

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Vinícius Alexandre Wippel

**NANOEMULSÃO DE LUTEOLINA REDUZ A NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO EM
MODELOS ANIMAIS AGUDOS DE DOR INFLAMATÓRIA**

Florianópolis

2023

Vinícius Alexandre Wippel

**NANOEMULSÃO DE LUTEOLINA REDUZ A NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO EM
MODELOS ANIMAIS AGUDOS DE DOR INFLAMATÓRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de graduação em farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva
Coorientadora: Scheila Iria Kraus, Doutoranda

Florianópolis

2023

Wíppel, Vinícius Alexandre
NANOEMULSÃO DE LUTEOLINA REDUZ NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO EM
MODELOS ANIMAIS AGUDOS DE DOR INFLAMATÓRIA / Vinícius Alexandre
Wíppel ; orientadora, Morgana Duarte da Silva, coorientadora,
Scheila Iria Kraus, 2023.
59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Dor. 3. Analgesia. 4. Luteolina. I. da Silva,
Morgana Duarte . II. Kraus, Scheila Iria. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Vinícius Alexandre Wippel

**Nanoemulsão de Luteolina reduz a nocicepção e inflamação
em modelos animais agudos de dor inflamatória**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutico e aprovado em sua forma final pelo Curso Farmácia

Local Florianópolis, 29 de junho de 2023.

Profa. Dra. Liliete Canes de Souza
Coordenadora do Curso

Banca examinadora

Profa. Morgana Duarte da Silva, Dra.
Orientadora

Prof. Geisson Marcos Nardi Dr.(a)
Instituição UFSC

Prof. Marcos Lisboa Neves, Dr.(a)
Instituição UFSC

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho ao meu tio, Odamir Winter (*in memoriam*),
que nunca mediu esforços para me ver feliz e realizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente às minhas duas mães Valci e Valmira, o amor e apoio incondicional de vocês foi imprescindível para que, também essa etapa da minha vida fosse concluída. Aos meus irmãos André e Graziela, por sempre cuidarem e zelarem imensamente por mim, com todo o amor e carinho, dignos somente dos melhores irmãos mais velhos que alguém poderia ter. Ao meu tio, Odamir (*in memoriam*), quem me criou, amou e educou como um filho, que não media barreiras para me fazer feliz e quem a partida deixou meu mundo preto e branco. Ao meu pai, por nunca permitir que me faltasse nada, seu trabalho e carinho foram sempre essenciais. Ao João, por sempre acreditar, cuidar e confiar em mim. Finalmente, aos meus cunhados, por cuidarem de meus irmãos e minha família nos momentos que eu estive ausente, principalmente à Rafaela, por ter me concedido a felicidade de ser tio da Maria Cecília, quem a chegada devolveu um pouco de cor aos meus dias.

Ao restante da minha família, avós, tias, primos e primas todos vocês são de extrema importância para minha caminhada.

Aos meus filhos de quatro patas, Buba, Juan Carlos e Pedro Henrique, que mesmo sem saberem, foram e são fundamentais na minha perseverança e força.

À minha professora orientadora Morgana Duarte da Silva, aquela que com muito carinho me mostrou o caminho da ciência, seus desafios e alegrias. Sua maneira maternal de ensinar, cuidar e advertir lhe fazem única e foram, sem dúvidas, determinantes em minha escolha.

À minha amiga e coorientadora, Scheila Kraus, sua amizade foi um dos melhores presentes que o destino me trouxe, nunca serei capaz de agradecer tudo aquilo que me ensinastes, diretamente e indiretamente. És uma das pessoas mais inteligentes, polidas e íntegras que tive o prazer de conhecer nesses anos de UFSC. Torço imensamente pelo seu sucesso, o qual sei que é certo. Espero que estejamos, de alguma forma, sempre perto. Muito obrigado, por tudo!

Aos colegas e amigos que fiz durante a graduação, sem vocês o caminho seria mais tortuoso e desanimado. Especialmente à minha amiga Yara, a qual tornou-se uma irmã, que levarei para sempre em minha jornada, fostes essencial em me fazer mais forte, corajoso e feliz nos últimos cinco anos. Palavras jamais serão suficientes para expressar minha gratidão a ti!

Aos meus amigos Laura, Matheus e Vanessa, os momentos com vocês foram, fora do ambiente acadêmico, foram e sempre serão de extrema importância para mim.

A todos os amigos e colegas que fiz no LANDI, à Jeane, Kelly, Luiza e Marcos, vocês além de brilhantes são seres humanos incríveis. Muito obrigado, especialmente à Jeane, a qual gratuitamente me introduziu nesse universo e fez tudo isso realidade, eternamente grato, minha amiga.

Aos membros da banca, Geisson e Marcos, que foram escolhidos com muito zelo e admiração, por se dedicarem a ler, avaliar e contribuir com meu trabalho.

A todos os professores do curso de graduação em Farmácia da UFSC, os quais possuem amor por sua profissão e fazem desse o melhor curso que eu poderia escolher. Especialmente àqueles com os quais eu tive o prazer de trabalhar junto, em minhas monitorias ou desenvolvi uma relação de admiração e amizade: Alexandre e Fabiana Onofre, Lucy, Izabel, Édson e Cleonice. Com vocês aprendi muito.

A todos os servidores da UFSC, por de formas diferentes, fazerem com que nossos sonhos sejam realizados através de seus trabalhos.

Às meninas do setor de Imunoquímica das análises clínicas do HU, Emerita, Letícia, Michelle, Nicoli e Priscila, vocês fizeram minha percepção da profissão ainda mais ampla e completa. As manhãs do meu último semestre foram mais ricas e animadas por conta de vocês. Tenho a certeza de que escolhi o melhor local para realizar meu estágio final. Muito obrigado por todos os grandes ensinamentos!

E por fim, a todos os animais com que trabalhei nesse período de iniciação científica e no desenvolvimento deste trabalho, os quais, ainda que inconscientemente, doaram a vida em prol do desenvolvimento do meu conhecimento e da ciência. A vocês, pequenos, serei sempre grato.

RESUMO

Introdução: Os ativos de origem natural, principalmente os advindos de matéria vegetal, já são há muito utilizados e pesquisados no campo da farmacologia, principalmente porque na maioria das vezes atuam por mais de um mecanismo de ação, não inibindo totalmente uma ou outra via bioquímica dos organismos, o que por fim, resulta em fármacos com menores efeitos adversos. Nesse âmbito, este trabalho obteve como objeto de pesquisa a luteolina, um flavonoide presente em diversos vegetais e com diversas propriedades farmacológicas conhecidas, dentre elas, analgésicas e anti-inflamatórias. Contudo, sua solubilidade em água é baixa o que afeta sua biodisponibilidade e a partir dessa problemática, desenvolveu-se a nanoemulsão de luteolina, com o intuito de promover uma melhor entrega do ativo. O trabalho objetivou pesquisar e analisar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da nanoemulsão de luteolina em diferentes doses. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas, com idades entre 40 e 60 dias. Os tratamentos realizaram-se com o extrato puro de luteolina, a nanoemulsão carregada com luteolina nas doses de 0,4; 0,8; 4 e 8 mg/kg, o grupo controle foi tratado com a nanoemulsão não carregada, dita branca. Todos os tratamentos foram realizados pela via oral. Primeiramente uma leva de animais foi submetida ao teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, com o intuito de analisar o perfil de atuação da nanoemulsão e as melhores doses a serem testadas. No segundo momento, diferentes animais foram submetidos aos seguintes testes em decurso temporal: edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, teste de hiperalgesia mecânica (von Frey) e teste de hiperalgesia térmica ao frio (teste da acetona). **Resultado:** Na primeira etapa de testes, as quatro doses da nanoemulsão mostraram-se muito efetivas no modelo de formalina, tanto na redução da nocicepção quanto da inflamação, superiores inclusive aos efeitos da própria luteolina. Já nos testes realizados em decurso temporal as doses de 0,8 mg/kg ($p < 0,001$) e 4 mg/kg ($p < 0,01$) possuíram efeito no teste de Von Frey e as doses de 4 mg/kg ($p < 0,01$) e 8 mg/kg ($p < 0,001$) possuíram efeitos significativos no teste da acetona. **Conclusão:** O presente estudo demonstrou o potencial analgésico e anti-inflamatório da nanoemulsão de luteolina administrada pela via oral em diferentes doses, em doses inferiores às do extrato puro, evidenciando sua melhor biodisponibilidade.

Palavras-chave: Analgésico; Luteolina; Nanoemulsão.

ABSTRACT

Introduction: The actives of natural origin, especially those coming from vegetable matter, have long been used and researched in the field of pharmacology, mainly because most of the time they act by more than one mechanism of action, not totally inhibiting one or another biochemical pathway of organisms, which ultimately results in drugs with fewer adverse effects. In this context, this work obtained as research object the luteolin, a flavonoid present in several plants and with several known pharmacological properties, among them, analgesic and anti-inflammatory. However, its solubility in water is low, which affects its bioavailability. Based on this problem, a luteolin nanoemulsion was developed, aiming to promote a better delivery of the active ingredient. The aim of this study was to research and analyze the antinociceptive and anti-inflammatory potential of luteolin nanoemulsion at different doses. **Methodology:** Swiss male and female mice, aged between 40 and 60 days, were used. The treatments were performed with the pure luteolin extract, the luteolin-loaded nanoemulsion at doses of 0.4; 0.8; 4 and 8 mg/kg, the control group was treated with the non-loaded nanoemulsion, said to be white. All treatments were performed orally. First, a group of animals was submitted to a nociception test induced by intraplantar injection of formalin, to analyze the profile of the nanoemulsion and the best doses to be tested. In the second moment, different animals were submitted to the following tests in time course: paw edema induced by intraplantar injection of carrageenan, mechanical hyperalgesia test (von Frey) and thermal hyperalgesia test to cold (acetone test). **Results:** In the first stage of tests, the four doses of nanoemulsion were very effective in the formalin model, both in reducing nociception and inflammation, superior even to the effects of luteolin itself. In the time course tests, the 0.8 mg/kg ($p < 0.001$) and 4 mg/kg ($p < 0.01$) doses had effects in the Von Frey test, and the 4 mg/kg ($p < 0.01$) and 8 mg/kg ($p < 0.001$) doses had significant effects in the acetone test. **Conclusion:** This study demonstrated the analgesic and anti-inflammatory potential of luteolin nanoemulsion administered orally at different doses, at lower doses than the pure extract, showing its better bioavailability.

Keywords: Analgesic; Luteolin; Nanoemulsion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mediadores envolvidos na sensibilização periférica	19
Figura 2: Luteolina e seu metabólito ativo.	21
Figura 3: Nanoemulsões.....	28
Figura 4: Micrômetro Digital (MDC-SX – Mitutoyo).....	32
Figura 5: Efeito da NECH-Lut no edema de pata induzido por formalina	36
Figura 6: Efeito da NECH-Lut no edema de pata induzido por carragenina .	37
Figura 7: Efeito da NECH-Lut na redução da hiperalgesia mecânica.....	39
Figura 8: Efeito da Nech-Lut à hiperalgesia térmica ao frio	41
Figura 9: Efeito Sedativo da NECH-Lut	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dose letal mediana da Luteolina.....	19
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD – Avaliação diária

AKT - Proteína Serina-treonina quinase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASIC - Canal iônico sensível ao ácido

ATP – Trifosfato de adenosina

CGRP - Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

cm - Centímetros

COX – Enzima Ciclo-oxigenase

COX-2 – Enzima Ciclo-oxigenase-2

E.P.M. – Erro Padrão da Média

g - Grama

h - Hora

IASP – Associação Internacional de Estudo da Dor

i.g. – Via intragástrica

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-10 – Interleucina 10

IL6 – Interleucina 6

INOS – Enzimas Óxido Nítrico Sintase

kg - Quilograma

LANDI - Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação

LUT/Lut - luteolina

μm – Micrômetro

μL - Microlitro

MAPK - Proteínas quinase ativadas por mitógeno

mg - Miligrama

min - Minuto

mm – Milímetro

ml - Mililitro

nº - Número

NF-K β - Fator Nuclear Kappa Beta

NECH-Br – nanoemulsão não carregada (branca)

NECH-Lut – nanoemulsão carregada com luteolina

OMS- Organização Mundial da Saúde

PGE2 - Prostaglandina

s - Segundos

SBED – Sociedade Brasileira do Estudo da Dor

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	27
3.1.	OBJETIVO GERAL	27
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.	SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	28
4.2.	ANIMAIS.....	28
4.5.	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI INFLAMATÓRIA	30
4.5.1.	NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA (2,5%)	30
4.5.2.	NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA	31
4.5.2.	EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA	31
5	RESULTADOS	35
5.1	EFEITO DOS TRATAMENTOS NA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO TESTE DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA (2,5%).....	35
5.2	EFEITO DOS TRATAMENTOS NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA	37
5.3	AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA EM DECURSO TEMPORAL (TESTE DE VON FREY)	38
5.4	EFEITO DOS TRATAMENTOS NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO (TESTE DA ACETONA)	40
5.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO SEDATIVO DA NECH-LUT (TESTE DO CAMPO ABERTO):	42
6	DISCUSSÃO	43
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO	55

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com, ou semelhante àquela associada com, uma lesão tecidual real ou potencial (RAJA et al, 2020). A Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) preconiza ainda que esse fenômeno é uma experiência subjetiva, a qual é influenciada, em graus variáveis, por fatores biológicos, sociais e psicológicos. Ainda, a SBED indica que, por meio das experiências de vida, as pessoas aprendem o conceito de dor e suas aplicações, mostrando que os diferentes indivíduos podem ter diferentes concepções de dor (DESANTANA et al, 2020).

