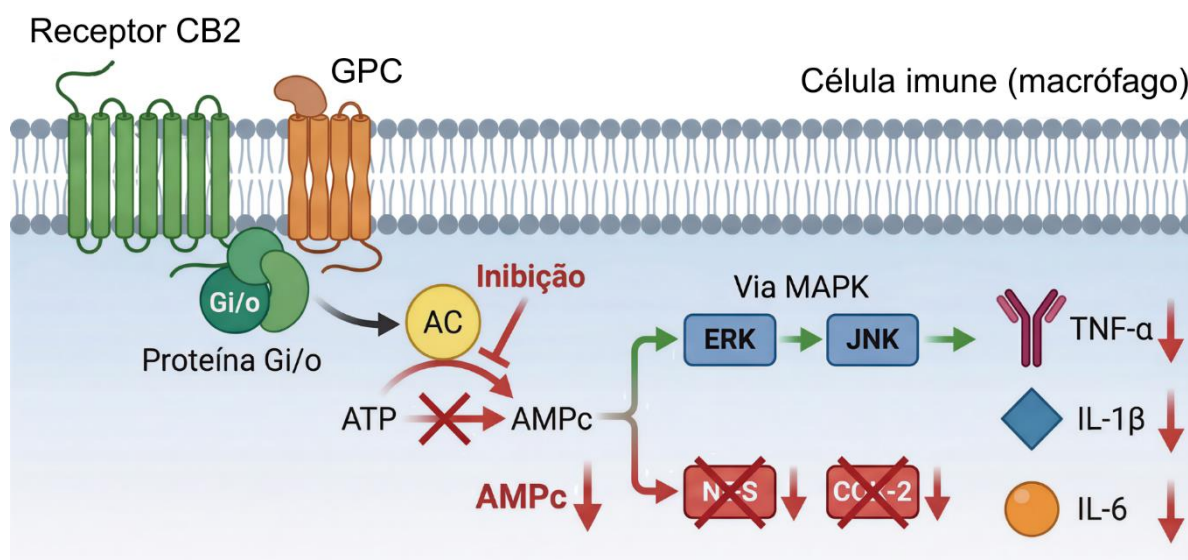


O  $\beta$ -cariofileno apresenta afinidade de ligação limitada ao receptor CB1 no sistema nervoso central, mas ativa predominantemente o receptor CB2 em tecidos periféricos e células imunes (linfócitos, macrófagos e mastócitos), promovendo efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores sem indução de efeitos psicoativos.

**Fonte:** Autora (2025).

A ativação de CB2 pelo  $\beta$ -cariofileno desencadeia a inibição da adenilato ciclase e a modulação de vias de sinalização intracelular, incluindo proteínas da família MAPK, como ERK e JNK, resultando em alterações na expressão gênica e na redução da produção de mediadores inflamatórios (Correa *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2010; Rajesh *et al.*, 2008). Além disso, o  $\beta$ -cariofileno interfere na atividade de enzimas pró-inflamatórias, como a óxido nítrico sintetase (NOS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2), e reduz a liberação de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Piomelli; Sasso, 2014).

**Figura 5** – Mecanismo de sinalização do receptor CB2 em célula imune (macrófago).



A ativação de CB2 pela ligação ao  $\beta$ -cariofileno resulta no acoplamento à proteína Gi/o, inibição da adenilato ciclase (AC) e redução de AMPc. A cascata de sinalização envolve a ativação de proteínas da família MAPK (ERK e JNK), redução de enzimas pró-inflamatórias (NOS e COX-2) e diminuição da produção de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), resultando em efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores.

**Fonte:** Autora (2025).

Essas propriedades farmacológicas posicionam o  $\beta$ -cariofileno como um candidato promissor para o tratamento de doenças inflamatórias, metabólicas e neurodegenerativas, nas quais a modulação seletiva do CB2 representa uma estratégia terapêutica segura e eficaz. Nesse cenário, o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, como nanoemulsões injetáveis contendo  $\beta$ -cariofileno, surge como uma abordagem inovadora para superar limitações relacionadas à biodisponibilidade e estabilidade do composto, ampliando seu potencial de aplicação clínica (Mastinu *et al.*, 2018).

## 3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO $\beta$ -CARIOFILENO

### 3.2.1 Efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e analgésicos

O potencial anti-inflamatório do  $\beta$ -cariofileno (BCP) foi inicialmente evidenciado em estudos *in vitro*, que demonstraram sua capacidade de modular vias pró-inflamatórias em nível celular. Gushiken *et al.* (2022) observaram que o BCP, em concentrações micromolares, reduziu a expressão de enzimas inflamatórias, como COX-2 e iNOS, em culturas de fibroblastos expostas a lipopolissacarídeo (LPS), além de diminuir a produção das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Os autores constataram aumento da atividade antioxidante endógena e do fator nuclear Nrf2, evidenciando que o BCP exerce um papel protetor celular contra a inflamação oxidativa.

Em modelos *in vivo*, o efeito inibitório do BCP sobre a inflamação foi amplamente confirmado. Hashiesh *et al.* (2023) relataram que a administração oral de BCP em ratos com cardiomiopatia diabética reduziu significativamente os níveis teciduais de NF- $\kappa$ B e de COX-2, além de restaurar a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e catalase. A análise histológica evidenciou menor infiltração inflamatória e preservação estrutural do miocárdio. Esses achados reforçam a ação anti-inflamatória sistêmica do composto, mediada por mecanismos que envolvem a modulação dos receptores CB2 e PPAR- $\gamma$ .

Além dos efeitos anti-inflamatórios, o BCP apresenta atividade analgésica relevante, especialmente em modelos de dor inflamatória crônica. Wang *et al.* (2025) verificaram que a administração combinada de canabidiol e BCP em camundongos reduziu a hiperalgesia e a alodinia mecânica, com um efeito sinérgico dependente dos receptores CB2 e TRPV1. O estudo demonstrou que o BCP isolado foi capaz de promover analgesia sustentada, sem induzir tolerância, o que o distingue de fármacos analgésicos convencionais que atuam em receptores centrais.

O potencial antioxidante e anti-inflamatório do BCP também foi confirmado em modelos de lesão pulmonar aguda. Ricardi *et al.* (2025) demonstraram que a administração intraperitoneal do composto, em ratos com inflamação induzida por LPS, reduziu significativamente a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e MDA, concomitantemente à ativação das vias Nrf2/HO-1 e ACE2/MasR. Essa resposta resultou na preservação da arquitetura alveolar e na redução da infiltração de neutrófilos, comprovando sua eficácia como agente antioxidante e modulador inflamatório.

### 3.1.2 Efeitos metabólicos e neuroprotetores

O  $\beta$ -cariofileno (BCP) apresenta potencial antidiabético relevante, com evidências de modulação de vias inflamatórias e oxidativas associadas à resistência à insulina. No modelo de cardiomiopatia diabética, Hashiesh *et al.* (2023) demonstraram que o tratamento oral com BCP reduziu NF- $\kappa$ B e COX-2, restaurou a glutatona e a catalase e atenuou lipotoxicidade miocárdica. Concomitantemente, observaram melhora na glicemia de jejum e no perfil lipídico, sugerindo ação integrada sobre estresse oxidativo e inflamação. Esses achados sustentam a hipótese de que o BCP atua como agonista de CB2, com crosstalk para PPAR- $\gamma$ , favorecendo a homeostase glicídica e o equilíbrio metabólico sistêmico.

Em condições metabólicas complexas, a melhora dos parâmetros bioquímicos pelo BCP tem sido atribuída à regulação das vias PPAR- $\alpha$ /PPAR- $\gamma$  e Nrf2. Revisão sistemática recente destacou que o agonismo seletivo de CB2 pelo BCP reduz as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6) e os EROs, ao mesmo tempo em que eleva as enzimas antioxidantes, com reflexos na sensibilidade insulínica e na dislipidemia (Ricardi *et al.*, 2024). A convergência desses mecanismos explica reduções concomitantes de triglicerídeos e transaminases em modelos de desordens cardiometabólicas, além de menor peroxidação lipídica, indicadores compatíveis com proteção hepática e vascular.

No contexto da aterosclerose, a modulação da inflamação e do estresse oxidativo pelo BCP pode afetar etapas-chave da aterogênese. Evidências experimentais recentes apontam que o composto reduz a ativação de NF- $\kappa$ B, a expressão de iNOS e a geração de espécies reativas, favorecendo um ambiente menos propício à disfunção endotelial e ao recrutamento de monócitos (Ricardi *et al.*, 2024; Hashiesh *et al.*, 2023). Em paralelo, dados *in vitro* mostram que o BCP atenua dano oxidativo induzido por hiperglicemia e suprime NOX2/NOX4, reforçando seu papel antiaterogênico indireto por meio da contenção de vias pró-oxidantes e da melhora do perfil lipídico (Li *et al.*, 2020).

Do ponto de vista neuroprotetor, o BCP reduz neuroinflamação e estresse oxidativo por meio da ativação de CB2 e da via Nrf2/HO-1, com impacto sobre homeostase mitocondrial e excitotoxicidade. Em síntese recente, Ivanova *et al.* (2025) compilaram dados *in vivo* e *in vitro* demonstrando diminuição de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e proteína carbonilada, além de melhora de marcadores sinápticos e comportamentais em modelos neurodegenerativos. Tais efeitos, associados à regulação de PPAR- $\gamma$ , fornecem base mecanística para a relação entre o controle metabólico periférico e a preservação neurológica, aspecto crucial em síndromes cardiometabólicas com componente neuroinflamatório.

### 3.1.3 Efeitos gastroprotetores e imunomoduladores

O  $\beta$ -cariofileno (BCP) tem-se destacado por seu papel na proteção do trato gastrointestinal e na modulação da resposta imune, atuando de forma multifatorial em processos inflamatórios e oxidativos. Estudos recentes evidenciam que o BCP exerce atividade gastroprotetora significativa ao reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e a expressão de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e COX-2, preservando a integridade da mucosa gástrica. De acordo com Parisotto-Peterle *et al.* (2020), formulações contendo  $\beta$ -cariofileno nanoemulsionado demonstraram efeito cicatrizante e antioxidante em modelos experimentais de úlcera gástrica, com aumento da proliferação epitelial e da deposição de colágeno, confirmando seu potencial como agente fitoterápico gastroprotetor.

Estudos mecanísticos sugerem que a ação gastroprotetora do BCP envolve a ativação dos receptores canabinoides tipo 2 (CB2) e a regulação negativa da via NF- $\kappa$ B, reduzindo a inflamação local e o dano oxidativo. Além disso, o BCP estimula a liberação de muco gástrico e a restauração da barreira epitelial, mecanismos relacionados à indução de PPAR- $\gamma$  e à modulação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que favorecem a homeostase do ambiente gástrico. Em formulações lipossomais e nanoemulsionadas, observou-se aumento da biodisponibilidade e prolongamento do efeito citoprotetor, especialmente em condições de lesão induzida por agentes ulcerogênicos (Amalraj *et al.*, 2020).

Quanto aos efeitos imunomoduladores, o  $\beta$ -cariofileno atua como modulador seletivo da resposta imune inata e adaptativa, equilibrando o perfil Th1/Th2. O composto regula a polarização de macrófagos, promovendo a transição do fenótipo M1 pró-inflamatório para o M2 anti-inflamatório, o que resulta na redução da liberação de citocinas inflamatórias e na ativação de processos regenerativos. Dados compilados por Ivanova *et al.* (2025) indicam que o BCP, ao ativar CB2 e PPAR- $\gamma$ , exerce um efeito imunossupressor leve, benéfico em doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, reduzindo o infiltrado celular e mantendo a integridade tecidual.

## 3.3 NANOEMULSÕES COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARENTERAL DE FÁRMACOS

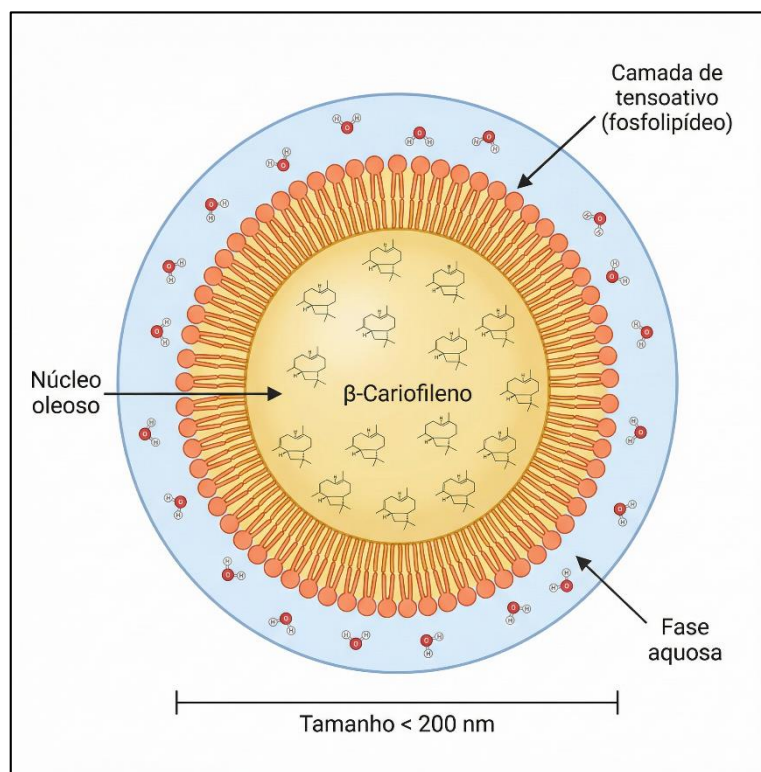
Nanoemulsões são sistemas dispersos formados por dois líquidos imiscíveis, geralmente estabilizados por surfactantes, em que a fase interna é reduzida a gotículas menores que 200 nm (Assis *et al.*, 2012). Essas formulações apresentam vantagens importantes, como

maior estabilidade físico-química, melhoria nas características organolépticas, aumento da biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água, incremento da penetração por barreiras biológicas e possibilidade de liberação controlada dos princípios ativos (Irache *et al.*, 2011). Para o desenvolvimento de uma nanoemulsão injetável, essas propriedades são fundamentais para viabilizar sua administração por via parenteral, assegurando melhor incorporação do fármaco e maior eficácia terapêutica. O controle do tamanho de partícula e a seleção adequada dos componentes da formulação são determinantes para alcançar essas características desejáveis (Assis *et al.*, 2012).

Apesar das vantagens, a administração parenteral de nanoemulsões representa um desafio no desenvolvimento farmacêutico, especialmente quanto à estabilidade e à biocompatibilidade dos sistemas. Métodos tradicionais de solubilização de fármacos, como a adição de co-solventes ou a formação de complexos com ciclodextrinas, apresentam limitações, incluindo precipitação do fármaco, dor no local de aplicação e baixa tolerabilidade (Strickley, 2004; Bruxel *et al.*, 2012). O uso de nanoemulsões visa superar essas barreiras, proporcionando maior estabilidade e minimizando reações adversas. A formulação de nanoemulsão, portanto, deve considerar cuidadosamente esses aspectos, priorizando componentes seguros e métodos de preparo que garantam a estabilidade cinética necessária para a administração intramuscular (Bruxel *et al.*, 2012).

As nanoemulsões lipídicas óleo em água têm longa história de uso, inicialmente como fonte de calorias e ácidos graxos essenciais e, mais recentemente, como sistemas carreadores de fármacos (Tamilvanan, 2009). A biocompatibilidade dos óleos vegetais e dos fosfolípidos utilizados torna essas formulações particularmente adequadas para aplicações parenterais. Para o  $\beta$ -cariofileno, um sesquiterpeno de alta lipofilicidade, a nanoemulsão representa uma estratégia eficaz para melhorar sua dispersão em meio aquoso, aumentar sua biodisponibilidade e controlar sua liberação no organismo. O desenvolvimento dessa formulação exige o controle rigoroso da composição e das condições de emulsificação, visando garantir não apenas a estabilidade físico-química do sistema, mas também a sua eficácia terapêutica e segurança biológica (Tamilvanan, 2009).

**Figura 6** – Estrutura de uma nanoemulsão óleo em água contendo  $\beta$ -cariofileno.



A formulação apresenta núcleo oleoso com o fármaco lipofílico, camada de tensoativo (fosfolípido) com moléculas anfifílicas organizadas radialmente, e fase aquosa externa. O tamanho das gotículas inferior a 200 nm caracteriza o sistema como nanoemulsão, conferindo maior estabilidade e biodisponibilidade para administração parenteral.

**Fonte:** Autora (2025)

Entretanto, a literatura científica ainda é escassa quanto ao uso do  $\beta$ -cariofileno em formulações de administração parenteral, o que evidencia uma lacuna de conhecimento e justifica o desenvolvimento de novas abordagens tecnológicas. A maioria dos estudos existentes avalia o  $\beta$ -cariofileno em formulações orais, tópicas ou lipossomais de uso oral, como o sistema lipossomal “Rephyl”, desenvolvido por meio de tecnologia de entrelaçamento de nanofibras, que demonstrou melhora significativa da biodisponibilidade e da estabilidade do composto em comparação às formas convencionais (Amalraj *et al.*, 2020). Estudos recentes também têm explorado o  $\beta$ -cariofileno em sistemas nanoparticulados e lipídicos voltados à neuroproteção e doenças crônicas, mas com foco em vias não parenterais (Ivanova *et al.*, 2025). Dessa forma, não há registros de formulações injetáveis validadas para o  $\beta$ -cariofileno, especialmente por via intramuscular ou intravenosa, nem de dados toxicológicos sistematizados após sua administração por via parenteral.

Essa lacuna científica é reforçada por revisões sobre nanoemulsões parenterais que destacam a escassez de estudos com compostos naturais e a necessidade de validação da

biocompatibilidade e da segurança antes da aplicação clínica (Bruxel *et al.*, 2012). Assim, o desenvolvimento de uma nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno representa uma contribuição inédita, tanto sob o ponto de vista farmacotécnico quanto toxicológico, uma vez que a investigação de parâmetros de segurança, estabilidade e compatibilidade tecidual de um fitocannabinóide apresenta o reconhecimento de um potencial terapêutico.

A possibilidade de direcionamento do fármaco para tecidos-alvo é outra vantagem oferecida pelas nanoemulsões, que pode ocorrer de forma passiva ou ativa (DATE, 2008; Tamilvanan, 2009). O direcionamento passivo ocorre pela captação natural das nanoemulsões pelo sistema fagocítico mononuclear, ou ainda pela sua acumulação em tecidos com capilares fenestrados, como áreas tumorais ou locais inflamados (Driscoll, 2006). Já o direcionamento ativo pode ser obtido por modificar a superfície das gotículas com ligantes específicos que reconhecem receptores celulares, aumentando a seletividade do fármaco. No caso da formulação de  $\beta$ -cariofileno, ao uso dessas estratégias pode favorecer a sua distribuição em tecidos inflamatórios, potencializando sua ação terapêutica (Driscoll, 2006).

