



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

POTENCIAL BIOATIVO DE NANOPARTÍCULAS DE PEJU
ACETILADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis*:
AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO*

CASSIO NAZARENO SILVA DA SILVA

GOIÂNIA-GO
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Cassio Nazareno Silva da Silva

3. Título do trabalho

POTENCIAL BIOATIVO DE NANOPARTÍCULAS DE PEJU ACETILADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE Citrus sinensis: AVALIAÇÕES IN VITRO E IN VIVO

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Karla de Aleluia Batista**, Usuário Externo, em 30/09/2024, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cassio Nazareno Silva Da Silva, Discente**, em 01/10/2024, às 07:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4864521** e o código CRC **7EAB8149**.

Referência: Processo nº 23070.048671/2024-17

SEI nº 4864521

CASSIO NAZARENO SILVA DA SILVA

**POTENCIAL BIOATIVO DE NANOPARTÍCULAS DE PEJU
ACETILADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis*:
AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como pré-requisito para a defesa de produto final - Nível Doutorado.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientadora: Profa. Dra. Karla de Aleluia Batista

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Carolina Bezerra Di Medeiros Leal

GOIÂNIA-GO

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Cassio Nazareno Silva da
POTENCIAL BIOATIVO DE NANOPARTÍCULAS DE PEJU
ACETILADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE Citrus sinensis:
AVALIAÇÕES IN VITRO E IN VIVO [manuscrito] / Cassio Nazareno
Silva da Silva. - 2024.
XV, 105 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Karla de Aleluia Batista; co-orientadora
Dra. Maria Carolina Bezerra Di medeiros Leal.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2024.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. d-limoneno. 2. nanoprecipitação. 3. atividade anti-hipertensiva. 4.
estresse oxidativo. 5. nefroproteção. I. Batista, Karla de Aleluia, orient.
II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 126 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que confere a **Cassio Nazareno Silva da Silva** o título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de concentração em Bioquímica e Genética.

Aos vinte e sete dias do mês de setembro de 2024, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “POTENCIAL BIOATIVO DE NANOPARTÍCULAS DE PEJU ACETILADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE Citrus sinensis: AVALIAÇÕES IN VITRO E IN VIVO”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientadora, Professora Doutora Karla de Aleluia Batista (IFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Maria Carolina Bezerra Di Medeiros Leal, coorientadora; Professor Doutor Carlos Henrique Xavier Custódio (ICB - UFG), membro titular interno; Professor Doutor Ricardo Neves Marreto (FF - UFG), membro titular externo; Professora Doutora Fernanda Cristina Alcantara dos Santos (ICB - UFG), membro titular interno; Professor Doutor Gustavo Rodrigues Pedrino (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a argüição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Karla de Aleluia Batista, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e sete dias do mês de setembro de 2024.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Karla de Aleluia Batista**, **Usuário Externo**, em 11/11/2024, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARIA CAROLINA BEZERRA DI MEDEIROS LEAL**, **Usuário Externo**, em 11/11/2024, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Xavier Custodio**, **Professor do Magistério Superior**, em 12/11/2024, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Cristina Alcantara Dos Santos**, **Professora do Magistério Superior**, em 13/11/2024, às 09:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Rodrigues Pedrino**, **Professor do Magistério Superior**, em 25/11/2024, às 08:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Neves Marreto, Professor do Magistério Superior**, em 25/11/2024, às 09:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4961701** e o código CRC **13B61521**.

Referência: Processo nº 23070.048671/2024-17

SEI nº 4961701

AGRADECIMENTO

À prof.^a Dr.^a Karla de Aleluia Batista pela orientação, paciência e principalmente, por ter aceitado o desafio de me orientar em uma área completamente nova para ambos, mas orientou como se trabalhasse com isso a anos, o que mostra a dedicação com que ela dirigiu essa orientação.

Agradeço aos meus pais, que sempre fizeram dos meus sonhos os deles, agradeço a minha irmã por toda a ajuda, companheirismo e companhia ao longo desses anos. Agradeço a minha esposa, por todo amor, parceria e por ser minha “cúmplice” em absolutamente tudo, e minha filha Júlia, que embora tão nova, me ensina tanto todos os dias. Sou completamente agradecido por poder acompanhar cada passo dela.

A prof.^a Dr.^a Kátia Flávia por todo o ensinamento que tem me transmitido desde a iniciação científica, além de todo carinho e preocupação que sempre demonstrou.

A prof.^a Dr.^a Maria Carolina, pela coorientação e imensa contribuição científica, além da amizade ao longo de toda minha trajetória científica.

Aos amigos do Laboratório de Química de Polímeros (ICB-UFG), em especial ao Guilherme Ananias por toda ajuda ao longo desse trabalho e ao prof. Dr. Maurício Vicente Cruz, pela amizade, companheirismo e cuidado comigo ao longo de toda minha trajetória científica.

Ao prof. Dr. Carlos Henrique Xavier pela amizade, ensinamentos e confiança, cuja colaboração foi essencial para a execução desse trabalho. Agradeço também aos amigos do laboratório de Neurobiologia de Sistemas (ICB-UFG), em especial a Jhulle, Isabel e Hannyele.

A Dr.^a Juliana Vila Verde Ribeiro, pela amizade, paciência e disposição em me ajudar na execução desse trabalho.

A prof.^a Dr.^a Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, por ter acreditado e apoiado o trabalho, suas contribuições e expertise deram um salto de qualidade nessa pesquisa. Aproveito para agradecer aos amigos do Laboratório de Microscopia Aplicada a Reprodução (ICB-UFG), em especial a Jane e Yohanny, que tiveram a paciência e disponibilidade para transmitir seus conhecimentos.

Agradeço também a CAPES pelo financiamento, sem o qual não seria possível a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	VII
RESUMO	X
ABSTRACT	XIII
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS	1
1.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	4
1.3 POTENCIAL BIOATIVO DE NANOPARTÍCULAS	5
1.4 POTENCIAL ANTI-HIPERTENSIVO	6
1.5 HIPÓTESES DO ESTUDO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 METODOLOGIA.....	11
3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	11
3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DE GOMA DE CAJUEIRO (PEJU)	11
3.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	12
3.3.1 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PEJU ^{ac} CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. sinensis</i>	12
3.3.2 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	13
3.3.3 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA.....	13
3.3.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	13
3.3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	14
3.3.6 CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	14

3.3.6.1	CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	14
3.3.6.2	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	14
3.3.6.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOPROTETOR FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO ENSAIO MTT	16
3.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA EM MODELO ANIMAL	16
3.4.1	ANIMAIS.....	16
3.4.2	AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DUODENAL DAS NANOPARTÍCULAS ..	17
	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAI.....	18
3.4.3	PLETISMOGRAFIA DE CAUDA.....	19
3.4.4	ESTUDOS DA FUNÇÃO RENAL	20
3.4.5	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA TECIDUAL	21
3.4.5.1	NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)	21
3.4.5.2	ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	21
3.4.5.3	ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)	21
3.4.6	PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	22
3.4.7	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	22
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4	RESULTADOS	24
4.1	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	24
4.2	CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
4.3	AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	29
4.4	EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAI	30
4.4.1	EFEITO NA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS).....	30
4.4.2	EFEITO NOS PARÂMETROS METABÓLICOS	32
4.4.3	EFEITO NO METABOLISMO URINÁRIO	37
4.4.4	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO TECIDO HEPÁTICO E RENAL	39
4.4.5	EFEITO NA HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO E RINS	41
5	DISCUSSÃO	46

5.1	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PEJUac@OE.....	46
5.2	CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	48
5.3	ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PEJUac@OE	49
5.4	EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS, OXIDATIVOS E HISTOPATOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL NÃO ENCAPSULADO E DAS NANOPARTÍCULAS DE PEJUac@OE.....	51
6	CONCLUSÕES	57
7	PERSPECTIVAS.....	58
8	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXO 1 – Artigo submetido à revista European Food Research and Technology (Qualis CAPES – A2)	72
	ANEXO 2 – Parecer da comissão de ética no uso de animais (CEUA-UFG).....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEJU	Polissacarídeo extraído da goma do cajueiro
mRNA	do inglês, <i>messenger ribonucleic Acid</i>
DCV	Doenças cardiovasculares
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
PA	Pressão arterial
PEJUac	Polissacarídeo extraído da goma do cajueiro acetilado
OE	Óleo essencial
SHR	do inglês, <i>Spontaneously hypertensive rat</i>
PAS	Pressão arterial sistólica
CICr	<i>Clearance</i> de creatinina
RFG	Ritmo de filtração glomerular
LPO	Peroxidação lipídica
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
MDA	Malondialdeído
BSA	Albumina bovina sérica
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
TNF α	do inglês, <i>Tumor necrosis factor α</i>
FTIR	do inglês, <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
DLS	do inglês, <i>Dynamic light scattering</i>
EE	Eficiência de encapsulação
CC	Capacidade de carga
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
TGI	Trato gastrointestinal
eNOS	do inglês, <i>Endothelial nitric oxide synthase</i>

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Composição percentual do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	24
Figura 1. Esquema representativo da estrutura química do limoneno.....	3
Figura 2. Sequência experimental para avaliação do potencial citotóxico do óleo essencial livre e encapsulado em nanopartículas de PEJUac sobre células endoteliais humanas da linhagem EA.hy 926.....	15
Figura 3. Sequência experimental para avaliação do potencial citoprotetor do óleo essencial livre e encapsulado em nanopartículas de PEJUac sobre células endoteliais humanas submetidas à estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio.....	16
Figura 4. Esquema representando a proposta metodológica dos ensaios em modelo animal para avaliação dos efeitos cardiometabólicos e renais do tratamento com óleo essencial de <i>C.sinensis</i> encapsulado (PEJUAc@OE) e não encapsulado (OE) em animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR).....	19
Figura 5. Espectro de FTIR do polissacarídeo de goma de cajueiro antes (PEJU) e após a modificação química por acetilação (PEJUac).....	24
Figura 6. Espectro de RMN ¹³ C do PEJU e do PEJUac em DMSO deuterado.....	25
Figura 7. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PEJUac contendo óleo essencial encapsulado.....	26
Figura 8. Micrografia de transmissão das nanopartículas de PEJUac@OE.....	27
Figura 9. Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>C.sinensis</i> não encapsulado e encapsulado em nanopartículas de PEJUac em células endoteliais humanas pelo ensaio MTT.....	27
Figura 10. Avaliação do potencial citoprotetor pré-tratamento do óleo essencial de <i>C.sinensis</i> não encapsulado e encapsulado em nanopartículas de PEJUac através do ensaio MTT frente ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio.....	28
Figura 11. Características ultraestruturais dos enterócitos que revestem a região inicial do duodeno de ratos SHR.....	30
Figura 12. Efeito do OE e das nanopartículas de PEJUac@OE sobre a pressão arterial sistólica dos ratos normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR).....	32

- Figura 13.** Comparação do peso corporal (a) e peso do tecido adiposo (b) entre os animais normotensos e hipertensos submetidos a tratamento crônico com OE e PEJUac@OE.....33
- Figura 14.** Comparação da massa de ração ingerida e quantidade de fezes excretadas entre os animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), amostrada 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹.....33
- Figura 15.** Comparação do volume de água ingerido e volume de urina excretada por peso de animal em 24h entre os animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), amostrada 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹.....34
- Figura 16.** Comparação da concentração de sódio plasmático e urinário entre os animais normotensos e hipertensos, medidas a partir de urina e sangue coletados 24h após a última administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹.....35
- Figura 17.** Comparação da concentração de potássio plasmático (a) e urinário (b) entre os animais normotensos e hipertensos, medidas a partir de urina e sangue coletados 24h após a última administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹.....35
- Figura 18.** Comparação da concentração de proteínas totais no plasma (a) e na urina (b) entre os animais normotensos e hipertensos, determinadas a partir de urina e sangue coletados 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹.....36
- Figura 19.** Comparação da concentração ácido úrico no plasma e na urina entre os animais normotensos e hipertensos, determinadas a partir de urina e sangue coletados 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹.....37
- Figura 20.** Comparação da concentração de creatinina plasmática creatinina urinária, ureia plasmática e ureia urinária entre os animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue coletados 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹.....38
- Figura 21.** Comparação do *clearance* de creatinina (a) e *clearance* de ureia (b), entre os animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹.....39

Figura 22. Avaliação de marcadores oxidativos e atividade antioxidante enzimática no tecido hepático: efeitos do OE e das nanopartículas de PEJUac@OE na peroxidação lipídica, efeitos do OE e das nanopartículas de PEJUac@OE na atividade enzimática da enzima superóxido dismutase (SOD) e efeitos do OE das e nanopartículas de PEJUac@OE na atividade enzimática da enzima catalase (CAT).....	40
Figura 23. Avaliação de marcadores oxidativos e atividade antioxidante enzimática no tecido renal: efeitos do OE e das nanopartículas de PEJUac@OE na peroxidação lipídica, efeitos do OE e das nanopartículas de PEJUac@OE na atividade enzimática da enzima superóxido dismutase (SOD) e efeitos do OE e das nanopartículas de PEJUac@OE na atividade enzimática da enzima catalase (CAT).....	41
Figura 24. Aspectos morfológicos do fígado e rim corados pelo método da hematoxilina-eosina.....	43
Figura 25. Imuno-histoquímica para TNF α do fígado e rim. Contracoloração pela hematoxilina.....	45
Figura 26. Quantificação das áreas positivas para TNF α no tecido hepático	46
Figura 27. Esquema representando os efeitos de repulsão eletrostática e impedimento estérico presentes nas nanopartículas de PEJUac@OE.....	48

RESUMO

O óleo essencial de *Citrus sinensis* é composto por uma mistura terpenoídica constituída majoritariamente por *d*-limoneno, e possui diversas atividades biológicas descritas na literatura, como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e antiarrítmica. No entanto, ainda é pouco utilizado como composto terapêutico pela indústria farmacêutica em função das limitações que possui, como baixa solubilidade em água, suscetibilidade a processos oxidativos e baixa absorção no trato gastrointestinal. Uma alternativa para mitigar os problemas do óleo essencial de *C. sinensis* é a encapsulação em nanopartículas poliméricas, uma vez que apresentam capacidade de melhorar a biodisponibilidade do princípio ativo, conferindo proteção da molécula contra degradação no trato gastrointestinal e permitindo uma liberação controlada do ativo, com redução da sua degradação e depuração em sistemas biológicos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo nanoencapsular o óleo essencial de *C. sinensis* em polissacarídeo extraído da goma do cajueiro acetilado como matriz polimérica (PEJUac@OE) e avaliar o potencial biológico do nanossistema obtido. As nanopartículas foram produzidas por nanoprecipitação e caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação do óleo essencial, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e morfologia por microscopia eletrônica de transmissão. Antes da realização do potencial funcional das nanopartículas de PEJUac@OE foi avaliado a segurança toxicológica dos nanomateriais por meio de testes de citotoxicidade celular. Os resultados do ensaio MTT demonstraram que, nas concentrações avaliadas, as nanopartículas de PEJUac@OE não apresentam citotoxicidade. Além disso, as nanopartículas produzidas foram eficientes em proteger as células endoteliais contra o estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio. Considerando a segurança toxicológica e o potencial antioxidante das nanopartículas produzidas, testes de absorção gastrointestinal foram realizados para avaliar se o nanossistema produzido conseguiria ser absorvido. A análise do tecido intestinal por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) evidenciou a presença de corpos vesiculares característicos de internalização celular, evidenciando a absorção do nanossistema. Além disso, foi observado o alargamento dos espaços intercelulares, o que sugere que as nanopartículas de PEJUac@OE também podem ser absorvidas pela via paracelular. Uma vez que as

partículas são absorvidas eficientemente no trato digestivo, testou-se o potencial biológico do óleo essencial e das nanopartículas de PEJUac@OE utilizando-se modelo animal, avaliando-se o efeito dos tratamentos em modelo de hipertensão. A atividade anti-hipertensiva foi avaliada utilizando-se ratos normotensos da linhagem Wistar e ratos espontaneamente hipertensos da linhagem SHR tratados durante 30 dias com óleo essencial livre (OE) ou nanopartículas de PEJUac@OE. Durante o tratamento, a pressão arterial sistólica foi acompanhada semanalmente por pletismografia de calda e ao final do tratamento os animais foram alojados em gaiolas metabólicas para avaliação de consumo de água e ração e excreção de urina e fezes. A fim de avaliar o efeito cardiometabólico dos tratamentos, testes bioquímicos e avaliações histopatológicas foram realizadas. O plasma e a urina foram avaliados quanto aos níveis de creatinina, ureia, ácido úrico, proteínas totais, sódio e potássio. Os tecidos hepático e renal foram avaliados quanto às suas características histopatológicas e imuno-histoquímicas. Os resultados evidenciaram que as nanopartículas de PEJUac@OE foram eficazes em encapsular o óleo essencial de *C.sinensis*, apresentando eficiência de encapsulação de 75,18%, e diâmetro hidrodinâmico de 161 nm. O índice de polidispersão foi de 0,141, o que caracteriza o material como monodisperso, com valores de potencial zeta igual a -19,17 mV, sendo a carga negativa atribuída às características intrínsecas na molécula de PEJUac. Após o final do tratamento com OE na dose de 75 mg/kg observou-se um efeito hipotensor nos ratos da linhagem Wistar e um efeito anti-hipertensivo nos ratos da linhagem SHR. Além disso, o tratamento com as nanopartículas de PEJUac@OE (75mg/kg de ativo) também foi eficaz na apresentação de efeito anti-hipertensivo nos animais SHR. Na análise dos parâmetros renais, ambos os tratamentos apresentaram natriurese sem alteração nos níveis plasmáticos de sódio, sugerindo melhora na função renal. Também foi observado um aumento do *Clearance* de creatinina e ureia nos animais SHR tratados com as nanopartículas de PEJUac@OE, demonstrando a importância do nanomaterial na melhora da taxa de filtração glomerular. Quanto aos parâmetros bioquímicos teciduais, foi observado uma redução da peroxidação lipídica no tecido renal e hepático dos animais tratados com as nanopartículas de PEJUac@OE. No que se refere às vias enzimáticas de combate ao estresse oxidativo, tanto o tratamento com OE quanto com as nanopartículas de PEJUac@OE foram eficazes em aumentar a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no rim e fígado de animais hipertensos. Por fim, os achados da imuno-histoquímica evidenciaram um efeito mais

acentuado das nanopartículas de PEJUac@OE na diminuição dos níveis de TNF α hepático e renal de animais SHR, evidenciando o potencial anti-inflamatório do nanossistema. Dessa forma, os resultados obtidos até o presente momento evidenciam que a metodologia proposta de produção de nanopartículas foi eficiente, e que a nanoencapsulação melhorou o potencial bioativo do OE de *Citrus sinensis*, apresentando absorção no trato gastrointestinal, além de efeitos anti-hipertensivo, anti-inflamatório, nefroprotetor e hepatoprotetor.