Deste modo, a dor apresenta papéis fisiológicos importantes, permitindo a sobrevivência da espécie humana durante o processo evolutivo. A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para que os mesmos possam ser minimizados, levando a ações de proteção, garantindo, ao fim, o bem-estar do organismo (WOOLF; SALTER, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001). Tal fato ilustra-se na observação de indivíduos que sofrem de anomalias congênitas que os fazem perder a capacidade de percepção da nocicepção. Essas pessoas são incapazes de sentir o desconforto associado a lesões internas e externas, como um osso quebrado, exemplo. Como resultado, tais indivíduos não promovem comportamentos de proteção e resguardo adequados para curar-se ou livrar-se dessas situações, muitas das quais, acabam por se tornarem fatais (BASBAUM et al, 2009).

Contudo, quando a dor torna-se persistente, com duração estendida após a cessação do estímulo nocivo ou cura do tecido avariado, não possuindo mais, portanto, um valor evolutivo ou de preservação para o indivíduo, ela é chamada de dor crônica. Estipula-se que após 3 meses de dor, tal estímulo não é mais considerado um auxílio à higidez da pessoa, e sim um processo patológico (COHEN et al, 2021). Nesta concepção, os fatores emocionais e cognitivos possuem crucial influência na percepção da dor, devido à conectividade das regiões cerebrais responsáveis por controlar a percepção da dor, atenção, expectativa e estados emocionais (LEE et al, 2020).

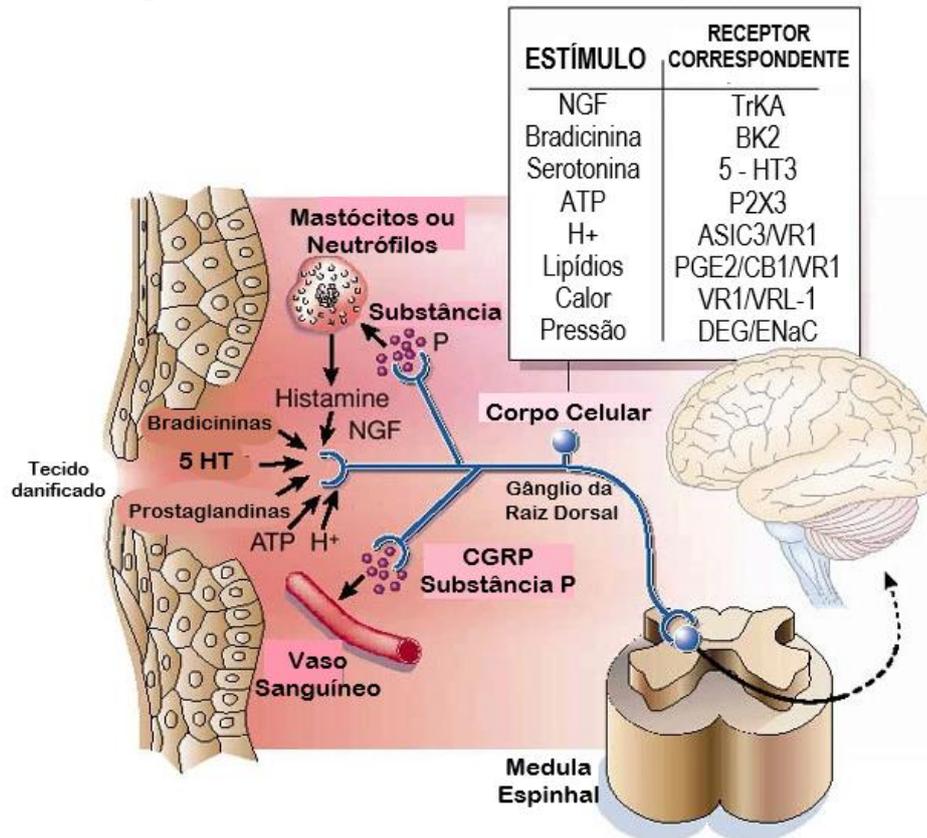
A dor pode ser categorizada em três principais classes, a primeira delas, dor nociceptiva, que ocorre por um dano tecidual, o qual gerará um estímulo nos nociceptores, presentes nos neurônios sensoriais da periferia e está majoritariamente relacionada à dor aguda. A segunda classe denomina-se dor neuropática, a qual define-se por uma dor iniciada ou causada a partir de uma lesão primária, disfunção ou perturbação transitória no sistema nervoso central ou periférico, podendo advir de distúrbios como a diabetes. Por fim, existe a dor nociplástica, que não está associada a danos teciduais, sendo fisiológica e clinicamente diferente das categorias anteriores, ela está relacionada a alterações na percepção da dor, tanto no âmbito periférico, quanto do sistema nervoso central (SNC). Tais mudanças promovem a diminuição na inibição do sinal de dor ou uma excitabilidade facilitada. Em geral, a dor nociplástica está ligada a situações de dor crônica (CHIMENTI et al, 2018 ; FITZCHARLES et al, 2021).

Com relação ao seu mecanismo fisiopatológico, já se sabe que, em situações de dor nociceptiva, há a ativação de receptores periféricos, chamados nociceptores, os quais são terminações nervosas livres que respondem a estímulos de alta intensidade. Eles são encontrados, por exemplo, na pele e em diversos órgãos. Acionados por estímulos térmicos, químicos ou mecânicos (MELLO; DICKENSON, 2008), os nociceptores despolarizam neurônios sensoriais, estes por sua vez transmitem informações de diferentes locais do corpo à medula espinhal. Os corpos desses neurônios estão localizados nos gânglios da raiz dorsal e entram no corno dorsal da medula espinhal, onde fazem sinapses com neurônios da própria medula (BASBAUM et al, 2009). No entanto, é primordial citar que existem diferentes naturezas das fibras sensoriais periféricas, sendo que as fibras-A β , são de grande diâmetro, bastante mielinizadas, por conta disso, são responsáveis pela transmissão de informações táteis, pois são ativadas com baixos limiares de ativação. Já as fibras-A δ são menos calibradas e menos mielinizadas, logo, demoram mais a carrear o sinal elétrico, seu limiar de ativação é mais alto e elas transmitem informações mecânicas e de temperatura. E as fibras-C são ainda menores e desmielinizadas, possuindo um potencial de ativação muito alto, ou seja, tende a ser ativada por estímulos potencialmente nocivos, mas uma transmissão lenta. As fibras-A δ e C levam informações de estímulos potencialmente nocivos e, por isso, elas são conhecidas como fibras sensoriais nociceptivas (MELLO; DICKENSON, 2008). Os

impulsos seguem do corno dorsal da medula espinhal, o qual é dividido em diferentes camadas anatômicas, sendo que as fibras nociceptivas entram principalmente nas camadas superficiais (I e II) e na V (BASBAUM et al, 2009). A partir destas regiões, após realizarem sinapses com os neurônios do corno dorsal da medula espinhal, eles comunicam-se com axônios que se projetam pela via ascendente espinotalâmica chegando, assim, ao tálamo. Neurônios talâmicos continuam para o córtex somatossensorial primário e secundário, onde a informação será processada e a informação será percebida e interpretada. Neurônios somatossensoriais podem fazer sinapse com diversos locais do encéfalo, podendo alcançar por exemplo o sistema límbico, responsável por várias funções emocionais (BASBAUM et al, 2009; SWIEBODA et al, 2013).

Quando o estímulo ativador for causado por um dano tecidual, ocorre a liberação e o acúmulo de fatores endógenos, por parte dos nociceptores ativados ou de células não neurais, como mastócitos, macrófagos e neutrófilos, que já residiam ou se infiltraram na área lesionada. Em conjunto, tais circunstâncias, representam uma ampla gama de moléculas sinalizadoras, incluindo neurotransmissores, peptídeos (substância P, CGRP, bradicinina), lipídios relacionados, como os tromboxanos e as prostaglandinas, citocinas, quimocinas, dentre outras substâncias endógenas pró-inflamatórias. Notavelmente, os nociceptores expressam um ou mais receptores de superfície celular capazes de reconhecer e responder a cada um dos agentes pró-inflamatórios ou pró-algésicos. Tais interações aumentam a excitabilidade da fibra nervosa, aumentando assim sua sensibilidade ao toque e/ou temperatura (Figura1) (BASBAUM et al, 2009). Portanto, a inflamação local e a lesão, frequentemente resultam em um estado de dor iniciado por estímulos inócuos ou moderadamente aversivos, chamados de alodinia e hiperalgesia, respectivamente (WOLLER et al, 2017).

Figura 1: Mediadores envolvidos na sensibilização periférica



Legenda: Quando se dá um dano a alguma estrutura ocorre a liberação dos produtos da lesão tecidual e de substâncias inflamatórias, o que é conhecido por “sopa inflamatória”, a qual é composta por: neurotransmissores (serotonina e glutamato), lipídeos (prostaglandinas), peptídeos (bradicinina), prótons extracelulares (H+), dentre outros. Após o evento causador de tais lesões, os mediadores liberados são responsáveis por realizar a sensibilização periférica do neurotransmissor ali localizado e fazem isso interagindo com eles por meio de seus receptores ou canais iônicos em suas terminações nervosas. Cada substância ou evento, seja físico ou químico, atua em seu receptor específico, os quais estão expressos na caixa. Além disso, uma vez estimulados, os nociceptores são capazes de facilitar a liberação e produção desses mediadores inflamatórios, uma vez que, promovem a liberação de fatores, chamados de substância P e CGRP, onde a segunda atuará na dilatação dos vasos da região e a primeira, além dessa função, também promove a degranulação de mastócitos e neutrófilos que liberam histamina. Este acontecimento é conhecido por inflamação neurogênica. Por fim, o neurônio ativado levará o potencial de ação até o corno dorsal da medula espinhal, tal potencial ascenderá pela medula chegando ao encéfalo, onde será interpretado, principalmente na região cortical, como dor. Adaptado de: JULIUS; BASBAUM, 2001.

No que tange ao tratamento, uma das classes de medicamentos muito utilizada para a dor aguda e crônica, são os opioides, apesar das controvérsias envolvendo seu uso, já que estão associados a efeitos adversos, incluindo uso

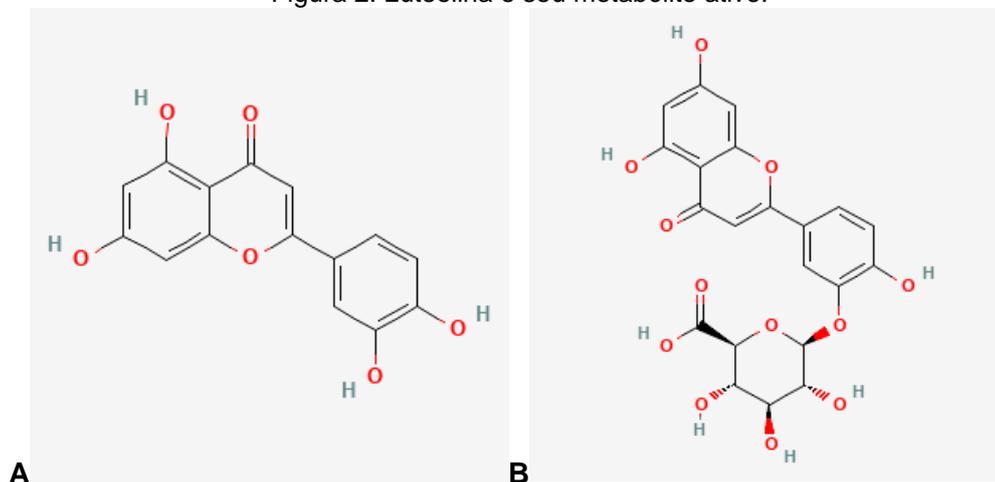
abusivo, dependência, óbitos por overdose, aumento do risco de insuficiência adrenal, dentre outras patologias, incluindo infarto do miocárdio. (BUJAK et al, 2019; FRIEDMAN et al, 2020). Também são utilizados os corticosteroides, todavia, tais medicamentos são conhecidos por causar alterações hormonais, podendo levar à supressão da função adrenal e síndrome de Cushing. Além disso, as duas classes medicamentosas supracitadas estão ligadas à imunossupressão e, conseqüentemente, à disseminação de patógenos (FRIEDMAN; NABONG, 2020). Entretanto, especificamente em relação à dor aguda, os principais fármacos utilizados são os inibidores seletivos da COX-2, os inibidores da COX e principalmente o acetaminofeno. Os inibidores seletivos da COX-2 podem levar a doenças renais e cardíacas, os inibidores da COX a úlceras gastrointestinais e problemas renais, já o acetaminofeno possui reconhecidamente uma alta hepatotoxicidade (FERRAZ et al, 2020). Todavia, apesar de tais constatações, esses medicamentos seguem compondo as principais e mais indicadas diretrizes clínicas em tratamentos farmacológicos para a dor (AMAECCHI et al, 2023).