Portanto, a incorporação de fármacos de baixa solubilidade em sistemas de nanoemulsão, como o  $\beta$ -cariofileno, oferece benefícios relevantes em comparação às formas farmacêuticas convencionais, incluindo aumento da segurança, melhoria da atividade terapêutica e controle da farmacocinética (Bruxel *et al.*, 2012). Esses sistemas minimizam efeitos adversos como irritação e dor local, comuns na administração parenteral de soluções convencionais. O sucesso da formulação depende diretamente das propriedades físico-químicas da nanoemulsão, das características químicas do  $\beta$ -cariofileno e da resposta fisiológica desencadeada após a administração. Assim, o desenvolvimento da nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno exige uma abordagem tecnológica criteriosa, voltada para a obtenção de um sistema estável, biocompatível e seguro, especialmente no contexto de sua avaliação toxicológica pré-clínica em ratos Wistar (Bruxel *et al.*, 2012).

### **3.3.1. Toxicidade e biocompatibilidade de formulações parenterais**

A toxicidade e a biocompatibilidade representam critérios essenciais na avaliação de formulações destinadas à administração parenteral, uma vez que essas vias ultrapassam as barreiras fisiológicas de proteção e introduzem diretamente os compostos no sistema circulatório ou em tecidos internos, exigindo um elevado grau de pureza e estabilidade (Begines *et al.*, 2020). Embora as nanoemulsões apresentem vantagens tecnológicas significativas, a escolha inadequada de componentes, como óleos, surfactantes e coemulsificantes, pode resultar

em efeitos adversos, como reações inflamatórias, necrose local ou alterações sistêmicas (Bruxel *et al.*, 2012).

De modo geral, uma formulação parenteral é considerada biocompatível quando não desencadeia reações inflamatórias intensas, necrose tecidual, alterações hematológicas ou distúrbios bioquímicos sistêmicos (Shah *et al.*, 2014). Para tanto, é essencial que os constituintes da nanoemulsão sejam reconhecidos como seguros pela Farmacopeia e pelo FDA (Food and Drug Administration), como os triglicerídeos de cadeia média (TCM), lecitinas de soja e polissorbatos não iônicos (Bruxel *et al.*, 2012; Strickley, 2004). Esses componentes apresentam boa tolerabilidade e ampla utilização em emulsões nutricionais e terapêuticas, com baixo potencial de irritação local e de toxicidade sistêmica.

A toxicidade de sistemas nanoestruturados pode decorrer de múltiplos fatores: composição química, carga superficial, tamanho de partícula, estabilidade coloidal e presença de resíduos de solventes ou agentes tensoativos (Zaher *et al.*, 2023). Em especial, partículas menores que 100 nm podem interagir com membranas celulares, alterando funções mitocondriais e promovendo estresse oxidativo (Patricio *et al.*, 2021). No entanto, quando adequadamente otimizadas, nanoemulsões lipídicas apresentam perfil seguro e são utilizadas com sucesso para transportar anestésicos, hormônios, anti-inflamatórios e antibióticos por via intravenosa e intramuscular (Tamilvanan, 2009; Bruxel *et al.*, 2012).

Em relação ao  $\beta$ -cariofileno, estudos de toxicidade aguda e subcrônica por via oral em roedores demonstram baixa toxicidade e ausência de efeitos adversos relevantes, com valores de  $DL_{50}$  superiores a 2000 mg/kg, o que classifica como uma substância de risco mínimo (da Silva Oliveira *et al.*, 2018). Essa segurança, associada à sua natureza lipofílica e ao reconhecimento de seu uso seguro em alimentos e produtos farmacêuticos, reforça seu potencial para formulações parenterais. Entretanto, a ausência de dados específicos sobre o comportamento do  $\beta$ -cariofileno quando injetado ressalta a necessidade de estudos pré-clínicos voltados à biocompatibilidade e toxicidade tecidual local, o que justifica a avaliação proposta neste trabalho.

### **3.3.2 Métodos de avaliação toxicológica *in vivo***

Os ensaios toxicológicos *in vivo* representam a principal ferramenta para determinar a segurança e a tolerabilidade de novas formulações farmacêuticas antes da transposição para estudos clínicos. Tais métodos permitem observar respostas fisiológicas e bioquímicas integradas à administração do produto, considerando tanto efeitos locais quanto sistêmicos.

Para formulações parenterais, são recomendados testes de toxicidade aguda e subcrônica, geralmente realizados em modelos roedores, como ratos Wistar ou camundongos Swiss (OECD, 2008).

Esses protocolos seguem as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), especialmente as Guidelines 420, 423, 425 e 407, que avaliam parâmetros de mortalidade, alterações comportamentais, ganho de peso, consumo de água e ração, além de análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas (OECD, 2008; ANVISA, 2019). A toxicidade aguda é observada nas primeiras 24 a 48 horas após a administração, enquanto a toxicidade subcrônica avalia os efeitos cumulativos ao longo de períodos prolongados, variando de 14 a 90 dias (González *et al.*, 2020).

No contexto de nanoemulsões injetáveis, parâmetros como o potencial inflamatório local e alterações hepáticas, renais e musculares são particularmente relevantes, visto que o contato direto com tecidos pode induzir reações inflamatórias e acúmulo lipídico (Begines *et al.*, 2020). A interpretação toxicológica envolve a correlação entre achados clínicos e laboratoriais. Dentre as principais análises, destacam-se o hemograma completo, capaz de revelar alterações mielotóxicas ou inflamatórias; os marcadores bioquímicos hepáticos e renais que indicam função orgânica; e a histopatologia de órgãos-alvo (fígado, rins e músculo), responsável por identificar infiltrado inflamatório, necrose e degeneração hialina (Silva *et al.*, 2018).

**Quadro 1** – Parâmetros laboratoriais utilizados na avaliação toxicológica *in vivo* de nanoemulsões parenterais

Análise	Parâmetro avaliado	Indicadores e interpretação
Hemograma completo	Avaliar possíveis efeitos mielotóxicos, inflamatórios ou imunológicos decorrentes da exposição à formulação.	Alterações no número de leucócitos, eritrócitos e plaquetas podem indicar inflamação sistêmica, hemólise ou toxicidade hematopoiética.
Marcadores bioquímicos hepáticos e renais	Verificar alterações no metabolismo e na função orgânica, principalmente no fígado e nos rins.	Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) indicam integridade hepatocelular; ureia e creatinina avaliam a função renal; Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) indicam lesão muscular e alterações no metabolismo energético.
Histopatologia de órgãos-alvo (fígado, rins e músculo)	Identificar alterações estruturais teciduais após administração da nanoemulsão.	Observa-se presença de infiltrado inflamatório, necrose, degeneração hialina ou alterações morfológicas compatíveis com resposta tecidual.

**Fonte:** Adaptado de Silva *et al.* (2018).

A integração desses parâmetros permite inferir não apenas o perfil de segurança toxicológica, mas também a biocompatibilidade funcional do sistema nanoemulsionado. Assim, o monitoramento dos efeitos sistêmicos e locais fornece base científica para compreender as interações entre a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno e os tecidos-alvo, assegurando a validade dos resultados obtidos no modelo experimental. Esses parâmetros permitem inferir não apenas a segurança toxicológica da nanoemulsão, mas também sua biocompatibilidade funcional, já que alterações bioquímicas sutis podem indicar interações indesejadas entre o sistema coloidal e o organismo.

### **3.3.3 Importância da avaliação da compatibilidade intramuscular**

A via intramuscular é amplamente empregada para formulações oleosas e nanoemulsionadas devido à sua capacidade de promover a liberação sustentada do fármaco e a absorção gradual (Pereira *et al.*, 2021). Entretanto, a administração de sistemas coloidais nessa via exige avaliação criteriosa de compatibilidade tecidual, uma vez que o contato direto com fibras musculares pode induzir inflamação, fibrose ou necrose, dependendo da natureza da formulação (Kumar *et al.*, 2019).

A avaliação histopatológica do músculo no sítio de aplicação constitui o método-padrão para estimar a biocompatibilidade local. São observados critérios como a integridade das fibras musculares, a presença de infiltrado inflamatório, o edema, a degeneração hialina e o processo de regeneração tecidual. Formulações adequadamente estabilizadas, com surfactantes biocompatíveis e pH fisiológico, tendem a provocar reações leves e transitórias, compatíveis com a fisiologia da via (Bruxel *et al.*, 2012; OECD, 2008).

No caso do  $\beta$ -cariofileno, que apresenta caráter lipofílico e alta afinidade por membranas celulares, a nanoemulsão injetável visa minimizar reações inflamatórias e controlar a dispersão local, evitando dor e lesão muscular. Assim, a avaliação da compatibilidade intramuscular em ratos Wistar é fundamental para confirmar a segurança da formulação e consolidar seu potencial como sistema de liberação parenteral inovador. Essa etapa experimental complementa a análise sistêmica e oferece evidências essenciais sobre o comportamento biológico da nanoemulsão no tecido muscular, permitindo concluir quanto à segurança, estabilidade e viabilidade farmacotécnica para aplicações clínicas futuras (da Silva Oliveira *et al.*, 2018).

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Aquisição do $\beta$ -cariofileno

O  $\beta$ -cariofileno ( $\geq 80\%$  de pureza), lote SHBM3771, foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Desenvolvimento e caracterização da nanoemulsão de $\beta$ -cariofileno

Foram desenvolvidas nanoemulsões utilizando o método de diagrama ternário de fases e determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico, utilizando metodologia adaptada de baixo aporte de energia descrita previamente por Fernandes *et al.* (2013), sendo produzidos 20ml de cada solução. As misturas foram agitadas com um agitador magnético (800 rpm) por 30 min. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min, com agitação contínua, por 30 min. Posteriormente, as nanoemulsões foram esterilizadas em autoclave.

A estabilidade da nanoemulsão foi avaliada no 0, 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias após a preparação, utilizando análise macroscópica de cor, aspecto visual, separação de fases e sedimentação. O tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta serão avaliados segundo a metodologia previamente descrita por Borges *et al.*, (2017). Durante este período, as nanoemulsões foram mantidas à temperatura ambiente em tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca.

#### 4.2.2 Determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico das nanoemulsões (EHLr)

Foram combinados dois tensoativos não-iônicos com baixo (mais lipofílico) e alto valor (mais hidrofílico) a fim de alcançar uma ampla faixa de valores de EHL (5 -12), de acordo com a equação abaixo:

$$EHLr = \frac{(EHLA \times mA) + (EHLB \times mB)}{mA + mB}$$

Onde: mA = massa usada do tensoativo hidrofílico;

mB = massa usada do tensoativo lipofílico;

EHLA = equilíbrio hidrofílico-lipofílico do monooleato de sorbitano;

EHLB = equilíbrio hidrofílico-lipofílico do polissorbato 80;

EHLr = equilíbrio hidrofílico-lipofílico requerido.

**Tabela 2.** Composição das diferentes formulações de  $\beta$ -cariofileno

Nanoemulsão	Monooleato de sorbitano (g)	Polissorbato 80 (g)	$\beta$ -cariofileno (g)	Água (g)
NBCP1	0,013	0,186	0,2	19,6
NBCP2	0,031	0,168	0,2	19,6
NBCP3	0,050	0,149	0,2	19,6
NBCP4	0,069	0,130	0,2	19,6
NBCP5	0,182	0,170	0,2	19,6

EHL – equilíbrio hidrófilo lipófilo;

Fonte: Autora (2024).

O valor de EHLr do beta-cariofileno foi determinado pelo valor de EHL de tensoativos capazes de induzir a formação da nanoemulsão com menor tamanho de gotícula e estável em 28 dias.

#### 4.2.3 Preparo das nanoemulsões

A partir do método descrito para emulsificação por inversão de fases pela alteração da fração volumétrica, com baixo aporte de energia, descrito por Ostertag *et al.* (2012) foram produzidas formulações 1%, considerando a massa do insumo comercial. Após correção pela pureza declarada do composto ( $\geq 80\%$ ), a concentração efetiva do  $\beta$ -cariofileno ativo na formulação correspondeu a aproximadamente 0,8% (m/v). Foram utilizados os tensoativos Polissorbato 80 (Tween 80) e Monooleato de Sorbitano (Span 80) na proporção 1:1 (óleo-tensoativo). A partir de um gotejamento contínuo, a fase dispersante (água deionizada) foi vertida na fase dispersa contendo os tensoativos e o  $\beta$ -cariofileno, sob agitação constante pelo aparelho agitador magnético a 800 rpm. A seguir, as formulações foram identificadas e armazenadas a 25°C em frascos de vidro.

#### 4.2.4 Eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação (EE%) do  $\beta$ -cariofileno foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), por meio da quantificação indireta da fração livre extraída em hexano, de acordo com a metodologia adaptada de Borges *et al.* (2018). Para esse procedimento, alíquotas da nanoemulsão foram submetidas à separação da fração não encapsulada por ultracentrifugação, seguida de extração líquido-líquido com solvente orgânico e análise cromatográfica das frações obtidas. O conteúdo total do composto foi determinado após ruptura completa das gotículas com solvente orgânico, permitindo o cálculo da EE% pela relação entre o  $\beta$ -cariofileno total e a fração livre detectada.

##### 4.2.4.1 Determinação da fração livre

Uma alíquota de 1,0 mL da nanoemulsão foi transferida para tubos de microcentrífuga e submetida à ultracentrifugação entre 20.000 e 30.000  $\times$  g, durante 30 a 60 min, à temperatura de 25 °C. Após separação, o sobrenadante contendo o  $\beta$ -cariofileno não encapsulado foi coletado e filtrado em membrana de 0,22  $\mu$ m. Para extração do composto, adicionou-se 1,0 mL de n-hexano, procedendo-se à agitação em vortex e posterior separação das fases. A fase orgânica foi recuperada e destinada à análise cromatográfica.

##### 4.2.4.2 Determinação do teor total de $\beta$ -cariofileno

Outra alíquota de 1,0 mL da nanoemulsão foi utilizada para ruptura das gotículas, com o objetivo de liberar completamente o composto. Para isso, adicionou-se solvente orgânico (n-hexano) na proporção 1:1 (v/v), seguido de agitação vigorosa por 5–10 min. A mistura foi centrifugada e filtrada, obtendo-se o extrato destinado à quantificação do teor total de  $\beta$ -cariofileno.

##### 4.2.4.3 Análises cromatográficas por CG-EM

As análises foram realizadas em um sistema CG-EM equipado com a coluna capilar DB-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m). A programação de temperatura consistiu em temperatura inicial de 50 °C (2 min), com incremento de 10 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup> até 280 °C, mantida por 5 min. Utilizou-se hélio como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. As injeções foram

realizadas no modo splitless, com volume de 1 µL.

O espectrômetro de massas operou no modo de ionização por impacto eletrônico (EI, 70 eV), nos modos SCAN ou SIM, monitorando-se o íon característico do β-cariofileno (m/z 204) e os fragmentos diagnósticos associados.

Para a quantificação, foi construída uma curva analítica utilizando o padrão de β-cariofileno (pureza ≥ 98%), em concentrações entre 0,5 e 50 µg·mL<sup>-1</sup>. As concentrações obtidas nas frações livres e totais foram determinadas por interpolação das áreas cromatográficas nas respectivas curvas de calibração.

#### 4.2.4.4 Cálculo da Eficiência de Encapsulamento (EE%)

A eficiência de encapsulamento (EE%) foi calculada segundo a equação, em que BCP total corresponde ao teor total de β-cariofileno liberado após ruptura da nanoemulsão, e BCP livre representa a fração não encapsulada isolada do sobrenadante.

$$EE\% = \frac{BCP\ total - BCP\ livre}{BCP\ total} \times 100$$

#### 4.2.5 Caracterização do estudo

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

#### 4.2.6 Animais utilizados

Neste estudo, foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar) machos, com idade inicial de 16 a 24 semanas, pesando 200-300g. Os animais utilizados foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas - UNICAMP. Foram mantidos em gaiolas de polietileno colocadas em ambiente ventilado, gabinete em temperatura controlada (25 ± 2 °C), ciclo claro/escuro (12/12 horas), com acesso livre a comida padrão para roedores e água *ad libitum*.

Este trabalho seguiu as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais, do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e das resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária, além de estar em conformidade com as leis vigentes que estabelecem normas éticas e práticas no âmbito da pesquisa experimental em animais. A pesquisa foi submetida à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) com aprovação em 28 de Agosto de 2018 sob o protocolo nº 015/2018.

#### **4.2.7 Estudo da toxicidade subaguda e compatibilidade intramuscular da nanoemulsão injetável de $\beta$ -cariofileno**

Para a triagem e avaliação de toxicidade subaguda da injeção os animais foram divididos em três grupos ( $n = 5/\text{grupo}$ ) e receberam uma injeção intramuscular no quadríceps a cada 3 dias durante 14 dias de tratamento. Foi utilizada a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno que apresentou melhor estabilidade e menor tamanho de partículas. Na avaliação da toxicidade subaguda em ratos Wistar machos ( $n=5$ ), o grupo controle foi tratado com o veículo da nanoemulsão e foram empregados grupos nas doses por via intramuscular de 5 e 15 mg/kg da NBCP. Os grupos foram divididos conforme a dose descrita por Harb *et al.* (2018) para  $\beta$ -cariofileno.

- CON: Grupo controle. Injetado o veículo com 2% (Span 80 e Tween 80, 0,2 mL);
- NBCP 5: Injetado com nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno na dose de 5 mg/kg (0,1 mL);
- NBCP 15: Injetado com nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno na dose de 15 mg/kg (0,25 mL).

O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013). Após a administração dos tratamentos, os animais foram submetidos à triagem observacional (screening hipocrático) para avaliação da atividade física, dos reflexos e da função do sistema nervoso central (SNC).

Foram avaliados os seguintes parâmetros: frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao toque da cauda, contorção, tônus corporais, força de preensão, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneano, tremores e/ou convulsões, anestesia, lacrimejamento, micção e defecação, piloereção, cianose ou hiperemia, bem como ocorrência de mortalidade. Essas avaliações foram realizadas nas primeiras 1, 2, 4 e 8 horas após a administração intramuscular e, posteriormente, de forma diária ao longo do período experimental.

O consumo de água, o consumo alimentar e o desenvolvimento ponderal foram

monitorados durante os 14 dias de tratamento, conforme protocolo de toxicidade subaguda. Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg; Cristália, São Paulo, Brasil) para a coleta de aproximadamente 1,5 mL de sangue por punção do plexo retro-orbital, destinado às análises bioquímicas e hematológicas.

#### **4.2.8 Análises histopatológicas**

Após a eutanásia foram removidos os órgãos internos: fígado, rins, pâncreas, coração, baço, pulmão e quadríceps, sendo avaliados macroscopicamente e quantificados sua massa (g). Os órgãos de fígado, rins e quadríceps foram fixados em solução de formalina tamponada 10% por 48hs e posteriormente esses órgãos serão desidratados em uma bateria de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (em lentilhas, marca Inlab) de acordo com metodologia por Borges *et al.*, (2017).

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo (Slee Medical) com navalhas descartáveis (Slee), na espessura de 4 e 5µm. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro para microscopia óptica, as quais foram deixadas por 25 minutos em estufa a 60°C para a secagem e melhor aderência do material, corado em HE (hematoxilina de Harris-LABORCLIN e eosina amarelada-INLAB). As lâminas foram observadas em microscópios ópticos marcas Olympus-micronal BX41 e fotografadas com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital).