Palavras-Chave: *d*-limoneno; nanoprecipitação; atividade anti-hipertensiva; estresse oxidativo; nefroproteção; atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

The essential oil of *Citrus sinensis* is a terpenoid mixture mainly composed of d-limonene and exhibits several biological activities described in the literature, including anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, and antiarrhythmic properties. However, it is still underutilized as a therapeutic compound by the pharmaceutical industry due to its limitations, such as low water solubility, susceptibility to oxidative processes, and poor absorption in the gastrointestinal tract. An alternative to mitigate these issues is the encapsulation of *C. sinensis* essential oil in polymeric nanoparticles, as they have the potential to improve the bioavailability of the active ingredient, protect the molecule from degradation in the gastrointestinal tract, and allow controlled release, reducing its degradation and clearance in biological systems. Thus, the present study aimed to nanoencapsulate *C. sinensis* essential oil (EO) using acetylated polysaccharides extracted from cashew gum as the polymeric matrix (acCGP@EO) and to evaluate the biological potential of the produced nanosystem. The nanoparticles were produced by nanoprecipitation and evaluated regarding their encapsulation efficiency, hydrodynamic diameter, polydispersity index, zeta potential, and morphology using transmission electron microscopy. Considering the purpose of testing the acCGP@EO in animal models, we first evaluate the cellular toxicity through the MTT assay. Results evidenced that the EO and acCGP@EO did not show baseline cytotoxicity at the tested concentrations, evidencing the safety of the non-nanostructured EO and the produced acCGP@EO nanoparticles. Also, the acCGP@EO nanoparticles protected cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. After demonstrating the non-cytotoxicity and the cytoprotective potential of the produced nanoparticles, it was evaluated if this nanosystem could be absorbed into the gastrointestinal system. Results evidenced the presence of voluminous multivesicular bodies in the enterocyte's periapical cytoplasm, suggesting an increase in the absorptive capacity of these cells. Furthermore, a significant enlargement of the apical intercellular space was observed, indicating a possible absorption of acGCP@EO nanoparticles via paracellular transport. The biological potential of the produced acCGP@EO nanoparticles was assessed by evaluating their effect in an animal model of hypertension. The antihypertensive activity was assessed using normotensive Wistar rats and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) treated for 30 days with free

essential oil or acCGP@EO in a dosage of 75 mg/kg. During treatment, the systolic blood pressure was monitored weekly by tail-cuff plethysmography. At the end of the treatment, water and food intake, as well as urine and feces excretion, were evaluated. Biochemical and histopathological tests were conducted to evaluate the cardiometabolic effect of the treatment. To assess the nephroprotective potential of the treatments, plasmatic and urinary levels of creatinine, urea, uric acid, total proteins, sodium, and potassium were measured. Hepatic and renal tissues were also analyzed in terms of their histopathological and immunohistochemical characteristics. The results demonstrated that the acCGP@EO nanoparticles effectively encapsulated the essential oil from *C. sinensis*, achieving an encapsulation efficiency of 75.18% and a hydrodynamic diameter of 161 nm. The polydispersity index was found to be 0.141, indicating a monodisperse nanosystem. The zeta potential was -19.17 mV, indicating a negative superficial charge that is attributed to the intrinsic characteristics of the acCGP molecule. Results from systolic blood pressure evidenced that EO and acCGP@EO had significant anti-hypertensive effects. The analysis of the plasma and urinary metabolites evidenced that EO and acCGP@EO nanoparticles promoted natriuresis without altering the plasmic levels of sodium, suggesting improvement of renal function. Results also evidenced a recovery of the glomerular filtration rate in the SHR animals treated with accGP@EO, confirmed by increased creatinine and urea clearance. This result highlights the best performance of the nanosystem compared to the non-nanostructured EO. The treatment with acCGP@EO nanoparticles was also efficient in reducing the lipidic peroxidation in the kidney and liver tissues. Treatment with EO and acCGP@EO nanoparticles was also efficient in increasing superoxide dismutase and catalase activity in the kidney and liver tissues of the SHR animals. Immunohistochemistry findings indicated a more pronounced anti-inflammatory effect of acCGP@EO nanoparticles in reducing hepatic and renal TNF α levels in SHR animals, demonstrating the nephroprotective and hepatoprotective potential of the produced nanoparticles. Altogether, results demonstrate that the proposed nanoparticle production methodology was effective, and the nanoencapsulation improved the bioactive potential of essential oil from *Citrus sinensis*, promoting absorption in the gastrointestinal tract, as well as antihypertensive, anti-inflammatory, nephroprotective, and hepatoprotective effects.

Keywords: d-limonene; nanoprecipitation; anti-hypertensive effect; oxidative stress; nephroprotective effect; anti-inflammatory effect.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

A hipertensão arterial, também conhecida como pressão alta, é uma condição comum que afeta muitas pessoas em todo o mundo. Se não for tratada, pode levar a problemas graves de saúde, como doenças cardíacas, acidentes vasculares cerebrais e problemas renais. Nossa pesquisa está focada no estudo do óleo essencial da casca de laranja, que é rico em um composto natural chamado limoneno. Durante o desenvolvimento do trabalho, testamos o efeito do óleo essencial em sua forma natural e encapsulado em nanopartículas para tratar a hipertensão e suas complicações.

Já sabemos que óleo essencial de casca de laranja possui diversos benefícios para a saúde. No entanto, existem alguns problemas relacionados à rapidez na evaporação do óleo e fácil degradação que diminuem seus efeitos benéficos no organismo. Nesse caso, buscamos protegê-lo em nanopartículas para verificarmos se seus efeitos benéficos ao organismo são melhorados. Encapsular o óleo essencial em nanopartículas significa envolver pequenas gotas do óleo em uma capa especial que ajuda a liberar o óleo essencial lentamente no corpo, aumentando assim sua eficácia e reduzindo possíveis efeitos colaterais.

O óleo essencial nanoencapsulado foi utilizado para tratar ratos hipertensos, onde foi demonstrado a eficácia na redução da pressão arterial, o que é crucial para prevenir doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais.

Nosso estudo também demonstrou que o óleo essencial pode proteger os rins, melhorando seu funcionamento, isto é, melhora a capacidade dos rins em filtrar o sangue, produzir urina e eliminar compostos que não são mais necessários no organismo. Isso é especialmente importante para pessoas com hipertensão, que muitas vezes desenvolvem problemas renais onde os rins não conseguem mais eliminar de forma correta diversos compostos.

Essa pesquisa tem grande potencial para melhorar a qualidade de vida de muitas pessoas. Com um tratamento mais eficaz e seguro para a hipertensão, as pessoas podem ter menos complicações de saúde, viver mais tempo e com melhor qualidade de vida. Além disso, usar um composto natural como o óleo essencial de casca de laranja pode ser uma opção mais acessível e com menos efeitos

indesejáveis que são frequentemente observados em muitos medicamentos tradicionais.

Nossa pesquisa com o óleo essencial nanoencapsulado representa um avanço promissor no tratamento da hipertensão arterial e suas complicações. Ao ajudar a controlar a pressão arterial e proteger os rins, podemos proporcionar uma vida mais saudável e com mais qualidade para muitas pessoas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são produtos odorantes, geralmente de composição complexa, obtidos a partir de uma matéria-prima vegetal definida botanicamente, por condução de vapor de água, por destilação a seco ou por um método mecânico adequado sem aquecimento. Um óleo essencial é geralmente separado da fase aquosa por um método físico que não leva mudanças significativas em sua composição química (1).

Estes compostos são biosintetizados como metabólitos secundários em diferentes órgãos vegetais, como flores, ervas, brotos, folhas, frutas, galhos, cascas, sementes, madeira, rizoma e raízes (2). Devido à sua natureza hidrofóbica e sua densidade frequentemente inferior à da água, são geralmente lipofílicos, solúveis em solventes orgânicos e imiscíveis com a água, podendo ser separados da fase aquosa por decantação (3).

As plantas que produzem óleos essenciais são normalmente chamadas de plantas aromáticas, e representam 10% das espécies de vegetais conhecidas (2, 4). Os óleos essenciais representam uma pequena fração da composição vegetal (cerca de 5% da matéria seca vegetal) e embora o papel específico da maioria das moléculas envolvidas permaneça desconhecido, sabe-se que esses compostos desempenham funções abióticas importantes, como na relação da planta com a luz, temperatura, correntes de ar, níveis de dióxido de carbono (CO₂) e níveis de ozônio (O₃), bem como papéis bióticos, como competidores (interespecíficos e intraespecíficos), combate de patógenos, além de atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes (5-8).

Na planta, os mecanismos químicos de defesa, onde os óleos essenciais estão inseridos, são divididos em constitutivos e induzíveis. Os óleos essenciais constitutivos são expressos independente de estímulos externos e são compostos principalmente de terpenóides, possuindo como funções a redução do estresse abiótico, alelopatia, defesa contra herbivoria e microrganismos patogênicos e atração de polinizadores e dispersores de sementes (5, 9). Os óleos essenciais constitutivos atuam sobre herbívoros principalmente repelindo-os diretamente e/ou inibindo sua alimentação. Eles também agem contra patógenos microbianos inibindo seu

crescimento por meio de atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas diretas, além de repelir vetores virais, como pulgões (9).

Os óleos essenciais induzíveis são ativados por ataques de patógenos ou herbívoros, e embora possuem custos metabólicos elevados, tornam a planta fenotipicamente plástica, além de diminuir a possibilidade de adaptação dos patógenos. Possuem como função a redução do estresse abiótico, defesa contra herbívoros e microrganismos e alelopatia (6).

Devido aos efeitos biológicos dos óleos essenciais, diversas plantas aromáticas têm sido utilizadas como conservantes, agentes curativos e fonte de aroma e sabor, sendo os variados efeitos biológicos atribuídos não apenas aos seus compostos principais, mas também aos fortes efeitos de sinergismo dos diferentes componentes dos óleos essenciais (10). Em função da diversidade de efeitos biológicos possíveis, os óleos essenciais têm sido largamente utilizados na indústria farmacêutica principalmente para aromaterapia e para melhorar as propriedades sensoriais de medicamentos. Além disso, diferentes sistemas tradicionais utilizam óleos essenciais para tratamento de diversas patologias, como óleo de eucalipto no tratamento de bronquite e tosse, óleo de sálvia e cravo como agente antimicrobiano e óleo de hortelã-pimenta no combate a problemas respiratórios. Vários estudos também evidenciam a sua potente atividade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica e capacidade de atuar como doador de hidrogênio (10-13). Becker e colaboradores (14) evidenciaram o efeito antioxidante de linalol e óleo essencial de *Lippia alba* no camarão perna branca do pacífico, onde os grupos tratados com linalol e *L. alba* apresentaram aumento da capacidade antioxidante total, diminuição da peroxidação lipídica, aumento da atividade da glutathione redutase e diminuição da concentração de grupos sulfidril associados à proteínas.

O óleo essencial de *Citrus sinensis* é extraído da casca da laranja, e sua composição varia de acordo com a região e o método de extração. De modo geral, os principais constituintes desse óleo são os monoterpenos hidrocarbonados (87,5% - 99,39%), monoterpenos oxigenados (0,4% - 5,51%), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (0,18% - 0,70%) e sesquiterpenos oxigenados (0,18% - 0,22%). Dentre as diferentes classes de terpenóides presentes no óleo essencial de *C. sinensis*, o componente majoritário é o monoterpeno limoneno (Figura 1) (15), que possui diversas atividades terapêuticas, como atividade anti-inflamatória (16),

antioxidante (17, 18), anticâncer (19, 20), antibacteriana (21), antiviral (22, 23), antinociceptiva (24), cardioprotetora (25) e antiarrítmica (26, 27).

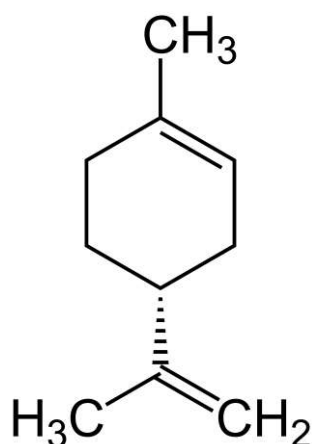


Figura 1. Esquema representativo da estrutura química do limoneno.

Murali e colaboradores (17) evidenciaram o efeito protetor do *d*-limoneno na peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, onde os animais tratados com *d*-limoneno apresentaram redução nos níveis de subprodutos da peroxidação lipídica, aumento na atividade de superóxidos dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além da prevenção a depleção de glutathione, vitamina C e vitamina E, mostrando o papel do terpenóide na manutenção dos parâmetros antioxidantes.

No entanto, a aplicação do óleo essencial de *C. sinensis* ainda é pouco utilizada como um composto terapêutico pela indústria farmacêutica em função de limitações associadas à manutenção da atividade biológica e estabilidade do ativo em formulações. Além da baixa solubilidade em água, os óleos essenciais podem apresentar sensibilidade a processos oxidativos e possuir baixa absorção no trato gastrointestinal (28), o que faz premente a busca por alternativas biotecnológicas que possibilitem melhorar as propriedades absorptivas, de estabilidade e de biodistribuição desses óleos para que seu potencial terapêutico possa ser utilizado em totalidade.

Uma alternativa para melhorar a performance do óleo essencial de *C. sinensis* como composto bioativo é a sua encapsulação em nanopartículas, uma vez que a encapsulação pode aumentar sua estabilidade e biodisponibilidade, proporcionar uma liberação controlada, garantindo níveis terapêuticos constantes e prolongando a ação do limoneno, além da melhoria na palatabilidade e aceitação do paciente, uma vez

que o composto tem um sabor cítrico forte que pode ser desagradável em doses terapêuticas (29-31). Os nanossistemas são uma alternativa interessante para viabilizar o uso de óleos essenciais na indústria, e, nesse cenário, as nanopartículas poliméricas têm ganhado importância como sistema de liberação por serem acessíveis para funcionalização e apresentarem capacidade de liberar compostos encapsulados a uma taxa controlada (32-35).

1.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas têm sido amplamente estudadas como carreadoras de moléculas bioativas, se destacando como uma ferramenta para melhorar a biodisponibilidade do ativo e prolongar sua liberação, além de possibilitar a redução da toxicidade sistêmica e melhora dos parâmetros farmacocinéticos, aumentando a concentração do ativo na biofase e permitindo assim a utilização de doses menores com efetividade terapêutica (36).

Dentre os materiais que podem ser utilizados para a produção de nanopartículas poliméricas, destacam-se os polímeros biodegradáveis, como a celulose, polietilenoglicol, poli (ácido lático-co-glicólico), quitosana e o polissacarídeo extraído da goma do cajueiro (PEJU), por serem biocompatíveis, pouco imunogênicos e apresentarem versatilidade quanto às possibilidades de modificações químicas (36, 37).

O PEJU é um heteropolissacarídeo ramificado isolado da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*), que tem atraído atenção como nanocarreador por ter como origem uma fonte renovável, ser biocompatível, e apresentar alta versatilidade química, em função da grande quantidade de ramificações e grupamentos passíveis de serem modificados quimicamente (38-41).

Embora o PEJU seja um polissacarídeo hidrofílico, sua utilização como carreador de moléculas hidrofóbicas tem sido extensivamente estudada nos últimos anos, e seu potencial em encapsular tais moléculas é grandemente aumentado pela hidrofobização do polissacarídeo por reações de carboximetilação, acetilação e ftalação (41). Dentre as possibilidade de modificação química, a acetilação se apresenta como uma alternativa interessante para a utilização do PEJU como

carreador de moléculas hidrofóbicas e diversos trabalhos têm demonstrado a eficiência do PEJU acetilado em encapsular e liberar anfotericina B (42), diclofenaco dietilamônio (43), epiisopiloturina (44), licopeno (45) e mesalazina (46). Frente aos relatos da literatura, o PEJU acetilado apresenta-se como um candidato potencial para a encapsulação de óleos essenciais, como o óleo essencial de *C. sinensis*.

1.3 POTENCIAL BIOATIVO DE NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas são veículos promissores para entrega eficiente e sítio-dirigida de ativos no local de ação desejado, pois seu tamanho em escala nanométrica permite que elas entrem em compartimentos biológicos e acessem seus alvos de forma mais efetiva do que o ativo não encapsulado (47). As nanopartículas são projetadas para desempenhar uma infinidade de funções, sendo possível ajustar tamanho, forma, capacidade de carga e propriedades de superfície (48). Duas das vacinas contra a COVID-19 de maior sucesso utilizam nanopartículas lipídicas para entrega do mRNA às células alvo, ao mesmo tempo que protegem a molécula da degradação pelo organismo (49). Na nanomedicina do câncer, nanopartículas são desenvolvidas para entrega de quimioterápicos a tumores sólidos de forma específica, reduzindo a toxicidade em células saudáveis e aumentando a dose do medicamento na biofase, aumentando assim a eficácia terapêutica (50).

No entanto, para se estruturar adequadamente um nanomaterial para que ele possua eficiência e entrega de ativos, deve-se levar em consideração alguns parâmetros importantes, como a especificidade do material pelo local de ação, o que torna a entrega sítio dirigida, se a liberação acontece de forma controlada, o que aumenta o tempo da janela terapêutica da formulação, e a proteção do ativo contra degradação no trato gastrointestinal e depuração sanguínea (51).

A entrega sítio dirigida de fármacos pode ser dividida em entrega direcionada passiva e entrega direcionada ativa (52). A entrega direcionada passiva acontece quando a especificidade se dá unicamente por características do local de ação. Esse tipo de entrega é muito comum no tratamento de tumores, pois o local apresenta maior permeação, maior acidez e maior temperatura, permitindo assim que seja desenvolvido uma nanomaterial que irá liberar o princípio ativo encapsulado nesse ambiente em maior concentração. Já a entrega direcionada ativa se dá pela interação

química da nanoformulação com o local de ação, onde utiliza-se processos de funcionalização das nanopartículas, normalmente utilizando anticorpos, receptores ou antígenos específicos da biofase, o que proporciona um maior acúmulo do nanomaterial no local e conseqüente aumento do fármaco no seu local de ação (53).

As nanopartículas, em especial as nanopartículas poliméricas, possuem a capacidade de liberar o princípio ativo de maneira controlada, permitindo um aumento do tempo de janela terapêutica. Essa característica deve-se ao fato da capacidade de entumescimento de alguns polímeros, permitindo um afrouxamento das cadeias poliméricas de forma lenta, com conseqüente liberação retardada do conteúdo do seu interior. Dependendo do material formador da matriz do nanomaterial, ele também pode ser degradado pelas enzimas presentes no local de ação, fazendo com que o princípio ativo seja liberado numa taxa controlada (36, 51).

As nanoformulações também se apresentam como uma alternativa interessante na proteção do fármaco contra degradação e depuração, principalmente quando se utiliza a via oral. A via oral é a forma mais comum de administração de compostos terapêuticos em função da facilidade de administração, segurança, maior adesão do paciente, além do preparo das formulações serem mais econômicos e fáceis de serem fabricados em larga escala (54). No entanto, apesar das vantagens de se administrar compostos utilizando a via oral, a produção de formulações destinadas à administração oral enfrenta muitos desafios, como solubilidade limitada em água de alguns fármacos, baixa permeabilidade intestinal, além da baixa estabilidade química de alguns fármacos no ambiente gastrointestinal, transportadores de efluxo e enzimas metabólicas como o citocromo P450 (CYP3A4) (55). Dessa forma, as nanopartículas são uma alternativa promissora para contornar esses gargalos, uma vez que possuem a capacidade de proteger o fármaco do ambiente extremo do trato gastrointestinal, melhorar a permeação intestinal e proteger do metabolismo pré-sistêmico por diferentes enzimas presentes no trato gastrointestinal (56).

1.4 POTENCIAL ANTI-HIPERTENSIVO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte de todo o mundo, sendo a pressão arterial descontrolada um fator de risco significativo para o

desenvolvimento de DCV. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a doença cardiovascular mais comum e constitui um dos principais problemas de saúde pública mundial em função de sua alta prevalência e capacidade de comprometimento fisiológico do organismo (57). A HAS é uma condição clínica caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, e está frequentemente associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (58).

Das quase 1,4 bilhões de pessoas em todo o mundo com hipertensão, apenas 14% conseguem mantê-la dentro da faixa fisiológica normal (59). Os estágios iniciais da hipertensão não apresentam sintomas clínicos específicos, mas quando não controlados, os portadores correm maior risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca, doença arterial coronária, angina, infarto do miocárdio, trombose e hemorragia cerebral, colocando em risco o comprometimento de órgãos como coração, cérebro e rim (59, 60).

O potencial debilitante dessa patologia faz com que seja mandatória a busca por alternativas terapêuticas e não terapêuticas que auxiliem não só na redução da pressão arterial, mas também contribuam para mitigar os danos estruturais e metabólicos associados ao desenvolvimento da HAS. Recomenda-se que o tratamento farmacológico seja aplicado se as intervenções no estilo de vida não forem suficientes para controlar a pressão arterial elevada (61). Medicamentos anti-hipertensivos comerciais, como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores dos receptores de angiotensina, bloqueadores dos canais de cálcio, β -bloqueadores e diuréticos, apresentam efeitos positivos de redução da pressão arterial isoladamente ou em terapia combinada (62). No entanto, essas drogas sintéticas apresentam efeitos colaterais, como distúrbios do paladar, tosse, dor de cabeça e tontura (63). Além disso, a necessidade de administração de várias doses ao longo do dia dos medicamentos anti-hipertensivos contribui para a redução da adesão dos pacientes ao tratamento e aumenta a possibilidade do surgimento de complicações ligada a descompasso da pressão arterial. Outra complicação é a prevalência de hipertensão resistente ao tratamento, definida pela PA permanecendo elevada mesmo com o tratamento com 3 classes diferentes de anti-hipertensivos em dosagem ótima ou máxima simultaneamente (64).