Por esses motivos, a busca por compostos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas, que apresentem menos efeitos adversos aos seus usuários, têm crescido muito nos últimos tempos. Nas últimas duas décadas muitos compostos bioativos, obtidos a partir de vegetais, foram relatados como novos agentes ativos no combate de doenças e agravos humanos, atuando como novos fármacos (IMRAN et al, 2019). Além disso, cerca de 30% dos produtos farmacêuticos atualmente comercializados, são derivados de plantas e microrganismos, podendo, no entanto, chegar a 60% das fontes de ativos em áreas como a oncologia (DUTRA et al, 2016). Dentre tais compostos, mais de cinco mil flavonoides foram detectados, os quais distribuem-se entre uma vasta gama de plantas. Os flavonóides possuem estrutura química característica, sendo formado por polifenóis que possuem um núcleo fundamental em sua composição, e por isso foram distribuídos em 10 categorias, 6 das quais possuem importância farmacêutica, sendo elas: flavonas, flavononas, antocianidinas, flavonóis, isoflavonas e catequinas (IMRAN et al, 2019; FERRAZ et al, 2020). Esses metabólitos secundários vegetais possuem reconhecidamente propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, agindo na inibição de diferentes citocinas pró-inflamatórias. Portanto,

os flavonóides são drogas multialvo, o que explica sua ampla gama de ações (FERRAZ et al, 2020).

A luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxi flavona), uma flavona, pode ser encontrada em ervas (por exemplo, salsa, tomilho, orégano e hortelã-pimenta), vegetais (como, sementes de aipo, brócolis, pimentão e cenoura) especiarias (cardamomo e anis) e em flores (crisântemos e *Reseda luteola*). O composto está majoritariamente disponível na sua forma de glicosídeo, a qual sofrerá desglicosilação no intestino, onde é mais absorvida, e a partir desse ponto, sofrerá a ação de algumas enzimas, como as UDP-glucuronosiltransferases (UGTs) e catecol-O-metiltransferases (COMTs), responsáveis por gerar os metabólitos glucorinados e metilados, respectivamente, da luteolina (LUT). A luteolina-3'-O-glicuronídeo, é reconhecida por ser o metabólito ativo, o qual possui efeitos antinociceptivos (TULI et al, 2022). Assim como os demais flavonóides, ela é uma substância pleiotrópica, isso significa que seu impacto farmacológico não se detém a um único efeito bioquímico, uma vez que não inibe somente um mecanismo nociceptivo ou analgésico (GENDRISCH et al, 2020) (Figura 1).

Figura 2: Luteolina e seu metabólito ativo.



Legenda: A) estrutura molecular da luteolina B) luteolina-3'-O-glicuronídeo. Fonte: Pubchem, 2023.

As atividades anti-inflamatórias da LUT são exibidas em concentrações micromolares, por esse fato, o composto despertou o interesse de pesquisadores. Seu mecanismo de ação é multifatorial e inclui a supressão de mediadores pró-inflamatórios, por exemplo, interleucina 6 (IL-6), óxido nítrico, interleucina 1 beta (IL-

1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e algumas Óxido Nítrico Sintases(iNOS), além da regulação de várias vias de sinalização, incluindo a do fato nuclear kappa-beta (NF- κ B), da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e pela via da proteína serina-treonina quinase (AKT). A LUT ainda possui, reconhecidamente, efeitos antioxidantes e capacidade de elevar os níveis de interleucina 10 (IL-10) (AZIZ et al, 2018; GENDRISCH et al, 2020). Além disso, o composto já foi descrito como um eficaz controlador da dor e inflamação, por estudos in vivo em camundongos (*Mus musculus*), nos modelos de nocicepção induzida por formalina e carragenina, onde ela foi capaz de reduzir hiperalgesia, nocicepção, edema e infiltração leucocitária e inibir a ativação das células da glia e do inflamossoma NLRP3, os quais são, também, agentes pró-inflamatórios (Fan et al, 2018; Zhou et al, 2022).

Ainda assim, em relação a sua toxicidade, não existem dados muito contundentes, como os efeitos toxicológicos de seu uso crônico ou um perfil de segurança para seu uso em humanos, porém, sua dose letal mediana (LD50) já foi estabelecida para camundongos e ratos, e são todos valores muito superiores àqueles utilizados na terapêutica, conforme demonstrado na tabela:

Tabela 1: Dose letal mediana da Luteolina

ANIMAL	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	LD50
Camundongos	Oral	>2500 mg/kg
	Intraperitoneal	>180 mg/kg
Ratos	Oral	>5000 mg/kg
	Intraperitoneal	411 mg/kg
	Intramuscular	592/kg

Fonte: Adaptado de AZIZ et al, 2018.

Contudo, apesar de seus muitos efeitos biológicos benéficos, suas ações antinociceptivas, anti-inflamatórias e a sua potencialidade enquanto um fármaco, a luteolina e os flavonóides, em geral, têm baixa solubilidade e biodisponibilidade em

água. Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), a luteolina é classificada como uma substância de classe II, ou seja, ela possui baixa solubilidade em água, mas alta permeabilidade nas barreiras biológicas, como estômago e intestino (AMIDON et al., 1995; ELMOWAFY et al., 2021). Essa desvantagem intrínseca decorre de sua associação intermolecular, que é induzida por questões de desordem conformacional e pelas fortes ligações de hidrogênio entre grupos hidroxila e carbonila, por exemplo (SHIN et al, 2018).

No entanto, o uso de nanopartículas anfifílicas para revestir as moléculas de luteolina é capaz de promover meios mais oportunos para o seu encapsulamento, formando assim uma nanoemulsão. Isso a fim de torná-la um princípio ativo, em uma forma farmacêutica viável, garantindo maior proteção da substância, promovendo uma melhor entrega de ativos solúveis, dado o aumento da solubilidade em água e biodisponibilidade. O que resultaria em uma atividade mais pronunciada do flavonoide, devido ao aumento da superfície de contato entre o ativo e as mucosas, culminando na melhora da absorção e permeação pelo organismo (JAFARI et al, 2017; SHIN et al, 2018).

Contudo, existem algumas características importantes a serem consideradas quando se refere a nanopartículas, especialmente quando se trata de uma nanoemulsão, sendo elas: o tamanho, que irá influenciar em sua atividade, biodisponibilidade e velocidade de eliminação. Sua carga superficial, a qual determinará o grau de interação do produto com as mucosas do organismo e deve idealmente obter valores positivos. E, suas características de polidispersão, que dizem respeito à uniformidade de tamanho das unidades de gotas da nanoemulsão e irá determinar tanto a qualidade quanto a efetividade da forma farmacêutica. Quanto a este último, a uniformidade do sistema dá-se por quanto mais próximo de zero for o valor de seu índice (KUMAR et al, 2008; ONODERA et al, 2015; ABDOU et al, 2017). A nanoemulsão utilizada neste trabalho possui tais propriedades já definidas. Diedrich (2021) produziu a nanoemulsão de luteolina (NECH-LUT) revestida de quitosana, um polissacarídeo, e obteve um material com partículas com um diâmetro de cerca de 67 nanômetros, com uma carga superficial de 9,09 mV e um índice de polidispersão de 0,174. Além disso, em condições análogas foi produzida uma nanoemulsão não carregada ou branca (NECH-BR), a qual possui

somente as substâncias adjuvantes, portanto, serve como um solvente para a realização de diluições da NECH-LUT.

A administração de nanomedicamentos para o tratamento de dor ainda é uma área em expansão, visto que o centro de administração de alimentos e drogas norte americano (FDA, do inglês, *Food and Drugs Administration*) até 2021, aprovou seis micro e nanomedicamentos para uso na dor e inflamação e desses, em sua maioria não se tratam de novos medicamentos, somente reformulações de fármacos já consolidados para partículas menores, a fim de melhorar as características farmacocinéticas do medicamento e sua eficácia. Entretanto, os nanomedicamentos demonstram uma série de vantagens em seu uso, como as já citadas maiores solubilidade e conseqüente biodisponibilidade, mas também o efeito mais duradouro em analgésicos, o que se configura como uma excelente característica para o uso deles contra dor aguda ou crônica (MAZALEUSKAYA, MUZYKANTOV, FITZGERALD, 2021; QUINTANS-JÚNIOR et al, 2016).

Diante do exposto, acredita-se que a nanoemulsão de luteolina pode apresentar um significativo potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, devido a sua forma farmacêutica, se comparado a outros medicamentos já em uso.

Seguindo o exposto, é possível inferir-se que a nanoemulsão de luteolina poderá ser uma alternativa eficaz para a redução da nocicepção e da inflamação, quando utilizada em modelos experimentais de dor aguda. Esse resultado poderá ser de grande importância, visto que, pode resultar em novos guias e tratamentos para pacientes que sofram de dor aguda, e em futuro até de dor crônica.

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a dor é a maior causa de busca por atendimento médico em prontos-socorros, sendo que, setenta por cento das visitas a esses centros médicos são motivadas por esse sintoma (TODD, 2017). É sabido que a dor possui um efeito direto na qualidade de vida dos indivíduos, pois afeta as atividades diárias de quem a sente. Além disso, apesar de grandes e vitoriosos esforços, da ciência e da clínica, a prevalência da dor no mundo, enquanto uma questão de saúde, ainda é muito significativa. Na Europa, 49 milhões de pessoas relataram viver com dor aguda e mais de 11 milhões alegam existir uma correlação entre a intensidade de suas dores e o aumento do uso dos programas de saúde, assim como a diminuição dos níveis de qualidade de vida e suas participações na força de trabalho (ALLEGRI et al, 2012; MICHAELIDES et al, 2019). Atualmente já possuímos uma ampla variedade de medicamentos direcionados para a cura ou alívio dos diferentes tipos de dores, contudo, a grande maioria deles, tende a gerar uma boa efetividade a curto prazo, mas traz muitos efeitos adversos a longo prazo e até mesmo inefetividade, como é o caso dos opioides (BUJAK et al, 2019). Isso evidencia que a busca por novos fármacos para o tratamento da dor, segue fundamental.

O uso de espécies botânicas no desenvolvimento de medicamentos é algo amplamente conhecido e utilizado, seus benefícios se dão por muitas vezes apresentarem um baixo custo em relação a moléculas sintéticas e possuem menos efeitos adversos que medicamentos não derivados de plantas (BOYD et al, 2013). É de suma importância destacar que uma enorme gama de medicamentos utilizados e comercializados hoje, são derivados de plantas e que a atenção da indústria farmacêutica está voltada para a busca de novas espécies e seus compostos com tal potencial, especialmente pelo fato de que, anualmente, esse ramo gera cerca de vinte bilhões de dólares, portanto, é inerente que pesquisas nessa área são de grande interesse econômico e científico (DUTRA et al, 2016). Dentre os ativos vegetais, a luteolina se destaca por apresentar ações antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes, além disso ela também reduz neuro inflamação, inibindo a ativação de células gliais e de inflamossomas, evidenciando um provável efeito direto no combate à dor. Ademais, essas ações foram acompanhadas de

menos efeitos adversos, quando comparados aos dos medicamentos comumente utilizados no tratamento da dor (FAN et al, 2018; ZHOU et al, 2022).