#### **4.2.9 Análise bioquímica e hematológica**

A coleta de sangue (1,5 ml) foi realizada via plexo retro-orbital, logo após o material foi centrifugado por 10 minutos a 5.000 RPM. Todas as análises foram realizadas utilizando kits (Doles®, Goiânia—GO, Brasil) e um espectrofotômetro UV-VIS modelo UVmini 1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os marcadores a serem avaliados são aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), mioglobina, creatina quinase (CPK), lactato desidrogenase (LDH), triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), ureia, creatinina e glicose (Carvalho *et al.* 2018).

A análise hematológica foi realizada com um contador automático HumaCount Plus (Human GMBH, Alemanha). Foram observados os seguintes parâmetros: células sanguíneas, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, tamanho corpuscular médio (MCS), hemoglobina corpuscular média (MCH) e leucócitos (total, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos) (Silva Lima *et al.* 2017).

#### 4.2.10 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram inicialmente organizados em planilhas eletrônicas e submetidos à análise estatística utilizando os softwares GraphPad InStat e GraphPad Prism, versão 8.0. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada previamente por meio do teste de Shapiro–Wilk, enquanto a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett.

Para a comparação entre os grupos experimentais, foi empregada a análise de variância de uma via (ANOVA one-way), adequada para a avaliação de diferenças entre médias de múltiplos grupos independentes. Quando identificada diferença estatisticamente significativa pela ANOVA, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey, com o objetivo de identificar especificamente quais grupos diferiram entre si.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Em todos os testes estatísticos adotou-se um nível de significância de 5%, sendo considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1. DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES (NCBCP)

#### 5.1.1 Determinação do valor de EHL requerido para o $\beta$ -cariofileno

O valor de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) é um parâmetro que reflete a estrutura do tensoativo na interface óleo/água (O/A) e facilita a escolha do tensoativo para a formulação de emulsões. Esse valor facilita a seleção do tensoativo mais eficiente, pois indica o EHL necessário para estabilizar a fase oleosa em uma emulsão específica. De acordo com Zhang e Que (2008), uma combinação de tensoativos pode ser utilizada para ajustar o EHL e atingir o valor ideal da fase oleosa, promovendo emulsões mais estáveis.

O EHL representa o equilíbrio entre os grupos hidrofílicos e lipofílicos de um tensoativo, sendo amplamente utilizado no desenvolvimento de emulsões. Esse valor é um número que indica as características de solubilidade do tensoativo, determinando se ele formará uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Dessa forma, o EHL permite prever o comportamento do tensoativo na formulação, auxiliando na escolha adequada para diferentes fases oleosas e garantindo a estabilidade.

**Tabela 3** – Composição das diferentes formulações de  $\beta$ -cariofileno

Nanoemulsão	EHL	Monooleato de sorbitano (g)	Polissorbato 80 (g)	$\beta$ -cariofileno (g)	Água (g)
NBCP1	5	0,013	0,186	0,2	19,6
NBCP2	6	0,031	0,168	0,2	19,6
NBCP3	7	0,050	0,149	0,2	19,6
NBCP4	8	0,069	0,130	0,2	19,6
NBCP5	9	0,182	0,170	0,2	19,6

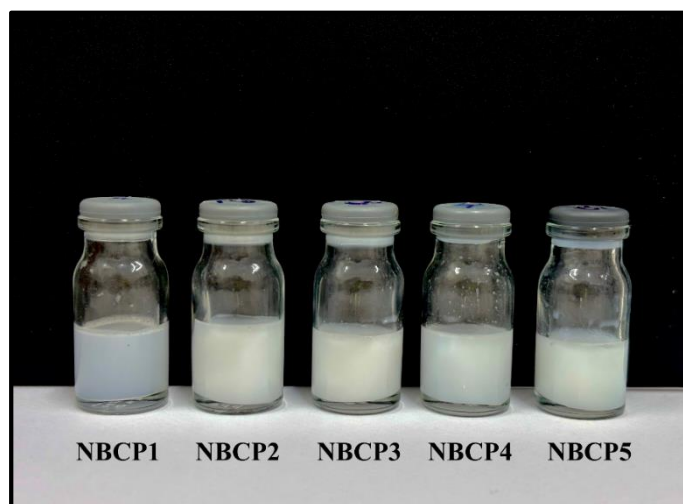
EHL – equilíbrio hidrófilo lipófilo;

**Fonte:** Autora (2025)

No desenvolvimento das nanoemulsões usando metodologia de baixo aporte de energia e empregando os mesmos percentuais (m/m) de água e BCP e diferentes percentuais de tensoativo, foi possível preparar 5 formulações que foram mantidas à temperatura ambiente

( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em tubos de ensaio de vidro com tampa. A **Tabela 3** apresenta a composição das emulsões, empregando o monooleato de sorbitano (EHL 4,3) como tensoativo lipofílico e o polissorbato 80 (EHL 15) como tensoativo hidrofílico.

**Figura 7** – Fotos das nanoemulsões de  $\beta$ -cariofileno referentes ao primeiro dia de avaliação da estabilidade.



Fonte: Autora, 2024.

### 5.1.2 Caracterização das nanoemulsões

Imediatamente após o preparo das NBCPs, foi realizada a caracterização do tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta por meio do equipamento Zetasizer Nano. Para uma avaliação precisa e estudo da estabilidade de cada nanoemulsão preparada, as formulações foram analisadas por 28 dias, apresentando algumas variações significativas entre seus resultados tanto no decorrer dos dias quanto no valor respectivo de EHL. Os resultados do último dia mostraram que as formulações apresentaram tamanho das partículas variando entre  $102,39 \pm 5,71$  e  $219,6 \pm 5,66$  nm, com índice de polidispersão de  $0,37 \pm 0,01$  a  $0,46 \pm 0,01$  e potencial zeta  $-27,5 \pm 0,6$  a  $-13,10 \pm 0,36$ .

**Tabela 4** – Influência da composição das nanoemulsões (NBCPs) sobre o diâmetro das partículas (nm), o índice de polidispersão (Pdi) e o potencial zeta.

Nanoemulsão	EHL	Dia 0			28º Dia		
		Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta
NBCP1	5	83,26 ± 0,12	0.22 ± 0.00	-15,9 ± 0,7	102,39 ± 5.71	0.55 ± 0.13	-27,5 ± 0,6
NBCP2	6	176,23 ± 2,68	0.42 ± 0.08	-11,0 ± 0,4	156,16 ± 2.12	0.41 ± 0.01	-25,1 ± 0,5
NBCP3	7	192,30 ± 1,73	0.38 ± 0.00	-16,50 ± 1,37	219,6 ± 5.66	0.59 ± 0.02	-22,80 ± 1,3
NBCP4	8	167,9 ± 2,50	0.37 ± 0.01	-14,03 ± 0,38	151,6 ± 1.31	0.37 ± 0.01	-16,17 ± 0,65
NBCP5	9	173,5 ± 1,92	0.44 ± 0.01	-11,03 ± 0,42	205,73 ± 6.84	0.46 ± 0.01	-13,10 ± 0,36

Os números representam a média ± desvio padrão de n = 3 réplicas.

Fonte: Autora, 2024.

Estudos relatam que a estabilidade de nanoemulsões depende em parte do tamanho das gotas formadas, pois nanoemulsões com gotas relativamente grandes perdem facilmente a estabilidade (Ostertag *et al.*, 2012; Mikulcova *et al.*, 2017). No presente trabalho, foram observadas no decorrer de 28 dias pequenas alterações, porém notáveis, de separação de fases, cremação/sedimentação e coalescência nas formulações com tamanho das partículas elevadas, sendo constatado que das 5 formulações apenas as formulações NBCP1, NBCP2 e NBCP4 apresentaram-se estáveis, uma vez que apresentaram tamanho das partículas menores que 200 nm.

Nos estudos realizados por Carvalho *et al.*, (2024), onde foi desenvolvido nanoemulsões de óleo de *Cannabis sativa*, os testes de estabilidade demonstraram que as formulações se apresentaram estáveis com diâmetros das gotículas variando entre 129 a 209 nm, o que corrobora com os resultados deste trabalho, com o resultado da NBC1 com o tamanho de partículas ainda menor e variação entre as nanoemulsões de 102,39 a 219,6 nm.

**Tabela 5** – Influência da composição das nanoemulsões (NBCPs) sobre o diâmetro das partículas (nm) e a estabilidade das formulações.

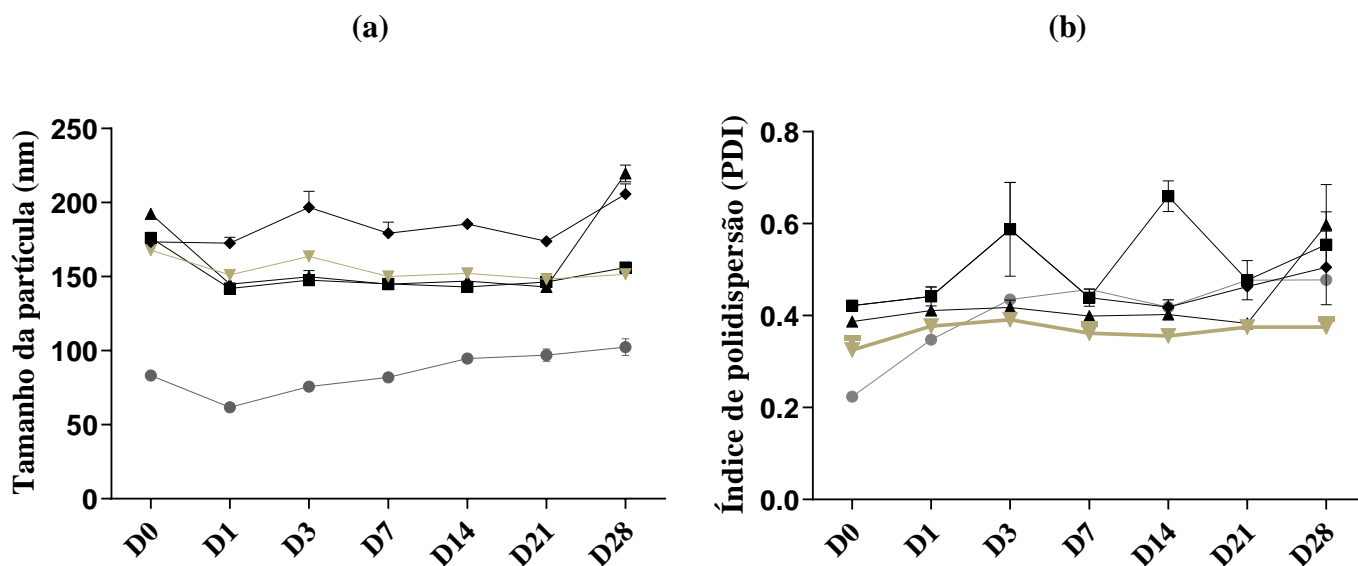
Nanoemulsão	Dia 0	1º dia	3º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
NBCP1	83,26±0,12	61,70±0,65	75,76±0,37	81,96±0,37	94,67±0,80	96,93±4,21	102,39±5,71
NBCP2	176,23±2,67	141,93±1,59	147,67±6,29	145,13±1,81	143,07±2,25	146,30±5,73	156,17±2,12
NBCP3	192,30±1,73	144,93±2,36	149,93±1,71	144,83±2,68	146,97±3,06	143,03±3,57	219,60±5,66
NBCP4	167,90±2,51	151,23±3,02	163,57±0,68	151,60±1,31	152,10±0,98	148,17±2,06	151,60±1,31
NBCP5	173,50±1,92	172,60±3,92	196,80±10,77	179,33±7,51	185,43±2,25	173,87±3,35	205,73±0,02

Os números representam a média ± desvio padrão de n = 3 réplicas. S: Span 80, T: Tween 80.

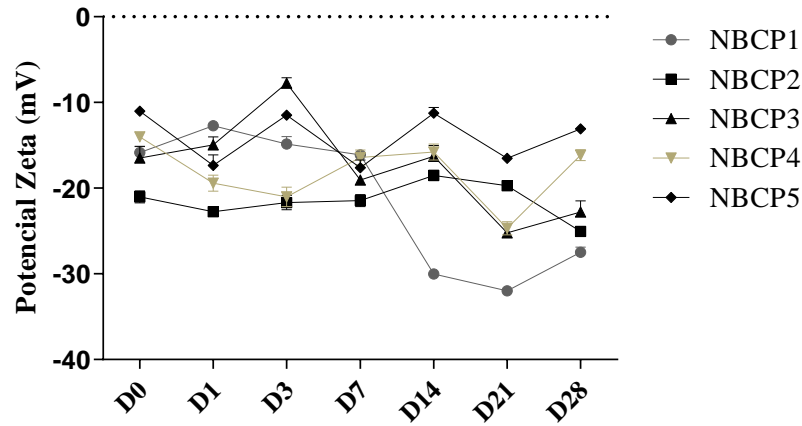
Fonte: Autora, 2024.

O índice de polidispersão (PDI) representa a homogeneidade do tamanho da gota na nanoemulsão. Nas amostras analisadas, observaram-se valores de 0,27 para NBCP1 E 0,37 para NBCP4. Este resultado indica que há uniformidade nos tamanhos das gotas da nanoemulsão. Um valor pequeno de PDI ( $< 0,08$ ) indica que há uniformidade nos tamanhos das gotículas da nanoemulsão, enquanto um valor grande de PDI ( $> 0,7$ ) indica uma distribuição no tamanho das partículas (Mirsharifi *et al.*, 2023).

O potencial de superfície pode ser determinado pelo potencial eletrocinético ou zeta, que é uma medida efetiva de controle do comportamento das partículas, pois indica a relação entre o potencial de superfície e as forças de repulsão entre elas. O potencial zeta é definido como a diferença de potencial entre a superfície da partícula e uma região neutra (não carregada) da solução, onde há uma viscoelasticidade diferente quando comparada à solução adjacente aos glóbulos. Quando o potencial zeta é de 30mV (em módulo) ou maior, a força repulsiva da dupla camada é maior do que a força atrativa, evitando, dessa forma, uma possível floculação. Dessa maneira, um valor elevado e negativo do potencial zeta é importante para a estabilidade físico-química da nanoemulsão, pois a força repulsiva entre as gotículas evita a instabilidade do sistema, o que contribui para os resultados de valor negativo de todas as nanoemulsões, com destaque para a NBCP1 que apresentou melhor resultado (figura 8) (Roland *et al.*, 2003).



(c)



Fonte: Autora, 2024.

### 5.1.1. Estabilidade físico-química das nanoemulsões

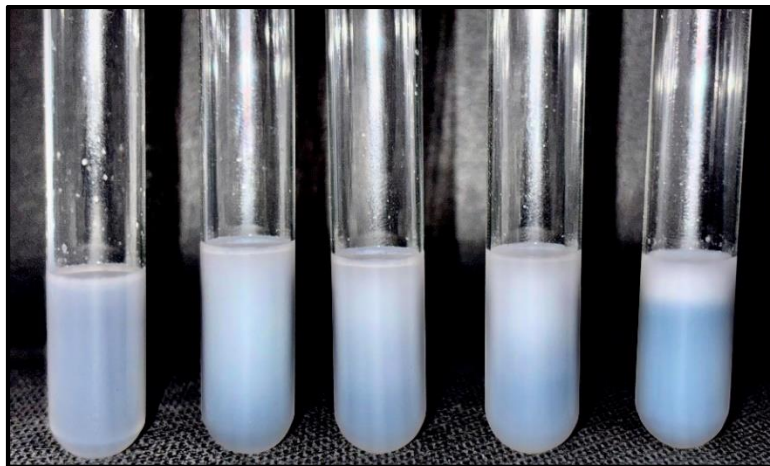
No 28º dia de avaliação, todas as formulações foram submetidas aos testes de centrifugação e estresse térmico (Tabela 6). Observou-se que as formulações NBCP2, NBCP3, NBCP4 e NBCP5 apresentaram sinais de instabilidade, evidenciados por discreta separação de fases após os testes. Em contraste, a NBCP1 manteve-se íntegra, sem qualquer alteração visual ou indício de instabilidade, mesmo após as condições de estresse aplicadas. Esses resultados demonstram que a NBCP1 apresentou o melhor perfil de estabilidade entre as formulações desenvolvidas, sendo, portanto, a escolhida para prosseguir nas etapas subsequentes do estudo.

**Tabela 6** – Propriedades físico-químicas das nanoformulações submetidas aos testes de estabilidade de centrifugação e estresse térmico

	NBCP1	NBCP2	NBCP3	NBCP4	NBCP5
<b>Cor</b>	Branco/ Translúcida	Branco/ Opaca	Branco/ Opaca	Branco/ Translúcida	Branco/ Opaca
<b>pH</b>	5,13±0.02	5,77±0.01	5,86±0.03	5,82±0.01	5,80±0.01
<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.996±0.01	0.962±0.02	0.938±0.02	0.97±0.001	0.967±0.02
<b>Centrifugação</b>	Estável	Instável	Instável	Instável	Instável
<b>Estresse térmico</b>	Estável	Estável	Estável	Estável	Estável

Fonte: Autora, 2024.

**Figura 8** – Imagem referente as nanoemulsões de  $\beta$ -cariofileno após os testes de centrifugação, indicando instabilidade e separação de fases para NBCP2, NBCP3, NBCP4 e NBCP5.

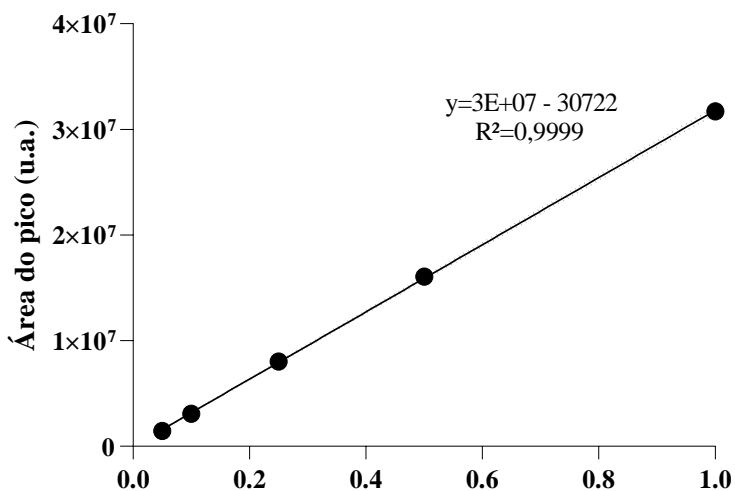


Fonte: Autora, 2024.

### 5.1.2. Eficiência de encapsulação

A concentração do  $\beta$ -cariofileno presente na nanoemulsão NBCP1 foi realizada a partir da construção de uma curva de calibração obtida por cromatografia gasosa. Para isso, utilizaram-se diferentes concentrações do padrão analítico, o que permitiu estabelecer a relação entre a concentração do composto e a área dos respectivos picos cromatográficos. A curva apresentou excelente linearidade, descrita pela equação da reta  $y = 3 \times 10^7x - 30.722$ , com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9999$ , que evidencia a elevada precisão do método empregado para a quantificação do terpeno. Essa linearidade assegura que pequenas variações na área do pico resultam em medidas confiáveis da concentração de  $\beta$ -cariofileno nas amostras analisadas.