Dada a prevalência contínua da hipertensão e inúmeras barreiras no seu tratamento eficaz, novas abordagens são necessárias para melhorar a eficácia das terapias atuais. Nos últimos anos, diversos compostos anti-hipertensivos foram isolados de plantas, e normalmente apresentam maior eficácia e segurança quando comparados com os medicamentos sintéticos existentes no mercado, além de apresentarem potencial de desenvolvimento por serem biocompatíveis e biodegradáveis (65, 66). Nesse cenário, o uso de compostos fitoterápicos com atividade antioxidante pode contribuir para a melhora dos impactos sistêmicos da HAS (57, 67, 68). Dentre as moléculas com atividade antioxidante disponíveis na natureza, os óleos essenciais apresentam diversos benefícios para a saúde humana, podendo agir como moléculas antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, anti-aterogênicas, antitrombóticas, cardioprotetoras e vasorelaxantes (69-72).

Contudo, a maioria dos compostos naturais que apresentam atividade anti-hipertensiva apresenta suscetibilidade oxidativa, sendo facilmente degradados no trato gastrointestinal, diminuindo sua biodisponibilidade. Para contornar essas desvantagens de uso, a encapsulação dessas biomoléculas em nanopartículas tem sido uma alternativa promissora (54, 73-75). A encapsulação não só melhora as características de estabilidade e absorção desses bioativos, mas também contribui para o aumento da concentração do ativo na biofase, redução das taxas de depuração e eliminação via metabolismo de primeira passagem. Nesse sentido, o uso do polissacarídeo da goma de cajueiro (PEJUac) como matriz de encapsulação do óleo essencial de *C. sinenses* poderá melhorar os parâmetros farmacocinéticos e farmacológicos do óleo essencial e melhorar seu potencial terapêutico no tratamento das complicações associadas à HAS.

1.5 HIPÓTESES DO ESTUDO

Considerando o potencial biológico do óleo essencial de *C. sinensis* e as limitações do seu uso em modelos *in vivo*, bem como a capacidade do polissacarídeo extraído da goma do cajueiro (PEJU) em formar nanopartículas, temos como hipóteses do trabalho:

1. A encapsulação do óleo essencial de *C. sinensis* em nanopartículas de PEJUac@OE melhora suas propriedades farmacológicas.

2. Nanopartículas de PEJUac@OE apresentam efeito biológico tipo anti-hipertensivo e citoprotetor.
3. Nanopartículas de PEJUac@OE auxiliam na redução dos efeitos associados ao estresse oxidativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produção, caracterização e avaliação do potencial e anti-hipertensivo e citoprotetor de nanopartículas de PEJUac contendo óleo essencial de *C. sinensis* (PEJUac@OE).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção e caracterização das nanopartículas de PEJUac contendo óleo essencial de *C. sinensis*;
- Avaliação do efeito citotóxico e citoprotetor em cultura de células;
- Avaliação do efeito do óleo essencial encapsulado e não encapsulado na pressão arterial de ratos normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR);
- Avaliação do efeito do óleo essencial e das nanopartículas de PEJUac@OE na função renal em ratos normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR);
- Determinação da atividade de superóxido dismutase e catalase tecidual após o tratamento com óleo essencial encapsulado e não encapsulado em ratos normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR);
- Determinação do efeito do tratamento com óleo essencial e PEJUac@OE na histopatologia do fígado e rim em ratos normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR).

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial (OE) de *C. sinensis* foi gentilmente cedido pela empresa Agroterenas S/A Citrus de Santa Cruz do Rio Pardo, São Paulo, Brasil. A caracterização da composição do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas utilizando cromatógrafo gasoso Shimadzu QP2010 MDGC acoplado a espectrômetro de massas (modelo TQ8030 triplo quadrupolo). Os experimentos foram realizados utilizando-se uma coluna DB5-MS, com o seguinte programa de aquecimento: aquecimento linear a uma taxa de 3 °C por minuto, com início em 60 °C e fim de aquecimento em 230 °C.

3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DE GOMA DE CAJUEIRO (PEJU)

A obtenção do polissacarídeo da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silva e colaboradores (76). O exsudato gomoso foi fragmentado e disperso em água destilada na proporção de 1:5. A dispersão foi mantida sob agitação por 24h e, em seguida, filtrada em nylon para a remoção das impurezas remanescentes. O filtrado foi precipitado com etanol na proporção de 1:3 (v/v) e armazenado a 4 °C por 24h. O polissacarídeo da goma de cajueiro (PEJU) precipitado foi separado por centrifugação (10000 rpm, 10 min, 4 °C) e seco à temperatura ambiente.

Após a secagem, o PEJU foi quimicamente modificado por acetilação (Pitombeira et al., 2015). 1 g de PEJU foi solubilizado em 20 mL de N,N-dimetilformamida e a mistura foi incubada sob agitação por 18h a 50°C. Em seguida, 6 mL de piridina e 15 mL de anidrido acético foram adicionados à mistura e o sistema foi incubado a temperatura ambiente por 24h, sob agitação magnética. Após a incubação, foi adicionado 82 mL de água ao sistema para precipitação do PEJU acetilado (PEJUac). A separação do PEJUac foi realizada por filtração à vácuo, seguida de lavagens exaustiva com água para remoção dos resíduos de piridina, anidrido acético e formamida. Após a lavagem, o material foi centrifugado (10000 rpm, 10min, 4°C), seco em temperatura ambiente (27 °C) e armazenado em frascos de polietileno.

A acetilação foi confirmada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR) e ressonância magnética nuclear (RMN).

Os espectros das amostras foram adquiridos pela técnica de reflexão total atenuada (ATR) no espectrômetro de absorção no infravermelho Bruker Vertex 70, com o acessório PLATINUM ATR UNIT A 225. A amostra foi colocada sobre uma célula de diamante (2 x 2 mm), operando no modo de reflexão simples com um ângulo de interação de 45°. O espectro foi adquirido na faixa espectral de 4000 a 400 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹, sendo cada espectro o resultado da média de 64 medidas. A análise foi realizada no Centro Regional para Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás.

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C do PEJU e do PEJUac foram realizados em um espectrômetro 11.7 Tesla Bruker Avance III (500 MHz para a frequência do hidrogênio), equipado com sonda PBI de 4 mm, utilizando DMSO_{d6} como solvente. A análise foi realizada no Laboratório de Ressonância de Magnética Nuclear (LabRMN) da Universidade Federal de Goiás.

3.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

3.3.1 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PEJUac CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. sinensis*

As nanopartículas de PEJUac contendo óleo essencial de *C. sinenses* foram produzidas utilizando-se a metodologia de nanoprecipitação. A fração hidrofóbica foi composta por 10 mL de acetona contendo 100 mg de PEJUac e 50 µL de óleo essencial de *C. sinenses*. Essa fração foi gotejada em 100 mL de água contendo 117 mg de tween 80 e a mistura foi submetida a uma sonicação de 500 watts durante 5 min. Após a produção das nanopartículas (PEJUac@OE), a acetona foi retirada da nanoemulsão usando concentrador a vácuo (Concentrator PlusTM Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e as nanopartículas foram recuperadas por liofilização (Liotop I101, São Paulo). Partículas sem óleo essencial foram produzidas nas mesmas condições descritas acima para utilização como branco nos experimentos de caracterização.

3.3.2 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação (EE) e a capacidade de carga (CC) das nanopartículas de PEJUac@OE foi avaliada segundo Cheikh e colaboradores (77), com modificações. Inicialmente, foi realizada uma curva analítica do óleo essencial de *C. sinensis* ($r^2=0,996$) no comprimento de onda de máxima absorção (231 nm). Para a quantificação do conteúdo de óleo essencial retido nas partículas, o sobrenadante das formulações foi quantificado em espectrofotômetro UV/VIS (K37-UVVIS Kasvi, São Paulo, SP) no comprimento de onda de 231 nm. As quantificações foram realizadas em triplicada, e a eficiência de encapsulação e capacidade de carga foram calculadas de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Capacidade de Carregamento (\%CC)} = \frac{W_T - W_F}{W_{PN}} \cdot 100$$

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%EE)} = \frac{W_T - W_F}{W_T} \cdot 100$$

onde, W_T é a massa de óleo essencial ofertada na produção das nanopartículas, W_F é a massa do óleo essencial no sobrenadante e W_{PN} é a massa total de PEJUac@OE.

3.3.3 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA

A análise do diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e a distribuição de tamanho das nanopartículas de PEJUac@OE foi realizada por meio de dispersão de luz dinâmica (DLS) utilizando um analisador ZetaSizer Nano (ZEN 1600, Malvern). A análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

3.3.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

As análises de espectroscopia na região do infravermelho das amostras foram realizadas no equipamento Espectrofotômetro Brucker, modelo Vertex 70 (Berlim, Alemanha), utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR). Os espectros de infravermelho foram obtidos em ampla região, de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e realização de 32 varreduras por amostra. A análise foi realizada no Centro

Regional para Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás.

3.3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A morfologia das nanopartículas produzidas foi avaliada em Microscópio eletrônico de Transmissão JEM-2100, Jeol, Tokyo Japan, equipado com EDS, Thermo Scientific, operando em 200 KV. As Amostras foram preparadas pela metodologia de negativo de stain com acetato de uranila 2%. A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás. A avaliação do diâmetro foi realizada utilizando o software ImageJ, analisando-se o tamanho das partículas em cinco imagens de campos diferentes para cada amostra.

3.3.6 CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO

3.3.6.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

Células permanentes endoteliais humanas da linhagem EA.hy 926 originárias da ATCC (American Type Culture Collections – Manassas, VA, USA), foram cultivadas e mantidas de acordo com metodologia descrita por Graziani e colaboradores (78) utilizando meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, Brasil) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, Brasil), penicilina e estreptomicina (10.000 U.I/ml – 10 mg/ml, Cultilab, Campinas, Brasil), anfotericina B (1% p/v, Cultilab, Campinas, Brasil) e de L-glutamina (1% p/v, Cultilab, Campinas, Brasil). Os inóculos foram mantidos em incubadora umidificada a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂. Durante o cultivo, o meio foi trocado a cada dois dias até se atingir a confluência mínima de 80%. Todos os testes envolvendo cultura de células foram realizados no Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos da Escola de Medicina Veterinária da UFG.

3.3.6.2 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Células apresentando confluência mínima de 80% foram utilizadas para a avaliação de viabilidade frente ao tratamento com óleo essencial, nanopartículas de PEJUac e PEJUac@OE. Os testes de citotoxicidade foram realizados incubando-se as células (concentração de 1×10^4 células por poço) com diferentes concentrações de óleo essencial livre ($0,031$ a $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$) e encapsulado (50 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24h a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . O grupo controle negativo foi tratado com uma solução salina enriquecida com tween 80 ($1,17 \text{ mg mL}^{-1}$). Células viáveis com metabolismo ativo convertem o reagente tetrazólio MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) em um produto de coloração roxa, enquanto células mortas não são capazes de realizar essa conversão. Dessa forma, a coloração roxa é utilizada como um quantificador de viabilidade das células testadas. A intensidade do sinal gerado é dependente da concentração de MTT, tempo de incubação, o número de células viáveis e sua atividade metabólica.

Após 24h de incubação, o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas com salina tamponada, seguido de adição de $90 \mu\text{L}$ de salina tamponada e $10 \mu\text{L}$ de MTT (5 mg mL^{-1}). As placas foram incubadas por 3 h à 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 , seguido de adição de $100 \mu\text{L}$ de solução dodecil sulfato de sódio (SDS, Vivantis Biochemical) 10% (preparado em $\text{HCL } 1 \text{ mol L}^{-1}$) em cada poço para paralisar a reação. As placas foram mantidas por 24h à temperatura ambiente e posteriormente foi realizada quantificação da densidade óptica a 545 nm para determinação da viabilidade celular (Awareness Technology Ine/ Stat Fax 2100). A sequência metodológica está representada na Figura 2.



Figura 2. Sequência experimental para avaliação do potencial citotóxico do óleo essencial livre e encapsulado em nanopartículas de PEJUac sobre células endoteliais humanas da linhagem EA.hy 926.

3.3.6.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOPROTETOR FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO PELO ENSAIO MTT

Células apresentando confluência mínima de 80% foram tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial livre e encapsulado e incubadas por 24h à 37 °C e 5% de O₂. Após a incubação por 24h o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas duas vezes com salina tamponada (PBS 1X, pH 7,4). Em seguida, foi adicionado meio DMEM contendo 3% de peróxido de hidrogênio e as células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e as placas foram novamente lavadas com salina tamponada, seguido de adição de 90 µL de salina tamponada e 10 µL de MTT (5 mg mL⁻¹). As placas foram incubadas por 3 h à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, seguido de adição de 100 µL de solução dodecil sulfato de sódio (SDS, Vivantis Biochemical) 10% (preparado em HCL 1 mol L⁻¹) em cada poço para paralisar a reação. As placas foram mantidas por 24h à temperatura ambiente e posteriormente foi realizada quantificação da densidade óptica a 545 nm para determinação da viabilidade celular (Awareness Technology Ine/ Stat Fax 2100). A sequência metodológica está representada na Figura 3.



Figura 3. Sequência experimental para avaliação do potencial citoprotetor do óleo essencial livre e encapsulado em nanopartículas de PEJUac sobre células endoteliais humanas submetidas à estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio.

3.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA EM MODELO ANIMAL

3.4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 41 ratos machos (*Rattus norvegicus*) com 16 semanas de idade, sendo 21 animais da linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) e 20 da linhagem Wistar. Estes animais foram fornecidos pelo Centro de Produção e Ciência em Biomodelos da Universidade Federal de Goiás (CPCBio) e mantidos em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, sob condições controladas de ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 23°C, sendo fornecidas água filtrada e ração “*ad libitum*”. Todos os protocolos experimentais foram aceitos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG) com registro número 049/22.

3.4.2 AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DUODENAL DAS NANOPARTÍCULAS

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais (N=3/grupo) e deixados em jejum, com livre acesso a água durante doze horas. Após esse período, receberam seus respectivos tratamentos uma única vez por gavagem:

- Grupo controle Wistar (n=3): Solução de tween 80 (1,17 mg mL⁻¹)
- Grupo nanopartícula Wistar (n=3): nanopartículas de PEJUac@OE, contendo concentração efetiva de óleo essencial de *C. sinenses* de 75 mg Kg⁻¹ de peso vivo.

Quatro horas após o tratamento, todos os animais foram submetidos a eutanásia através de alta dosagem de anestésico (40 mg Kg⁻¹, i.p) com o Tiopental sódico (THIOPENTAX®, 2,5%), seguido de coleta do duodeno.

Os fragmentos de duodeno (n = 3/grupo) foram fixados com glutaraldeído 2,5% e ácido pícrico a 0,2% em tampão de cacodilato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,2) durante 24 horas a 4°C. Os tecidos foram lavados duas vezes em tampão de cacodilato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,2) e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% diluído no mesmo tampão durante 2 h a 4°C. Após a pós-fixação, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de acetona e incluídos em resina Epon 812. Os materiais foram cortados em seções ultrafinas (50-70 nm) e contrastados com 2% de acetato de uranila e 0,2% de citrato de chumbo. As telas de cobre foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEM-2100 (Jeol, Akishima, Japão) equipado com EDS (Thermo Scientific, Waltham, EUA) no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic - UFG). As fotomicrografias obtidas foram

submetidas a mensuração da espessura (nm) do espaço intercelular periapical (n = 50 mensurações/grupo) utilizando o software ImageJ.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAIIS

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (N=7/grupo) e receberam seus respectivos tratamentos, diários e por gavagem, por um período de 30 dias consecutivos:

- Grupo controle normotenso (n=7): Solução de tween 80 (1,17 mg mL⁻¹)
- Grupo controle hipertenso (n=7): Solução de tween 80 (1,17 mg mL⁻¹)
- Grupo óleo essencial normotenso (n=7): óleo essencial de *C. sinenses* na concentração de 75 mg/kg de peso vivo
- Grupo óleo essencial hipertenso (n=7): óleo essencial de *C. sinenses* na concentração de 75 mg/kg de peso vivo.
- Grupo nanopartícula hipertenso (n=7): nanopartículas de PEJUac@OE, contendo concentração efetiva de óleo essencial de *C. sinenses* de 75 mg/kg de peso vivo.

Vinte e quatro horas após o último tratamento, todos os animais foram submetidos a eutanásia através de alta dosagem de anestésico (40 mg/kg, i.p.) com o Tiopental sódico (THIOPENTAX®, 2,5%), seguidos de coleta de fígado e rim para posteriores análises morfofisiológicas e bioquímicas. Também foram coletados e pesados o tecido adiposo retroperitoneal dos animais. Durante o tratamento crônico foram monitorados os dados de peso corpóreo (início e fim de tratamento) e pressão arterial sistólica (Figura 4).

na caixa sem a necessidade de contenção. A partir da insuflação e desinsuflação do manguito em intervalos regulares determinou-se a pressão arterial sistólica (PAS) pela média aritmética de triplicata dos valores para o mesmo registro. Esse procedimento foi realizado uma vez por semana, durante todo o período de tratamento.

3.4.4 ESTUDOS DA FUNÇÃO RENAL

Para a obtenção de informações sobre a função renal dos ratos em tratamento, inicialmente os ratos foram pesados e alojados em gaiolas metabólicas individuais com livre acesso a água e ração por 24 h. Os animais ficaram por 24 horas para adaptação à gaiola antes do final do tratamento. No último dia de tratamento os ratos foram realojados nas gaiolas metabólicas com livre acesso a água (250 mL) e ração (30 g) por 24 h. Após retirar os animais da gaiola, foi realizada a medição do volume de urina produzida e água ingerida, pesagem de ração e fezes. Amostras de urina foram centrifugadas (3000 rpm por 15 min, 4 °C) e armazenadas a -80 °C para realização de análises posteriores. Foram monitorados os parâmetros de ingestão de água e ração, volume urinário e peso das fezes. O sangue coletado por punção cardíaca foi centrifugado a 10000 rpm por 15 min, 4 °C, e o plasma armazenados em freezer a -80 °C. As análises bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático utilizando kits de análises específicos para cada metabólito: Creatinina (K222-1, Bioclin), Bioprot U/LCR (K108-2, Bioclin), Ureia UV (K056-1, Bioclin), Ácido úrico monoreagente (K139-2, Bioclin). A dosagem dos íons sódio e potássio no plasma e na urina foi realizada em Analisador de Eletrólitos Ion Seletivo Automático (Modelo 103AP AutoPlus, INBRAS, Jardinópolis, SP, Brasil).

Os valores lidos a partir das amostras foram multiplicados pelos seus respectivos fatores de diluição. A partir dos dados de creatinina séria e urinária foi determinado o *clearance* de creatinina (ClCr), utilizada para estimar o valor do ritmo de filtração glomerular (RFG). A determinação do *clearance* de ureia foi realizada para estimar a taxa de depuração de ureia. Para realizar os cálculos de *clearance* de creatinina e de ureia foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$ClCr(mL \cdot min^{-1} \cdot Kg^{-1}) = \frac{[creatinina]_{urina} \cdot volume\ de\ urina}{[creatinina]_{plasma} \cdot 1440 \cdot peso\ do\ animal\ (Kg)}$$

$$\text{Clearance de ureia (mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Kg}^{-1}) = \frac{[\text{ureia}]_{\text{urina}} \cdot \text{volume de urina}}{[\text{ureia}]_{\text{plasma}} \cdot 1440 \cdot \text{peso do animal (Kg)}}$$

3.4.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA TECIDUAL

3.4.5.1 NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

Para a quantificação de LPO, foi utilizado o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A estimativa de TBARS foi realizada espectrofotometricamente seguindo o método descrito por Ohkawa e colaboradores (79) com algumas modificações. As amostras foram incubadas com ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA) e dodecil sulfato de sódio (SDS) a 95 °C por 60 minutos. O produto da reação foi determinado a 532 nm, utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Agilent Biotek Epoch™, Biotek Instruments, VT, USA). Para a interpretação dos resultados, foi realizada uma curva de malondialdeído (MDA) e os dados foram expressos como equivalentes de MDA em nmol mg⁻¹ de proteína. A concentração total de proteína foi medida pelo método descrito por Bradford (80) usando albumina bovina séria (BSA) como padrão.