A questão acerca desse ativo seria sua alta lipofilicidade e concomitante baixa solubilidade em água, o que compromete sua biodisponibilidade, portanto, justamente com o intuito de melhorar a distribuição do flavonoide pelos tecidos, é que surge a proposta da nanoemulsão, a qual permite reduzir parcialmente a hidrofobia da molécula ativa, melhorando sua solubilidade, concentração plasmática e conseqüentemente, aumentando a biodisponibilidade da luteolina (WANG et al, 2019). Já se sabe que, quando em nanopartículas, a biodisponibilidade do composto, fica até 4,89 vezes maior quando comparada ao composto puro, e sua solubilidade aumenta 132,74 vezes na mesma comparação (WANG et al, 2019; KAZMI et al, 2021). Além disso, em relação às nanoemulsões, sabe-se que, justamente, devido à sua maior biodisponibilidade, seu efeito biológico torna-se maior, atingindo mais efetivamente o local de ação, já que possuem um menor tamanho de molécula e essa é anfifílica (SHIN et al, 2018).

Diante do exposto, acredita-se que a nanoemulsão de luteolina pode apresentar um significativo potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, devido a sua forma farmacêutica, se comparado a outros medicamentos já em uso.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da nanoemulsão de luteolina por via oral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da nanoemulsão de luteolina, por meio do modelo de nocicepção aguda induzida pelo teste da formalina em camundongos;
- Verificar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da nanoemulsão de luteolina sob a hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pela carragenina injetada na pata de camundongos;
- Realizar uma curva dose resposta do efeito da nanoemulsão de luteolina no modelo de formalina e carragenina;
- Avaliar o decurso temporal do efeito antinociceptivo da nanoemulsão de luteolina administrada pela via oral na nocicepção induzida pela carragenina;
- Comparar os possíveis efeitos analgésicos e anti-inflamatórios da nanoemulsão de luteolina com o composto puro na via de administração oral.

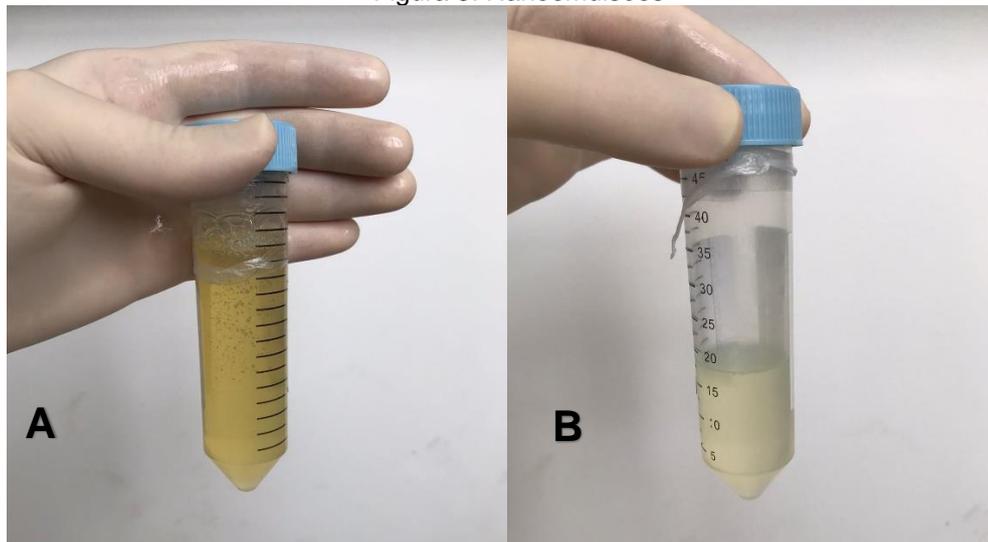
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Luteolina grau farmacêutico, extraída da casca do amendoim, adquirido da Extrato Vital (Farmácia e Manipulação) e a nanoemulsões branca e carregada de luteolina preparadas através do método de cavitação por sonicador, conforme descrito previamente (DIEDRICH, 2021; em uma concentração de 8mg/ml), e atenciosamente doada pela Profa. Dra^a Rubiana Mara Mainardes, do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Tanto a Luteolina quanto a sua nanoemulsão foram administradas 1 hora antes das induções dos modelos testados no presente estudo.

Figura 3: Nanoemulsões



Legenda: a figura A demonstra a NECH-LUT, enquanto a figura B representa a NECH-Br.

Fonte: O Autor, 2023.

4.2. ANIMAIS

Nesta pesquisa foram utilizados camundongos Swiss (25 a 35 g) machos e fêmeas, com idade entre 40 a 60 dias, os quais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e mantidos no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) sob condições padrão de biotério, como, controle de umidade, ciclo claro/escuro (de 12 horas cada), temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$),

assim como, oferta água filtrada (filtro Jojaco) e ração (da marca Biobase) ad libitum. O protocolo, de número 5444211221, de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (em anexo). Todos os experimentos seguiram os critérios dispostos no guia ARRIVE, bem como no guia ético para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em duas etapas, com diferentes animais em cada uma delas. Na primeira etapa, buscou-se estabelecer a comprovação de efeitos da nanoemulsão de luteolina, assim como as melhores doses a serem seguidas para a realização deste trabalho. Já na segunda etapa buscou-se pesquisar mais a fundo as propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias da nanoemulsão, assim como averiguar, ainda que superficialmente, algum efeito tóxico do tratamento.

Previamente ao início dos experimentos, foram realizados testes basais de hiperalgesia mecânica (teste de von Frey - descrito no item 4.5.3), com o intuito de assegurar que os animais possuíam um alto e homogêneo limiar de resposta. Então, dividiu-se os animais nos seguintes grupos randomizados: grupo controle (tratados com o veículo NECH-Br), grupo luteolina (25 mg/kg) e grupo salina (induzidos com salina e sem tratamento), assim como, os grupos nanoemulsão de luteolina, G2 (0,4 mg/kg), G3 (0,8mg/kg), G3 (4 mg/kg) G5 (8 mg/kg). Todos os grupos supracitados receberam tratamentos pela via oral.

Ressalta-se que os experimentos foram realizados de forma cega, e foram orientados com base naquilo preconizado pelo guia ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (KILKENNY et al., 2010). Além disso, anteriormente a realização de todos os testes, os animais foram submetidos a ambientação de 60 minutos no espaço de realização das avaliações.

A primeira etapa de experimentos se iniciou com o teste de injeção intraplantar de formalina (2,5%), onde utilizou-se diferentes doses da NECH-LUT a fim de se identificar e caracterizar os efeitos analgésico e anti-inflamatório dela. Neste experimento foram utilizados camundongos machos e fêmeas, em uma média de 10 animais por grupo. Com o intuito de se poder comparar tais parâmetros,

estabeleceu-se o tratamento com luteolina 25 mg/kg (FAN et al, 2018) e com NECH-BR enquanto veículo para o grupo controle.

Já a segunda etapa contou com uma série de testes e análises comportamentais, em sua maioria realizadas em um mesmo período de 4 horas, com aferições realizadas em diferentes intervalos, exceto o teste de campo aberto. Da mesma forma, para que se pudesse realizar comparações e identificar ou não a eficácia dos tratamentos, foram utilizados além dos grupos tratados com NECH-LUT, agora já com doses selecionadas, os grupos tratados com veículo da nanoemulsão (controle), LUT e grupo salina (induzido com salina). Já nessa fase de testes, foram utilizados somente animais fêmeas, devido a disponibilidade, com uma média de 6 animais por grupo.

Após a finalização dos experimentos os animais foram eutanasiados e tiveram estruturas coletadas para posteriores análises.

4.5. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI INFLAMATÓRIA

4.5.1. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA (2,5%)

Neste teste, duas categorias de resposta nociceptiva foram examinadas: aquela de origem inflamatória, que se dá pela liberação dos mediadores inflamatórios e aquela de origem neurogênica, originada na ativação dos nociceptores (HUNSKAAR et al, 1985, TJØLSEN et al., 1992). Para o desenvolvimento do método, 20 µl de solução de formalina 2,5% foram injetadas por via intraplantar, na pata posterior direita do animal, em sua superfície ventral, isso uma hora após ter sido realizado o tratamento com luteolina e/ou sua nanoemulsão, nos devidos grupos. Foi cronometrado o tempo, em segundos, que os animais se encontraram lambendo, mordendo, ou sacudindo a pata injetada, demonstrando dor e desconforto, após a injeção da substância. A contagem é feita de zero aos cinco minutos, representando a fase neurogênica, e dos quinze aos trinta minutos após administração, representando a fase inflamatória (SANTOS e CALIXTO, 1997). A partir dos resultados obtidos nesse teste, foram selecionadas as melhores doses

para a realização das avaliações seguintes, levando-se em consideração também, o volume total de nanoemulsão e seu diluente disponíveis.

4.5.2. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA

Realizou-se o teste de edema de pata induzido por carragenina a fim de evidenciar a propriedade anti-inflamatória da nanoemulsão de luteolina contra agentes inflamatórios, como a carragenina (PASSOS et al, 2007).

Os animais foram divididos em seis grupos e tratados 1 h antes do início do experimento com a solução de nanoemulsão branca, luteolina (25mg/kg) e nanoemulsão carregada, nas diferentes doses utilizadas nesta etapa de experimentos, sendo elas: 0,8 mg/kg, 4 mg/kg e 8 mg/kg. Cada animal teve sua aferição basal realizada anteriormente à injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata), em seguida receberam seus tratamentos, passados 30 minutos aplicou-se a injeção de carragenina na região plantar da pata posterior direita dos animais e então após mais 30 minutos, tempo necessário para o estabelecimento da inflamação neurogênica, iniciaram-se as avaliações (PASSOS et al, 2007). O edema de pata, hiperalgesia mecânica (Von Frey) e a hiperalgesia térmica, foram medidos em: 60, 120, 180 e 240 minutos, após o tratamento. Os diferentes testes obtiveram diferentes intervalos de avaliações.

Os animais do grupo salina receberam uma injeção intraplantar de 20 µL de solução salina 0,9%. E as medidas da aferição basal dos animais de cada grupo foram utilizadas como controle, numa análise pareada, onde cada animal foi seu próprio controle.

4.5.2. EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA

O edema formado foi medido no tempo zero, em 60, 120 e 240 minutos. As medidas foram realizadas com o auxílio de um micrômetro digital (MDC-SX – Mitutoyo Figura 3), onde as patas lesionadas eram cuidadosamente pressionadas, até que ficassem detidas no aparelho. A partir desses valores, calculou-se a

diferença entre as patas quando hígidas e depois da injeção de carragenina e formação do edema (delta).

Figura 4: Micrômetro Digital (MDC-SX – Mitutoyo)



Fonte: O Autor, 2023.

4.5.3. TESTE DE HIPERALGESIA MECÂNICA (VON FREY)

O teste de Von Frey foi realizado seguindo o método “*up & down*” (CHAPLAN et al, 1994). Os animais foram dispostos de maneira individual, e ambientados pelo período de uma hora, em compartimentos acrílicos (9 cm x 7 cm x 11 cm) sobre placas de malha de arame vazadas e elevadas à uma altura de 30 cm, para que fosse possível o acesso à superfície plantar da pata traseira direita de cada um deles (BOBINSKI et al., 2011). Utilizou-se filamentos de von Frey (0,02; 0,07; 0,16; 0,4; 1,4; 4,0; gramas; VFH, Stoelting, Chicago-EUA), os quais foram pressionados, verticalmente, na superfície do membro posterior direito, até que a leve curvatura do filamento se fizesse (HERVERA et al., 2010). Ao fim, cada animal teve seu o limiar calculado através do programa Microsoft Excel® e expresso em uma percentagem de 50% do limiar de resposta.

4.5.4 TESTE DE HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO (TESTE DA ACETONA)

A hiperalgesia térmica ao frio é avaliada por meio do método da gota de acetona (Choi et al 1994), com modificações. Os animais são colocados no mesmo

aparato utilizado no teste de Von Frey, onde se tem acesso à superfície ventral de suas patas direitas. Utiliza-se uma seringa, com a qual estila-se 50µL de acetona sobre a pata posterior direita de cada camundongo. Os comportamentos sucedidos foram classificados de acordo com a seguinte escala: 0 = nenhuma resposta à ação; 1 = rápida retirada da pata, rápida pressionada da pata sob a superfície(carimbada) ou agitação (inferior a 1s); 2 = repetidas carimbadas, agitação ou guarda da pata (inferior a 3 s); 3 = comportamentos anteriormente citados, mas, mantidos por mais de 3s, ou ainda, lambar a pata por mais de 3s. E um ponto adicional é considerado em casos de vocalizações.