**Figura 9** – Curva de calibração do  $\beta$ -cariofileno obtida por cromatografia gasosa (CG-EM). Relação entre concentração e área do pico cromatográfico, com equação da reta  $y = 3 \times 10^7x - 30722$  e coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9999$ .



Fonte: Autora (2025).

A partir da curva de calibração obtida por cromatografia gasosa, determinou-se a concentração de  $\beta$ -cariofileno livre presente na fração aquosa da nanoemulsão NBCP1. O valor encontrado foi de 0,283 mg/mL. Considerando a pureza declarada do  $\beta$ -cariofileno utilizado na formulação ( $\geq 80\%$ ), o teor total efetivo do composto ativo na nanoemulsão correspondeu a 8,0 mg/mL, após ajuste do valor teórico inicialmente estimado.

Com base nesse valor corrigido, a fração livre de  $\beta$ -cariofileno representou 3,54% do conteúdo total, resultando em uma eficiência de encapsulação (EE) de 96,46%. Esse elevado percentual indica que a maior parte do  $\beta$ -cariofileno permaneceu retida no interior das gotículas da nanoemulsão, evidenciando adequada afinidade do composto lipofílico pela fase oleosa e eficiência do sistema nanoestruturado desenvolvido.

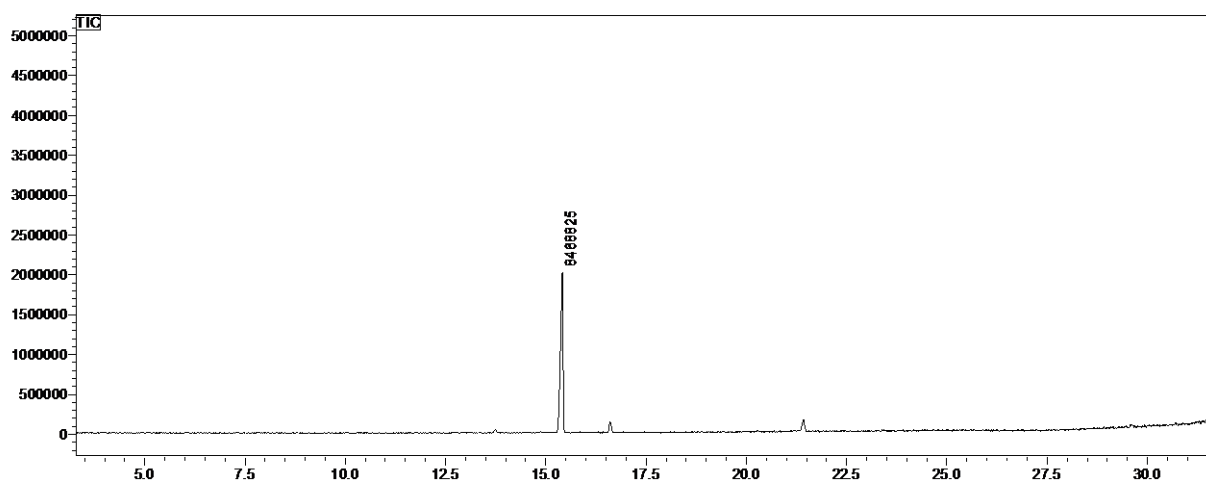
$$\%livre: \frac{0,283}{8,0} \times 100 = 3,54\%$$

$$EE\%: \left(1 - \frac{0,283}{8,0}\right) \times 100 = 96,46\%$$

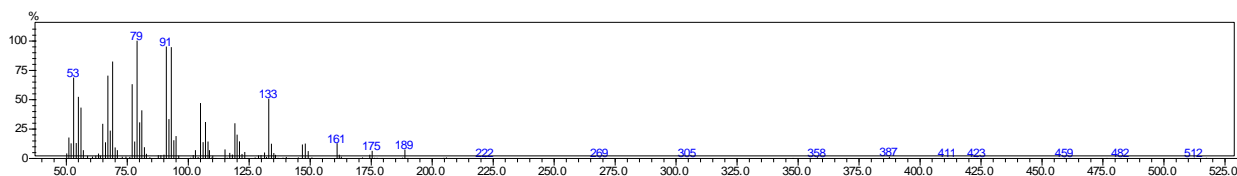
A identidade do  $\beta$ -cariofileno quantificado foi confirmada por GC-MS. O cromatograma exibiu um pico intenso e bem definido, com tempo de retenção em torno de 15 minutos, característico do composto. O espectro de massas associado apresentou os íons diagnósticos mais intensos, como m/z 93, 107, 119 e 133, compatíveis com o padrão analítico e com a biblioteca NIST, confirmando a presença do  $\beta$ -cariofileno na amostra sem

interferências significativas de outros componentes da formulação. Assim, a análise conjunta do cromatograma e do espectro de massas reforça a especificidade e confiabilidade do método analítico utilizado.

**Figura 10** – Cromatograma obtido por CG-EM referente ao  $\beta$ -cariofileno presente na fração livre da nanoemulsão NBCP1.



**Figura 11** – Espectro de massas do pico correspondente ao  $\beta$ -cariofileno identificado na fração livre da nanoemulsão NBCP1.



Os resultados obtidos para a formulação NBCP1 evidenciaram desempenho físico-químico superior, com estabilidade, elevada eficiência de encapsulação e perfil adequado para administração parenteral. A originalidade da composição, associada ao método de obtenção e aos dados de segurança pré-clínica, fundamentou o depósito de pedido de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o número BR 10 2025 026011 5, evidenciando o potencial inovador e a aplicabilidade tecnológica da nanoemulsão desenvolvida (**Anexo A**).

## 5.2 ESTUDO DA TOXICIDADE SUBAGUDA

Nos estudos de toxicidade foi utilizada a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP1), que apresentou melhor estabilidade e menor tamanho de partículas. Na avaliação da

toxicidade subaguda em ratos Wistar machos foram empregadas doses por via intramuscular de 5 e 15 mg/kg da NBCP.

### 5.1.3. Avaliação comportamental

A avaliação clínica realizada por meio do screening hipocrático não revelou alterações comportamentais ou sinais de toxicidade aguda ou tardia durante os 14 dias de experimento. Os animais mantiveram reflexos fisiológicos, resposta ao toque, atividade motora, comportamento exploratório, padrão de micção e defecação, além da ausência de manifestações como piloereção, tremores, convulsões ou hipóxia. A ausência de alterações neurológicas ou autonômicas sugere que a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP) não interferiu negativamente na integridade do sistema nervoso central ou periférico nas doses avaliadas. Esse padrão está de acordo com estudos toxicológicos que indicam que formulações seguras tendem a preservar o comportamento fisiológico e a responsividade dos animais (Cunha *et al.*, 2009; Sá *et al.*, 2015).

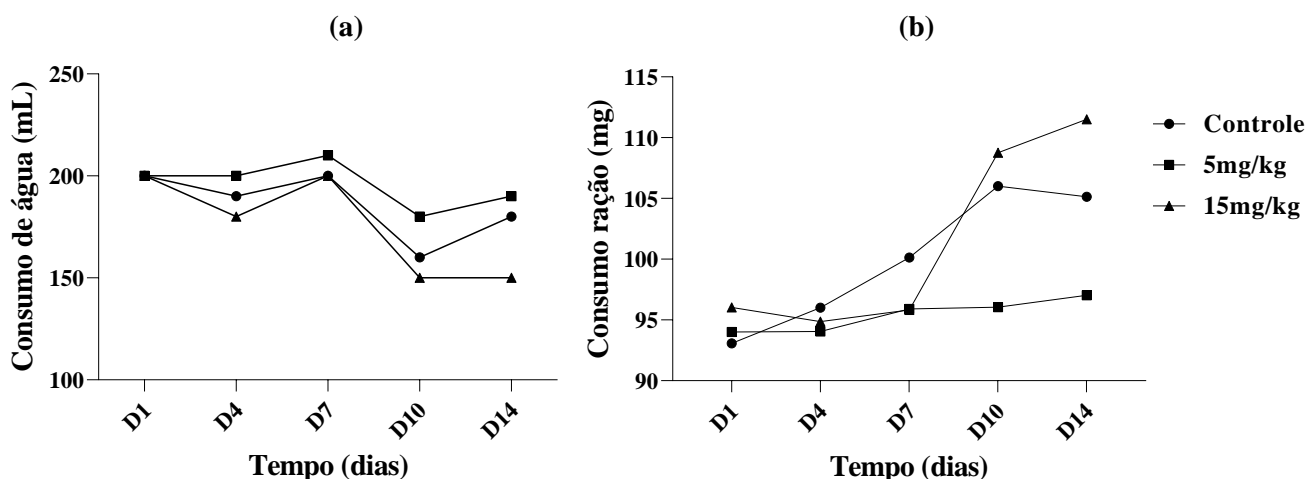
**Tabela 7** – Resultados dos parâmetros avaliados no screening hipocrático durante 14 dias de observação dos animais submetidos ao teste de toxicidade subaguda por via intramuscular com NBCP nas doses de 5, 10 e 15 mg/kg.

Parâmetros	CON	5 mg/kg	15 mg/kg
Frêmito vocal	Normal	Normal	Normal
Irritabilidade	Ausente	Ausente	Ausente
Resposta ao toque	Normal	Normal	Normal
Resposta aperto cauda	Normal	Normal	Normal
Contorção	Ausente	Ausente	Ausente
Tônus do corpo	Normal	Normal	Normal
força para agarrar	Normal	Normal	Normal
Ataxia	Ausente	Ausente	Ausente
Reflexo auricular	Normal	Normal	Normal
Tremores/ convulsões	Ausente	Ausente	Ausente
Hipnose/anestesia	Ausente	Ausente	Ausente
Lacrimação	Ausente	Ausente	Ausente
Micção/defecação	Normal	Normal	Normal
Piloereção	Ausente	Ausente	Ausente
Cianose/ Hiperemia	Ausente	Ausente	Ausente
Morte	Ausente	Ausente	Ausente

#### 5.1.4. Consumo de água, ração e peso corporal

O consumo de água e ração foi monitorado de forma coletiva, os valores observados refletem o consumo total dos cinco animais alojados por grupo (n=5/grupo). Os padrões de ingestão alimentar e hídrica mantiveram-se estáveis ao longo dos 14 dias de tratamento, sem reduções abruptas ou variações acentuadas que indicassem desconforto, aversão à formulação ou possível efeito tóxico sistêmico. Os dados referentes à evolução do consumo encontram-se apresentados na **Figura 12**.

**Figura 12** – Efeito do tratamento subagudo (v.m.) com NBCP (5 e 15 mg/kg) sobre o consumo de água e ração de ratos Wistar machos (n=5). (a) Apresenta a evolução do consumo de água dos ratos e (b) apresenta o resultado da evolução do consumo de ração. Os dados representam o consumo total por grupo (caixa) e são apresentados de forma descritiva ao longo de 14 dias de tratamento



Fonte: Autora (2025).

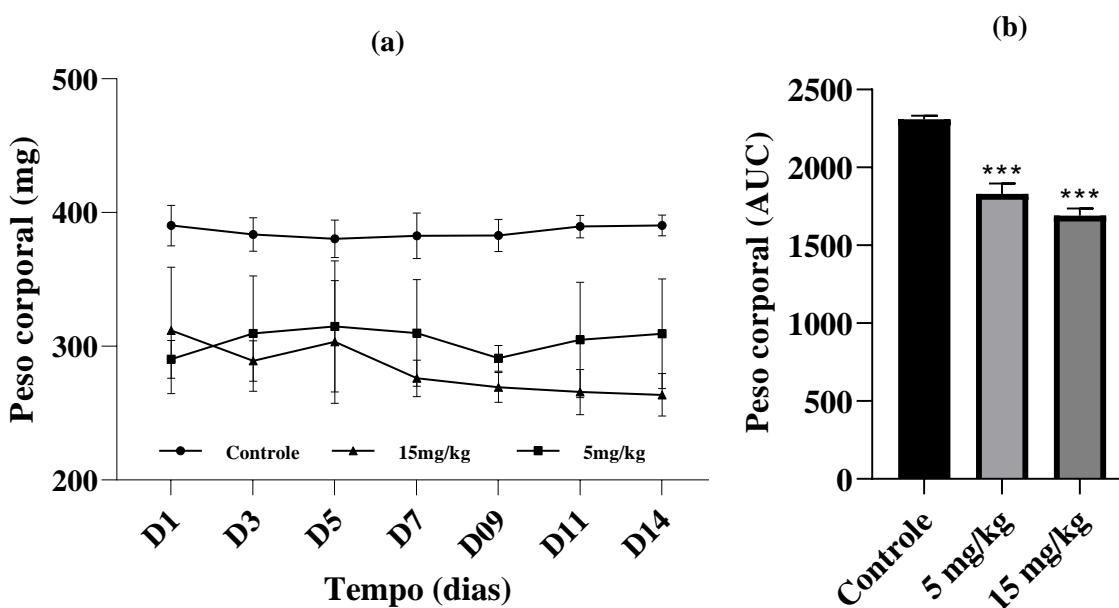
De forma descritiva, observou-se que as variações no consumo de ração acompanharam o crescimento fisiológico esperado dos animais ao longo do período experimental. Destaca-se que, entre o dia 7 e o dia 10, foi observado um aumento aproximado de 13,5% no consumo de ração, passando de 95,82 g para 108,76 g, sem caráter abrupto ou progressivo que sugerisse efeito adverso associado ao tratamento.

A estabilidade no consumo hídrico e alimentar sugere ausência de impacto da nanoemulsão sobre o comportamento ingestivo dos animais, parâmetro frequentemente alterado em condições de toxicidade subaguda ou subcrônica. Alterações no consumo são reconhecidas como sinais precoces de toxicidade sistêmica e podem estar associadas a

desconforto, dor, estresse metabólico ou efeitos adversos gastrointestinais (Cunha *et al.*, 2009; Vital *et al.*, 2009; Tubesha *et al.*, 2013).

A avaliação do peso corporal demonstrou que, no início do experimento (Dia 1), os animais do grupo controle apresentavam peso basal discretamente superior em relação aos grupos tratados com NBCP, conforme evidenciado na **Figura 13**. Essa diferença inicial contribuiu para a significância estatística observada no fator grupo, não estando relacionada a efeitos adversos do tratamento. Ao longo do período experimental, a evolução ponderal dos animais ocorreu de forma paralela entre os grupos, sem perda de peso, estagnação ou divergências progressivas associadas à administração da nanoemulsão. A análise estatística não evidenciou interação significativa entre tempo e tratamento, indicando que as variações observadas acompanharam o crescimento fisiológico esperado para a espécie, independentemente da dose administrada.

**Figura 13** – Efeito do tratamento suabgudo com NBCP (5 e 15 mg/kg) sobre o **peso corporal** de ratos Wistar machos (n=5) tratados durante 14 dias.



Observa-se diferença inicial no peso basal do grupo controle em relação aos grupos tratados, sem progressão ao longo do período experimental. (a) apresenta a evolução do peso corporal, (b) área sobre a curva (AUC) do peso corporal. Resultados são apresentados como a média  $\pm$  D.P. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância one-way (ANOVA), seguido teste de Tukey. \*( $p < 0.05$ ), resultado estatisticamente significativo versus grupo Controle.

Fonte: Autora (2025).

A ausência de perda de peso ou estagnação ponderal reforça que a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno, nas doses avaliadas, não comprometeu o estado nutricional, o metabolismo

energético ou o bem-estar geral dos animais. A manutenção do ganho ponderal ao longo do estudo é considerada um dos principais indicadores de segurança toxicológica, uma vez que alterações negativas nesse parâmetro refletem frequentemente toxicidade sistêmica, distúrbios metabólicos, inflamação generalizada ou redução da ingestão alimentar (Pires Júnior *et al.*, 2012; Vital *et al.*, 2009).

### 5.1.5. Avaliação do peso dos órgãos

Os animais foram eutanasiados e a avaliação dos órgãos (**Tabela 8**), não demonstrou diferença significativa quanto ao peso dos pulmões, rins, coração, baço e pâncreas entre os grupos controles e tratados dos animais machos. O fígado apresentou-se sem alterações no grupo tratado com 5 mg/kg de NBCP, porém foi evidenciado que nos animais tratados com 15 mg/kg houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) no seu peso entre o grupo controle. Em conformidade, também não foram observadas alterações macroscópicas no músculo injetado, as imagens representam aspecto macroscópico do músculo injetado após tratamento com NBCP.

**Tabela 8** – Efeito do tratamento subagudo com NBCP (5, 10 e 15 mg/kg) sobre peso dos órgãos (g) de ratos machos tratados por via intramuscular durante 14 dias.

Parâmetro	Controle	5mg/kg	15mg/kg
Baço	1,274 ± 0,658	0,542 ± 0,05	0,766 ± 1,161
Pâncreas	2.050 ± 1,308	1,696 ± 1,320	1,016 ± 0,532
Coração	1,792 ± 0,249	0,980 ± 0,492	1,39 ± 0,357
Fígado	12,384 ± 0,557	8.840 ± 1,080	9,51 ± 0,828*
Rins	1,698 ± 1,515	0,996 ± 0,073	1,144 ± 0,073
Pulmão	2,390 ± 1,718	1,552 ± 1,391	1,946 ± 0,339

Resultados são apresentados como a média ± D.P (n=5). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey. \*( $p < 0.05$ ), resultado estatisticamente significativo versus grupo Controle.

Estudos descrevem que alterações no peso dos órgãos internos pode ser indicativo de toxicidade e danos causados pelo tratamento (Berenguer-Rivas *et al.*, 2013). Por outro lado, autores como Dallegrave *et al.* (2018) e Alimba (2024) reforçam o princípio de que alterações no peso dos órgãos internos só devem ser consideradas evidências de toxicidade quando corroboradas por alterações bioquímicas e histológicas.

A literatura descreve que alterações isoladas no peso dos órgãos, especialmente do

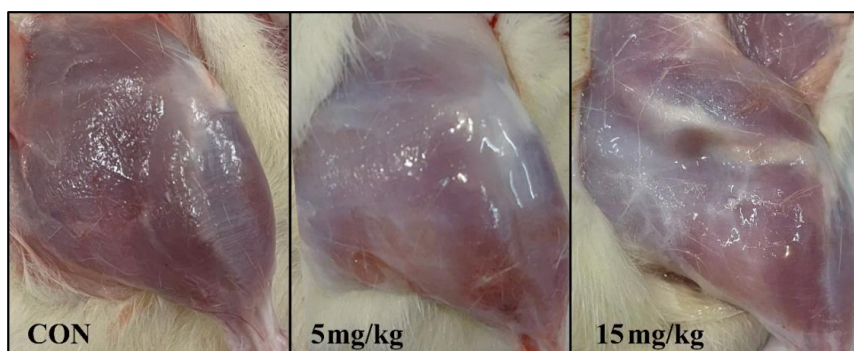
fígado, devem ser interpretadas com cautela e somente consideradas indicativas de toxicidade quando acompanhadas por alterações bioquímicas, histológicas ou morfológicas (Dallegrave *et al.*, 2018; Alimba, 2024). Em consonância com esses princípios, estudos recentes demonstram que compostos ricos em terpenos podem induzir aumento leve e não patológico do peso hepático devido à intensificação do metabolismo hepático de xenobióticos.