3.4.5.2 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Misra e Fridovich (81) com algumas modificações. O princípio deste método envolve a capacidade da enzima superóxido dismutase de inibir a auto oxidação da epinefrina. O tecido foi incubado com bitartarato de epinefrina 60 mmol L⁻¹, e a intensidade da cor da amostra foi medida a 480 nm, utilizando um espectrofotômetro de microplacas. A atividade enzimática foi expressa em unidades (U) de SOD por mg⁻¹ de proteína. A concentração total de proteína foi medida pelo método descrito por Bradford (80) usando BSA como padrão.

3.4.5.3 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo acompanhamento da decomposição de H₂O₂ a 240 nm de acordo com o método descrito por Aebi (82), com modificações. A

amostra de tecido foi incubada com H_2O_2 86 mmol L^{-1} e tampão de fosfato de sódio (pH 7,0). A atividade enzimática foi expressa em unidades (U) de CAT mg^{-1} de proteína, sendo 1 unidade de enzima (U) determinada como a quantidade de enzima capaz de decompor 1 μmol de H_2O_2 min^{-1} em pH 7,0 a 25 °C. A concentração total de proteína foi medida pelo método descrito por Bradford (80) usando BSA como padrão.

3.4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os rins e o fígado coletados foram fixados em metacarn (solução de metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%; n = 5), por 4 horas a 4°C. Depois de fixados, foram desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluídos em Paraplast (Histosec®, Merk®, Darmstadt, Alemanha). Os órgãos foram seccionados a 5 μm em micrótomo Leica (Leica® RM2155, Nussloch, Alemanha) e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). As análises histopatológicas e a obtenção das imagens foram realizadas em microscópio de luz Zeiss Axioscope A1 (Zeiss®, Alemanha).

3.4.7 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos de fígado e rim (n = 5 animais por grupo) foram submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de TNF α . Depois de desparafinizados, os cortes foram reidratados em série decrescente de etanol, e submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) a 100 °C por 1h. Em seguida, foram lavados em salina tamponada (PBS) por 3 vezes de 5 minutos. Para a detecção do anticorpo primário foi utilizado o kit Leica BIOSYSTEMS NovoLink Polymer Detection System (RE7150-K), seguindo as instruções do manual. Em resumo, foi realizado o bloqueio da atividade endógena da peroxidase, seguido pela aplicação do Novocastra Protein Block, por 5 minutos cada etapa. Na sequência, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (TNF alpha polyclonal antibody PA19810, Invitrogen) diluídos em BSA a 1%, na concentração de 1:100 a 4 °C overnight. No dia seguinte, os cortes foram incubados com o Post Primary Block e o polímero, ambos por 1h cada. Em seguida, os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB Chromogen e NovoLink DAB Substrate Buffer), desidratados em séries crescentes de etanol e montados em Entellan (MERK). Para quantificar as marcações positivas para TNF α foram capturadas 15 fotomicrografias (n = 5 animais

por grupo) para cada grupo experimental. Posteriormente, as áreas positivas para TNF α foram quantificadas no software Fiji (ImageJ), por meio da ferramenta color threshold. Os valores obtidos corresponderam à área (μm^2) de marcação castanha positiva para TNF α por campo fotomicrográfico.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ou média \pm erro padrão da média. Os resultados foram analisados utilizando análise de variância ANOVA, seguida de pós-teste Tukey para comparação de médias, com nível de significância de 95%. As análises foram realizadas no software GraphPadPrism 9.0 (GraphPad Software, Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

O óleo essencial utilizado neste trabalho foi caracterizado quanto a sua composição terpenoídica e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Como pode ser observado, o principal componente do óleo essencial é o monoterpeneo *d*-limoneno, representando 95,85% dos terpenos presentes na amostra.

Tabela 1. Composição percentual do óleo essencial de *Citrus sinensis*.

Composto	Tempo de retenção (min)	Área do pico (%)
α -pineno	4,68	0,89
Sabineno	5,63	0,55
β -mirceno	6,05	1,72
β -ocimeno	6,64	0,11
<i>d</i> -limoneno	7,39	95,85
Linalol	9,70	0,78

Considerando a natureza hidrofóbica do óleo essencial extraído da casca de laranja, o polissacarídeo de goma de cajueiro foi hidrofobizado por meio da introdução de grupamentos acetil à sua matriz polimérica. As reações de acetilação podem ser observadas através da comparação entre espectros de FTIR para o PEJU antes e após a modificação química (Figura 5).

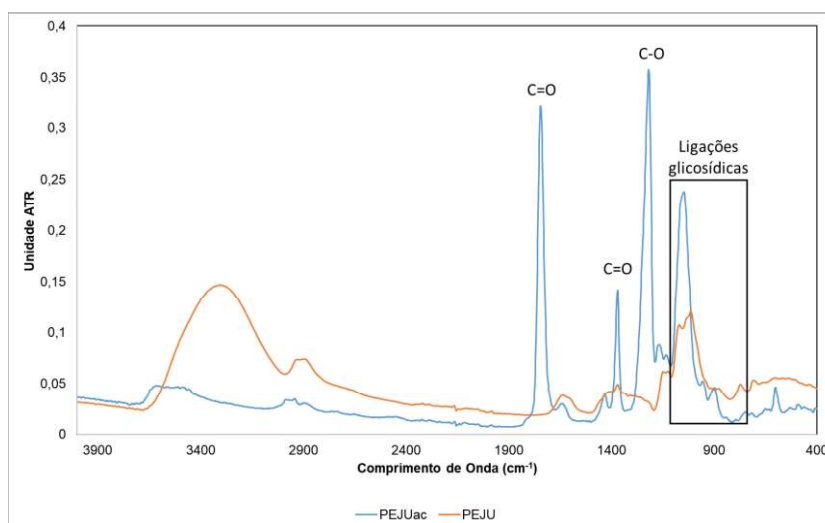
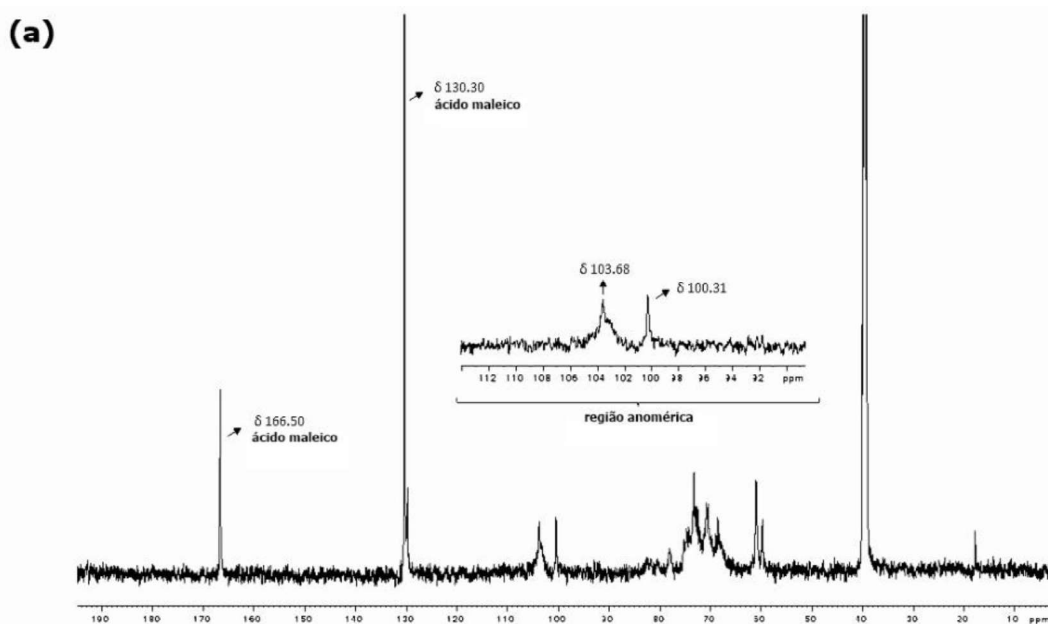


Figura 5. Espectro de FTIR do polissacarídeo de goma de cajueiro antes (PEJU) e após a modificação química por acetilação (PEJUac).

Os dois espectros evidenciam bandas características de estruturas polissacarídicas na região de $1100\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ (região anomérica), apresentando picos relativos aos estiramentos e deformações associadas às ligações glicosídicas entre os monômeros formadores do PEJU (83). A acetilação do PEJU pode ser evidenciada pelas seguintes alterações no espectro de infravermelho: (1) surgimento de pico em torno de 1746 cm^{-1} , associado à vibração de estiramento $\text{C}=\text{O}$ de ésteres; (2) aparecimento de bandas em torno de 1369 cm^{-1} associada à deformação angular C-H de CH_3 dos grupos acetil; (3) surgimento de pico por volta de 1220 cm^{-1} atribuído à vibração de estiramento C-O de grupamento éster; e (4) desaparecimento da banda em torno de 3400 , indicando uma redução significativa de espécies OH na estrutura e/ou em associação com o PEJU (42, 84).

A acetilação do PEJU foi também confirmada por ressonância magnética nuclear (Figura 6). Os dados espectroscópicos da região anomérica do espectro de ^{13}C do PEJU (Figura 6a) e PEJUac (Figura 6b) evidenciam a presença de resíduos de açúcar típicos da composição do PEJU (Di Paula, 2011). No espectro de ^{13}C do PEJUac pode ser notado o surgimento de quatro sinais adicionais em δ 169.85, 169.68, 169.26, e δ 169.05, correspondentes aos grupos carbonila do radical acetil, evidenciando que o processo de acetilação do PEJUac foi bem-sucedido.



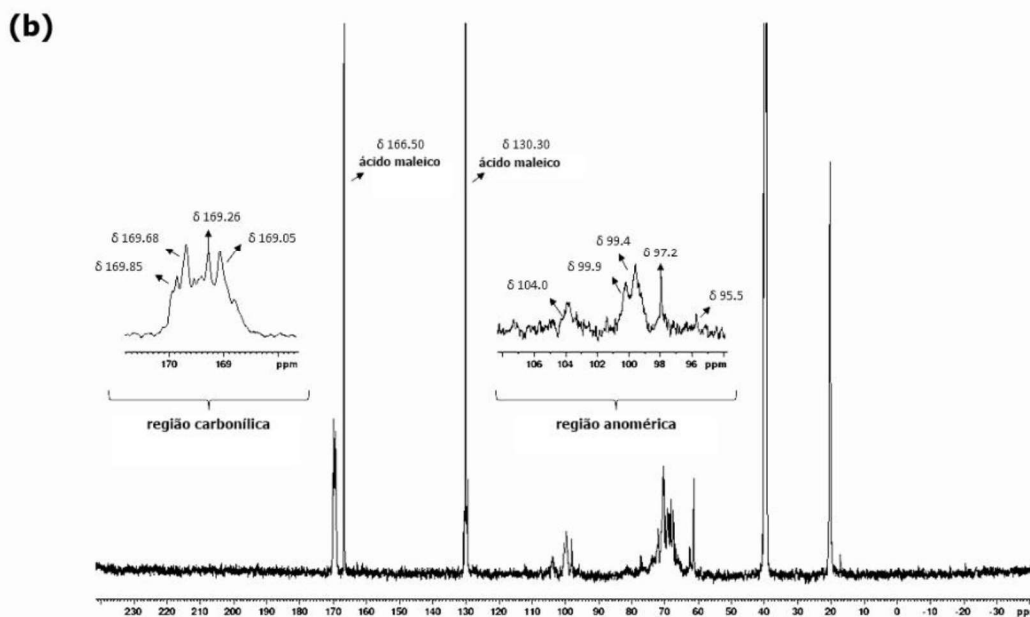


Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C do (a) PEJU e (b) do PEJUac em DMSO deuterado.

O PEJUac foi utilizado como matriz para a produção de nanopartículas para o encapsulamento do óleo essencial de *Citrus sinensis* (OE), sendo produzidas partículas com diâmetro médio hidrodinâmico de 161 nm ($\pm 1,48$), com a presença de um único pico (Figura 7), índice de polidispersão igual a 0,141 ($\pm 0,01$) e potencial Zeta de -19,17 ($\pm 0,83$). As partículas produzidas apresentaram eficiência de encapsulação de 75,18%, com uma capacidade de carga de 15,18%.

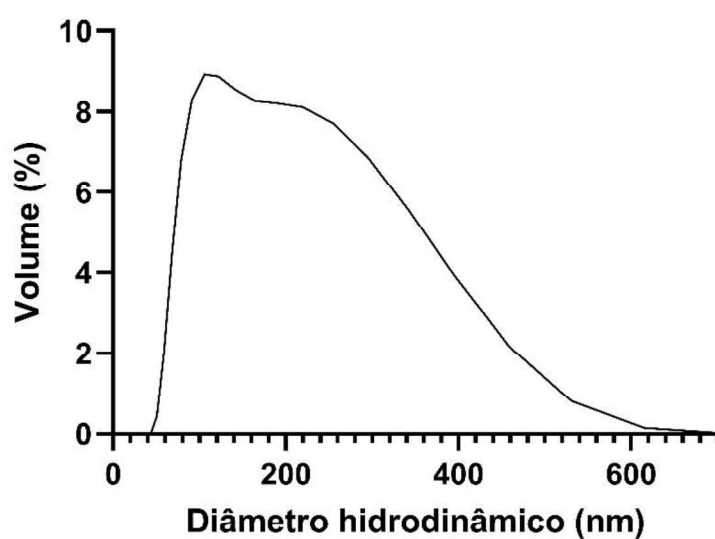


Figura 7. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PEJUac contendo óleo essencial encapsulado.

A análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 8) evidenciou a formação de partículas circulares, de superfície lisa com diâmetro médio de $133 \pm 12,4$ nm.

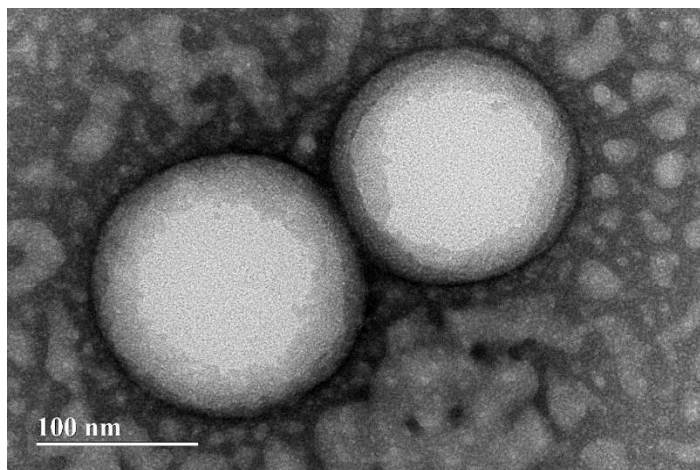


Figura 8. Micrografia de transmissão das nanopartículas de PEJUac@OE (ampliação de 60.000 vezes).

4.2 CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO

O ensaio MTT permitiu inferir que as concentrações de OE (Figura 9a) e PEJUac@OE (Figura 9b) testadas não causam morte celular quando comparado com o grupo tratado com veículo (salina + tween). Além disso, todos os grupos testados apresentaram diferença estatística em relação ao controle com peróxido de hidrogênio, que por sua vez, causou morte de 80% das células (Figura 9).

O potencial citoprotetor do OE e das nanopartículas de PEJUac@OE foi avaliado em células endoteliais expostas ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio a 3% por 1h. Foi possível observar potencial protetor do OE apenas nas concentrações de 0,031 e 0,062 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 10a). Por outro lado, todas as concentrações de nanopartículas de PEJUac@OE foram efetivas na proteção do estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio a 3% por 1h (Figura 10b).

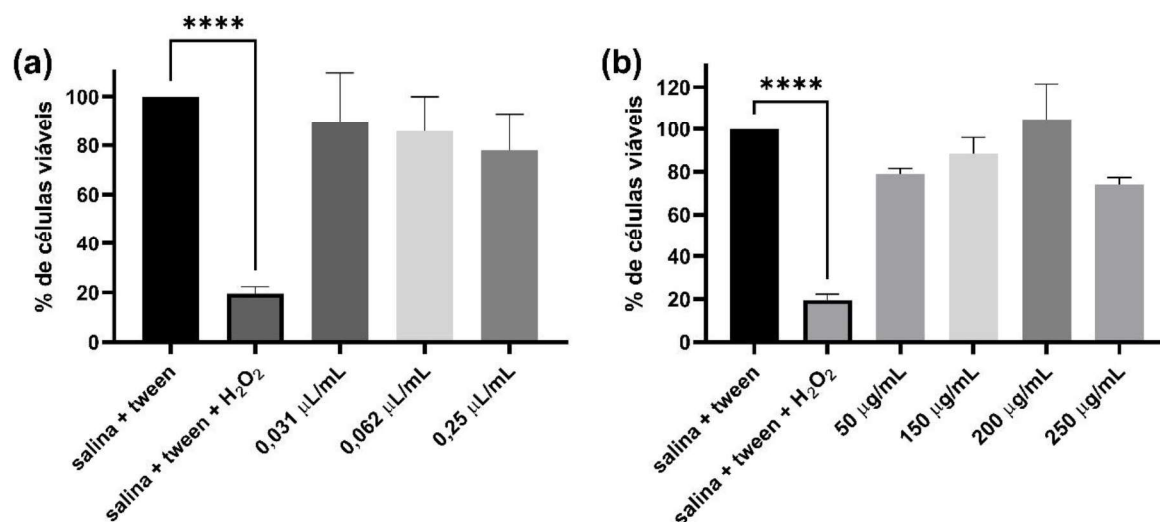


Figura 9. Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações de óleo essencial de *C.sinensis* não encapsulado e encapsulado em nanopartículas de PEJUac em células endoteliais humanas pelo ensaio MTT. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Análise One-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. **** $p < 0,0001$ tratamento vs. controle (salina + tween).