4.6. AVALIAÇÃO LOCOMOTORA

4.6.1 TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste de Campo Aberto foi realizado com o intuito de se observar se havia atividade sedativa na nanoemulsão de luteolina (dose de 8 mg/kg), para isso, avaliou-se sua desenvoltura motora, assim como o comportamento exploratório geral e os parâmetros associados ao comportamento tipo-ansioso dos animais (MECHAN et al., 2002). O teste foi realizado com três grupos, os quais foram tratados 1h antes da exposição ao aparato: controle, luteolina (25 mg/kg) e nanoemulsão de luteolina (8 mg/kg). O aparato utilizado para a realização consiste em uma base plana, feita de madeira lisa, com uma área quadrada de 60 cm x 40 cm x 40 cm. Os animais foram posicionados no centro do aparato, dando-lhes livre exploração do campo. Filmou-se a desenvoltura do animal no teste, com uma câmera de vídeo, durante 5 minutos. Em seguida, os parâmetros de locomoção (número de cruzamentos através dos quadrantes) e ansiedade (período de delonga no centro e periferia do campo) foram avaliados e contabilizados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados deu-se pelo uso do software *Graph Pad Prism version 6* (*GraphPad Software®*, San Diego, CA). Posteriormente, realizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de

Bonferroni ou de Tukey. Apresentou-se os dados como como média + erro padrão da média (E.P.M.) ou, em relação ao dados de área sob a curva, média + erro desvio da média (D.P.M.). Considerou-se significativo, os valores de p menores que 0,05. Ademais, a área sob a curva foi calculada para os resultados dos testes de hiperalgesia mecânica e térmica. Por fim, a IMax (Inibição Máxima) foi calculada a partir dos valores individuais das respostas dos animais dos grupos tratados no modelo da formalina, comparados a Média do grupo controle no mesmo teste (grupo sem tratamento).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO TESTE DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA (2,5%)

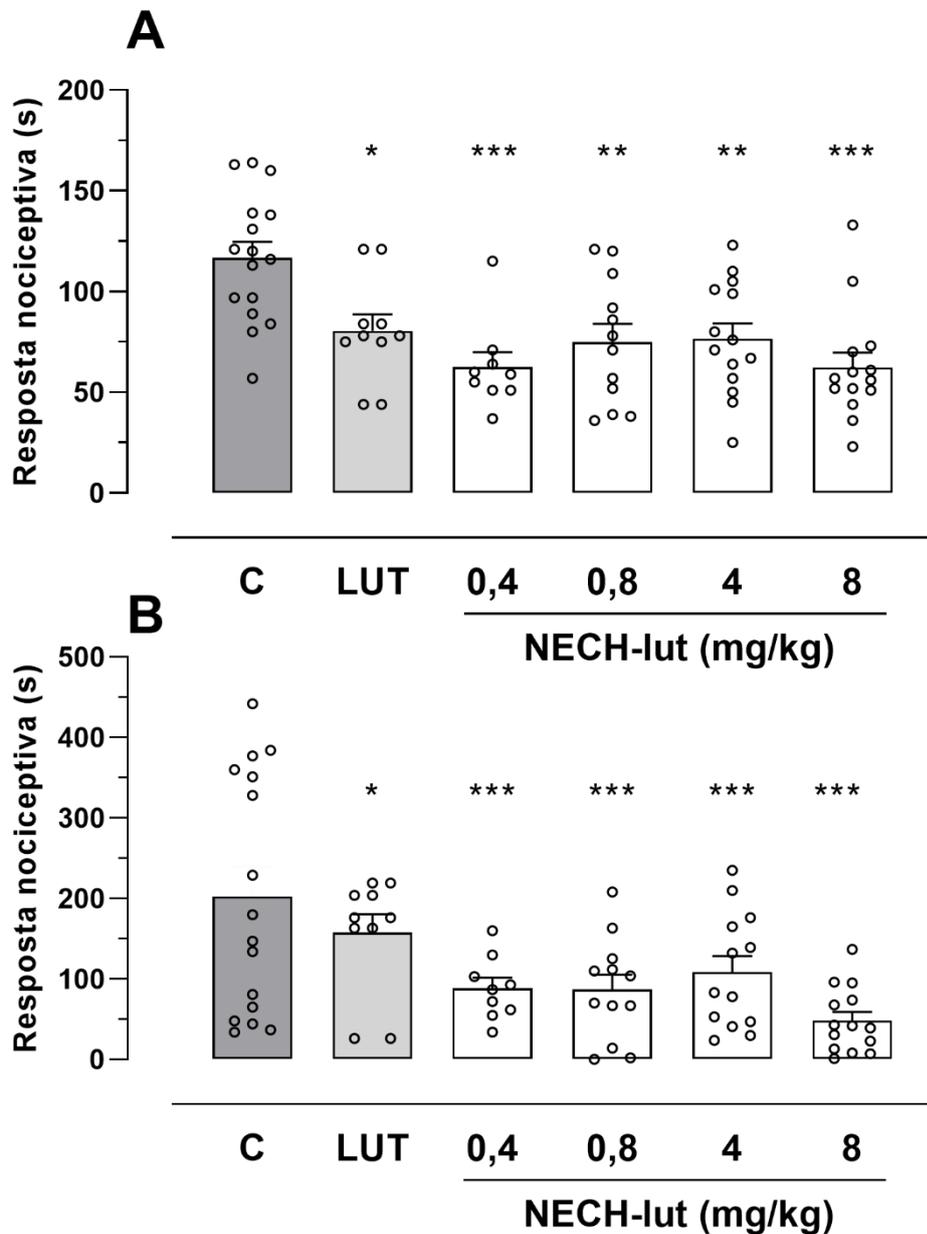
Com o intuito de constatar-se as propriedades analgésica e anti-inflamatória da NECH-LUT, utilizou-se quatro diferentes doses neste teste 0,4 mg/kg, 0,8 mg/kg, 4 mg/kg e 8 mg/kg. Assim como os grupos que receberam LUT (25 mg/kg), veículo e o grupo salina.

Percebeu-se então, que a NECH-LUT possui um efeito analgésico mais potente, em todas as doses testadas, se comparado a LUT (Figura 4A). Todos os tratamentos com NECH-LUT foram eficazes em reduzir a resposta nociceptiva na primeira fase da formalina. No entanto, os grupos tratados com NECH-LUT 0,4 mg/kg ($IMax=46\% \pm 6$) e 8,0 mg/kg ($IMax=47\% \pm 6$), apresentaram maior efeito comparados ao grupo controle (Figura 5A).

Da mesma forma, na segunda fase do teste, na qual avalia-se o potencial anti-inflamatório do tratamento, a LUT apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ($IMax=39\% \pm 9$) os tratamentos com NECH-LUT demonstraram uma ótima resposta anti-inflamatória (Figura 5B). Os melhores resultados obtidos nessa fase, foram aqueles das doses de: 0,4 mg/kg ($IMax=66\% \pm 5$), 0,8 mg/kg ($IMax=66\% \pm 6$) e de 8 mg/kg ($IMax=81 \pm 4$).

A partir de tais resultados e das quantidades de droga e diluente disponíveis para a conclusão do trabalho, decidiu-se utilizar para as próximas análises, somente as doses de 0,8 mg/kg, 4,0 mg/kg e 8,0 mg/kg.

Figura 5: Efeito da NECH-Lut no edema de pata induzido por formalina



Legenda: O painel A indica o resultado da fase nociceptiva do teste da formalina. Já o painel B indica o resultado da fase inflamatória do teste. Cada barra representa a média de 10 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos controle e tratados. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. C: controle (nanoemulsão branca). LUT: tratamento com luteolina. NECH-LUT: tratamento com nanoemulsão de luteolina.

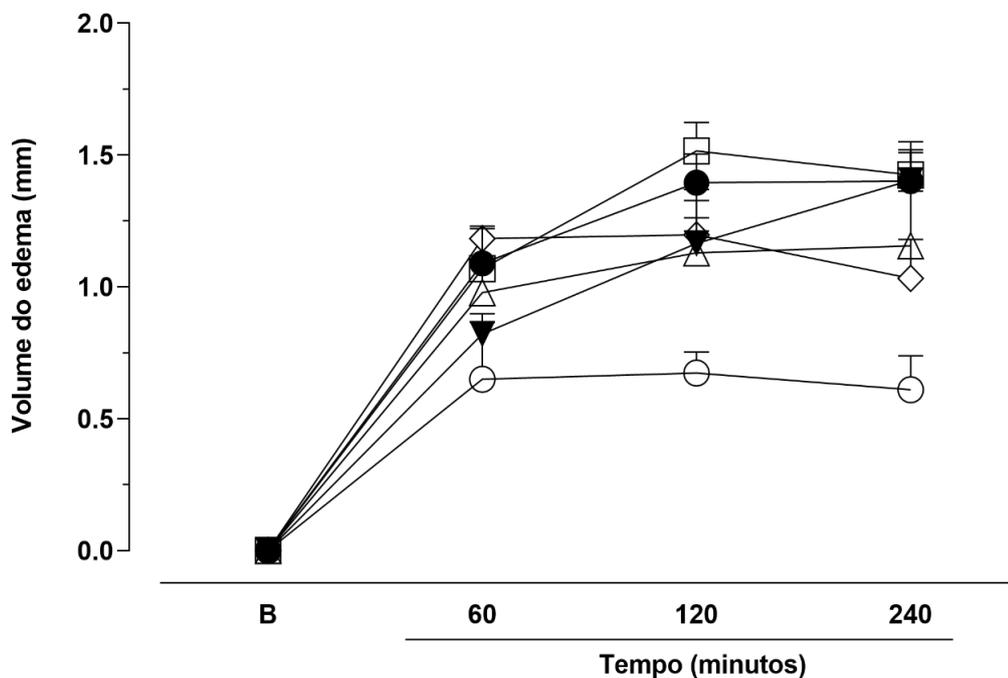
5.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA

Neste teste avaliou-se a capacidade anti-inflamatória, de redução de edema, da luteolina e sua nanoemulsão em diferentes doses frente ao agente carragenina, em diferentes períodos, de 60, 120 e 240 minutos. O edema de pata foi mensurado cerca de uma hora antes de se realizar a injeção intraplantar de carragenina, e tal medida foi utilizada para a realização do cálculo do delta das medidas posteriores. Para a plotagem do gráfico foi estabelecido o valor de zero para todos os tratamentos na avaliação basal (representada por B).

Não foi observada redução significativa do edema de pata em nenhum dos grupos avaliados (figura 6). No entanto, os valores diminuídos do grupo salina, em relação àqueles que receberam a injeção de carragenina intraplantar, comprovam que houve o desenvolvimento de edema de pata, fato que valida o teste.

Figura 6: Efeito da NECH-Lut no edema de pata induzido por carragenina

○ SALINA ● CONTROLE ▼ LUTEOLINA △ 0,8 NECH-Lut □ 4 NECH-Lut ◇ 8 NECH-Lut



Legenda: Cada linha representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. LUT: tratamento com luteolina. NECH-LUT: tratamento com nanoemulsão de luteolina.