Pouyfung *et al.* (2022) relataram que a administração subcrônica de extrato de *Paederia foetida*, rico em ácido ursólico e  $\beta$ -sitosterol, promoveu aumento significativo do peso hepático sem alterações séricas de AST, ALT ou danos histopatológicos. De forma semelhante, Tran e Tran (2021) observaram discreto aumento no peso do fígado em camundongos tratados com extrato etanólico de *Plukenetia volubilis*, composto por terpenoides e fitoesteróis, interpretado como hipertrofia adaptativa associada ao aumento da atividade metabólica. Achados equivalentes foram reportados por Bemidinezhad *et al.* (2023), que demonstraram aumento hepático leve em animais expostos a formulações fitoterápicas contendo terpenos, sem evidência bioquímica ou histológica de hepatotoxicidade.

Portanto, o aumento discreto do peso do fígado observado neste estudo sugere uma adaptação fisiológica do órgão ao metabolismo do  $\beta$ -cariofileno, em concordância com o comportamento metabólico descrito para outras substâncias terpênicas. Esse efeito parece refletir maior demanda enzimática relacionada à biotransformação do composto, e não um indicativo de toxicidade subcrônica.

A inspeção macroscópica do músculo no local de aplicação não revelou sinais de inflamação, necrose, hemorragia, fibrose ou reação adversa ao material administrado. O aspecto homogêneo do tecido muscular é apresentado na Figura 14. A integridade estrutural do tecido muscular reforça a boa tolerabilidade local da formulação nanoemulsionada, indicando que a administração intramuscular repetida não provocou reatividade tecidual ou injúria no sítio de aplicação, achado compatível com formulações parenterais bem toleradas descritas na literatura.

**Figura 14** – Aspecto macroscópico do músculo injetado após injetado com o veículo no grupo controle (CON) e o tratamento com NBCP nas doses de 5 e 15mg/kg.



Fonte: Autora (2025).

### 5.1.6. Avaliação hematológica

Os parâmetros laboratoriais analisados forneceram subsídios relevantes para a avaliação da toxicidade sistêmica da nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno (BCP) em ratos Wistar. O tratamento intramuscular nos animais com NBCP, de forma geral não interferiu nos parâmetros hematológicos (**Tabela 9**), fundamentais nos estudos de toxicidade, pois o sistema hematopoiético é altamente sensível à ação de agentes tóxicos, especialmente aqueles com potencial citotóxico ou mutagênico (Faustova; Saloponova, 2025).

**Tabela 9** – Efeito do tratamento subcrônico com NBCP (5 e 15 mg/kg) sobre os parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos (n = 5) tratados por via i.m durante 14 dias.

Parâmetro	Controle	5 mg/kg	15 mg/kg
<b>Eritrograma</b>			
Hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	9,56 $\pm$ 0,21	9,41 $\pm$ 0,23	9,26 $\pm$ 0,15
Hemoglobina (g/dl)	16,68 $\pm$ 0,21	16,04 $\pm$ 0,25	16,06 $\pm$ 0,35
Hematócrito (%)	50,68 $\pm$ 0,84	48,42 $\pm$ 1,09	48,40 $\pm$ 1,08
VCM (fL)	53,08 $\pm$ 0,58	51,48 $\pm$ 1,15	52,25 $\pm$ 1,12
HCM (pg)	17,44 $\pm$ 0,18	17,06 $\pm$ 0,40	17,34 $\pm$ 0,42
CHCM (g/dL)	32,90 $\pm$ 0,16	33,14 $\pm$ 0,27	33,18 $\pm$ 0,13
RDW (%)	21,14 $\pm$ 1,18	20,88 $\pm$ 0,82	19,64 $\pm$ 1,04
<b>Leucograma</b>			
Leucócitos totais (células/ $\text{mm}^3$ )	7853 $\pm$ 689	8227 $\pm$ 581	7028 $\pm$ 771
Neutrófilos segmentados (células/ $\text{mm}^3$ )	1.201 $\pm$ 182	1.625 $\pm$ 369*	1.794 $\pm$ 779*
Eosinófilos (células/ $\text{mm}^3$ )	108 $\pm$ 32	163 $\pm$ 53	96 $\pm$ 35
Basófilos (células/ $\text{mm}^3$ )	912 $\pm$ 176	963 $\pm$ 219	593 $\pm$ 188
Linfócitos (células/ $\text{mm}^3$ )	5.272 $\pm$ 650	4.968 $\pm$ 1.012	4.170 $\pm$ 794
Monócitos (células/ $\text{mm}^3$ )	358 $\pm$ 73	512 $\pm$ 130	377 $\pm$ 58

## Plaquetas

Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	1.063 $\pm$ 172	1.211 $\pm$ 124	1.374 $\pm$ 121
VPM (fL)	10,88 $\pm$ 0,36	10,94 $\pm$ 0,56	10,84 $\pm$ 0,39

Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular média (HCM), Concentração de hemoglobina, Corpuscular média (CHCM), Volume plaquetário médio (VPM). Resultados são apresentados como a média  $\pm$  D.P. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Resultado estatisticamente significativo \* ( $p < 0,05$ ) versus grupo Controle.

**Fonte:** Autora (2025).

O hemograma dos animais indicou manutenção global dos parâmetros hematológicos dentro da normalidade, incluindo as contagens de eritrócitos, leucócitos totais e plaquetas. Essa estabilidade sugere que a administração intramuscular repetida da nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno não desencadeou alterações hematológicas compatíveis com toxicidade sistêmica, como leucocitose, leucopenia ou trombocitopenia, condições frequentemente associadas a processos inflamatórios ou respostas imunes exacerbadas.

De forma geral, o tratamento intramuscular com NBCP não interferiu de maneira adversa nos parâmetros hematológicos avaliados. Observou-se, entretanto, um aumento estatisticamente significativo na contagem absoluta de neutrófilos segmentados nos grupos tratados, sem alteração concomitante na contagem total de leucócitos ou em outros subtipos celulares. Esse achado, isolado e não acompanhado de alterações clínicas, bioquímicas ou histopatológicas, sugere uma resposta adaptativa discreta, sem relevância toxicológica aparente.

Esses parâmetros são particularmente importantes na avaliação toxicológica, uma vez que o sistema hematopoiético é altamente sensível à ação de agentes com potencial mutagênico ou citotóxico (Silva *et al.*, 2012). Em estudos de toxicidade subcrônica, sinais de toxicidade sistêmica são geralmente definidos pela associação entre alterações clínicas e laboratoriais, como redução do consumo alimentar e hídrico, perda de peso corporal, alterações bioquímicas e hematológicas, bem como alterações morfológicas em órgãos-alvo (Cunha *et al.*, 2009; Sá *et al.*, 2015). No presente estudo, a ausência dessa associação reforça que a administração intramuscular repetida da nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno não resultou em toxicidade sistêmica relevante, sustentando um perfil de segurança compatível com o uso parenteral.

### 5.1.7. Avaliação bioquímica

A análise bioquímica dos animais tratados com a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP) nas doses de 5 e 15 mg/kg demonstrou manutenção da função hepática e renal, sem evidências de hepatotoxicidade ou nefrotoxicidade. Os níveis séricos de ureia e creatinina permaneceram dentro da faixa fisiológica e sem diferenças estatísticas relevantes entre os grupos, indicando preservação da integridade renal. Tais resultados contrastam com achados de Sá *et al.* (2015), que relataram elevação significativa desses marcadores em modelos experimentais expostos a compostos tóxicos, reforçando que a NBCP, nas concentrações avaliadas, não induziu alterações compatíveis com dano renal.

**Tabela 10** – Efeito do tratamento subagudo com NBCP (5 e 15 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar (n = 5) tratados por via intramuscular durante 14 dias.

Parâmetro	Controle	5 mg/kg	15 mg/kg
Glicose (mg/dL)	97,6 ± 23,17	79,33 ± 21,41	71,6 ± 6,81
Colesterol (mg/dL)	95,8 ± 8,6	61,2 ± 34,60***	59,0 ± 36,0***
HDL (mg/dL)	17,8 ± 8,78	23,6 ± 5,8	27,8 ± 9,2**
LDL (mg/dL)	41,22 ± 8,545	21,84 ± 9,57**	22,84 ± 14,54*
VLDL (mg/dL)	28,52 ± 10,12	16,36 ± 12,16	10,7 ± 7,82**
Triglicerídeos (mg/dL)	140,2 ± 31,0	93,8 ± 11,59	53,5 ± 8,98**
Creatinina (mg/dL)	1,03 ± 0,68	0,6 ± 0,03	0,46 ± 0,27*
AST (U/L)	144,8 ± 7,65	140 ± 5,72	155,2 ± 6,40
ALT (U/L)	39,8 ± 9,42	37,4 ± 12,25	32,8 ± 13,45
Ureia (mg/dl)	55 ± 3,06	63,6 ± 3,19	61,0 ± 2,99

Colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL); colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); colesterol de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL); aspartato aminotransferase (AST); alanina aminotransferase (ALT). Resultados são apresentados como a média ± D.P. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Resultado estatisticamente significativo \*( $p < 0,05$ ) versus grupo Controle.

Fonte: Autora (2025).

De forma semelhante, as transaminases AST e ALT não apresentaram aumento significativo nos grupos tratados, o que indica ausência de lesões hepatocelulares. A estabilidade desses marcadores é coerente com a ação farmacológica previamente descrita para o  $\beta$ -cariofileno, que apresenta propriedades hepatoprotetoras mediadas pela ativação dos receptores CB2 e pela indução da via antioxidante Nrf2/HO-1, contribuindo para a redução de estresse oxidativo e inflamação hepática (Abdelgawad *et al.*, 2023). Assim, os marcadores de função hepática observados reafirmam a segurança do composto, mesmo quando administrado em nanoestrutura e por via intramuscular.

A avaliação da glicemia demonstrou manutenção da homeostase glicêmica, uma vez que os níveis de glicose permaneceram estáveis entre os grupos e sem diferenças estatisticamente significativas. A estabilidade desse parâmetro evidencia que a nanoemulsão não interferiu negativamente no metabolismo energético dos animais. Esses achados são compatíveis com estudos que descrevem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do  $\beta$ -cariofileno capazes de melhorar a sensibilidade à insulina e reduzir processos metabólicos desregulados, conforme relatado por El-Sayed *et al.* (2022).

Quanto ao perfil lipídico, verificou-se redução significativa dos níveis de colesterol total, LDL e VLDL, acompanhada por diminuição expressiva dos triglicerídeos. Esses achados não caracterizam dislipidemia induzida por toxicidade; ao contrário, refletem efeitos metabólicos benéficos já documentados para o  $\beta$ -cariofileno. Baldissera *et al.* (2017) demonstraram que o composto exerce atividade hipolipemiante principalmente por meio da inibição da enzima HMG-CoA redutase hepática, mecanismo semelhante ao observado para estatinas. De forma complementar, Ghosh *et al.* (2021) relataram modulação de vias metabólicas relacionadas à inflamação e ao acúmulo lipídico, contribuindo para um perfil metabólico mais equilibrado.

Observou-se também aumento significativo dos níveis de HDL, sobretudo na dose de 15 mg/kg. Esse efeito diverge dos achados de Baldissera *et al.* (2017), nos quais o  $\beta$ -cariofileno reduziu lipídios circulantes, porém sem elevar HDL. A discrepância pode estar relacionada à maior estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade conferidas pela nanoemulsão utilizada neste estudo, potencializando a atividade moduladora sobre o metabolismo lipídico. O incremento de HDL, portanto, não sugere toxicidade, mas sim um possível indicativo de melhora metabólica, consonante com o papel cardioprotetor atribuído a essa lipoproteína.

Em conjunto, os achados bioquímicos demonstram ausência de alterações adversas nos sistemas hepático, renal e glicêmico. Pelo contrário, observou-se um conjunto de efeitos metabólicos favoráveis, com destaque para a modulação positiva do perfil lipídico. A consistência entre esses resultados e as propriedades farmacológicas descritas para o  $\beta$ -cariofileno, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e moduladores metabólicos (Chen *et al.*, 2019; Waltenberger, 2016), sustenta a segurança da formulação nanoestruturada para administração intramuscular prolongada e reforça seu potencial farmacológico para aplicações terapêuticas futuras.

### 5.1.8. Avaliação dos marcadores de lesão muscular

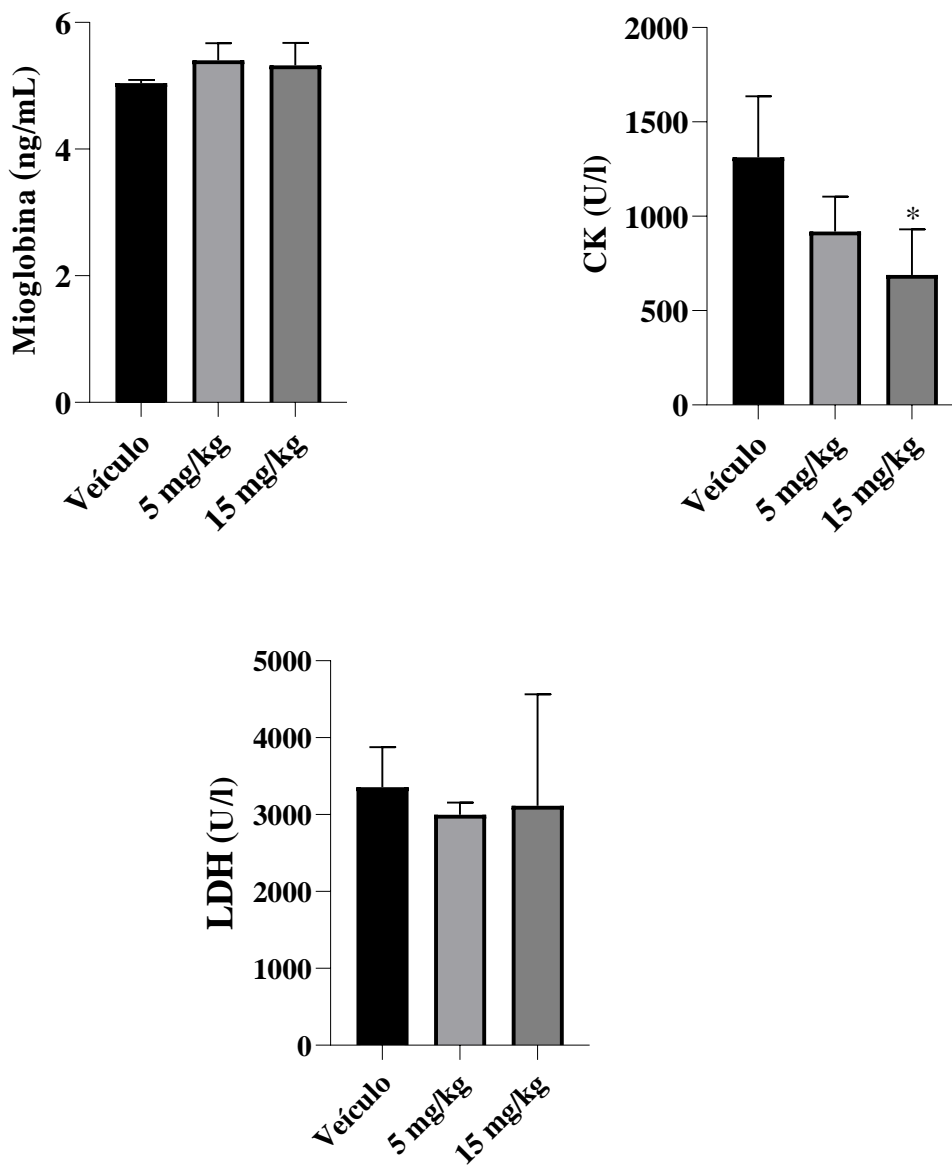
A análise dos marcadores séricos de lesão muscular demonstrou preservação da integridade do tecido esquelético após a administração intramuscular repetida da nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP). Conforme apresentado na Tabela 8, não foram observados aumentos significativos nos níveis de creatinoquinase (CK), desidrogenase láctica (LDH) ou mioglobina, parâmetros classicamente empregados para a detecção de ruptura das fibras musculares, necrose ou inflamação local. Esses biomarcadores tendem a se elevar de forma proporcional ao dano estrutural do tecido, sendo amplamente utilizados como indicadores precoces de mionecrose (ELY et al., 2000; ALVES et al., 2019). A manutenção de seus valores dentro da faixa fisiológica sugere que o composto não induziu toxicidade muscular local mesmo após múltiplas aplicações.

**Tabela 11** – Efeito do tratamento subagudo com NBCP (5 e 15 mg/kg) sobre os marcadores de lesão muscular de ratos Wistar (n = 5) tratados por via intramuscular durante 14 dias.

Parâmetro	Controle	5mg/kg	15mg/kg
Mioglobina (mg/dL)	5,040 $\pm$ 0,055	5,400 $\pm$ 0,055	5,320 $\pm$ 0,356
CK (U/L)	1.312 $\pm$ 323,833	919,600 $\pm$ 184,028	689,0 $\pm$ 241,404*
LDH (U/L)	3.357,0 $\pm$ 520,448	2.998,0 $\pm$ 159,830	3.116,60 $\pm$ 1.448,412

Resultados são apresentados como a média  $\pm$  D.P. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , resultado estatisticamente significativo *versus* grupo Controle.

**Figura 17** – Resultados bioquímicos dos marcadores de lesão muscular após tratamento com nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP; diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$ ; ANOVA).



Fonte: Autora (2025).

A análise dos marcadores séricos de lesão muscular demonstrou preservação da integridade do tecido esquelético após a administração intramuscular repetida da nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP). Conforme apresentado nos gráficos, não foram observados aumentos significativos nos níveis de creatinoquinase (CK), desidrogenase láctica (LDH) ou mioglobina, parâmetros classicamente empregados para a detecção de ruptura das fibras musculares, necrose ou inflamação local. A manutenção de seus valores dentro da faixa fisiológica sugere que o composto não induziu toxicidade muscular local mesmo após múltiplas aplicações.