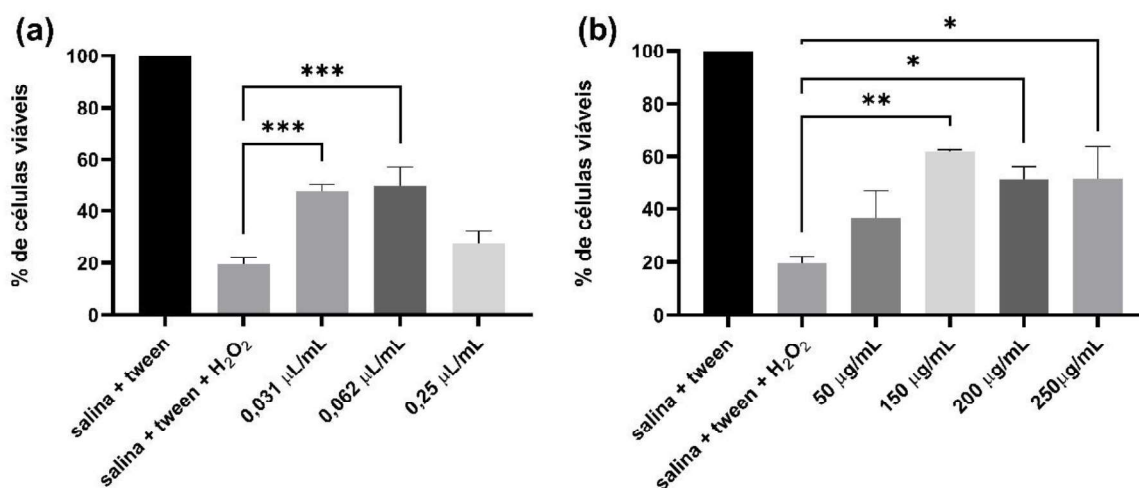
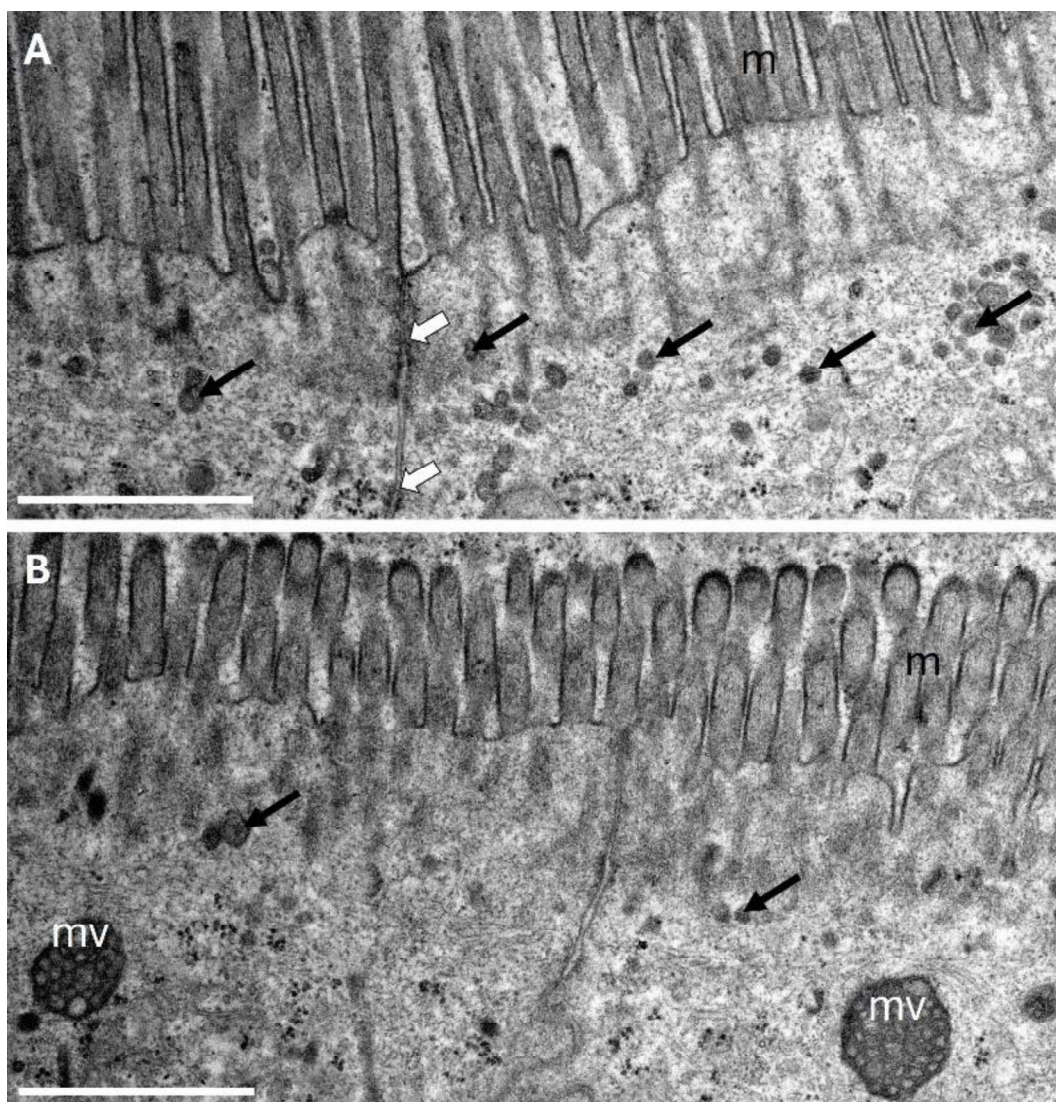


Figura 10. Avaliação do potencial citoprotetor pré-tratamento do óleo essencial de *C.sinensis* não encapsulado e encapsulado em nanopartículas de PEJUac através do ensaio MTT frente ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 1h. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Análise One-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$ tratamento vs controle oxidativo (salina + tween + H₂O₂).

4.3 AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Os enterócitos do grupo controle (tween 80; 1,17 mg mL⁻¹) apresentaram citoplasma apical com inúmeras microvesículas de pinocitose, e complexos juncionais apicais íntegros (Figura 11A). No grupo tratado com PEJUac@OE os enterócitos apresentaram vários corpos multivesiculares volumosos e repletos de vesículas endossômicas com conteúdo elétron-lucido (Figura 11B). Estes corpos multivesiculares foram observados no citoplasma periapical e são indicativos do aumento da capacidade absorptiva destas células (Figura 11C). Ademais, no grupo PEJUac@OE também foi observado um alargamento significativo do espaço intercelular apical (Controle: 27,61 ± 7,16 nm; PEJUac@OE: 54,85 ± 16,43 nm), especificamente das regiões localizadas acima das interdigitações da membrana plasmática (Figura 11D).



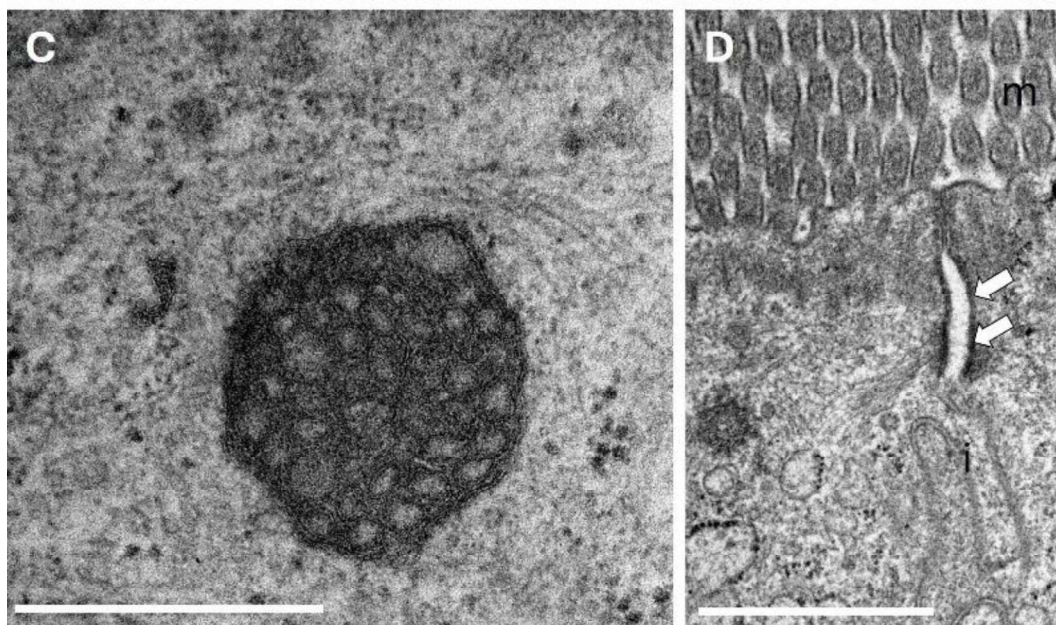


Figura 11. Características ultraestruturais dos enterócitos que revestem a região inicial do duodeno de ratos SHR. Figura A = grupo controle (tween 80); figuras B-D: grupo PEJUac@OE. (A) Citoplasma apical dos enterócitos do grupo controle exibindo inúmeras microvesículas de pinocitose (setas pretas). Complexos juncionais íntegros estão indicados pelas setas brancas. Microvilosidades (m); barra de escala: 1 μ m. (B) Citoplasma apical dos enterócitos do grupo PEJUac@OE. As setas pretas indicam microvesículas de pinocitose. Corpos multivesiculares (mv) volumosos são observados nesta região; barra de escala: 1 μ m. (C) Detalhe de um corpo multivesicular exibindo inúmeras vesículas com conteúdo elétron-lúcido; barra de escala: 500 nm. (D) Região de contato célula-célula exibindo alargamento do espaço intercelular (setas brancas) na região acima das interdigitações da membrana plasmática (i); barra de escala: 1 μ m.

4.4 EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAIIS

4.4.1 EFEITO NA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

Para avaliar o efeito do óleo essencial de *C. sinensis* e das nanopartículas de PEJUac@OE foram utilizados animais da linhagem Wistar (modelo normotenso) e SHR (modelo espontaneamente hipertenso). Antes da realização dos testes, a pressão arterial sistólica dos grupos foi avaliada para confirmação do estado normotenso, em Wistar, e hipertenso, em animais SHR. O valor médio de pressão

arterial obtido para os animais SHR foi de $164,6 \pm 5,1$ mmHg, o que confirma o estado espontaneamente hipertensivo desse modelo animal. Para os ratos Wistar, as condições normais de pressão arterial foram confirmadas, com valores médios de pressão arterial de $106,3 \pm 7,5$ mmHg.

A PAS dos animais foi avaliada semanalmente durante todo o tratamento e os registros obtidos estão apresentados na Figura 12. Os valores basais de PAS confirmam o estado normotenso e hipertenso dos animais.

No que se refere ao tratamento com OE, os dados demonstram um efeito tipo hipotensor, com redução da pressão arterial dos animais tratados em comparação ao controle Wistar na última semana de tratamento. O OE também apresentou efeito tipo anti-hipertensivo, com os valores de PAS diferindo do controle SHR nos últimos 10 dias de tratamento (Figura 12a). Além disso, ao final do tratamento com OE, a PAS dos animais SHR apresentou valores similares ao do controle normotenso.

O efeito anti-hipertensivo das nanopartículas de PEJUac@OE foi observado ao final do tratamento (Figura 12a), e os valores do delta da PAS (Figura 12b) demonstraram que tanto o OE quanto as nanopartículas foram eficientes em reduzir a pressão arterial dos animais hipertensos, não havendo diferença estatística entre os valores de delta de PAS nos tratamentos com o OE e PEJUac@OE.

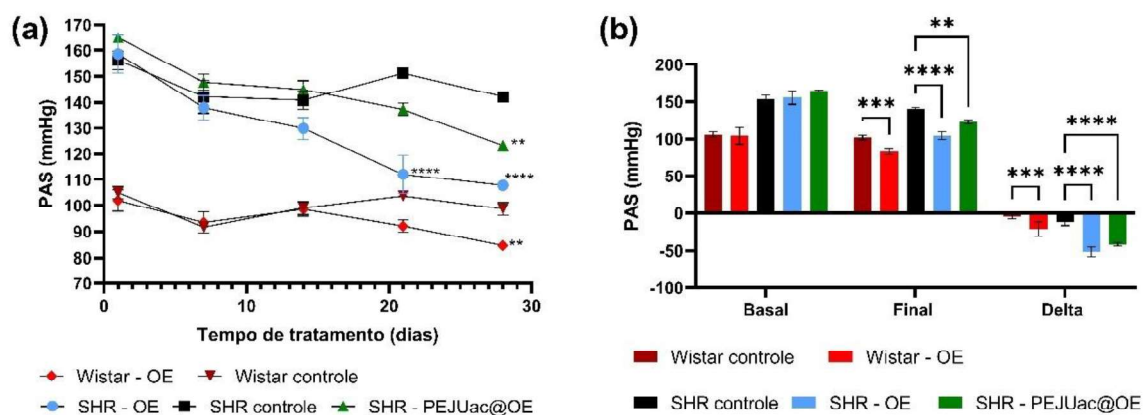


Figura 12. Efeito do OE e das nanopartículas de PEJUac@OE sobre a pressão arterial sistólica dos ratos normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR). Painel (a): efeitos do OE e do PEJUac@OE na pressão arterial ao longo do tempo tratamento. Painel (b): valores basais de PAS, valores de PAS ao final do tratamento e deltas (mmHg). Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 tratamento vs. controle.

4.4.2 EFEITO NOS PARÂMETROS METABÓLICOS

Na avaliação do peso corporal dos animais, o tratamento crônico com OE ocasionou a redução de peso dos animais normotensos, mas não interferiu com o peso dos animais hipertensos. Por outro lado, o tratamento com nanopartículas de PEJUac@OE ocasionou redução de peso dos animais SHR (Figura 13a). Não houve alteração significativa de peso entre as linhagens estudadas. O peso do tecido adiposo foi reduzido nos animais da linhagem SHR, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com OE, e aos controles Wistar e SHR (Figura 13b).

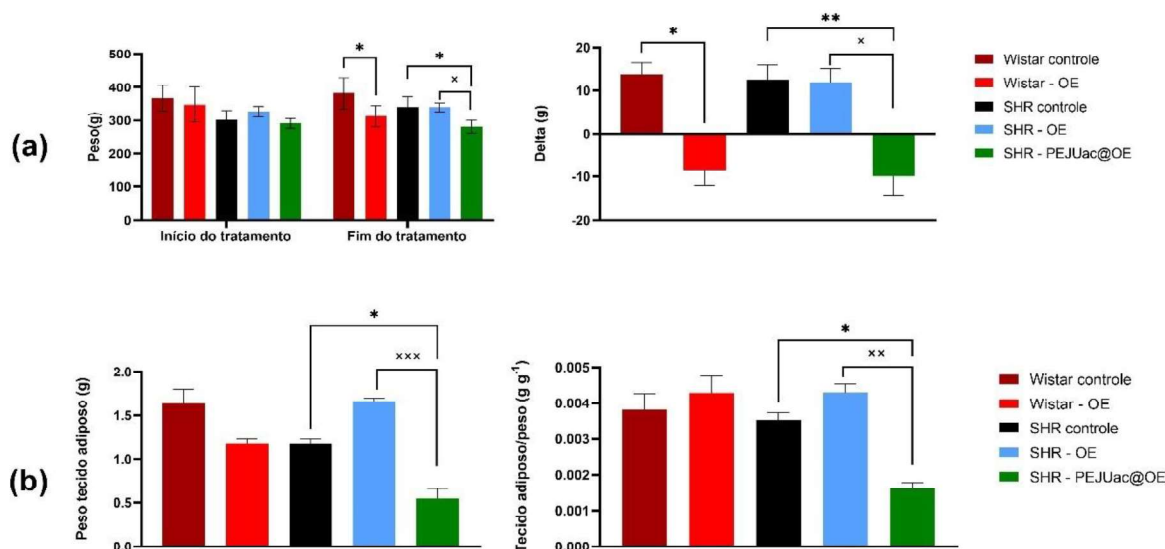


Figura 13. Comparação do peso corporal (a) e peso do tecido adiposo (b) entre os animais normotensos e hipertensos submetidos a tratamento crônico com OE e PEJUac@OE. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. *p<0,05; **p <0,01; ***p<0,001 tratamento vs. controle; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,01 tratamento SHR - PEJUac@OE vc SHR - OE.

Em relação a ingestão de ração e excreção de fezes, observou-se que não houve alteração significativa entre os grupos experimentais e o veículo, e não houve diferença no consumo de ração e na quantidade de fezes excretadas entre as linhagens Wistar e SHR (Figura 14). Estes resultados indicam que o tratamento

crônico com OE ou nanopartículas de PEJUac@OE não interfere com o comportamento alimentar dos animais.

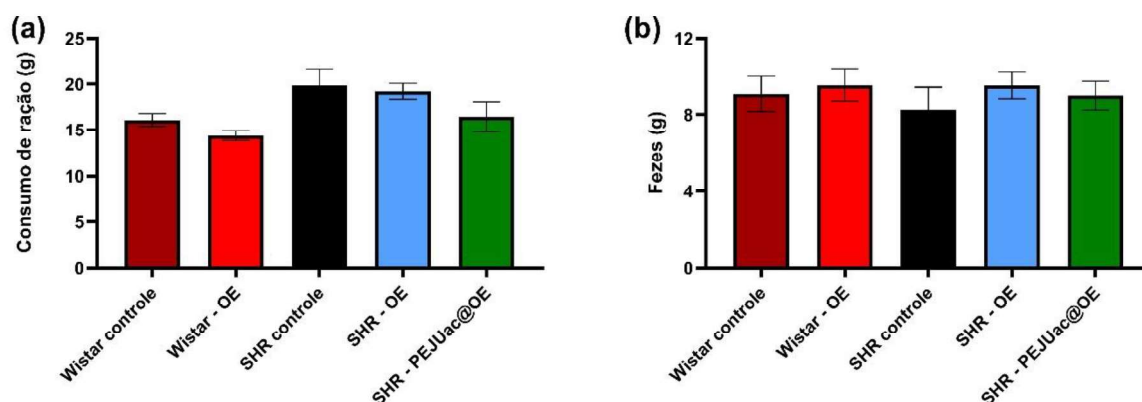


Figura 14. Comparação da massa de ração ingerida (a) e quantidade de fezes excretadas (b) entre os animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), amostrada 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey.

Da mesma maneira, não houve diferença entre linhagens e grupos quanto à ingestão de água e volume de urina excretada (Figura 15).

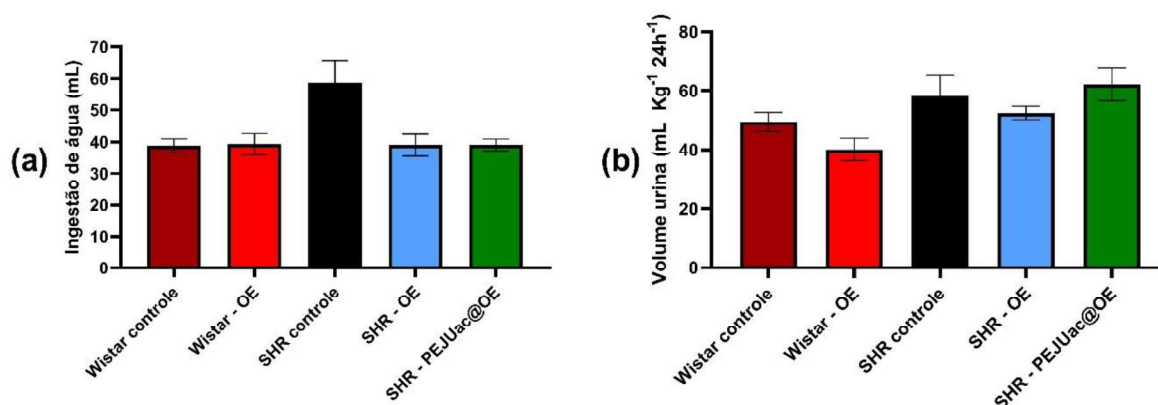


Figura 15. Comparação do volume de água ingerido (a) e volume de urina excretada por peso de animal em 24h (b) entre os animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), amostrada 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey.

Os níveis de sódio sérico e urinário em animais normotensos e hipertensos foram avaliados para verificar se o OE e as nanopartículas de PEJUac@OE interferem na natriurese pressórica. Em relação à concentração de íons sódio no plasma, não foi observado nenhuma diferença estatística entre os grupos (Figura 16a). No que se refere à excreção urinário do íon sódio, o grupo controle SHR apresentou uma diminuição dos níveis de sódio urinário quando comparados com o grupo Wistar controle (Figura 16b). Em contrapartida, os animais SHR tratados com OE ou PEJUac@OE tiveram os níveis de sódio urinário restaurados para os valores observados no grupo controle Wistar (Figura 16b).

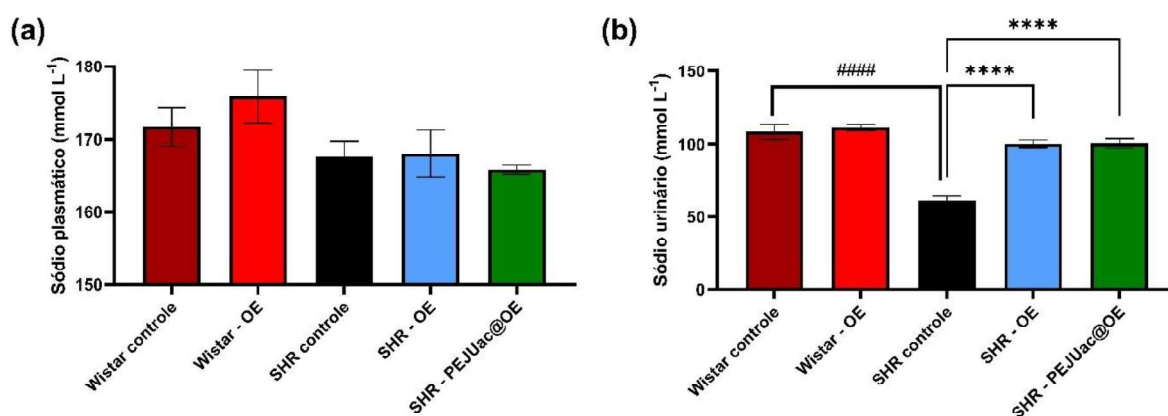


Figura 16. Comparação da concentração de sódio plasmático (a) e urinário (b) entre os animais normotensos e hipertensos, medidas a partir de urina e sangue coletados 24h após a última administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. #####p<0,0001 controle SHR vs. controle Wistar; ****p<0,0001 tratamento vs. controle SHR.