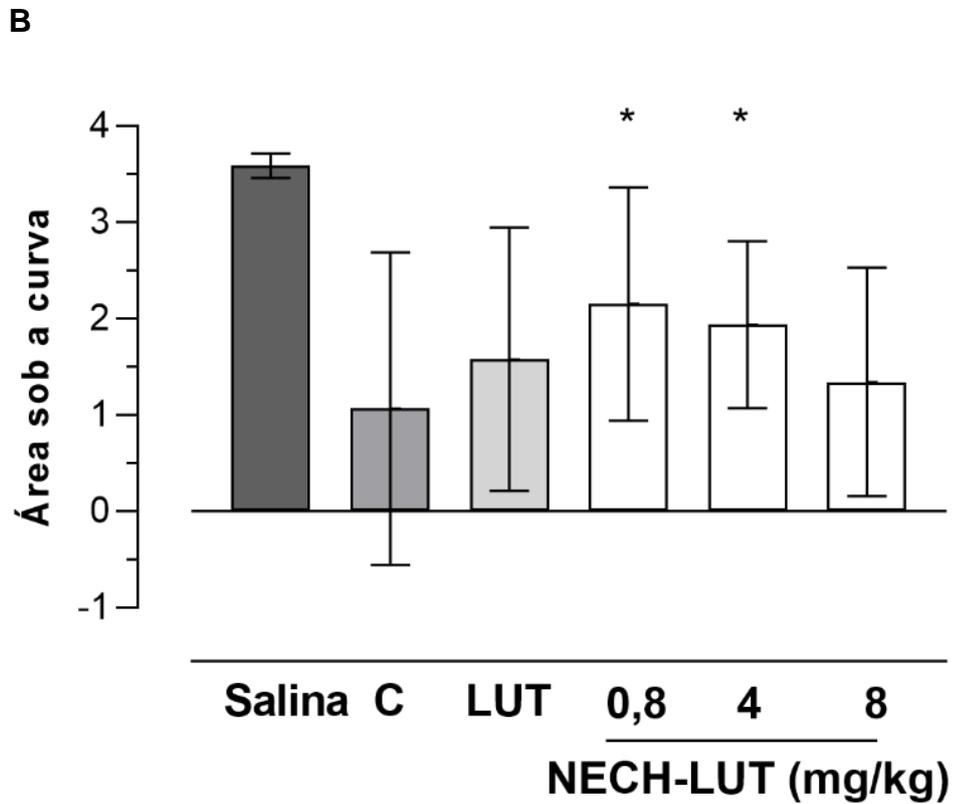
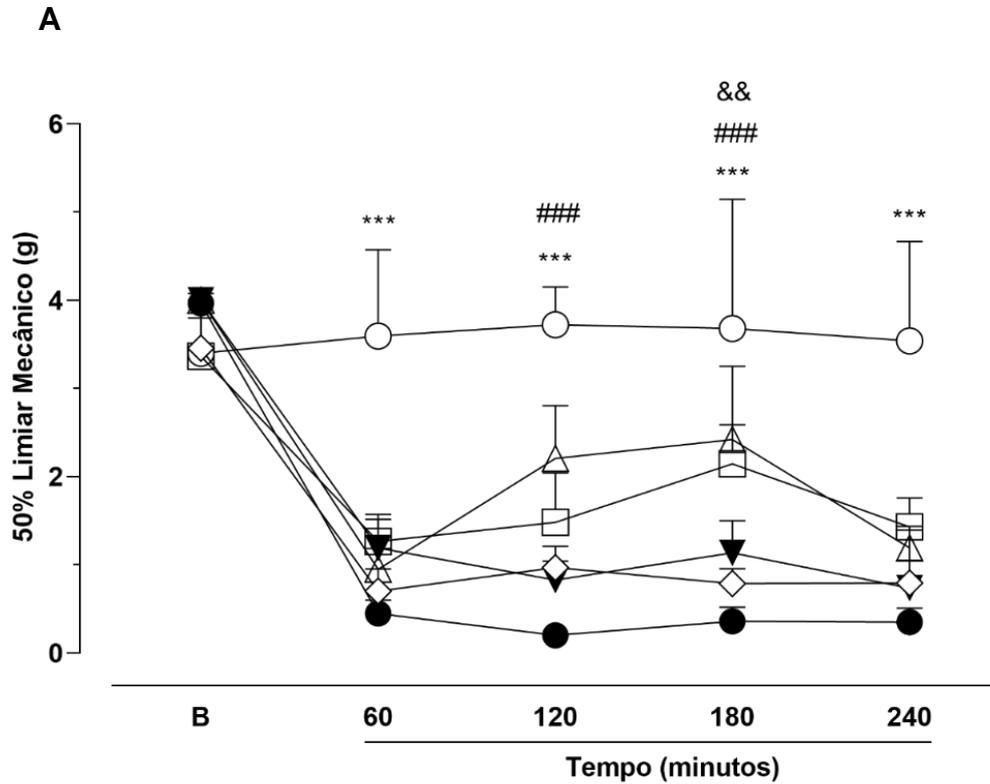
5.3 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA EM DECURSO TEMPORAL (TESTE DE VON FREY)

A partir do teste basal de hiperalgesia mecânica, os animais foram randomicamente 6 divididos em grupos. Com esse teste, também pode-se observar que os grupos que receberam a carragenina apresentaram diferenças em relação aos que receberam salina, comprovando a instauração dos processos álgicos.

Portanto, a figura 5 representa o efeito das diferentes doses de NECH-LUT por um decurso temporal de 4 horas e os resultados nela expostos demonstram que na primeira hora somente o tratamento com NECH-Br (controle) possuiu diferença significativa se comparado ao grupo salina, mantendo-se assim até a quarta hora. Tal fato demonstra que o veículo da nanoemulsão não possui nenhum efeito antinociceptivo. Já na segunda hora, o tratamento de NECH-LUT 0,8 mg/kg promoveu a redução da hiperalgesia mecânica ($I_{Max}=22\pm7$), e persistiu com tal resposta até os 180 minutos ($I_{Max}=29\pm11$). E por fim, na terceira hora o grupo tratado com a dose de 4 mg/kg também apresentou uma diferença significativa ($I_{Max}=43\pm10$) em relação ao grupo controle, o que evidencia um potencial analgésico dessa dose.

Figura 7: Efeito da NECH-Lut na redução da hiperalgesia mecânica

○ SALINA ● CONTROLE ▼ LUTEOLINA △ 0,8 NECH-Lut □ 4 NECH-Lut ◇ 8 NECH-Lut



Legenda: No painel A cada linha representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA),

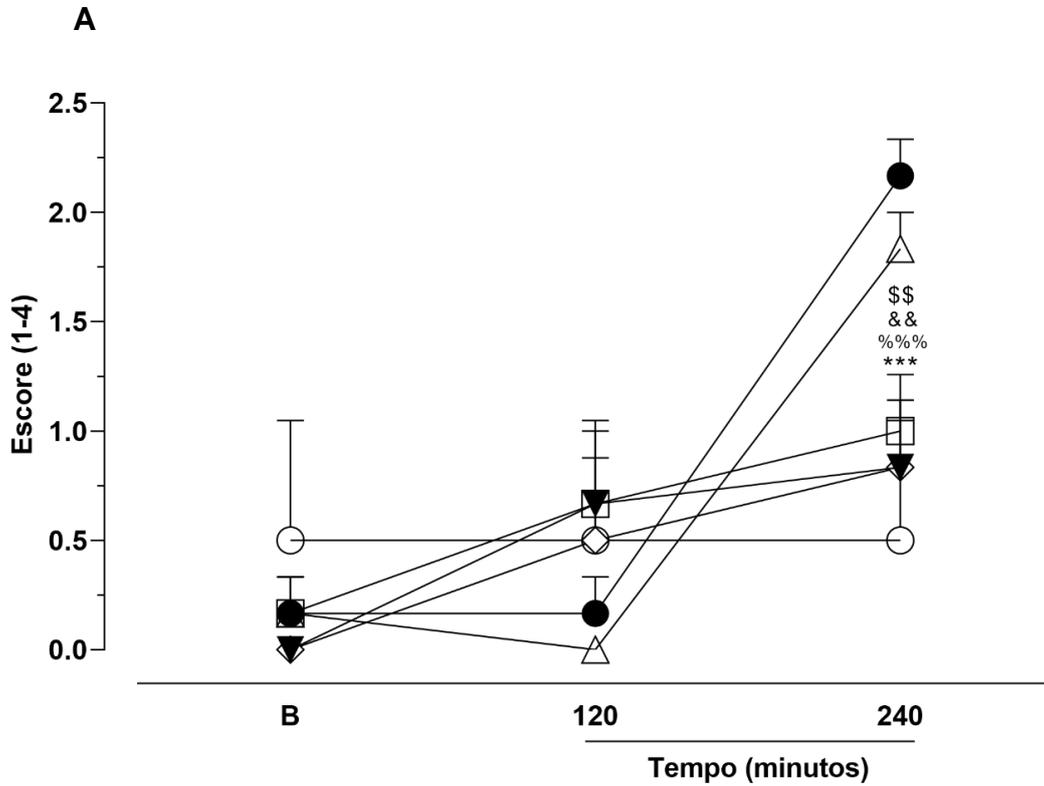
seguido do pós-teste de Tukey. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos salina e controle. *** $p < 0,001$. Os sustenidos (#) denotam a significância entre os grupos controle e NECH-LUT na dose de 0,8 mg/kg. ### $p < 0,001$. A letra "E" (&) denota a significância entre os grupos controle e a dose de 4 mg/kg. && $p < 0,01$. Já o painel B, representa a área sob a curva do gráfico A. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o desvio padrão da média (D.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos controle e tratados. * $p < 0,05$. C: controle (nanoemulsão branca). LUT: tratamento com luteolina. NECH-LUT: tratamento com nanoemulsão de luteolina.

5.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO (TESTE DA ACETONA)

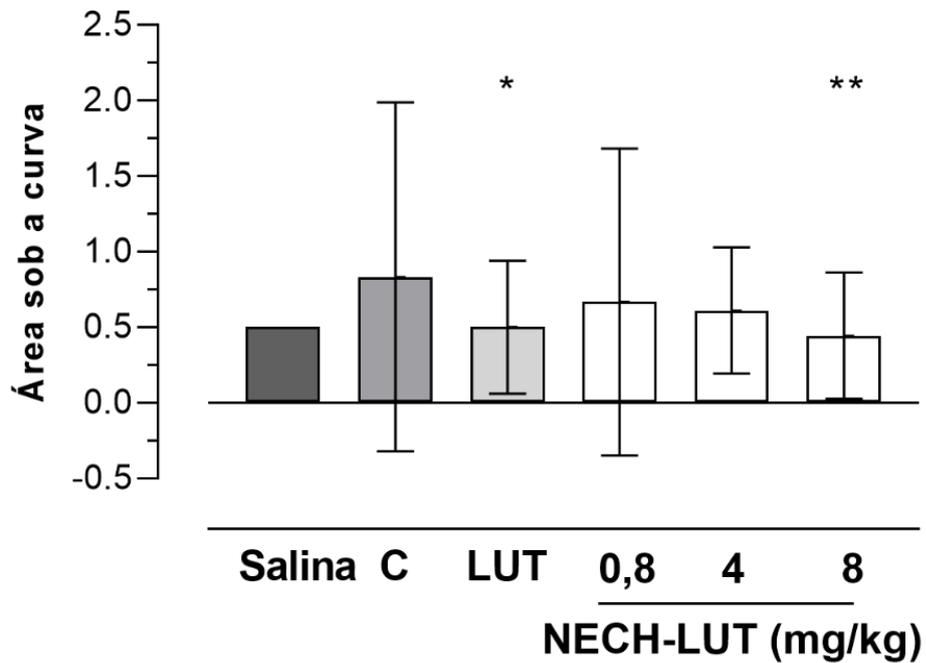
Os dados da figura 6 demonstram os escores de resposta a nocicepção induzida pelo frio, na medida basal e nos tempos de 120 e 240 minutos. Neles é possível perceber-se que, o grupo salina manteve seu escore de maneira permanente até o final da quarta hora, o que seria esperado para tal situação. Os animais do grupo controle possuíram um aumento do escore de nocicepção a partir de 120 minutos. E por fim, na última aferição dois tratamentos de NECH-LUT promoveram uma analgesia frente o estímulo térmico frio, aquele de 4 mg/kg e de maneira ainda mais eficiente a dose de 8 mg/kg. Além disso o tratamento com LUT também foi capaz de promover analgesia nesse modelo.

Figura 8: Efeito da Nech-Lut à hiperalgesia térmica ao frio

○ SALINA ● CONTROLE ▼ LUTEOLINA △ 0,8 NECH-Lut □ 4 NECH-Lut ◇ 8 NECH-Lut



B



Legenda: No painel A, cada linha representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos controle e

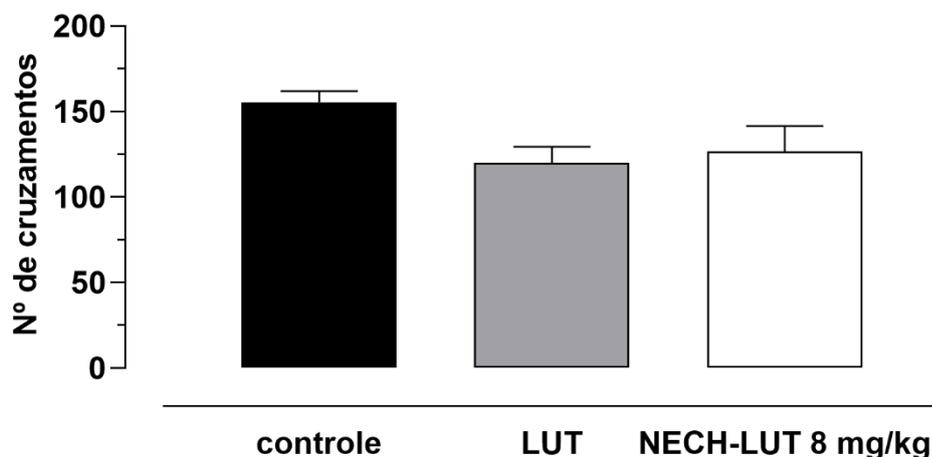
salina. *** $p < 0,001$. A letra E (&) denota significância entre os grupos controle e a NECH-LUT dose de 4 mg/kg. && $p < 0,01$. O cifrão (\$) denota a significância entre o grupo controle e a NECH-LUT 8 mg/kg. \$\$\$ $p < 0,001$. O percento (%) denota a significância entre o grupo controle e a LUT. %%% $p < 0,001$. Já o painel B, representa a área sob a curva do gráfico A. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o desvio padrão da média (D.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos controle e tratados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. C: controle (nanoemulsão branca). LUT: tratamento com luteolina. NECH-LUT: tratamento com nanoemulsão de luteolina.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DA NECH-LUT (TESTE DO CAMPO ABERTO):

Neste teste foi avaliado um possível efeito sedativo ou modificador da locomoção da NECH-Lut, o qual poderia mascarar os efeitos analgésicos do produto, pela depressão do SNC, configurando-se como um possível efeito adverso e evidenciando um diferente mecanismo de ação para a nanoemulsão. Três grupos de animais foram comparados, foi utilizado como controle um grupo de animais tratados com salina, a luteolina em sua dose reconhecidamente não sedativa (FAN et al, 2018) e o grupo NECH-Lut, avaliado na maior dose testada neste trabalho, de 8 mg/kg.