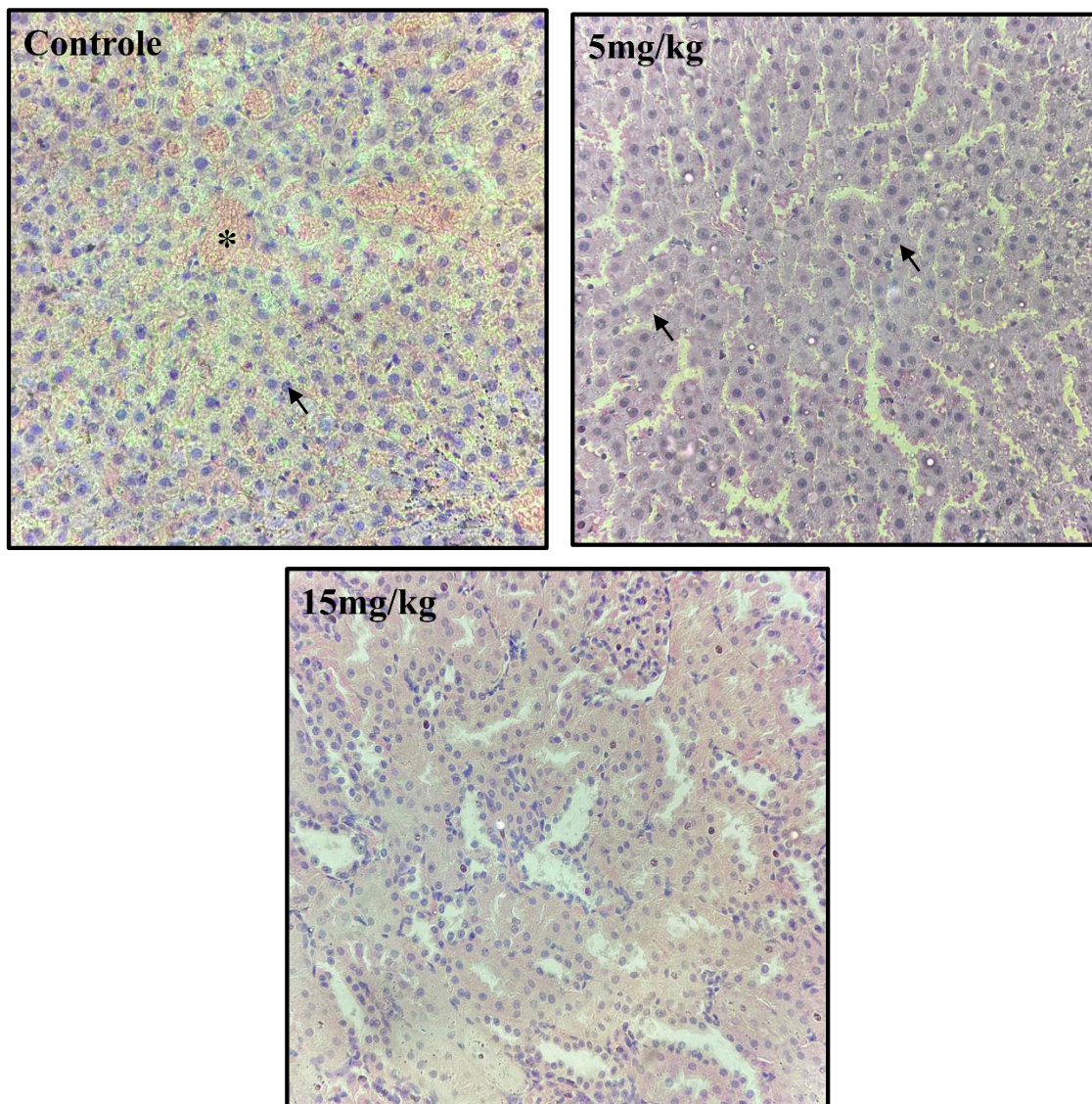
Além disso, observou-se redução significativa nos níveis séricos de CK no grupo tratado com 15 mg/kg, achado que não é compatível com processo lesivo. A CK é considerada um dos marcadores mais sensíveis de dano muscular, exibindo elevações marcantes mesmo diante de microlesões teciduais. Assim, sua diminuição sugere não apenas ausência de injúria, mas possível efeito protetor sobre as fibras esqueléticas. Evidências recentes sustentam essa interpretação: preparações contendo  $\beta$ -cariofileno demonstraram capacidade de reduzir dor muscular e marcadores de dano em voluntários submetidos a exercício excêntrico, efeito atribuído à ação anti-inflamatória e moduladora da via nociceptiva (Amalraj *et al.*, 2020; Johnson *et al.*, 2021).

Esse perfil é consistente com estudos experimentais que demonstram que o  $\beta$ -cariofileno reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias e atenua processos lesivos mediados por estímulos inflamatórios ou nociceptivos (Guimarães *et al.*, 2014; Gertsch *et al.*, 2008). Do ponto de vista farmacotécnico, a literatura descreve elevada compatibilidade intramuscular de formulações nanoestruturadas contendo surfactantes de baixa toxicidade, como o polissorbato 20, que não induzem reações inflamatórias locais mesmo após aplicações repetidas (Lee *et al.*, 2021). Resultados semelhantes foram relatados em sistemas oleosos nanoestruturados contendo compostos vegetais, nos quais não foram detectadas alterações relevantes em CK, LDH ou mioglobina, corroborando a ausência de dano muscular (TRAESEL *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2023).

De modo geral, os achados bioquímicos reforçam o perfil de segurança da nanoemulsão injetável de  $\beta$ -cariofileno, evidenciando compatibilidade musculoesquelética e ausência de efeitos tóxicos locais. A estabilidade dos marcadores de função muscular, associada à preservação dos parâmetros hepáticos, renais e hematológicos, sugere que a formulação apresenta características adequadas para administração parenteral repetida. Somadas às propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes já descritas para o composto, essas evidências sustentam o potencial farmacológico da NBCP para aplicações terapêuticas seguras.

### 5.1.9. Análise histopatológica

**Figura 16** – Lâminas representativas do fígado dos animais dos grupos Controle, 5 mg/kg e 15 mg/kg após 14 dias de tratamento com a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP).



Observa-se preservação da arquitetura em todos os grupos, com cordões de hepatócitos organizados, núcleos centrais e sinusoides bem delimitados, sem evidências de necrose, infiltrado inflamatório ou alterações degenerativas relevantes. Os achados indicam ausência de hepatotoxicidade associada ao tratamento nas doses avaliadas, apresenta tecido hepático sem alterações evidentes, com núcleos celulares íntegros (**setas**) e citoplasma com ausência de danos (**asteriscos**). (Hematoxilina e eosina – H&E, objetiva 40 $\times$ ; aumento total 400 $\times$ ).

**Fonte:** Autora (2025).

A avaliação histológica do fígado demonstrou preservação da organização lobular, com hepatócitos morfologicamente íntegros, sinusoides permeáveis e espaços portais sem sinais de inflamação, edema ou proliferação ductular. A manutenção dessa arquitetura indica

ausência de agressão direta ao parênquima hepático após o tratamento intramuscular com a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP). Achados semelhantes foram descritos por Schmitt, Levy e Carroll (2016), que relataram ausência de alterações histopatológicas em fígados de ratos submetidos à exposição subcrônica ao  $\beta$ -cariofileno, reforçando seu perfil de segurança em formulações experimentais.

A ausência de degeneração vacuolar, necrose, balonização citoplasmática ou acúmulo lipídico nos hepatócitos observada no presente estudo está em consonância com investigações prévias envolvendo compostos terpênicos estruturalmente relacionados ao  $\beta$ -cariofileno. Em estudo realizado por Pouyfung *et al.* (2022), extratos ricos em  $\beta$ -sitosterol e ácido ursólico, terpenos de perfil metabólico similar, não induziram esteatose ou lesão hepatocelular, mesmo quando administrados de forma contínua por 28 dias, sugerindo uma resposta adaptativa fisiológica ao metabolismo aumentado de fitoquímicos.

Além disso, a integridade dos sinusoides e a ausência de congestão ou hemorragia corroboram a inexistência de hepatotoxicidade vascular. Esses achados convergem com o estudo de Bemidinezhad *et al.* (2023), no qual formulações fitoterápicas contendo terpenos de *Anethum graveolens* e *Citrus aurantium* não produziram alterações vasculares hepáticas ou evidências de inflamação, mesmo após longos períodos de exposição, sugerindo que terpenoides têm baixa propensão a desencadear agressões sinusoidais.

O padrão histológico preservado também dialoga com os resultados bioquímicos obtidos no presente estudo, que demonstraram transaminases AST e ALT dentro da normalidade. Essa convergência entre dados histológicos e bioquímicos é amplamente descrita na literatura como um indicador seguro de ausência de hepatotoxicidade significativa. Segundo Abdelgawad *et al.* (2023), o  $\beta$ -cariofileno exerce efeito hepatoprotetor por meio da ativação dos receptores CB2 e da via Nrf2/HO-1, reduzindo inflamação e estresse oxidativo no tecido hepático, mecanismos compatíveis com a manutenção da morfologia observada nas lâminas analisadas.

A consistência dos achados deste trabalho também se alinha ao observado por Tran e Tran (2021), que relataram aumento do peso hepático associado a adaptações metabólicas, mas sem qualquer alteração histológica relevante em animais tratados com extratos ricos em terpenoides. Esses autores reforçam que a ausência de lesão hepatocelular, mesmo diante de mudanças pontuais no peso do órgão, caracteriza uma resposta fisiológica adaptativa e não um processo tóxico.

De maneira complementar, estudos conduzidos com outras formas nanoestruturadas contendo terpenos também relatam compatibilidade hepática elevada. Carvalho *et al.* (2023),

ao avaliar nanodispersões oleosas intramusculares, observaram que mesmo formulações ricas em compostos bioativos não induziram alterações hepáticas, salientando que sistemas nanoestruturados bem estabilizados tendem a apresentar boa biocompatibilidade tecidual.

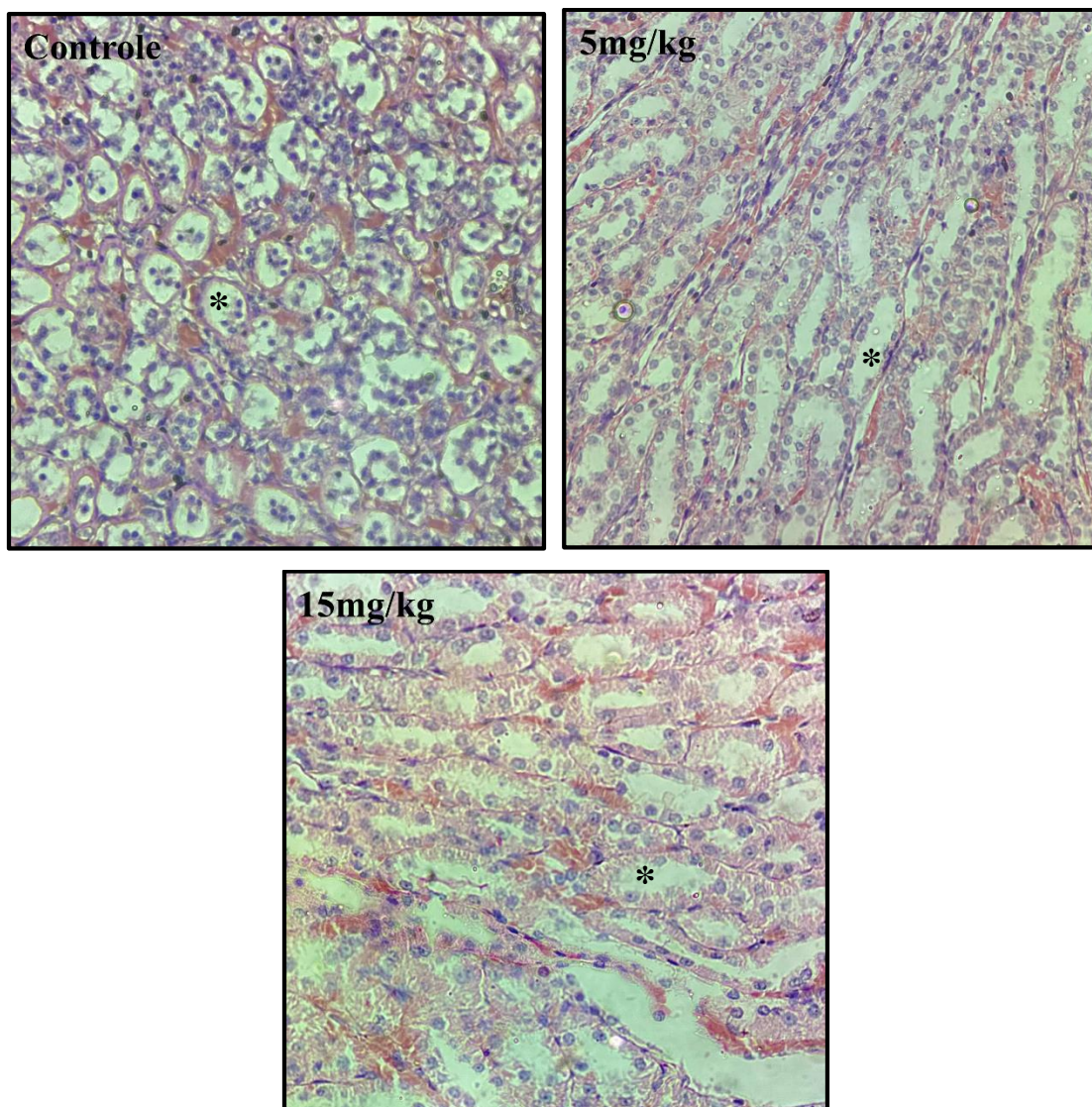
A avaliação histológica do tecido muscular no presente estudo demonstrou ausência de necrose, infiltrado inflamatório significativo ou fibrose nas regiões de aplicação intramuscular da nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno, mesmo após cinco administrações repetidas. Esses dados contrastam com os achados de Hodges *et al.* (2018), que ao avaliarem diversos excipientes farmacêuticos comumente utilizados em formulações injetáveis, relataram reações adversas locais como inflamação, necrose muscular e fibrose, principalmente com polissorbato 80 e propilenoglicol. Tais achados reforçam a biocompatibilidade superior da formulação avaliada, cuja estabilidade e tolerabilidade local podem estar relacionadas tanto à nanoestrutura do sistema quanto às propriedades anti-inflamatórias do  $\beta$ -cariofileno.

A avaliação histopatológica do músculo esquelético nas áreas de aplicação da nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno demonstrou, de forma geral, boa preservação da arquitetura tecidual, sem evidência de necrose fibrilar, edema ou fibrose em graus significativos.

No presente experimento, os níveis séricos de CK, LDH e mioglobina permaneceram dentro da faixa de normalidade, sem diferença significativa entre os grupos. Portanto, mesmo com a observação histológica pontual no grupo de maior dose, os dados laboratoriais corroboram a inexistência de dano muscular agudo ou risco sistêmico associado à formulação.

Esses achados não se aproximam das lesões musculares extensas descritas por Hodges *et al.* (2018) em formulações injetáveis contendo surfactantes como polissorbato 80 ou veículos como propilenoglicol, onde foram observadas necrose tecidual franca, inflamação difusa e fibrose muscular. A discreta alteração observada em nosso estudo mostra-se mais compatível com efeitos mínimos, esperados em aplicações intramusculares repetidas, especialmente de sistemas nanoestruturados com maior tempo de retenção local.

**Figura 17** – Lâminas representativas do rim de ratos Wistar dos grupos Controle, 5 mg/kg e 15 mg/kg após 14 dias de tratamento com a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP).



Observam-se glomérulos preservados (**asteriscos**) em todos os grupos, sem evidências de degeneração epitelial, infiltrado inflamatório ou alterações glomerulares significativas. As estruturas renais mantêm sua integridade morfológica, indicando ausência de nefrotoxicidade associada ao tratamento nas doses avaliadas. (Hematoxilina e eosina – H&E, objetiva 40 $\times$ ; aumento total aproximado 400 $\times$ ).

**Fonte:** Autora (2025).

A avaliação histopatológica dos rins dos animais pertencentes aos grupos controle e tratados com a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP) nas doses de 5 e 15 mg/kg revelou preservação integral da morfologia renal. Os cortes corados por hematoxilina-eosina demonstraram glomérulos bem delimitados, com espaço de Bowman regular, ausência de hiperplasia e alças capilares íntegras. Os túbulos contorcidos proximais apresentaram epitélio cúbico simples com borda em escova preservada, enquanto os túbulos distais exibiram

lúmen discretamente mais amplo, ambos sem sinais de degeneração, vacuolização ou necrose tubular. O interstício manteve-se delgado, sem infiltrado inflamatório, edema ou hemorragia, e não foram observados cilindros intratubulares ou indícios morfológicos de nefrotoxicidade. Esses achados estruturais estão de acordo com o esperado para rins fisiologicamente normais em modelos experimentais de roedores (Junqueira & Carneiro, 2017; Mescher, 2018).

A integridade histológica observada nos rins dos animais tratados correlaciona-se com os resultados bioquímicos obtidos previamente, nos quais ureia e creatinina séricas permaneceram dentro dos valores fisiológicos de referência. A concordância entre parâmetros laboratoriais preservados e ausência de lesões na arquitetura renal reforça a interpretação de que a administração repetida da nanoemulsão por via intramuscular não desencadeou alterações funcionais ou estruturais compatíveis com toxicidade renal, evidenciando um perfil de segurança adequado do composto. Esse comportamento é consistente com os critérios clássicos de toxicologia subcrônica que consideram a associação entre função renal, parâmetros séricos e histologia como determinante para caracterizar nefrotoxicidade (Cunha *et al.*, 2009; Sá *et al.*, 2015).

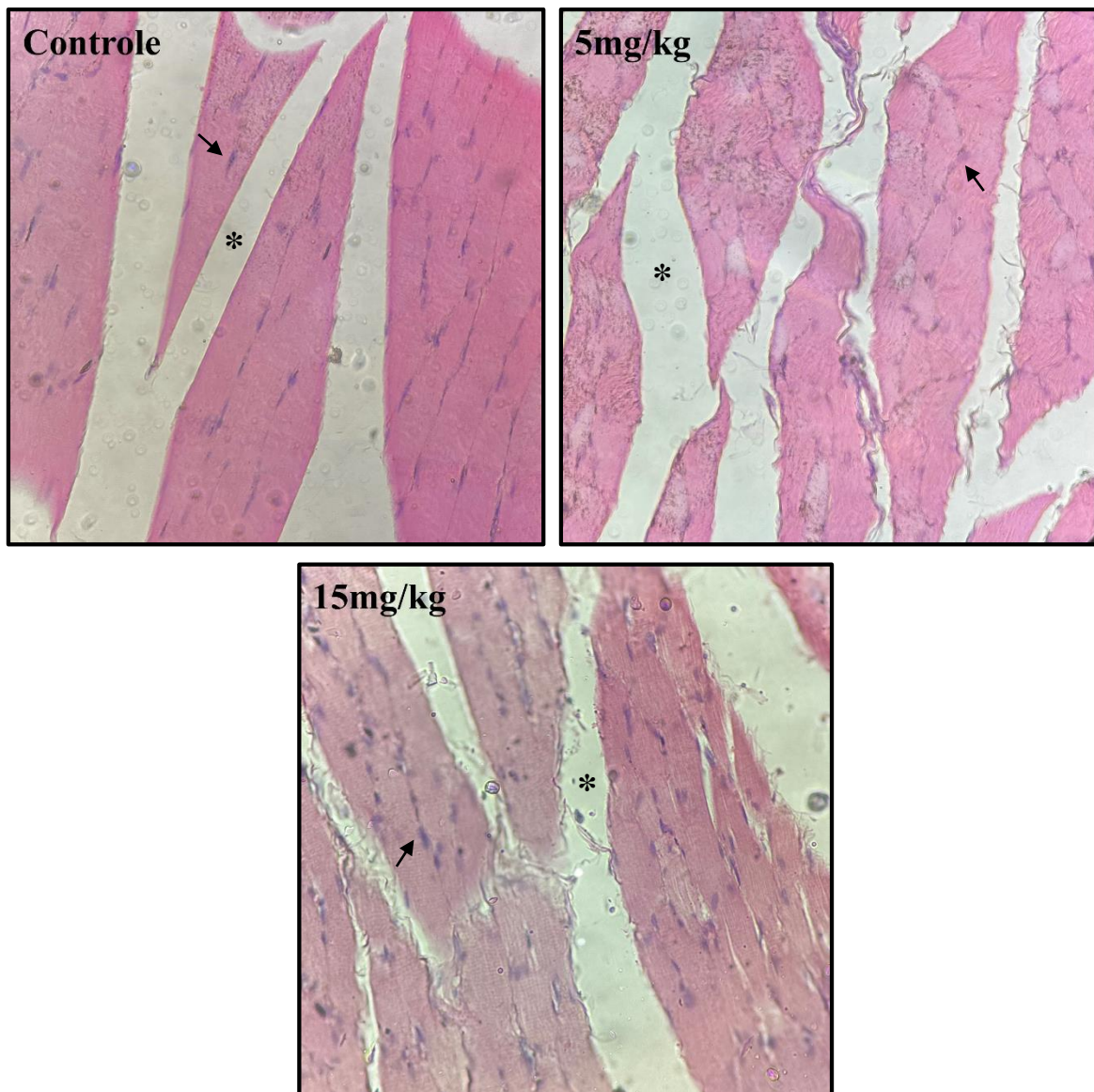
Os achados também convergem com estudos prévios que investigaram o  $\beta$ -cariofileno em diferentes modelos de toxicidade. Em experimentos de exposição subcrônica, Schmitt, Levy e Carroll (2016) observaram que o composto não produziu sinais de nefrotoxicidade, mantendo níveis séricos renais normais e preservação da histoarquitetura renal, de modo semelhante ao observado no presente estudo. Além disso, propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do  $\beta$ -cariofileno, amplamente descritas na literatura, contribuem para sua baixa toxicidade tecidual, incluindo proteção contra danos induzidos por diferentes agentes nefrotóxicos (Gertsch *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2019).