Em relação aos níveis de potássio plasmático, não foi observado diferença estatística entre os grupos (Figura 17a). No que se refere ao conteúdo urinário do íon potássio, houve uma diminuição da concentração de potássio no grupo SHR controle quando comparado com o grupo Wistar controle, sem presença de alteração das concentrações de potássio urinário nos animais SHR tratados com OE ou nanopartículas de PEJUac@OE (Figura 17b).

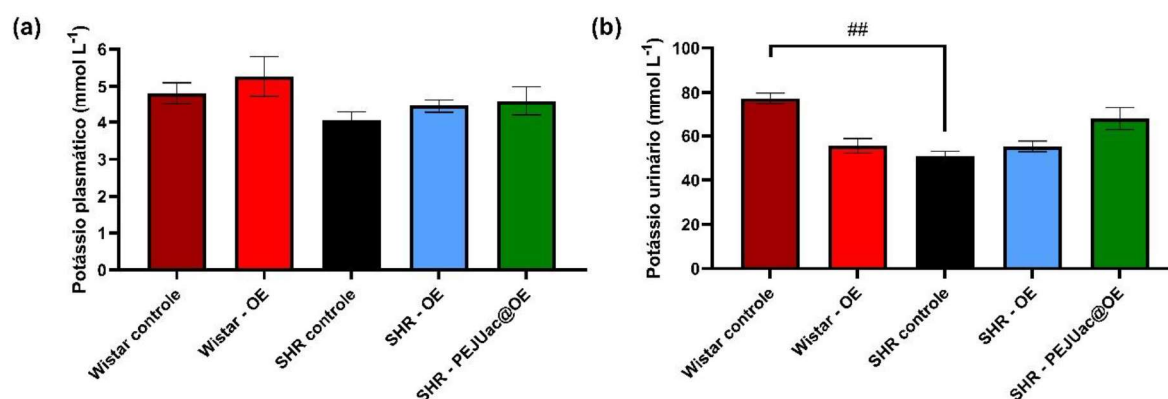


Figura 17. Comparação da concentração de potássio plasmático (a) e urinário (b) entre os animais normotensos e hipertensos, medidas a partir de urina e sangue coletados 24h após a última administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. ##p<0,01 controle SHR vs. controle Wistar.

Os resultados das análises de proteínas totais no plasma demonstraram que a administração crônica de OE ou PEJUac@OE não alterou os níveis de proteína plasmáticas nas linhagens testadas (Figura 18a). Os resultados de quantificação de proteínas totais presentes na urina demonstraram que animais da linhagem SHR naturalmente apresentam maior excreção proteica em comparação com a linhagem Wistar (Figura 18b). Quando observamos os animais SHR que foram tratados com OE e PEJUac@OE, nenhum tratamento foi capaz de reduzir os níveis de proteínas urinárias para os níveis observados nos animais do grupo Wistar controle, porém, o grupo tratado com nanopartículas de PEJUac@OE apresentou diminuição significativa na concentração de proteínas totais quando comparado com o grupo SHR controle (Figura 18b).

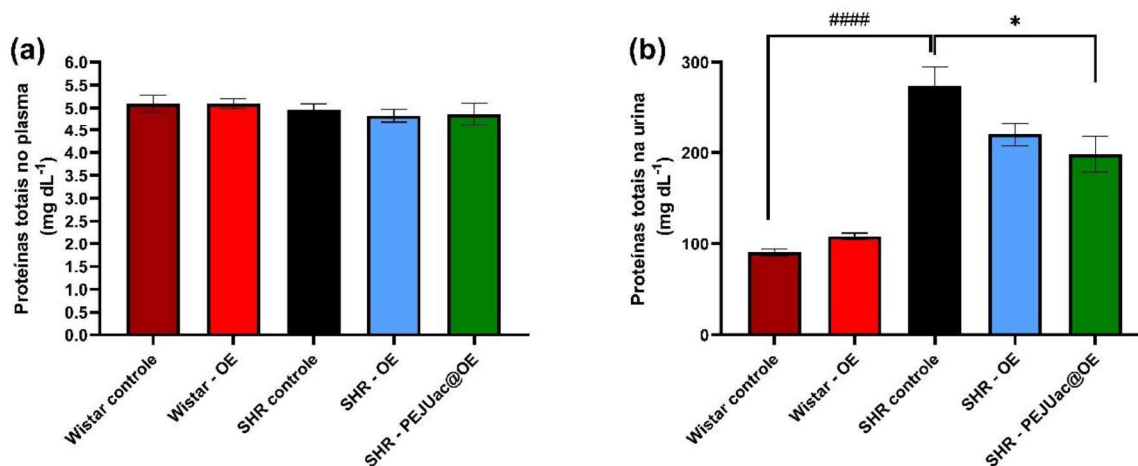


Figura 18. Comparação da concentração de proteínas totais no plasma (a) e na urina (b) entre os animais normotensos e hipertensos, determinadas a partir de urina e sangue coletados 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. ####p<0,0001 controle SHR vs. controle Wistar; *p<0,05 tratamento vs. controle SHR.

Em relação aos níveis de ácido úrico plasmático (Figura 16a), é possível observar um aumento nos níveis de ácido úrico no grupo SHR controle em relação ao grupo Wistar controle. Por outro lado, nos grupos tratados com óleo essencial não encapsulado (SHR-OE) ou nanopartículas de PEJUac@OE (SHR-PEJUac@OE) observou-se uma redução significativa nos valores de ácido úrico plasmático, sendo encontrados valores similares aos apresentados pelos animais do grupo Wistar controle (Figura 19a). Por outro lado, a dosagem do ácido úrico urinário não evidenciou diferenças de concentração desse metabólito entre os grupos avaliados (Figura 19b).

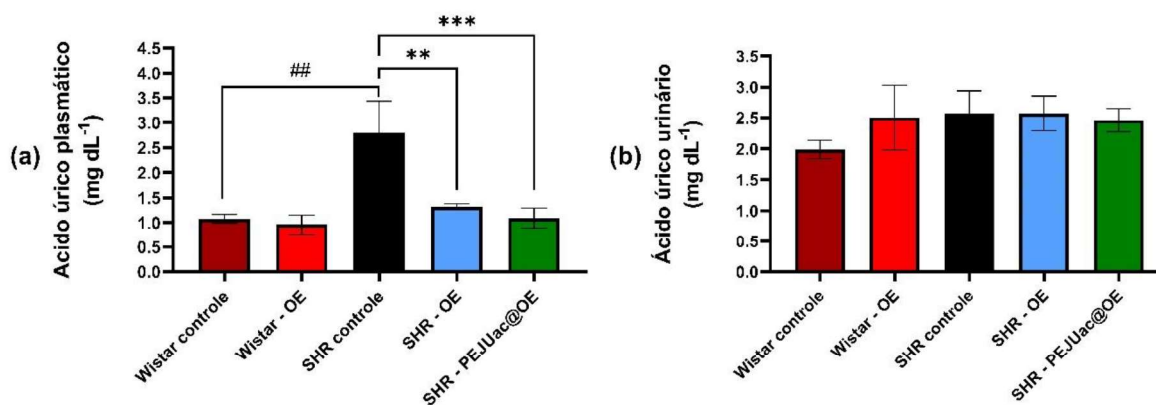


Figura 19. Comparação da concentração ácido úrico no plasma (a) e na urina (b) entre os animais normotensos e hipertensos, determinadas a partir de urina e sangue coletados 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg^{-1} . Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n=6$). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. $###p<0,01$ controle SHR vs. controle Wistar; $**p<0,01$ tratamento vs. controle SHR.

4.4.3 EFEITO NO METABOLISMO URINÁRIO

O efeito do tratamento crônico com OE ou PEJUac@OE na função renal dos animais foi acompanhado pela avaliação dos níveis de creatinina sérica e urinária e, também, pela determinação do *clearance* de creatinina e ureia, parâmetros utilizados para se avaliar o ritmo de filtração glomerular (RFG). Apesar de não ser observado alterações significativas no teor de creatinina sérica (Figura 20a), o tratamento com PEJUac@OE aumentou o conteúdo de creatinina excretado pela urina em animais SHR (Figura 20b).

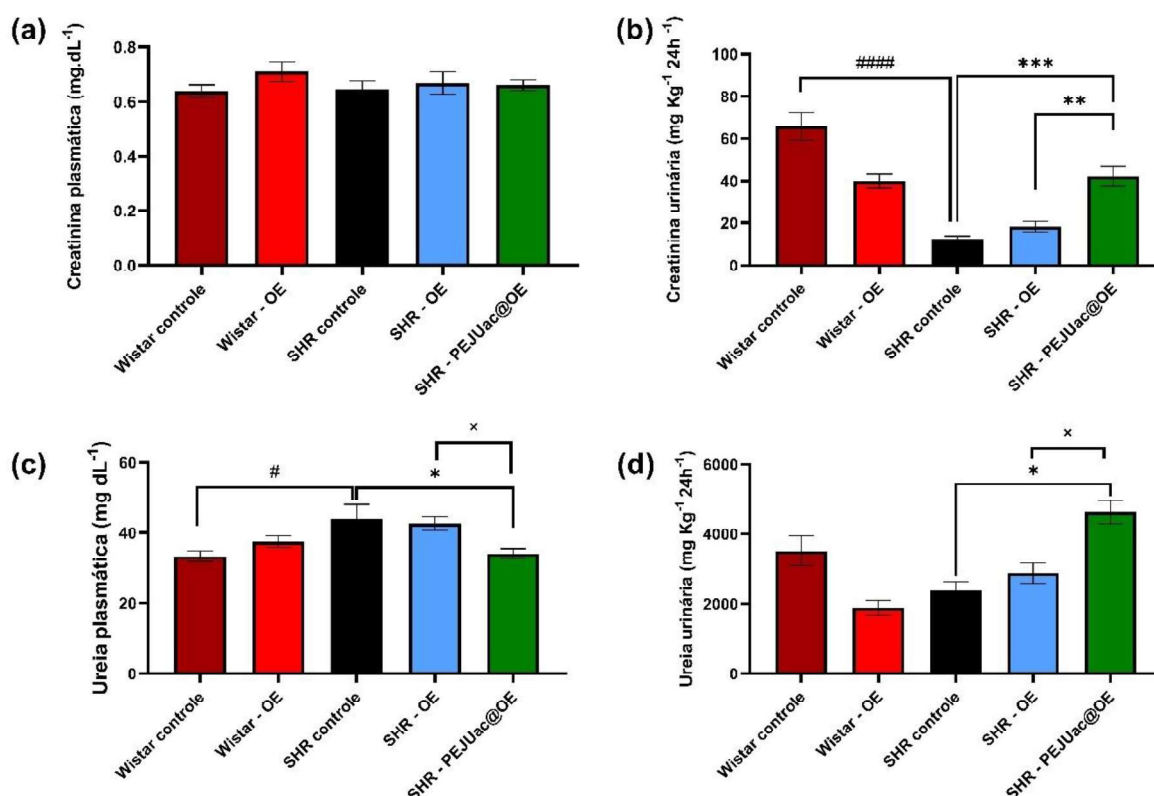


Figura 20. Comparação da concentração de creatinina plasmática (a) creatinina urinária (b), ureia plasmática (c) e ureia urinária (d) entre os animais normotensos

(Wistar) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue coletados 24h após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. #p<0,01; #####p<0,0001 controle SHR vs. controle Wistar; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 tratamento vs. controle SHR; ^xp<0,05 tratamento SHR-PEJUac@OE vs tratamento SHR - OE.

Os níveis de ureia plasmática foram reduzidos nos animais SHR tratados com PEJUac@OE quando comparados com o grupo SHR controle (Figura 20c), sendo também observado um aumento da excreção urinária de ureia no grupo SHR - PEJUac@OE quando comparado com o grupo SHR controle (Figura 20d). Por outro lado, o tratamento com óleo essencial não encapsulado (OE) não alterou os níveis de ureia plasmática e urinária dos animais SHR (Figuras 20c e 20d).

Os resultados do *clearance* de creatinina demonstram que o tratamento dos animais SHR com nanopartículas de PEJUac@OE aumentou o *clearance* de creatinina quando comparado com o grupo SHR controle, não sendo observado aumento nos valores de *clearance* de creatinina nos animais SHR tratados com OE (Figura 21a).

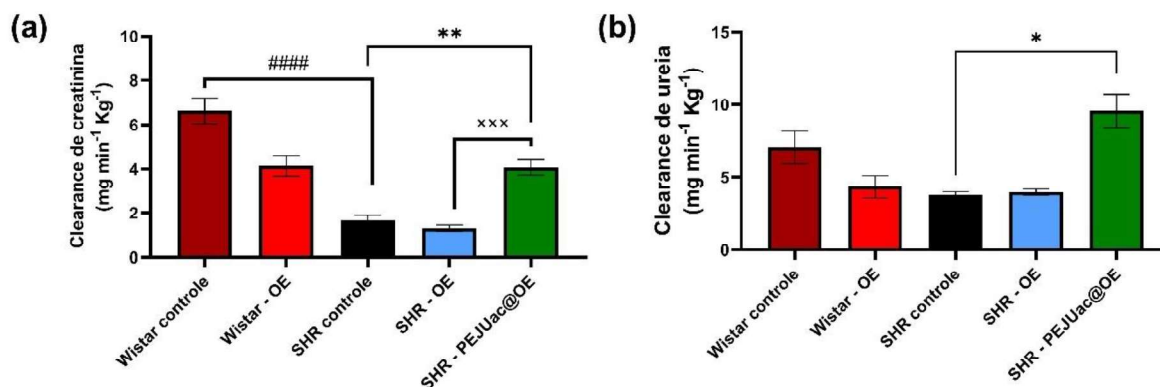


Figura 21. Comparação do *clearance* de creatinina (a) e *clearance* de ureia (b), entre os animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), após a administração via oral de veículo ou OE/PEJUac@OE na dose de 75mg Kg⁻¹. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. #####p<0,0001 controle SHR vs. controle Wistar; *p<0,05; **p<0,01; tratamento vs. controle SHR; ^{xxx}p<0,001 tratamento SHR-PEJUac@OE vs tratamento SHR - OE.

Em relação ao *clearance* de ureia, é possível observar um aumento do *clearance* no grupo tratado com nanopartículas de PEJUac@OE quando comparado com o grupo SHR controle (Figura 21b). Além disso, os valores de *clearance* dos animais SHR tratados com PEJUac@OE não apresentam diferença estatística com relação aos valores de *clearance* de ureia observados para o grupo Wistar controle (Figura 21b). Por fim, o aumento do *clearance* de creatinina e ureia é um indicativo de melhora na função renal dos animais da linhagem SHR ocasionada pelo tratamento com as nanopartículas de PEJUac@OE.

4.4.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO TECIDO HEPÁTICO E RENAL

A determinação da taxa de peroxidação lipídica foi avaliada pela dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido hepático (Figura 22) e renal (Figura 23). Nos dois tecidos, os resultados demonstraram que não há diferença significativa nos níveis de malonaldeído (MDA) entre os animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR). O tratamento com as nanopartículas de PEJUac@OE foi eficiente em reduzir os níveis de MDA tecidual nos ratos hipertensos, sendo observado uma redução de 22,53% na peroxidação lipídica no tecido hepático (Figura 22a) e 38,31% no tecido renal (Figura 23a).

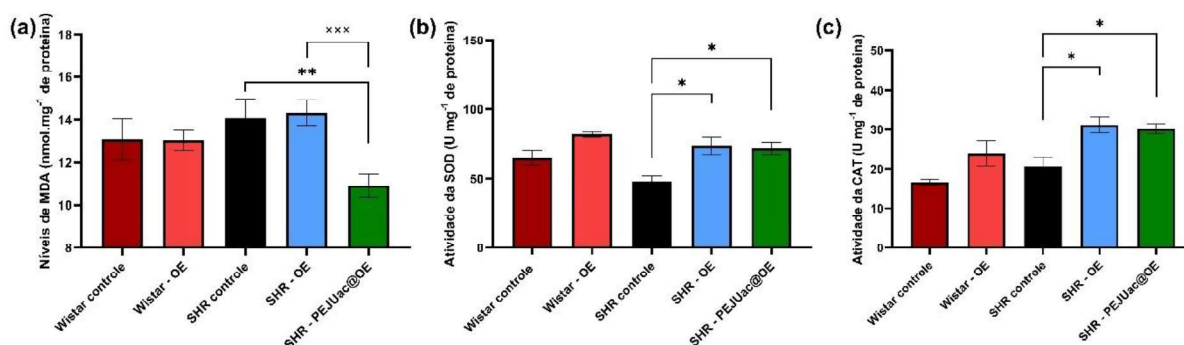


Figura 22. Avaliação de marcadores oxidativos e atividade antioxidante enzimática no tecido hepático. Painel (a): efeitos do OE das nanopartículas de PEJUac@OE na peroxidação lipídica. Painel (b): efeitos do OE das nanopartículas de PEJUac@OE na atividade enzimática da enzima superóxido dismutase (SOD). Painel (c): do OE das nanopartículas de PEJUac@OE na atividade enzimática da enzima catalase (CAT). Os valores são expressos como média \pm SEM (n=6). Análise Two-Way ANOVA

seguido por pós-teste Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; tratamento vs. controle SHR; $^{xxx}p < 0,001$ tratamento SHR - PEJUac@OE vs tratamento SHR - OE.

O potencial protetor contra estresse oxidativo também foi avaliado estudando-se o efeito do tratamento com óleo essencial não encapsulado e nanopartículas de PEJUac@OE na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), importantes enzimas envolvidas no controle endógeno dos processos oxidativos. Os resultados de atividade da SOD evidenciaram que o tratamento dos animais hipertensos (SHR) com óleo essencial não encapsulado e as nanopartículas de PEJUac@OE aumentou a atividade dessa enzima no tecido hepático (Figura 22b) e renal (Figura 23b). A atividade enzimática da SOD no tecido hepático (Figura 22b) aumentou 52,78% nos animais SHR tratados com óleo essencial não encapsulado (SHR – OE) e 48,98% nos animais SHR tratados com as nanopartículas de PEJUac@OE (SHR – PEJUac@OE). No tecido renal, o tratamento com OE aumentou a atividade de SOD em 40,99% nos animais SHR, enquanto o tratamento com PEJUac@OE aumentou em 55,37% a atividade da enzima (Figura 23b).

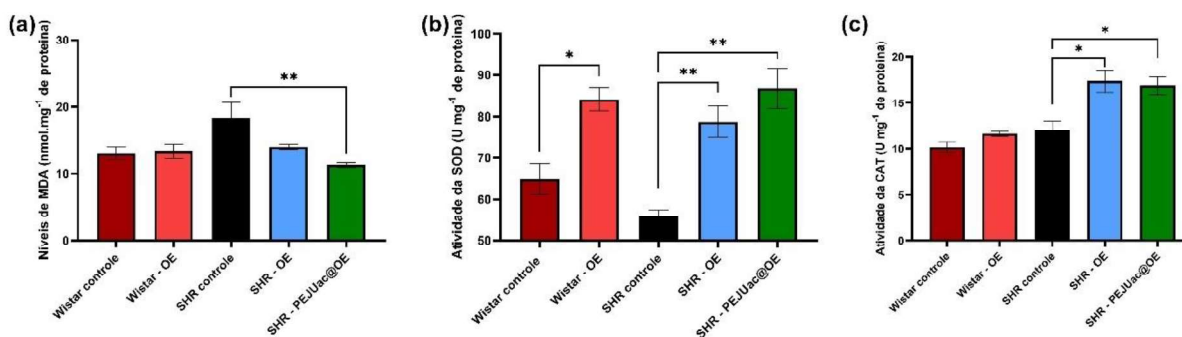


Figura 23. Avaliação de marcadores oxidativos e atividade antioxidante enzimática no tecido renal. Painel (a): efeitos do OE das nanopartículas de PEJUac@OE na peroxidação lipídica. Painel (b): efeitos do OE das nanopartículas de PEJUac@OE na atividade enzimática da enzima superóxido dismutase (SOD). Painel (c): do OE das nanopartículas de PEJUac@OE na atividade enzimática da enzima catalase (CAT). Os valores são expressos como média \pm SEM (n=6). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; tratamento vs. controle.