Contudo, não foi observada diferença significativa entre os grupos, demonstrando que a NECH-Lut não possui efeito sedativo.

Figura 9: Efeito Sedativo da NECH-Lut



Legenda: Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de teste T independente. LUT: tratamento com luteolina. NECH-LUT: tratamento com nanoemulsão de luteolina.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho, corroborando com dados da literatura, foi capaz de reproduzir e assegurar os efeitos antinociceptivos da LUT no teste da formalina onde, na primeira fase, a substância foi capaz de diminuir o comportamento nociceptivo, além de reduzir a hiperalgesia térmica decorrente da injeção intraplantar de Carragenina. Ademais, o presente estudo demonstrou, de forma inédita, que a nanoemulsão de luteolina foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela formalina em ambas as fases, nas doses utilizadas. Já no modelo de Carragenina, a NECH-Lut apresentou efeitos significativos na hiperalgesia mecânica e térmica, contudo, não foi capaz de alterar o edema de pata.

De fato, alguns estudos na literatura já demonstram o importante papel do flavonoide luteolina na redução da nocicepção e da inflamação (FAN et al 2018; ZHOU et al, 2022). De acordo com Ching e colaboradores (2012), esse efeito é devido seu imenso potencial em inibir enzimas como a COX-2, iNOS, assim como interferir na ação de interleucinas como TNF- α e IL-6. Os resultados desse estudo, no entanto, encontraram que a LUT não foi capaz de expressar seu efeito anti-inflamatório de maneira homogênea no modelo de Carragenina. O tratamento com LUT não apresentou uma redução significativa do edema de pata, evento que pode ter decorrido do fato dos grupos experimentais dessa etapa de testes serem compostos apenas por fêmeas, as quais sofrem influências hormonais, principalmente por seus estrógenos e baixas concentrações de testosterona. Fator este que pode afetar o desenvolvimento e manutenção de processos inflamatórios, uma vez que, a literatura sugere que tais hormônios podem agir na regulação das ciclooxigenases e produção de interleucinas anti-inflamatórias (CHILLIGNWORTH et al, 2006; STRAUB, 2007). Da mesma forma, não foi observada ação contra a hiperalgesia e nocicepção no teste de hiperalgesia mecânica, o que pode dar-se pelos mesmos motivos anteriormente citados, pois, as fêmeas reconhecidamente possuem comportamentos relacionados a dor diferente daqueles apresentados pelos machos, o que incita a importância de se trabalhar com ambos os sexos (SMITH, 2019).

No que diz respeito a nanoemulsão, os resultados foram promissora e melhores se comparados a luteolina. O teste da formalina, muito utilizado no estudo

da dor e inflamação, é reconhecido por se tratar de uma análise bifásica, possuindo uma primeira etapa neurogênica, provocada pela ação direta da substância sob as fibras nociceptivas, ativando-as. Já a segunda fase é reconhecida por ser a etapa inflamatória, onde a dor é resultado do dano tecidual causado e modulada pela liberação de reguladores inflamatórios, principalmente as prostaglandinas, isso ocorre em conjunto da sensibilização central (GAO et al, 2021). Os resultados obtidos em relação ao teste da formalina também compactuam com aquilo expresso na literatura, portanto, percebe-se que há tanto ação antinociceptiva quanto anti-inflamatória, como resposta à LUT. Adicionalmente, a NECH-LUT(0,4; 0,8 e 8 mg/kg) também demonstrou ambos os potenciais, o que muito provavelmente se explica pela supressão das enzimas iNOS e COX-2, que são um dos mecanismos de ação pelos quais a luteolina, nesse caso nanoparticulada e de maneira mais eficaz age, fato que culminará em uma menor produção de prostaglandinas, diminuindo a ativação de nociceptores da região afetada, assim como também ocorrerá com a inflamação (TAGHIPOUR et al, 2017; Fan et al, 2018) .

No que tange o teste da carragenina, propõe-se que apesar de não possuírem desfechos diferentes, como no teste de formalina, esse também possui duas fases. Na primeira delas, que ocorre nas horas preliminares, a resposta é majoritariamente mediada pela liberação de histamina e bradicinina, que levarão a formação do edema e posteriormente há uma maior liberação dos mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e as citocinas inflamatórias, como, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (GAO et al, 2021; KRAUS et al, 2023). Portanto, pode-se inferir que, em relação ao teste de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, realizado em decurso temporal, aquilo que se observou nesse estudo vai de encontro com aquilo visto na literatura, uma vez que não houve diminuição significativa do edema por nenhum dos tratamentos. Uma possibilidade de explicação para o fato, além daquelas já levantadas, é de que os animais do estudo possuíam aproximadamente 6 semanas de idade, sendo que estudos já demonstram uma migração celular deficitária na inflamação, quando comparados a animais de 7 e 8 semanas. Além disso existem certas divergências entre o tempo de ação máxima do composto inflamatório, neste trabalho optou-se por utilizar o tempo de 4 horas como período total a fim de se ter dados até a hora de ação máxima da carragenina, a quarta hora, contudo, outros autores sugerem que o pico inflamatório

máximo do composto seja a sexta hora. Ou seja, talvez não tenha sido possível se obter dados completos sobre a inflamação e sua consequente inibição (POSADAS et al, 2004; PASSOS et al, 2007).

Considerando os testes realizados em decurso temporal, encontrou-se que a nanoemulsão possui efeitos mais pronunciados se comparada a formulação inicial. Ademais, pode-se observar que os efeitos da NECH-LUT foram percebidos com maior intensidade mais próximos da quarta hora do teste. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a ação do flavonoide ocorre por mais de uma via ação simultaneamente, ou seja, ao mesmo tempo que inibe as enzimas anteriormente citadas, também está inibindo as interleucinas que ativam nociceptores (IL-6 e TNF- α) e vias de sinalização importantes, como a via das MAPKs, onde a luteolina pode atuar inibindo diversos pontos, incluindo suas enzimas regulatórias, portanto, a luteolina possui um importante papel inibitório sobre essa via que participa da indução e manutenção do processo doloroso (JI et al, 2008; ZHOU et al, 2022; AZIZ et al, 2018).

Os motivos mais prováveis para os resultados supracitados são a melhora da solubilidade e conseqüentemente também da biodisponibilidade do composto luteolina, quando carregado na forma de nanoemulsão, pelo fato de que a dispersão óleo em água promove a interação do flavonoide com ambas as polaridades, permitindo então, que o fármaco fique mais disponível e propenso a interagir com as mucosas intestinais, onde será absorvido (DEEN; SKOVGAARD; PEDERSEN, 2016; SHEGOKAR et al, 2017; ELMOWAFY et al., 2021). Além disso, o fato de estar na escala nanométrica, faz com que a área superficial de contato entre o fármaco e o organismo seja muito maior (SHEGOKAR et al, 2017).

Por fim, outro dado relevante diz respeito a uma das questões ainda pouco exploradas acerca do composto luteolina: sua toxicidade. Nesse estudo explorou-se superficialmente a partir do teste de campo aberto, a fim de identificar um possível efeito adverso sedativo da nanoemulsão do fitofármaco. Contudo, nossos resultados expõem que, ao menos na maior dose testada, de 8 mg/kg, não houve um efeito negativo percebido, tal fato corrobora com aqueles encontrados na literatura, onde foram realizados testes de campo aberto com doses de até 50 mg/kg da LUT e não foram percebidos efeitos sedativos (FAN et al, 2018). Não obstante, é importante salientar que a segurança da NECH-LUT é um fator bastante determinante, uma vez

que nano formulações podem estar associadas a certas imprevisibilidades, já que envolvem vários fatores, dentre eles, seu tamanho, o fármaco em questão e sua farmacodinâmica, assim como a bioacumulação (TAGHIPOUR et al, 2017; EGBUNA et al, 2021). Por essa razão, enfatiza-se que o potencial toxicológico em questão deve ser averiguado com mais detalhes, seguindo guias e diretrizes específicos.

Complementarmente, é válido salientar as limitações do dado trabalho, que em sua maioria giram entorno do baixo número de animais disponíveis para a segunda etapa de testes (decorso temporal), que acabou culminando no uso somente de fêmeas e de uma média de 6 animais por grupo. Tal situação pode ter levado a problemas estatísticos, principalmente em grupos que perderam indivíduos durante o seguimento das análises. Além disso, não terem sido exploradas as 4 doses iniciais de NECH-LUT pode representar uma limitação do trabalho, pois, nos testes iniciais a dose que teve de ser excluída (0,4 mg/kg), devido à falta de diluente suficiente (NECH-Br), também apresentou bons resultados na redução da nocicepção. Além disso, observou-se que em todos os testes realizados alguma das doses mostrou-se funcional e estatisticamente efetiva, contudo, nenhuma delas foi capaz de reproduzir bons efeitos em todos os testes. Com isso, não foi possível se estabelecer a partir destas análises uma dose mínima efetiva.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se com o dado trabalho a existência de efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios na nanoemulsão de luteolina, em todas as doses testadas, sob o tratamento pela via oral. No que diz respeito às doses utilizadas, todas foram relativamente mais baixas em comparação àquilo utilizado do extrato puro de luteolina na literatura, e ainda assim a nanoemulsão demonstrou efetividade. Tal fato evidencia uma maior eficácia da NECH-LUT, promovida pela diferença e melhorias na entrega do ativo, propiciadas pela nanoemulsão e ainda com a garantia da segurança, em relação ao efeito sedativo, assim como observado na LUT.

Ainda em relação aos resultados obtidos, têm-se que no teste da formalina, o qual avalia tanto atividade antinociceptiva quanto anti-inflamatória, as quatro doses da NECH-LUT obtiveram resultados significativos e mais pontuais que o extrato puro. Já nos testes realizados em decurso temporal, excetuando a mensuração do edema de pata, observou-se a efetividade de diferentes doses da NECH-LUT. As doses de 0,8 e 4 mg/kg demonstraram redução significativa no limiar de hiperalgesia mecânica. E as doses de 4 e 8 mg/kg foram capazes de reduzir a hiperalgesia térmica induzida por frio.

Em relação a perspectivas futuras para o trabalho e para a nanoemulsão de luteolina, inferiu-se que é necessário a realização da análise e quantificação bioquímica e imunológica de mediadores inflamatórios, assim como das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, a fim de que se possa corroborar os dados comportamentais obtidos nestes ensaios do trabalho, confirmando a ação anti-inflamatória da NECH-LUT. Tais análises serão futuramente realizadas a partir das amostras coletadas dos animais durante os processos de eutanásia.

Ademais, o dado trabalho esclareceu a extrema necessidade de estudos mais aprofundado das propriedades toxicológicas tanto do composto luteolina, quanto da sua nanoemulsão, observando-se também seus possíveis efeitos adversos. Isso com o intuito de que se possa difundir ainda mais a pesquisa acerca de ambas.

Por fim, outra grande perspectiva futura a ser explorada, com o intuito de obter-se mais dados e informações concisas acerca do composto quanto e da forma farmacêutica em questão é a de se avaliar o desempenho e as características dos

efeitos analgésicos e anti-inflamatórios da NECH-LUT frente ao uso em tratamentos de questões prolongadas (a partir de 6h) e crônicas, visto que, como foi exposto, tais condições também carecem de novos tratamentos medicamentosos.

REFERÊNCIAS

ABDOU, E. M. et al. Brain targeting efficiency of antimigrain drug loaded mucoadhesive intranasal nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 529, n. 1–2, p. 667–677, 2017.

ALLEGRI, M. et al. Acute and chronic pain: where we are and where we have to go. **Minerva Anestesiologica**, v. 78, n. 2, p. 222–235, fev. 2012.

AMAECHI, O.; HUMAN, M. M.; FEATHERSTONE, K. Pharmacologic Therapy for Acute Pain. **American Family Physician**, v. 104, n. 1, p. 63–72, jul. 2021. Disponível em: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2021/0700/p63.html>. Acesso em: 3 jun. 2023.

AMIDON, G. L. et al. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

AZIZ, N.; KIM, M.-Y.; CHO, J. Y. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 342–358, out. 2018

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807–819, ago. 2010.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, out. 2009.

BOBINSKI, F.; MARTINS, D. F.; BRATTI, T.; MAZZARDO-MARTINS, L.; WINKELMANN-DUARTE, E. C.; GUGLIELMO, L. G. A.; SANTOS, A. R. S.

Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337–348, out. 2011.

BUJAK, B. K.; REGAN, E.; BEATTIE, P. F.; HARRINGTON, S. The effectiveness of interdisciplinary intensive outpatient programs in a population with diverse chronic pain conditions: a systematic review and meta-analysis. **Pain Management**, v. 9, n. 4, p. 417–429, jul. 2019.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 6, p. 401–418, set. 2000.

CHAPLAN, SR, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 53, p. 55-63. 1994.

CHILLINGWORTH, N. L.; MORHAM, S. G.; DONALDSON, L. F. Sex differences in inflammation and inflammatory pain in cyclooxygenase-deficient mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 2, p. R327–R334, ago. 2006

CHIMENTI, Ruth L; A FREY-LAW, Laura; A SLUKA, Kathleen. A Mechanism-Based Approach to Physical Therapist Management of Pain. **Physical Therapy**, [S.L.], v. 98, n. 5, p. 302-314, 16 abr. 2018.

CHOI, Y. et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. v.59, n. 3, p. 369-376. 1994.

COHEN, S. P.; VASE, L.; HOOTEN, W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *The Lancet*, v. 397, n. 10289, p. 2082–2097, maio 2021.

DEEN, G. R.; SKOVGAARD, J.; PEDERSEN, J. S. Formation and properties of nanoemulsions. **Emulsions**. [S. l.]: Elsevier, 2016. p. 193–226.

DESANTANA, Josimari Melo; PERISSINOTTI, Dirce Maria Navas; OLIVEIRA JUNIOR, José Oswaldo de; CORREIA, Luci Mara França; OLIVEIRA, Célia Maria de; FONSECA, Paulo Renato Barreiros da. **Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor.** 2020. Disponível em: https://sbed.org.br/wp-content/uploads/2020/08/Defini%C3%A7%C3%A3o-revisada-de-dor_3.pdf. Acesso em: 30 jun. 2022.

DIEDRICH, Camila. **Desenvolvimento de Nanoemulsão de Luteolina Revestida com Quitosana.** 2021. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Biologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Pato Branco, 2021. Cap. 6.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, jul. 2008.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, out. 2016.

EGBUNA, C.; PARMAR, V. K.; JEEVANANDAM, J.; EZZAT, S. M.; PATRICK-IWUANYANWU, K. C.; ADETUNJI, C. O.; KHAN, J.; ONYEIKE, E. N.; UCHE, C. Z.; AKRAM, M.; IBRAHIM, M. S.; EL MAHDY, N. M.; AWUCHI, C. G.; SARAVANAN, K.; TIJJANI, H.; ODOH, U. E.; MESSAOUDI, M.; IFEMEJE, J. C.; OLISAH, M. C.; ... IBEABUCHI, C. G. Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. **Journal of Toxicology**, v. 2021, p. 1–21, 30 jul. 2021.

ELMOWAFY, M.; SHALABY, K.; AL-SANEA, M. M.; HENDAWY, O. M.; SALAMA, A.; IBRAHIM, M. F.; GHONEIM, M. M. Influence of Stabilizer on the Development of Luteolin Nanosuspension for Cutaneous Delivery: An In Vitro and In Vivo Evaluation. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1812, 30 out. 2021.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA. **Compound Summary: Luteolin.** 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Luteolin>. Acesso em: 10 jun. 2023.

FAN, Xiaoying; DU, Kexin; LI, Na; ZHENG, Zhonglei; QIN, Yan; LIU, Jing; SUN, Rong; SU, Yuqiang. Evaluation of Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Effect of Luteolin in Mice. **Journal Of Environmental Pathology, Toxicology And Oncology**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 351-364, 2018.

FERRAZ, C. R.; CARVALHO, T. T.; MANCHOPE, M. F.; ARTERO, N. A.; RASQUEL-OLIVEIRA, F. S.; FATTORI, V.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 762, 10 fev. 2020.

FITZCHARLES, M.-A.; COHEN, S. P.; CLAUW, D. J.; LITTLEJOHN, G.; USUI, C.; HÄUSER, W. Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. **The Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2098–2110, maio 2021.

FRIEDMAN, A.; NABONG, L. Opioids: Pharmacology, Physiology, and Clinical Implications in Pain Medicine. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 31, n. 2, p. 289–303, maio 2020.

GAO, L. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of butein in different nociceptive and inflammatory mice models. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 12, p. 7090–7097, dez. 2021.

GENDRISCH, F.; ESSER, P. R.; SCHEMPP, C. M.; WÖLFLE, U. Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation. **BioFactors**, v. 47, n. 2, p. 170–180, mar. 2021.

HERVERA, A. et al. The Role of Nitric Oxide in the Local Antiallodynic and Antihyperalgesic Effects and Expression of μ -Opioid and Cannabinoid-2 Receptors during Neuropathic Pain in Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 334, n. 3, p 887– 896. 2010.

IMRAN, M.; RAUF, A.; ABU-IZNEID, T.; NADEEM, M.; SHARIATI, M. A.; KHAN, I. A.; IMRAN, A.; ORHAN, I. E.; RIZWAN, M.; ATIF, M.; GONDAL, T. A.; MUBARAK,

M. S. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108612, abr. 2019.

JAFARI, Seid Mahdi; PAXIMADA, Paraskevi; MANDALA, Ioanna; ASSADPOUR, Elham; MEHRNIA, Mohammad A. Encapsulation by nanoemulsions. **Nanoencapsulation Technologies For the Food and Nutraceutical Industries**, [S.L.], p. 36-73, 2017.

JI, R.-R.; GEREAU, R. W.; MALCANGIO, M.; STRICHARTZ, G. R. MAP kinase and pain. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 135–148, abr. 2009.

KAZMI, I.; AL-ABBASI, F. A.; NADEEM, M. S.; ALTAYB, H. N.; ALSHEHRI, S.; IMAM, S. S. Formulation, Optimization and Evaluation of Luteolin-Loaded Topical Nanoparticulate Delivery System for the Skin Cancer. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1749, 20 out. 2021.

KILKENNY, C.; BROWNE, W.J.; CUTHILL, I.C.; EMERSON C.; ALTMAN, D. The Arrive Guidelines. **Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments**. 2010.

KRAUS, S. I. et al. Toxicological and pharmacological effects of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 309, p. 116309, jun. 2023.

KUMAR, M. et al. Mucoadhesive nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of olanzapine for brain targeting. **Journal of Drug Targeting**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 806–814, 2008

LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 47, n. 2, p. 173–180, abr. 2020.

MAZALEUSKAYA, Liudmila L.; MUZYKANTOV, Vladimir R.; FITZGERALD, Garret A.. Nanotherapeutic-directed approaches to analgesia. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 42, n. 7, p. 527-550, jul. 2021.

MECHAN, A. O. et al. A comparison between Dark Agouti and Sprague–Dawley rats in their behavior on the elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters and their response to diazepam. **Psychopharmacology**, v.159, s.n., p.188–195. 2002.

MICHAELIDES, A.; ZIS, P. Depression, anxiety and acute pain: links and management challenges. **Postgraduate Medicine**, v. 131, n. 7, p. 438–444, 3 out. 2019.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, abr. 2002.

ONODERA, T. et al. Influence of particle size on the in vitro and in vivo antiinflammatory and anti-Allergic activities of a curcumin lipid nanoemulsion. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1720–1728, 2015.

Passos GF, Fernandes ES, da Cunha FM, Ferreira J, Pianowski LF, Campos MM, Calixto JB. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**. 2007;110(2):323–33.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Expression of Concern: Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331–338, maio 2004.

QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo J.; BRITO, Renan G.; QUINTANS, Jullyana S. S.; SANTOS, Priscila L.; CAMARGO, Zaine T.; BARRETO, Péricles A.; ARRIGONI-BLANK, Maria F.; LUCCA-JÖNIOR, Waldecy; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus T. Nanoemulsion Thermoreversible Pluronic F127-Based Hydrogel Containing Hyptis pectinata (Lamiaceae) Leaf Essential Oil Produced a Lasting Anti-hyperalgesic Effect in Chronic Noninflammatory Widespread Pain in Mice. **Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 1665-1675, 13 fev. 2017.

RAJA, Srinivasa N.; CARR, Daniel B.; COHEN, Milton; FINNERUP, Nanna B.; FLOR, Herta; GIBSON, Stephen; KEEFE, Francis J.; MOGIL, Jeffrey S.; RINGKAMP, Matthias; SLUKA, Kathleen A. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [S.L.], v. 161, n. 9, p. 1976-1982, set. 2020.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**. v. 31, p. 381-389. 1997.

SANTOS, A. R. S., et al. The involvement of K⁺ channels and Gi protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. **European Journal of Pharmacology**. v. 379, p. 7-17. 1999.

SHEGOKAR, R.; ATHAWALE, R.; KURUP, N.; YANG, R.; CHOUGULE, M. B. Lipid-Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery of Anticancer Drug. **Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes**. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 287–321.

SHIN, K.; CHOI, H.; SONG, S. K.; YU, J. W.; LEE, J. Y.; CHOI, E. J.; LEE, D. H.; DO, S. H.; KIM, J. W. Nanoemulsion Vehicles as Carriers for Follicular Delivery of Luteolin. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 14, p. 1723-1729, 2018.

SINGH TULI, H.; RATH, P.; CHAUHAN, A.; SAK, K.; AGGARWAL, D.; CHOUDHARY, R.; SHARMA, U.; VASHISHTH, K.; SHARMA, S.; KUMAR, M.; YADAV, V.; SINGH, T.; YERER, M. B.; HAQUE, S. Luteolin, a Potent Anticancer Compound: From Chemistry to Cellular Interactions and Synergetic Perspectives. **Cancers**, v. 14, n. 21, p. 5373, 31 out. 2022

SMITH, J. C. A Review of Strain and Sex Differences in Response to Pain and Analgesia in Mice. **Comparative Medicine**, v. 69, n. 6, p. 490–500, 1 dez. 2019

ŚWIEBODA, P.; FILIP, R.; PRYSTUPA, A.; DROZD, M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 20, n. 1, p. 2–7, 30 dez. 2013.

TAGHIPOUR, Y. D.- et al. Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], p. 2689–2702, 2017.

TJØLSEN, A., et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v. 51, p. 5-17. 1992.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.M. (Eds.), *The pharmacology of pain*, 130/l. **Springer-Verlag**, Berlin, p. 1-20. 1997.

TODD, K. H. A Review of Current and Emerging Approaches to Pain Management in the Emergency Department. **Pain and Therapy**, v. 6, n. 2, p. 193–202, dez. 2017.

VINEGAR, R. et al. Antagonism of Pain and Hyperalgesia. In: VANE, D. J. R.; FERREIRA, D. S. H. (Eds.). *Anti-Inflammatory Drugs*. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer Berlin Heidelberg, 1979. p. 209–222.

WANG, L.; ZHONG, C.; ZU, Y.; ZHAO, X.; DENG, Y.; WU, W.; SUN, X.; WANG, L.; WU, M. Preparation and characterization of luteolin nanoparticles for enhance bioavailability and inhibit liver microsomal peroxidation in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 57–64, abr. 2019.

WOLLER, Sarah A.; EDDINGER, Kelly A.; CORR, Maripat; YAKSH, Tony L.. An Overview of Pathways Encoding Nociception. **Clinical And Experimental Rheumatology**, San Diego, La Jolla, Ca, v. 107, n. 35, p. 40-46, 17 jul. 2019.

ZHOU, Yong-Sheng; CUI, Yue; ZHENG, Jia-Xin; QUAN, Ya-Qi; WU, Sheng-Xi; XU, Hui; HAN, Yong. Luteolin relieves lung cancer-induced bone pain by inhibiting NLRP3 inflammasomes and glial activation in the spinal dorsal horn in mice. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 96, p. 153910, fev. 2022.

ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110. 1983

ANEXO

Anexo A: Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS DO COMPOSTO LUTEOLINA E SUA NANOEMULSÃO EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 5444211221 (ID 002036), sob a responsabilidade de **Morgana Duarte da Silva e equipe; Rafaela Andreguetti; Jeane Bachi Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 04/04/2022.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF THE COMPOUND LUTEOLIN AND ITS NANOEMULSION IN MICE", utilizing 220 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 5444211221 (ID 002036), under the responsibility of **Morgana Duarte da Silva and team; Rafaela Andreguetti; Jeane Bachi Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 04/04/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2022** a **05/2023**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **30 a 40 dias**

N: **220**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: Este projeto será desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da dor e inflamação (LANDI), no Departamento de Ciências Biológicas da UFSC. O presente estudo caracteriza-se como uma pesquisa quantitativa, experimental e randomizada.

Florianópolis, 03 de maio de 2022

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