Estudos recentes reforçam esse perfil protetor, Rajab *et al.* (2022), utilizando um modelo de nefrotoxicidade induzida por amicacina, demonstraram que o  $\beta$ -cariofileno reduziu apoptose tubular, preservou a integridade morfológica dos néfrons e normalizou parâmetros bioquímicos renais, sugerindo ação nefroprotetora significativa mediada por inibição de vias oxidativas e inflamatórias. Esses mecanismos incluem modulação negativa de NF- $\kappa$ B e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a preservação da função e estrutura renal (Abdelgawad *et al.*, 2023).

Por outro lado, alguns autores descrevem efeitos leves a moderados sobre a morfologia renal em estudos com extratos ricos em terpenos ou compostos terpênicos administrados em altas doses. Moradi *et al.* (2017) e Dashti *et al.* (2022), por exemplo, relataram discreta vacuolização epitelial ou dilatação tubular após administração oral prolongada de misturas

terpênicas. A ausência completa dessas alterações no presente estudo indica que a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno, em sua formulação, dose e via de administração intramuscular, apresenta perfil de segurança superior quando comparada a outras substâncias naturais terpênicas avaliadas em condições experimentais semelhantes.

**Figura 18** – Lâminas representativas do músculo esquelético dos animais dos grupos Controle, 5 mg/kg e 15 mg/kg após 14 dias de tratamento com a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP).



Observam-se fibras musculares estriadas com sarcolema íntegro, núcleos periféricos preservados (**setas**) e disposição fascicular uniforme. Não foram identificados sinais de degeneração fibrilar, necrose, infiltrado inflamatório ou edema intersticial significativo. As alterações discretas observadas, como pequenos espaçamentos interfibrilares (**asteriscos**), são compatíveis com variações técnicas do processamento histológico. Os achados indicam ausência de miotoxicidade associada ao tratamento nas doses avaliadas. (Hematoxilina e

eosina – H&E, objetiva 40×; aumento total aproximado 400×).

**Fonte:** Autora (2025).

A análise histológica do músculo esquelético no sítio de aplicação revelou preservação da arquitetura tecidual nos animais dos grupos controle e tratados com a nanoemulsão de  $\beta$ -cariofileno (NBCP) nas doses de 5 e 15 mg/kg. As fibras musculares estriadas apresentaram-se com disposição paralela uniforme, citoplasma homogêneo, estriações transversais bem definidas e núcleos periféricos íntegros, sem evidências de degeneração hialina, fragmentação miofibrilar, necrose ou infiltrado inflamatório. O endomísio e o perimísio mantiveram-se preservados, sem espessamento ou edema, indicando ausência de miotoxicidade ou reação inflamatória local após as injeções repetidas. Esses achados estão alinhados ao padrão histológico considerado normal para músculo esquelético em roedores, conforme descrito por Junqueira e Carneiro (2017), reforçando a manutenção da integridade tecidual.

A preservação morfológica observada nos grupos tratados está de acordo com estudos que avaliaram a segurança de sistemas nanoestruturados administrados por via parenteral. Nanoemulsões e sistemas lipídicos estabilizados por surfactantes biocompatíveis apresentam baixo potencial de irritação tecidual e alta compatibilidade muscular, demonstrando ausência de infiltrado inflamatório, necrose ou fibrose após administração intramuscular repetida (Chamanza *et al.*, 2018; Hassert *et al.*, 2019; Donahue *et al.*, 2023). Esses achados sugerem que a formulação empregada neste estudo apresenta comportamento semelhante, provavelmente devido às propriedades físicas estáveis e ao perfil biocompatível da NBCP.

Além disso, estudos recentes demonstram que o  $\beta$ -cariofileno exerce efeito anti-inflamatório e antioxidante capaz de proteger o tecido muscular contra processos degenerativos. Ensaios clínicos e pré-clínicos realizados entre 2020 e 2025 mostraram que formulações contendo  $\beta$ -cariofileno reduzem marcadores séricos de dano muscular, como creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase, e favorecem a integridade das fibras após estímulos lesivos, como exercícios excêntricos intensos (Amalraj *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2022; Hsieh *et al.*, 2024; Evans *et al.*, 2024). Esses efeitos têm sido atribuídos à modulação de vias inflamatórias e ao aumento da capacidade antioxidante, fatores que podem ter contribuído para a ausência de alterações musculares nesta investigação.

Em paralelo, estudos com fitocompostos ricos em terpenos reportam que o tratamento com misturas terpênicas reduz dor muscular, infiltrado inflamatório e estresse

oxidativo, além de melhorar a organização estrutural das fibras (Gul; Bakht, 2022). Esses dados reforçam que compostos terpênicos apresentam perfil favorável de biocompatibilidade muscular, o que corrobora os achados morfológicos observados nos grupos tratados com NBCP.

Quando comparados aos dados bioquímicos deste estudo, especialmente à redução significativa de CK no grupo 15 mg/kg, os achados histológicos fortalecem a interpretação de que a nanoemulsão não apenas evitou lesões musculares, mas pode ter contribuído para proteção tecidual. A redução de CK, marcador altamente sensível para lesão muscular, é compatível com trabalhos recentes que demonstram menor extensão de miofibrólise e maior estabilidade de membrana muscular após utilização de compostos anti-inflamatórios naturais (Tian *et al.*, 2022; Hsieh *et al.*, 2024). Dessa forma, o conjunto de evidências indica que a NBCP apresenta elevada compatibilidade muscular e segurança para uso intramuscular repetido.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

---

O presente estudo permitiu o desenvolvimento e a caracterização de uma nanoemulsão injetável contendo  $\beta$ -cariofileno, com foco em sua estabilidade físico-química e em sua avaliação toxicológica pré-clínica em ratos Wistar. Entre as formulações testadas, a NBCP1 apresentou o melhor desempenho, destacando-se como a nanoemulsão mais estável, inclusive após o processo de centrifugação, etapa crítica para avaliar resistência à separação de fases. A NBCP1 apresentou tamanho médio de gotículas compatível com sistemas nanoestruturados, índice de polidispersidade adequado e potencial zeta negativo, sugerindo estabilidade eletrostática satisfatória e comportamento coloidal adequado para aplicações injetáveis.

A caracterização química por cromatografia gasosa (CG-EM) confirmou a identidade do  $\beta$ -cariofileno e possibilitou a quantificação precisa do composto encapsulado, que subsidiou o cálculo da eficiência de encapsulação. Os resultados demonstraram que a formulação NBCP1 apresentou elevada capacidade de retenção do ativo, com desempenho adequado para sistemas nanoestruturados de administração parenteral, aliando segurança e inovação tecnológica. Esse conjunto de evidências fundamentou o depósito de pedido de patente, reforçando o caráter aplicado e translacional do presente estudo.

No estudo de toxicidade subcrônica, conduzido durante 14 dias com administração intramuscular repetida, a nanoemulsão mostrou bom perfil de segurança, sem evidências de toxicidade sistêmica relevante. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos permaneceram dentro dos valores fisiológicos de referência, indicando preservação das funções hepática, renal e muscular. As análises histológicas do fígado, rins e músculo esquelético corroboraram esses achados, demonstrando ausência de lesões estruturais, necrose, inflamação significativa ou alterações compatíveis com efeitos tóxicos.

O único achado discreto foi o aumento do peso relativo do fígado, observado no grupo tratado, porém não acompanhado de alterações bioquímicas nem histopatológicas. Esse comportamento sugere que o aumento pode refletir um fenômeno adaptativo funcional, e não um processo de toxicidade hepática. Esse padrão já foi descrito na literatura em estudos com terpenos administrados por vias distintas, reforçando a interpretação de segurança biológica da nanoemulsão. Além disso, a administração intramuscular repetida demonstrou boa compatibilidade tecidual, sem sinais de inflamação significativa, fibrose, infiltrados extensos

ou degeneração muscular, indicando que a via intramuscular é adequada para esta formulação nanoestruturada.

De modo geral, os resultados confirmam que a nanoemulsão NBCP1 constitui uma plataforma promissora para veiculação parenteral do  $\beta$ -cariofileno, reunindo características físico-químicas favoráveis, estabilidade satisfatória e baixa toxicidade nos parâmetros avaliados. Esses achados contribuem para ampliar o conhecimento sobre sistemas nanoemulsionados contendo terpenos e reforçam o potencial farmacológico do  $\beta$ -cariofileno em formulações para uso terapêutico.

ABEGAZ, B. M.; KINFE, H. H. Secondary metabolites, their structural diversity, bioactivity, and ecological functions: An overview. **Physical Sciences Reviews**, v. 5, n. 3, p. 20180121, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0121>. Acesso em: 1 dez. 2025.

AGUILAR-ÁVILA, D. S.; FLORES-SOTO, M. E.; TAPIA-VÁZQUEZ, C.; PASTOR-ZARANDONA, O. A.; LÓPEZ-ROA, R. I.; VIVEROS-PAREDES, J. M.  $\beta$ -Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Attenuates Neuropathic Pain and Depressive-Like Behavior in Experimental Diabetic Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 5, p. 453-461, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0157>. Acesso em: 1 dez. 2025.

ALIMBA, C. G. Principles of Animal Toxicology. In: **A Textbook of Animal Toxicology**. Cham: Springer, 2024. p. 1-20. Acesso em: 1 dez. 2025.

AMALRAJ, A.; JACOB, J.; VARMA, K.; GOPI, S. Preparation and Characterization of Liposomal  $\beta$ -Caryophyllene. **ACS Omega**, v. 5, n. 37, p. 23865-23873, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03456>. Acesso em: 1 dez. 2025.

ANVISA. **Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Farmacologia**. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/caminhos-para-o-registro/arquivos/2019-09-19-guia-para-a-conducao-de-estudos-nao-clinicos-de-toxicologia-e-farmacologia.pdf>. Acesso em: 1 dez. 2025.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 97-108, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012005000016>. Acesso em: 1 dez. 2025.

BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C.  $\beta$ -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. 86-94, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.016>. Acesso em: 1 dez. 2025.

BEGINES, B.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, M.; ARTEAGA-PÉREZ, L. E.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. M.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. Nanoemulsions for drug delivery: a review of formulation, characterization, and applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2020, p. 1-18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/6475902>. Acesso em: 1 dez. 2025.

BEMIDINEZHAD, F.; GHAREHBAGHI, F.; GHAREHBAGHI, M. A review on the hepatotoxicity of herbal medicines. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 20, n. 4, p. 741-750, 2023. Acesso em: 1 dez. 2025.

BERENGUER-RIVAS, C. A.; CASTILLO, A. A.; LORES, O. F.; ODIO, A. D. Toxicidad aguda y subaguda del extracto acuoso de hojas de *Morinda citrifolia* L. en ratas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 15-27, 2013. Acesso em: 1 dez. 2025.

BORGES, R. S.; FERREIRA, J. M. S.; COSTA, J. G. M.; DE OLIVEIRA, M. S.; DE SOUZA, E. L.; DE ALMEIDA, R. N.; DE LIMA, M. C. C.; DE SOUZA, P. F. Study of the anti-inflammatory activity of nanoemulsions based on the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 1-9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.001>. Acesso em: 1 dez. 2025.

BORGES, R. S.; FERREIRA, J. M. S.; COSTA, J. G. M.; DE OLIVEIRA, M. S.; DE SOUZA, E. L.; DE ALMEIDA, R. N.; DE LIMA, M. C. C.; DE SOUZA, P. F. Study of the anti-inflammatory activity of nanoemulsions based on the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 1-9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.001>. Acesso em: 1 dez. 2025.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2029-2038, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001000018>. Acesso em: 1 dez. 2025.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; SOUZA, L. C.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol-induced neuroprotection in a mouse model of global cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 337, p. 225-234, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.006>. Acesso em: 1 dez. 2025.

CARVALHO, A. C. S.; SOUZA, M. F.; SILVA, L. M.; OLIVEIRA, J. M.; SANTOS, M. S.; ALMEIDA, R. N.; SOUZA, P. F. Toxicological evaluation of nanoemulsion containing *Rosmarinus officinalis* essential oil in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 1-8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.001>. Acesso em: 1 dez. 2025.

CARVALHO, H. O.; SANTOS, A. M.; SILVA, L. M.; OLIVEIRA, J. M.; SANTOS, M. S.; ALMEIDA, R. N.; SOUZA, P. F. Cannabis sativa L. Fixed Oil and its Nanoemulsion: Effect on Diabetes and Dyslipidemia Induced in Rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 20, n. 123, p. 1-8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/09731296241234123>. Acesso em: 1 dez. 2025.

CHIURCHIÙ, V.; LEUTI, A.; MACCARRONE, M. The endocannabinoid system in the regulation of inflammation and immunity. **Pharmacological Research**, v. 86, p. 1-15, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.05.003>. Acesso em: 1 dez. 2025.

CORREA, F. M. A.; GUIMARÃES, F. S.; RESSTEL, L. B. M. Cannabinoid CB2 receptor-mediated modulation of the inflammatory response. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 10, p. 1477-1485, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005001000004>. Acesso em: 1 dez. 2025.

CORREA, F. M. A.; GUIMARÃES, F. S.; RESSTEL, L. B. M. Cannabinoid CB2 receptor-mediated modulation of the inflammatory response. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 10, p. 935-942, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2010000800002>. Acesso em: 1 dez. 2025.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2a, p. 403-411, 2009. Acesso em: 1 dez. 2025.

DA SILVA OLIVEIRA, G. L.; MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; DA SILVA, A. P. D. S. C. L.; FEITOSA, C. M.; DE CASTRO ALMEIDA, F. R. Non-clinical toxicity of  $\beta$ -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 1-7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.001>. Acesso em: 1 dez. 2025.

DALLEGRAVE, E. et al. Toxicidade aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico de folhas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 20, n. 1, p. 10-18, 2018. Acesso em: 1 dez. 2025.

DATE, A. A.; DATE, V. A.; DEVARAKONDA, B.; NAGARSENKER, M. S. Nanoemulsions for drug delivery and targeting. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 9, p. 657-671, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10611860802359653>. Acesso em: 1 dez. 2025. Acesso em: 1 dez. 2025.

DEV, S. Terpenoids. In: **Natural Products of Woody Plants: Chemicals Extraneous to the Cell Wall**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1989. p. 691-807. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74075-6\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74075-6_19). Acesso em: 1 dez. 2025.

DHOPESHWARKAR, A.; MACKIE, K. CB2 cannabinoid receptors as a therapeutic target—what does the future hold? **Molecular Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 430-438, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/mol.114.094593>. Acesso em: 1 dez. 2025.

DI MARZO, V.; FONTANA, A.; ZURIA, I.; PARISI, O.; DE PETROCELLIS, L.; MECHOULAM, R. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in the rat brain. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 266-269, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/372266a0>. Acesso em: 1 dez. 2025.

DRISCOLL, D. F. Lipid-based parenteral drug delivery systems. **Drug Delivery Technology**, v. 6, n. 6, p. 44-49, 2006. Acesso em: 1 dez. 2025.

FAUSTOVA, N. M.; SALOPONOVA, E. Y. Hematological parameters in toxicology. **Toxicology Reports**, v. 13, p. 100-105, 2025. Acesso em: 1 dez. 2025.

FERNANDES, L. A.; LIMA, S. A. C.; LIMA, E. M. Nanoemulsões: desenvolvimento e aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 2, p. 125-132, 2013. Disponível em: <https://www.revistabrasileiradefarmacia.com.br/index.php/rbf/article/view/100>. Acesso em: 1 dez. 2025.

FRANCOMANO, F.; CARUSO, A.; BARBAROSSA, A.; FAZIO, A.; LA TORRE, C.; CERAMELLA, J.; MALLAMACI, R.; SATURNINO, C.; IACOPETTA, D.; SINICROPI, M. S.  $\beta$ -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. **Applied Sciences**, v. 9, n. 24, p. 5420, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app9245420>. Acesso em: 1 dez. 2025.

GARCIA-ARENCIBIA, M.; RAMOS, J. A.; FERIA, M.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. J. Cannabinoids and neuroprotection in Parkinson's disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 6, n. 6, p. 377-387, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/187152707783399158>. Acesso em: 1 dez. 2025.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408-414, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>. Acesso em: 1 dez. 2025.

GONZÁLEZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M. E.; PÉREZ, J. M.; SÁNCHEZ, M. G. Nanoemulsions for drug delivery: a review of formulation, characterization, and applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2020, p. 1-18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/6475902>. Acesso em: 1 dez. 2025.

GUSHIKEN, L. F. S.; BESERRA, F. P.; HUSSNI, M. F.; GONZAGA, M. T.; RIBEIRO, V. P.; DE SOUZA, P. F.; CAMPOS, J. C. L.; MASSARO, T. N. C.; HUSSNI, C. A.; TAKAHIRA, R. K.; MARCATO, P. D.; BASTOS, J. K.; PELLIZZON, C. H. Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 9004014, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/9004014>. Acesso em: 1 dez. 2025.

HARB, A. S.; ABOU-EL-MAGD, R. M.; EL-SHERBINY, M. A.; EL-KASHEF, H. A.  $\beta$ -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 1, p. e22003, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbt.22003>. Acesso em: 1 dez. 2025.

HERRING, A. C.; HINE, B.; HINE, J. D. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in rat brain membranes. **Life Sciences**, v. 63, n. 21, p. 1877-1884, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00486-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00486-1). Acesso em: 1 dez. 2025.

IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGÜEROS, M.; ESPUELAS, S. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 47-71, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.021>. Acesso em: 1 dez. 2025.

IRRERA, N.; D'ASCOLA, A.; PALLIO, G.; BITTO, A.; MAZZON, E.; SQUADRITO, F.  $\beta$ -Caryophyllene Mitigates Collagen Antibody Induced Arthritis (CAIA) in Mice Through a Cross-Talk between CB2 and PPAR- $\gamma$  Receptors. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 326, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom9080326>. Acesso em: 1 dez. 2025.

JOURDAN, T.; SZALLASI, Z.; PÁCHER, P.; SZABÓ, C. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 96-112, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.001>. Acesso em: 1 dez. 2025.

KUMAR, M.; MISRA, S.; JAIN, A. K. Nanoemulsions for parenteral drug delivery: an overview. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 28-40, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.009>. Acesso em: 1 dez. 2025.

LI, H.; WANG, D.; CHEN, Y.; YANG, M.  $\beta$ -Caryophyllene inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and extracellular matrix accumulation in mesangial cells. **International Immunopharmacology**, v. 87, p. 106859, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106859>. Acesso em: 1 dez. 2025.

LIU, H.; YANG, G.; TANG, Y.; CAO, D.; QI, F.; GUO, R. Physicochemical characterization and pharmacokinetics of  $\beta$ -caryophyllene/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 81, p. 188-194, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.009>. Acesso em: 1 dez. 2025.

LOVERME, J.; FELDMAN, B.; TANG, J.; FOWLER, C.; PATERSON, K.; GORMAN, A.; DI MARZO, V.; PIOMELLI, D. A fatty acid amide hydrolase-independent pathway for the biosynthesis of anandamide. **Science**, v. 308, n. 5722, p. 699-703, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1109128>. Acesso em: 1 dez. 2025.

MACKIE, K.; STELLA, N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S11-S18, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706409>. Acesso em: 1 dez. 2025.

MAFFEI, M. E. Plant Natural Sources of the Endocannabinoid (E)- $\beta$ -Caryophyllene: A Systematic Quantitative Analysis of Published Literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6540, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21186540>. Acesso em: 1 dez. 2025.

MASTINU, A.; PIGA, M.; PISU, C.; MACCIONI, P.; SABA, P.; SERRALIS, G.; GESSA, G. L.; COLLU, M. Cannabinoids in neurological and neurodegenerative diseases. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 9, p. 1241-1254, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180716104804>. Acesso em: 1 dez. 2025.

MECHOULAM, R. The Pharmacohistory of Cannabis Sativa. In: MECHOULAM, R. (ed.). **Cannabinoids as Therapeutic Agents**. Boca Raton: CRC Press, 1986. p. 1-19. Acesso em: 1 dez. 2025.

MIKULCOVA, V.; MIKULCOVA, V.; VAVRÍKOVÁ, L.; VAVRÍKOVÁ, L.; VAVRÍKOVÁ, L. Stability of nanoemulsions: a review. **Chemical Papers**, v. 71, n. 11, p. 2073-2083, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0177-8>. Acesso em: 1 dez. 2025.

MIRSHARIFI, A.; MIRSHARIFI, A.; GHAEDI, M.; GHAEDI, M.; GHAEDI, M. A review on the application of nanoemulsions in drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 80, p. 104107, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104107>. Acesso em: 1 dez. 2025.

MÖDINGER, Y.; KNAUB, K.; DHARSONO, T.; WACKER, R.; MEYRAT, R.; LAND, M. H.; PETRAGLIA, A. L.; SCHÖN, C. Enhanced Oral Bioavailability of  $\beta$ -Caryophyllene in Healthy Subjects Using the VESIsorb® Formulation Technology, a Novel Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS). **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2860, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27092860>. Acesso em: 1 dez. 2025.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>. Acesso em: 1 dez. 2025.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2008. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>. Acesso em: 1 dez. 2025.

OLDFIELD, E.; LIN, F. Y. Terpene biosynthesis: modularity rules. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 5, p. 1124-1146, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201103110>. Acesso em: 1 dez. 2025.

O'SULLIVAN, S. E. Cannabinoids modulate the inflammatory response in a PPAR-gamma dependent manner. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 341-351, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707423>. Acesso em: 1 dez. 2025.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of oil-in-water nanoemulsions: effect of surfactant concentration and oil type. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 379, n. 1, p. 115-122, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.04.051>. Acesso em: 1 dez. 2025.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIOŁKA, M. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae**

**Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>. Acesso em: 1 dez. 2025.

PARISOTTO-PETERLE, J.; BITTENCOURT, M. L.; AVILA, D. S.  $\beta$ -Caryophyllene: A review of its anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective effects. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 11, p. 2841-2851, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6740>. Acesso em: 1 dez. 2025.

PEREIRA, A. S. et al. Análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2021. Acesso em: 1 dez. 2025.

PIRES JÚNIOR, H. B. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 1, p. 57-65, 2012. Acesso em: 1 dez. 2025.

POUYFUNG, P.; KHAMPHAYA, T.; CHATURAPANICH, G.; KAEWKONG, W.; KAEWKONG, P. Ameliorative effects of *Paederia foetida* Linn. on lead-induced hematological and hepato-renal toxicity in rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 12, n. 1, p. 136-143, 2022. Acesso em: 1 dez. 2025.

RASO, G. M.; MESTRE, L.; RIZZO, R.; MECHOULAM, R.; DI MARZO, V. The endocannabinoid system in the inflammatory and immune responses. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 574-585, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9459-7>. Acesso em: 1 dez. 2025.

RE, L.; BARONI, S.; FONTANA, M.; DI MARZO, V. Endocannabinoids and the immune system in health and disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 568, n. 1-3, p. 1-12, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.045>. Acesso em: 1 dez. 2025.

RICARDI, C. S. et al.  $\beta$ -Caryophyllene ameliorates cognitive impairment and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 245, p. 109800, 2024. Acesso em: 1 dez. 2025.

ROLAND, J. P.; KRAFFT, M. P.; PERRUT, M. Supercritical fluid-based methods for the preparation of drug-loaded micro- and nanoparticles. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 26, n. 3, p. 215-233, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(02\)00179-8](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(02)00179-8). Acesso em: 1 dez. 2025.

SÁ, R. D. C. S. et al. Avaliação da toxicidade subcrônica e reprodutiva do extrato seco de pericarpo de *Passiflora edulis* variedade flavicarpa Degener em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 423-429, 2015. Acesso em: 1 dez. 2025.

SANTOS, E. A.; DE-OLIVEIRA, A. C.; SOARES, P. M.; DE-SOUZA, G. E. P. The role of the endocannabinoid system in the inflammatory response. **Current Opinion in**

**Pharmacology**, v. 11, n. 6, p. 667-673, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.08.005>. Acesso em: 1 dez. 2025.

SANTOS, E. A.; DE-OLIVEIRA, A. C.; SOARES, P. M.; DE-SOUZA, G. E. P. The role of the endocannabinoid system in the inflammatory response. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 22, p. 1-8, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.02.001>. Acesso em: 1 dez. 2025.

SCANDIFFIO, R.; MAZZEO, M.; PISTONE, A.; BONACCORSI, L.; DI MAURO, R.; CANNISTRACI, A.; D'ANGELO, V.; CINÀ, D.; ARRIGO, E.; GIGLIO, G.; GRASSO, G.; ZIMMITI, G.; SANTAGATI, M. O.  $\beta$ -Caryophyllene Reduces the Inflammatory State in Adipocytes and in Obese Mice. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 3273, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12113273>. Acesso em: 1 dez. 2025.

SHARMA, C.; AL-DHARRAB, A.; ABID, M.; AL-QAHTANI, M. H.  $\beta$ -Caryophyllene protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 18-23, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.02.002>. Acesso em: 1 dez. 2025.

SILVA, A. A. L. et al. Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated from sewage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1620-1631, 2012. Acesso em: 1 dez. 2025.

SILVA, L. M.; SOUZA, M. F.; CARVALHO, A. C. S.; OLIVEIRA, J. M.; SANTOS, M. S.; ALMEIDA, R. N.; SOUZA, P. F. Toxicological evaluation of nanoemulsion containing *Rosmarinus officinalis* essential oil in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 1-8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.001>. Acesso em: 1 dez. 2025.

SILVA, M. J. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico de folhas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 20, n. 1, p. 10-18, 2018. Acesso em: 1 dez. 2025.

TRAN, T. T.; TRAN, T. T. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Plukenetia volubilis* leaves in mice. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2021. Acesso em: 1 dez. 2025.

TUBESHA, Z.; IQBAL, D.; ISHAQ, A.; JAVED, I.; KHAN, M. Z. Toxicological evaluation of *Cichorium intybus* L. seeds in rats. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 33, n. 1, p. 1-5, 2013. Acesso em: 1 dez. 2025.

VITAL, N. S. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico de folhas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 369-376, 2009. Acesso em: 1 dez. 2025.

WALTENBERGER, B.; WACHTER, R.; TEMML, V.; ALARCON-DE-LA-LASTRA, C.; SCHUSTER, D.; STUPPNER, H. A systematic study on the structural requirements of natural and synthetic compounds to inhibit 5-lipoxygenase. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 807, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21060807>. Acesso em: 1 dez. 2025.

WANG, Y.; XIANG, S.; ZHANG, M.; ZHANG, J.; DING, X. Intra-gastric administration of prednisone acetate induced impairment of hippocampal long-term potentiation. **Brain Research**, v. 1799, p. 148270, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148270>. Acesso em: 1 dez. 2025.

ZAHER, K. S. et al. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Annona muricata* L. leaves extract. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2023. Acesso em: 1 dez. 2025.

ZHANG, L.; QUE, G. Study on the HLB value of mixed emulsifier by GC. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 11, n. 4, p. 329-332, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11743-008-1081-3>. Acesso em: 1 dez. 2025.

**ANEXO 1 – Comprovante de depósito de patente da composição farmacêutica nanoestruturada de  $\beta$ -cariofileno (INPI BR 10 2025 026011 5)**



26/11/2025 870250108411  
18:01  
  
29409162348827901

Pedido nacional de invenção; Pedido nacional de modelo de utilidade; Pedido nacional de certificado de adição de invenção; e Entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2025 026011 5

**Dados do Depositante (71)**

**Depositante 1 de 2**

**Nome ou Razão Social:** JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Física

**CPF/CNPJ:** 20876025220

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Travessa Rosa dos Ventos, 75

**Cidade:** Macapa

**Estado:** AP

**CEP:** 68902-689

**País:** Brasil

**Telefone:** 96-32172769

**Fax:** 96-33121704

**Email:** farmacos@unifap.br

**Depositante 2 de 2**

**Nome ou Razão Social:** AMAZBIOTECH LTDA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 57726043000176

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Empresa de Pequeno Porte assim definidas em lei

**Endereço:** Rua BEIRA RIO, 1258 2o/3o andar

**Cidade:** Macapá

**Estado:** AP

**CEP:** 68901-470

**País:** BRASIL

**Telefone:** (96) 981 406979

**Fax:**

**Email:** frank@amazoncure.com.br

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOESTRUTURADA DE  $\beta$ -CARIOFILENO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO

**Resumo:** A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica nanoestruturada na forma de nanoemulsão óleo-em-água contendo  $\beta$ -cariofileno, destinada à administração parenteral. A composição compreende uma fase oleosa com  $\beta$ -cariofileno, uma fase aquosa e uma mistura de tensoativos com EHL de 10. A nanoemulsão apresenta tamanho de partícula inferior a 200 nm, PDI inferior a 0,3, potencial zeta negativo superior a 20 mV, em módulo, e eficiência de encapsulação superior a 95%. A invenção também descreve o processo de obtenção por meio de um método de baixa energia e o uso da composição na preparação de medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos. Estudos pré-clínicos demonstraram ausência de toxicidade local e sistêmica, comprovando a segurança da formulação.

**Figura a publicar:** 13

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 26/11/2025 às 18:01, Petição 870250108411

Dados do Inventor (72)

---

Inventor 1 de 3

Nome: JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO

CPF: 20876025220

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Travessa Rosa dos Ventos 75

Cidade: Macapá/Amapá

Estado: AP

CEP: 68903-419

País: BRASIL

Telefone: (96) 999 02292

Fax:

Email: jctcarvalho@gmail.com

Inventor 2 de 3

Nome: ANA BÁRBARA SOUZA VIANA

CPF: 81375875272

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Jovino Dinoá, 2270

Cidade: Macapá

Estado: AP

CEP: 68900-075

País: BRASIL

Telefone: (96) 981 409717

Fax:

Email: anabarbara1998@hotmail.com

Inventor 3 de 3

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
26/11/2025 às 18:01, Petição 870250108411

**Nome:** ABRAHÃO VICTOR TAVARES DE LIMA TEIXEIRA DOS SANTOS

**CPF:** 01426305273

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Rua Felipe Camarao, 3270

**Cidade:** Macapá

**Estado:** AP

**CEP:** 68902-060

**País:** BRASIL

**Telefone:** (96) 981 048669

**Fax:**

**Email:** abrahaolima28@gmail.com

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em  
26/11/2025 às 18:01, Petição 870250108411

#### Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	comprovante de pagamento.pdf
Declaração de período de graça	declaracao_de_divulgacao_assinado (1).pdf
Resumo	Resumo PATENTE.pdf
Relatório Descritivo	Relatorio descritivo PATENTE.pdf
Reivindicação	Reivindicacoes PATENTE.pdf
Desenho	figuras patente.pdf
Contrato Social	AmazBiothec contrato atual (1).pdf

#### Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

#### Declaração de Divulgação Anterior Não Prejudicial

---

- Artigo 12 da LPI - Período de Graça.

#### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

#### **PETICIONAMENTO ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 26/11/2025 às 18:01, Petição 870250108411

**RESUMO****COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOESTRUTURADA DE  $\beta$ -CARIOFILENO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO**

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica nanoestruturada na forma de nanoemulsão óleo-em-água contendo  $\beta$ -cariofileno, destinada à administração parenteral. A composição compreende uma fase oleosa com  $\beta$ -cariofileno, uma fase aquosa e uma mistura de tensoativos com EHL de 10. A nanoemulsão apresenta tamanho de partícula inferior a 200 nm, PDI inferior a 0,3, potencial zeta negativo superior a 20 mV, em módulo, e eficiência de encapsulação superior a 95%. A invenção também descreve o processo de obtenção por meio de um método de baixa energia e o uso da composição para a preparação de medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos. Estudos pré-clínicos demonstraram ausência de toxicidade local e sistêmica, comprovando a segurança da formulação.

## ANEXO 2 – Comprovante de submissão de manuscrito

10/01/2026, 06:09

E-mail de Universidade Federal do Amapá - [Pharmaceuticals] Manuscript ID: pharmaceuticals-4118004 - Submission Received



JOSE Carlos Tavares CARVALHO <farmacos@unifap.br>

### [Pharmaceuticals] Manuscript ID: pharmaceuticals-4118004 - Submission Received

1 mensagem

Editorial Office <pharmaceuticals@mdpi.com>

10 de janeiro de 2026 às 06:06

Responder a: pharmaceuticals@mdpi.com

Para: José Carlos Tavares Carvalho <farmacos@unifap.br>

Cc: Ana Bárbara Souza Viana <anabarbara1998@hotmail.com>, Natália Gabriely Lobato-Santos <natalyagabriely@gmail.com>, Andressa Ketelem Meireles Alberto <andressaketelem@gmail.com>, Abrahão Victor Tavares de Lima Teixeira dos Santos <abrahaolima28@gmail.com>, Sergio Gabriell Leite Brito <gabriell.mcp12@gmail.com>, Nayara Nilcia Dias Colares <nayarandiascolares@gmail.com>

Dear Professor Carvalho,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Pharmaceuticals

Manuscript ID: pharmaceuticals-4118004

Type of manuscript: Article

Title: Development and preclinical safety evaluation of an injectable  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsion

Authors: Ana Bárbara Souza Viana, Natália Gabriely Lobato-Santos, Andressa Ketelem Meireles Alberto, Abrahão Victor Tavares de Lima Teixeira dos Santos, Sergio Gabriell Leite Brito, Nayara Nilcia Dias Colares, Jose Carlos TAVARES Carvalho \*

Received: 10 Jan 2026

E-mails: [anabarbara1998@hotmail.com](mailto:anabarbara1998@hotmail.com), [natalyagabriely@gmail.com](mailto:natalyagabriely@gmail.com), [andressaketelem@gmail.com](mailto:andressaketelem@gmail.com), [abrahaolima28@gmail.com](mailto:abrahaolima28@gmail.com), [gabriell.mcp12@gmail.com](mailto:gabriell.mcp12@gmail.com), [nayarandiascolares@gmail.com](mailto:nayarandiascolares@gmail.com), [farmacos@unifap.br](mailto:farmacos@unifap.br)

Natural Products

[https://www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals/sections/natural\\_products](https://www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals/sections/natural_products)

Natural Products and Phytomedicines: From Chemical Profiling and Pharmacological Properties to Therapeutic Applications

[https://www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals/special\\_issues/13739J9YAN](https://www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals/special_issues/13739J9YAN)

We encourage you to provide an Author Biography on this publication's webpage. Please click the following link to find the corresponding instructions and decide whether to accept our invitation:

[https://susy.mdpi.com/user/manuscript/author\\_biography/6466160419eb444a1d96f9ab9149d1f4](https://susy.mdpi.com/user/manuscript/author_biography/6466160419eb444a1d96f9ab9149d1f4)

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

[https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review\\_info/6466160419eb444a1d96f9ab9149d1f4](https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/6466160419eb444a1d96f9ab9149d1f4)

The following points were confirmed during submission:

1. Pharmaceuticals is an open access journal with publishing fees of 2900 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals/apc/>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code, if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP)(<https://www.mdpi.com/about/ioap/>), or if a society you are a member of is part of our affiliation program([https://www.mdpi.com/societies\\_partnership](https://www.mdpi.com/societies_partnership)). If you have been granted any other special discounts for your submission, please contact the Pharmaceuticals editorial office.

<https://mail.google.com/mail/u/1/?ik=018e2cfaa7&view=pt&search=all&permthid=thread-f:1853920110403118005&simpl=msg-f:1853920110403118005>

1/2

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission. (Please refer to the Rights & Permissions website: <https://www.mdpi.com/authors/rights>).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm that I will inform the journal editorial office if this is the case for my manuscript. I confirm that all authors are familiar with and agree with submission of the contents of the manuscript. The journal editorial office reserves the right to contact all authors to confirm this in case of doubt. I will provide email addresses for all authors and an institutional e-mail address for at least one of the co-authors, and specify the name, address and e-mail for invoicing purposes.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Pharmaceuticals editorial office at [pharmaceuticals@mdpi.com](mailto:pharmaceuticals@mdpi.com)

Kind regards,  
Pharmaceuticals Editorial Office  
Grosspeteranlage 5, 4052 Basel, Switzerland  
E-Mail: [pharmaceuticals@mdpi.com](mailto:pharmaceuticals@mdpi.com)  
Tel. +41 61 683 77 34  
Fax: +41 61 302 89 18

\*\*\* This is an automatically generated email \*\*\*