Em relação a atividade da catalase (CAT), não foi observado diferença significativa entre os animais da linhagem Wistar controle e SHR controle nos tecidos

hepático (Figura 22c) e renal (Figura 23c). Por outro lado, os resultados evidenciaram aumento na atividade da CAT nos dois tecidos dos animais da linhagem SHR tratados com óleo essencial não encapsulado ou nanopartículas de PEJUac@OE em comparação com os valores de atividade observados para o grupo SHR controle (Figuras 22c e 23c). O tratamento com óleo essencial não encapsulado ocasionou aumento de 50,68% na atividade da CAT hepática (Figura 22c) e 44,19% na atividade da CAT renal (Figura 23c) dos animais da linhagem SHR em comparação com o controle SHR. No grupo de animais da linhagem SHR tratados com nanopartículas de PEJUac@OE foi observado aumento de 46,22% na atividade da CAT hepática (Figura 22c) e 39,81% na atividade da CAT renal (Figura 23c).

4.4.5 EFEITO DO TRATAMENTO NA HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO E RINS

A análise histopatológica dos animais da linhagem Wistar demonstrou que os animais normotensos do grupo controle e do grupo tratado com o óleo essencial não apresentaram alterações teciduais no fígado e rins (Figura 24A-D). Por outro lado, os animais SHR controle apresentaram focos inflamatórios no fígado, principalmente nos espaços porta-hepáticos (Figura 24E). O tratamento com o óleo essencial não encapsulado e com as nanopartículas de PEJUac@OE causou uma aparente redução das áreas hepáticas comprometidas por infiltrados inflamatórios (Figuras 24G e 24I). Os animais SHR controle também apresentaram alterações teciduais nos rins, tais como vastas áreas edematosas associadas a focos inflamatórios intersticiais (Figura 24F). Dentre os grupos de animais da linhagem SHR tratados, apenas o tratamento com o óleo essencial foi capaz de reduzir as regiões de edema e inflamação renal (Figuras 24H e 24J).

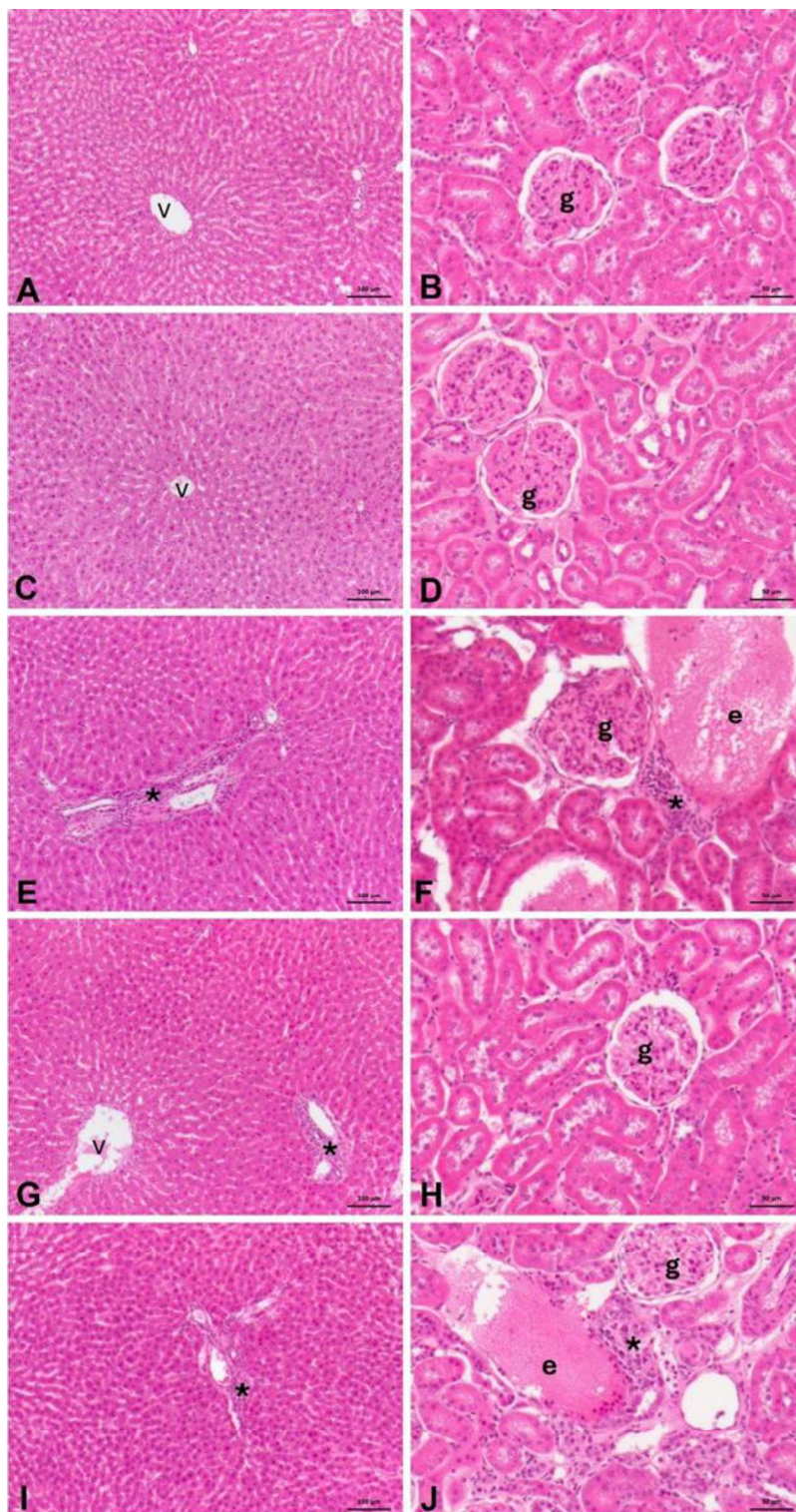


Figura 24. Aspectos morfológicos do fígado (A, C, E, G, I) e rim (B, D, F, H, J) corados pelo método da hematoxilina-eosina. Grupos: Wistar controle (A-B), Wistar – OE (C-D), SHR controle (E-F), SHR – OE (G-H) e SHR – PEJUac@OE (I-J). Veia controlobular (v), infiltrados inflamatórios (*), glomérulo renal (g), edema intersticial (e). No fígado os focos inflamatórios foram observados nos espaços porta, e nos rins estes

infiltrados ocorreram predominantemente nas áreas intersticiais adjacentes aos corpúsculos renais.

A análise imuno-histoquímica demonstrou que o fígado e os rins dos animais das linhagens SHR controle apresentaram uma maior imunomarcação para TNF α quando comparados ao controle Wistar (Figuras 25 e 26). No fígado, o tratamento com o óleo essencial reduziu significativamente a marcação de TNF α tanto nos animais Wistar (Figura 25C e 26a), quanto nos SHR (Figura 25 D e 26a). Contudo, em animais da linhagem SHR as nanopartículas de PEJUac@OE foram mais eficientes em reduzir esta citocina pró-inflamatória tanto no tecido hepático (Figura 25I e 26a), quanto renal (Figuras 25J e 26b).

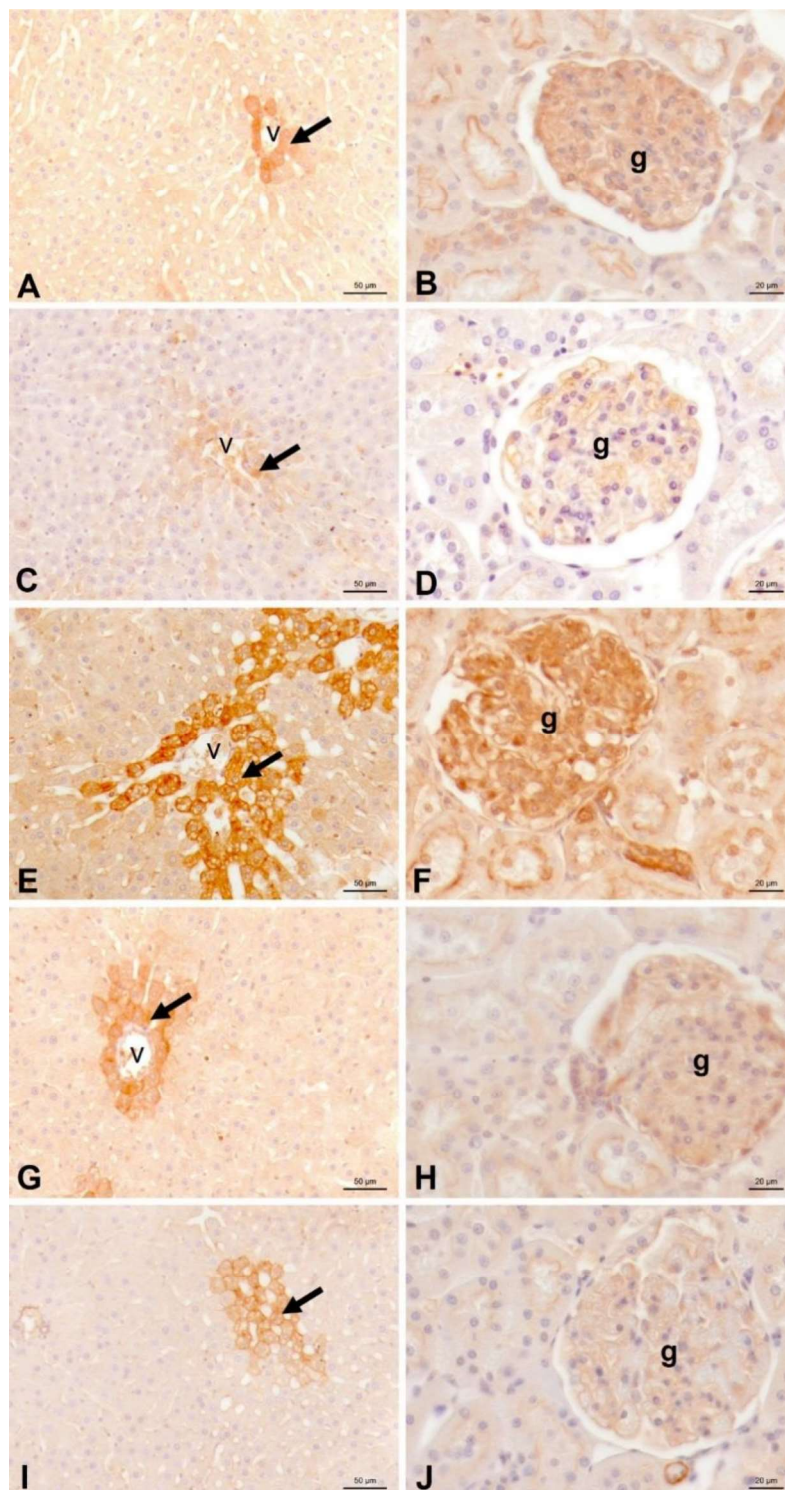


Figura 25. Imuno-histoquímica para TNF α do fígado (A, C, E, G, I) e rins (B, D, F, H, J). Contracoloração pela hematoxilina. Grupos: Wistar controle (A-B), Wistar – OE (C-D), SHR controle (E-F), SHR – OE (G-H) e SHR – PEJUac@OE (I-J). No fígado as marcações positivas para TNF α (setas) são observadas principalmente nos hepatócitos adjacentes aos vasos sanguíneos (v). Nos rins, as marcações em castanho são observadas nos capilares glomerulares (g).

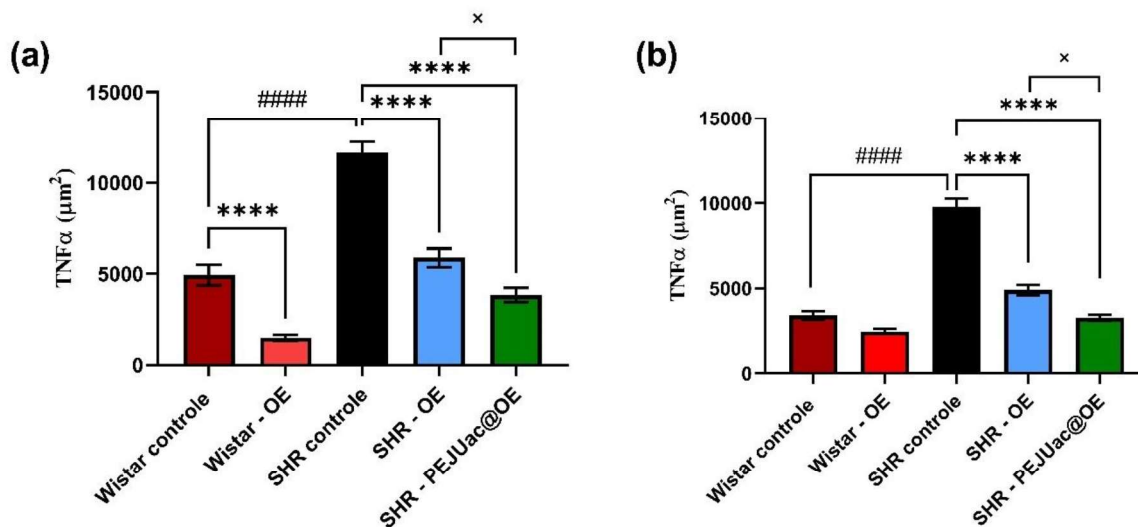


Figura 26. Quantificação das áreas positivas para TNF α no tecido hepático (a) e renal (b). Os valores são expressos como área \pm EPM (n=5, 15 imagens por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste Tukey. ####p<0,0001 controle SHR vs. controle Wistar; ****p<0,01; tratamento vs. controle; *p<0,05 tratamento SHR - PEJUac@OE vs tratamento SHR - OE.

5 DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PEJUac@OE

O óleo essencial extraído de *C. sinensis* é um produto secundário da obtenção do suco de laranja, sendo obtido a partir do resíduo de bagaço gerado durante o processo de prensagem da fruta. Esse óleo essencial é amplamente utilizado na indústria farmacêutica e cosmética em função de suas propriedades aromatizantes e apresenta grande potencial bioativo em função do seu alto conteúdo de *d*-limoneno (Tabela 1), um monoterpeno que apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante, cardioprotetora e antibacteriana (85).

No entanto, considerando sua natureza volátil, para que seja possível utilizar eficientemente este óleo essencial em sistemas biológicos, é necessário o desenvolvimento de carreadores que aumentem sua estabilidade no trato gastrointestinal, possibilitem uma maior absorção intestinal e maior disponibilidade do óleo essencial no local de ação desejado.

As nanopartículas são uma estratégia interessante para o aumento da biodisponibilidade de drogas administradas via oral, sendo o diâmetro uma característica que exerce grande influência no processo de absorção do nanomaterial. Win e colaboradores (86) demonstraram que nanopartículas com diâmetro entre 100-200 nm apresentaram maior absorção quando comparadas com nanopartículas de 50 nm e 500 nm, o que mostra que existe uma faixa ótima de diâmetro para nanoformulações com administração oral. As nanopartículas de PEJUac@OE apresentaram um diâmetro hidrodinâmico médio de 161 nm, tendo assim um tamanho ideal para melhor absorção no trato gastrointestinal. Além disso, a dispersão de tamanho de partículas foi baixa (0,141), o que caracteriza as nanopartículas de PEJUac@OE como um sistema monodisperso, com baixa tendência à agregação (87).

Outra característica importante é a morfologia do nanomaterial. Bayat e colaboradores (88) demonstraram que as nanopartículas com formato esférico ou subesférico e com superfície lisa aumentam a área superficial das nanopartículas, maximizando a absorção do composto de interesse. As nanopartículas de PEJUac@OE apresentaram tamanho médio de $133 \pm 12,4$ nm e morfologia circular e superfície lisa, bem característicos de nanopartículas polissacarídicas produzidas por

nanoprecipitação. O menor diâmetro observado é um reflexo das diferenças de detecção observados nas técnicas de DLS e microscopia, pois na técnica de DLS faz-se a medida do nanomaterial e a sua camada de solvatação, o que não ocorre na microscopia eletrônica de transmissão. Apesar da característica geral hidrofóbica do PEJUac, resíduos de monossacarídeos que não foram acetilados apresentam potencial de interação com moléculas de água, o que gera uma camada de solvatação ao redor da nanopartícula em solução (89, 90).

O potencial Zeta é um dos principais parâmetros que influenciam na estabilidade de nanopartículas, sendo caracterizado como o potencial elétrico na dupla camada interfacial. Os materiais macroscópicos ou particulados quando em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície, podendo essa carga ser por diversos motivos, como a dissociação de grupos iônicos na superfície da partícula ou adsorção diferencial de íons da solução na superfície da partícula. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons da camada de solvatação, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície, formando assim uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido (91).

No caso de nanopartículas poliméricas, esse efeito de carga se alia ao efeito de impedimento estérico oriundo das cadeias poliméricas da superfície do nanomaterial (Figura 27), o que torna desejável a utilização de polímeros carregados como carreadores de moléculas bioativas, uma vez que a estabilidade desses materiais implica em menor agregação e conseqüentemente melhor liberação do princípio ativo.

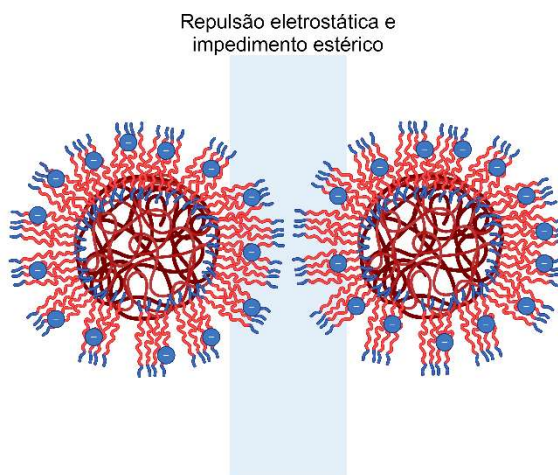


Figura 27. Esquema representando os efeitos de repulsão eletrostática e impedimento estérico presentes nas nanopartículas de PEJUac@OE.

Além da estabilidade da formulação, a carga superficial das nanopartículas pode influenciar a captação pelas células gastrointestinais, bem como a interação com a barreira mucosa e os enterócitos (92, 93). Chickering e Mathiowitz (94) relataram que o uso de polímeros aniônicos conferem uma melhor adesão à mucosa do que polímeros catiônicos ou não iônicos devido à presença de grupamentos carboxila na superfície que geram fortes interações bioadesivas por ligações de hidrogênio com a mucina.

Do ponto de vista químico, as nanopartículas de PEJUac@OE apresentam características que as habilitam como bons carreadores de moléculas bioativas, e sua capacidade de encapsular o óleo essencial confirma a qualidade do nanomaterial produzido.

A eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC) da nanoformulação são características importantes do processo, uma vez que demonstram a eficiência de produção do material, sendo que quanto maior a EE, maior a quantidade de princípio ativo na formulação final, e quanto maior a CC, menor é a quantidade de polímero necessário para produzir a formulação. A nanopartícula de PEJUac@OE apresentou eficiência de encapsulação de 75,18% e capacidade de carga de 15,18%, valores condizentes com os achados da literatura (95, 96). A EE demonstra a importância da acetilação do PEJU na encapsulação do óleo essencial de *C. sinensis*, uma vez que a característica hidrofóbica do polímero permitiu o surgimento de interações químicas com os componentes apolares do óleo essencial, sendo possível a formação de uma nanoformulação automontável por interações químicas hidrofóbicas.

5.2 CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO

A lesão celular pode ser induzida pelo estresse oxidativo, que danifica elementos celulares vitais como RNA, DNA, lipídios e proteínas. Portanto, estratégias para intervenção terapêuticas visando a redução do estresse oxidativo oferecem uma abordagem promissora no tratamento de várias doenças e suas comorbidades (97). O estresse oxidativo surge de uma disparidade entre o sistema de defesa antioxidante da célula e a superprodução de moléculas oxidantes, particularmente espécies reativas de oxigênio (EROs) (98).

Embora o H_2O_2 não seja diretamente um radical livre, ele é comumente reconhecido com um contribuidor significativo para geração de EROs, pois pode modificar o estado redox intracelular por meio de sua transformação em radicais hidroxila altamente reativos, o que pode comprometer de forma irreversível a função mitocondrial, levando à morte celular (99).

O ensaio de citotoxicidade demonstrou que tanto óleo essencial quando as nanopartículas de PEJUac@OE não apresentam toxicidade celular nas concentrações testadas, mostrando seu potencial biocompatível (Figura 9). Além disso, o ensaio de atividade citoprotetora contra peróxido de hidrogênio demonstrou o potencial antioxidante do óleo essencial e das nanopartículas de PEJUac@OE. Vários relatos na literatura demonstram o efeito antioxidante do óleo essencial de *C. sinensis*, como Huang e colaboradores (99), Roberto e colaboradores (18) e Piccialli e colaboradores (100). Seu efeito antioxidante está ligado principalmente a redução da peroxidação lipídica, bem como aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como SOD e CAT.

5.3 ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PEJUac@OE

Existem vários relatos na literatura que demonstram que nanopartículas podem ser absorvidas no epitélio do intestino delgado por via paracelular ou transcelular (101). Essas vias de transporte aumentam a absorção de compostos bioativos no trato gastrointestinal, uma vez que protegem o composto da passagem no TGI, bem como diminuem o efluxo ativo que muitos compostos naturais sofrem durante o processo de absorção (102).

Na Figura 11, é possível observar um alargamento do espaço intercelular epitelial, o que permite um transporte paracelular das nanopartículas de PEJUac@OE com menor diâmetro. O transporte paracelular se refere a uma difusão passiva através de espaços intercelulares entre o epitélio (103). Tanto as nanopartículas quanto os mediadores de proteína juncional, como o tween 80, podem controlar de maneira transitória e reversível a abertura das junções estreitas para melhorar o transporte de compostos bioativos por via paracelular (104). As junções estreitas são formadas por proteínas juncionais entre as células epiteliais e são responsáveis pela integridade e proteção do epitélio.

O processo de absorção das nanopartículas também pode envolver transporte transcelular, como macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina (105, 106). A macropinocitose é um processo conduzido por actina e pode internalizar as nanopartículas sem mediação de receptores. Partículas com tamanho médio abaixo de 2 μm são envolvidas por macropinosomos formados na superfície dos enterócitos e internalizados pela célula. As nanopartículas internalizadas são posteriormente translocadas para o endolisossomo (107). O'Neill e colaboradores (108) relataram que as nanopartículas de ciclodextrina com cauda lipídica foram absorvidas pelas células Caco-2 por meio de macropinocitose e confirmadas pela inibição da endocitose mediada por clatrina e caveolina, sendo esse um mecanismo possível para a absorção das nanopartículas de PEJUac@OE.

Uma parte do nanomaterial também pode ser internalizado pelas células do epitélio intestinal por endocitose mediada por clatrina. As fossetas englobam nanopartículas nas células por meio de receptores lipoproteicos de baixa densidade ou receptores de transferência carregados com ferro. Nanopartículas com tamanhos médios abaixo de 200 nm tiveram a capacidade de estabilizar as cavidades revertidas de clatrina (109, 110). A endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina são as menos prováveis de estarem envolvidas na absorção das nanopartículas de PEJUac@OE, uma vez que estão envolvidas na internalização de nanomateriais menores que 60 nm (111, 112). Sendo assim, com base nos relatos da literatura e os achados na microscopia eletrônica de transmissão do intestino de ratos tratados com nanopartículas de PEJUac@OE, o mais provável é que as nanopartículas menores sejam absorvidas de forma paracelular, enquanto as nanopartículas maiores sejam internalizadas pelos enterócitos por macropinocitose e endocitose mediada por clatrina.

Após serem internalizadas pelas células epiteliais intestinais, as nanopartículas podem ser translocadas para o endolisossomo e posteriormente degradadas no lisossomo para liberar o óleo essencial. As nanopartículas podem potencialmente permanecerem intactas no endolisossomo e entrar na circulação sanguínea por exocitose, uma vez que o PEJUac é um heteropolissacarídeo ramificado de difícil degradação enzimática (102, 113).

5.4 EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS, OXIDATIVOS E HISTOPATOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL NÃO ENCAPSULADO E DAS NANOPARTÍCULAS DE PEJUac@OE

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são um modelo genético de ratos que desenvolvem pressão arterial consistentemente mais alta em comparação com outras linhagens, apresentando aumento da atividade dos mecanismos de retenção de líquidos, reabsorção de sódio e aumento da resistência vascular (114, 115). O modelo genético SHR é o que mais se assemelha com a forma humana da hipertensão arterial primária (116). Os SHR desenvolvem outras complicações associadas à hipertensão semelhantes às que ocorrem na hipertensão humana, como lesões cerebrais e miocárdicas.

Os resultados de pressão arterial sistólica nas linhagens Wistar e SHR utilizados neste trabalho estão de acordo com os dados da literatura, sendo observados valores médios de PAS entre 109 e 99 para animais da linhagem Wistar e valores de PAS acima de 160 mmHg para animais da linhagem SHR com idade a partir de 10 semanas (117-120). Nesse sentido, a aferição da PAS e análise da função renal realizados neste estudo sugerem que o efeito evocado pelo OE de *C. sinensis* nessas linhagens é do tipo hipotensor e anti-hipertensivo. Além disso, os resultados apresentados nos tratamentos com as nanopartículas de PEJUac@OE também indicam uma atividade tipo anti-hipertensiva (Figura 12). O efeito tipo hipotensor do *d*-limoneno, principal componente do OE de *C. sinensis* já foi relatado por Nascimento e colaboradores (26) em ratos Wistar. Segundo o autor, o efeito hipotensor pode estar associado ao bloqueio de canais de cálcio do tipo L. Além disso, efeito anti-hipertensivo do *d*-limoneno já foi descrito por Santiago e colaboradores (121), utilizando modelo de indução de hipertensão em ratos Wistar. Wyer e colaboradores (122) também evidenciaram que o *d*-limoneno atua como indutor de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), restaurando o relaxamento aórtico em camundongos asmáticos.

Os achados da literatura, juntamente com os resultados da pressão arterial sistólica obtidos nesse trabalho sugerem que o efeito mais potente do óleo essencial não encapsulado na redução da PAS dos animais da linhagem SHR em comparação aos resultados observados para o tratamento com as nanopartículas de PEJUac@OE está associado ao fato de que a forma livre do óleo essencial provavelmente possui

um pico de concentração mais alto na corrente sanguínea, o que estaria agindo de forma mais efetiva no bloqueio dos canais de cálcio do tipo L da musculatura lisa vascular e na ativação da eNOS, enquanto que as nanopartículas apresentam uma liberação sustentada com pico de concentração plasmático do composto bioativo menor.

Além do efeito na pressão arterial, o OE e o PEJUac@OE foram avaliados quanto à sua capacidade de interferir com os parâmetros metabólicos e com a função renal dos animais. A análise do peso dos animais revelou que o tratamento com OE e PEJUac@OE afetou diferentemente o peso das linhagens Wistar e SHR (Figuras 13a e 13b), sem alterar o consumo de ração e/ou a excreção de fezes (Figura 14), o que indica ausência de efeito anorexígeno. Estudos do efeito do *d*-limoneno em modelo animal de obesidade sugerem que o mecanismo de ação desse composto está associado à ativação da Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK) em adipócitos, o que resulta em inibição da adipogênese e lipogênese, com ativação da lipólise (123). Essa proposição é corroborada pelos resultados de peso do tecido adiposo dos animais da linhagem SHR (Figura 13b), com a presença de uma redução de peso do tecido adiposo nos animais tratados com as nanopartículas de PEJUac@OE. É possível que a diferença de efeito na redução de peso dos tratamentos com OE e PEJUac@OE na linhagem SHR (Figura 13a) possa ser um reflexo das alterações celulares características desses animais. Alterações de permeabilidade de membrana podem ter afetado a capacidade de internalização do OE na linhagem SHR, uma vez que foi observado efeito de redução de peso nos tratamentos com OE na linhagem Wistar. Nesse caso, a encapsulação contribuiu para um possível aumento da concentração de OE na biofase, que pode estar associado (1) à adesão das nanopartículas à membrana plasmática do adipócito com consequente liberação sustentada do ativo, e/ou (2) ao aumento da concentração intracelular do OE ocasionado por uma permeação facilitada do nanossistema, por mecanismos semelhantes ao observado na absorção pelos enterócitos. Nesse caso, a encapsulação torna possível o reestabelecimento da atividade ativadora de lipólise do OE, o que resulta em uma redução de conteúdo lipídico no tecido adiposo e consequente redução de peso nos animais da linhagem SHR tratados com o PEJUac@OE (Figura 13a).

Considerando que o conteúdo de gordura visceral constitui uma das vias associadas ao aumento da PAS, a depleção das reservas adipocíticas é um resultado importante para o manejo da hipertensão arterial dos animais SHR. O excesso de gordura visceral ocasiona o aumento dos níveis de diversas citocinas associadas ao desenvolvimento de disfunção endotelial e hipertensão. Além disso, o aumento de citocinas pró-inflamatórias pode ocasionar, também, rigidez ventricular e hipertrofia cardíaca, contribuindo para o desenvolvimento da síndrome metabólica associada à hipertensão (124, 125). Nesse sentido, o efeito anti-inflamatório observado tanto para o OE quanto para as nanopartículas de PEJUac@OE pode ser outro resultado importante tanto na prevenção quanto no tratamento das complicações associadas ao desenvolvimento da síndrome metabólica.

Considerando a importância da avaliação do efeito da administração crônica do OE e do PEJUac@OE na ingestão de água, foi avaliado o volume de água ingerido e os resultados obtidos permitiram inferir que não houve diferença entre os grupos experimentais e as linhagens Wistar e SHR (Figura 15a), podendo-se concluir que nem o OE, nem as nanopartículas de PEJUac@OE interferem com a osmolaridade plasmática dos animais.

Além dos efeitos metabólicos, a hipertensão ocasiona alterações funcionais e estruturais nos rins e, nesse sentido, avaliar a formação e composição da urina é de grande importância para se estudar a função renal. A determinação do volume de urina excretada é um importante parâmetro para se avaliar o fluxo urinário no decorrer de 24h. Ao analisarmos os resultados podemos observar ausência de alteração de volume urinário entre as linhagens e tratamentos (Figura 15b), porém, é possível observar que ambos os grupos SHR tratados apresentaram um aumento dos níveis de sódio urinário (Figura 16b). A natriurese sem alteração nos níveis plasmáticos de sódio (Figura 16a) sugerem uma melhora na função renal, possivelmente mediada pela inibição da reabsorção tubular de sódio. Este efeito pode contribuir para a redução da pressão arterial observada, uma vez que a excreção aumentada de sódio é uma estratégia reconhecida para o controle da hipertensão arterial.

Também foi observado uma diminuição dos níveis de proteínas totais urinárias no grupo PEJUac@OE (Figura 18b), e uma diminuição da concentração plasmática de ácido úrico nas linhagens SHR tratadas com OE e PEJUac@OE em comparação com o grupo SHR controle (Figura 19a), demonstrando uma melhora da função renal

dos animais tratados, possivelmente devido a modulação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase (Figuras 23b e 23c). Além disso, os níveis de malonaldeído no rim sofreram redução apenas no grupo SHR - PEJUac@OE (Figura 23a), o que vai de encontro com os achados de proteínas totais na urina (Figura 18b), demonstrando que o óleo essencial na sua forma nanoencapsulada apresenta uma liberação sustentada, o que contribui para uma ação anti-inflamatória e antioxidante mais potente.

Em relação às alterações bioquímicas (Figura 22) e morfológicas (Figura 24) observadas no fígado, nota-se um comportamento semelhante ao observado no rim, onde níveis de peroxidação lipídica foram reduzidos apenas no grupo SHR - PEJUac@OE, enquanto os dois grupos SHR tratados tiveram um aumento na atividade da SOD e CAT, reforçando a tese de que uma liberação sustentada do óleo essencial favorece a atividade antioxidante do composto.

A superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). O radical superóxido é uma das formas reativas de oxigênio (ROS) mais prevalentes e iniciais que se formam nas células. A SOD é frequentemente a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo. A catalase (CAT) converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Embora o H_2O_2 seja menos reativo que o superóxido, ele pode ser convertido em radicais hidroxila altamente reativos via reação de Fenton, tornando a sua remoção essencial para a proteção celular (126). Com base nos relatos da literatura, o limoneno pode agir no aumento da atividade da SOD e CAT de três formas: (1) pode agir diretamente nas enzimas, estabilizando sua estrutura, (2) pode agir como um indutor gênico, aumentando assim a expressão das enzimas e (3) devido a sua estrutura química que lhe permite neutralizar eficientemente os radicais livres, ele pode atuar como um regenerador da SOD e CAT, otimizando suas atividades enzimáticas (17, 18). Esses mecanismos podem estar envolvidos na melhora da atividade dessas enzimas nos tecidos hepático e renal observados neste trabalho.

A hipertensão desenvolvida no modelo SHR ocasiona alterações estruturais nos rins antes mesmo da hipertensão ser aparente (114, 127). Dentre as principais alterações estruturais temos a remodelação vascular causada pela deposição de matriz extracelular, hipertrofia e vasodilatação dependente do endotélio vascular prejudicada (128). Esses fatores causam redução do diâmetro do lúmen e aumento

da resistência periférica e, portanto, aumento da pressão arterial média. Essas alterações estruturais resultam em redução da taxa de filtração glomerular (TGF) e anormalidades em diversos mecanismos de transporte de íons (114). O estudo do *clearance* de creatinina nos permite estudar virtualmente a TGF. No grupo SHR controle é possível observar o efeito negativo causado na depuração de creatinina quando comparo com o grupo Wistar controle (Figura 21a). Em relação aos animais hipertensos tratados, o óleo essencial não encapsulado não foi capaz de melhorar a taxa de filtração glomerular, enquanto o grupo tratado com PEJUac@OE apresentou aumento do *clearance* de creatinina, demonstrando que as nanopartículas de PEJUac@OE apresentam um efeito nefroprotetor (Figura 21a).

Os rins também têm função de controle dos níveis de ureia, metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas que é um importante biomarcador da função renal. A ureia possui grande função no transporte de contracorrente ao longo da Alça de Henle, auxiliando no transporte de biomoléculas. A linhagem SHR apresentou valores de ureia plasmática superiores aos determinados no controle normotenso (Figura 20c), o que pode ser explicado em função das características intrínsecas do modelo SHR. A linhagem SHR apresenta diferenças no fluxo sanguíneo renal e na função renal quando comparados com ratos da linhagem Wistar normotensos. Estas diferenças devem-se em parte a alterações estruturais, como remodelação vascular dependente do endotélio prejudicada (117). Esses fatores causam redução no diâmetro do lúmen e aumento da resistência periférica vascular e, portanto, diminuição da depuração de ureia, elevando os níveis séricos (129, 130).

No entanto, foi observado que o tratamento da linhagem SHR com PEJUac@OE ocasionou redução significativa dos níveis de ureia plasmática, aumento nos valores de ureia urinária (Figura 20d) e depuração de ureia (Figura 21b), indicando que o nanossistema auxilia na recuperação da função renal da linhagem SHR, apresentando efeito tipo nefroprotetor.

Desse modo, é possível concluir que o óleo essencial não encapsulado, com sua rápida absorção e depuração, mostrou uma ação eficaz na redução da inflamação renal aguda, conforme evidenciado pela redução de edema e dos focos inflamatórios (Figura 24H). No entanto, essa rápida excreção pode limitar seu impacto sustentado sobre a função renal, que requer uma recuperação prolongada e consistente das células glomerulares e tubulares para melhorar a TFG. Por outro lado, a

nanoencapsulação do óleo essencial oferece uma liberação prolongada do composto, permitindo uma exposição contínua nos tecidos renais, sendo isso crucial para a manutenção da hemodinâmica renal e para a promoção da regeneração celular a longo prazo, fatores essenciais para a melhora funcional renal. Essa afirmação é corroborada com a imuno-histoquímica para TNF α , onde o grupo SHR tratado com nanopartículas de PEJUac@OE apresentaram menor imunomarcação quando comparados com o grupo SHR tratado com óleo essencial livre, principalmente nos glomérulos renais (Figuras 24H, 24J e 25b), evidenciando que o nanomaterial potencializa o efeito nefroprotetor do óleo essencial.

Assim, enquanto o óleo essencial não encapsulado é eficaz na modulação imediata da inflamação, a forma nanoencapsulada proporciona uma recuperação funcional renal superior devido à sua liberação sustentada, destacando a importância das nanopartículas de PEJUac@OE na melhora dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos do óleo essencial de *C. sinensis*.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Nanopartículas de PEJUac@OE foram eficientemente produzidas, apresentando propriedades químicas e morfológicas satisfatórias e elevado percentual de encapsulação de óleo essencial de *C. sinensis*.
- ✓ Nanopartículas de PEJUac@OE não apresentaram citotoxicidade e foram eficientemente absorvidas no intestino delgado.
- ✓ O óleo essencial de *C. sinensis* e as nanopartículas de PEJUac@OE possuem efeito redutor de peso, provavelmente associado à redução da adipogênese e lipogênese e ativação de lipólise.
- ✓ O óleo essencial de *C. sinensis* e as nanopartículas de PEJUac@OE apresentam efeito tipo anti-hipertensivo com interferência na natriurese pressórica.
- ✓ Nanopartículas de PEJUac@OE aumentaram a taxa de filtração glomerular dos animais SHR, melhorando a função renal dessa linhagem SHR, apresentando efeito nefroprotetor.
- ✓ O óleo essencial de *C. sinensis* e as nanopartículas de PEJUac@OE aumentam a atividade das enzimas SOD e CAT renais e hepáticas, enquanto apenas as nanopartículas de PEJUac@OE conseguem diminuir a peroxidação lipídica no rim e fígado.
- ✓ O óleo essencial de *C. sinensis* e as nanopartículas de PEJUac@OE reduzem as áreas hepáticas comprometidas, e apenas o óleo essencial de *C. sinensis* melhora as regiões de edema e inflamação renal.
- ✓ O óleo essencial de *C. sinensis* e as nanopartículas de pEJUac@OE reduzem as imunomarcações por TNF α , e nanopartículas de PEJUac@OE são mais eficientes em reduzir a produção de TNF α no tecido renal e hepático.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliação do efeito do óleo essencial *C. sinensis* e das nanopartículas de PEJUac@OE na produção de óxido nítrico em células endoteliais humanas.
- ✓ Avaliação do efeito do óleo essencial *C. sinensis* e das nanopartículas de PEJUac@OE na produção de radicais livres provocada por peróxido de hidrogênio.
- ✓ Avaliação do efeito do óleo essencial *C. sinensis* e das nanopartículas de PEJUac@OE na histopatologia do coração.
- ✓ Avaliação do efeito do óleo essencial *C. sinensis* e das nanopartículas de PEJUac@OE nos marcadores oxidativos e atividade antioxidante enzimática no tecido cardíaco.
- ✓ Avaliação do efeito do óleo essencial *C. sinensis* e das nanopartículas de PEJUac@OE na produção de marcadores inflamatórios no tecido cardíaco.

8 REFERÊNCIAS

1. Nahler G. European Pharmacopoeia (Eur Ph). In: Nahler G, editor. Dictionary of Pharmaceutical Medicine. Vienna: Springer Vienna; 2009. p. 69-.
2. Asbahani AE, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;483(1):220-43.
3. Kant R, Kumar A. Review on essential oil extraction from aromatic and medicinal plants: Techniques, performance and economic analysis. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2022;30:100829.
4. Svoboda KP, Greenaway RI. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *International Journal of Aromatherapy*. 2003;13(4):196-202.
5. Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules*. 2017;22(1).
6. War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav*. 2012;7(10):1306-20.
7. War AR, Sharma HC, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S. Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant Signal Behav*. 2011;6(12):1973-8.
8. Holopainen JK, Blande JD. Where do herbivore-induced plant volatiles go? *Front Plant Sci*. 2013;4:185.
9. Fürstenberg-Hägg J, Zagrobelny M, Bak S. Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):10242-97.
10. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2014;62:250-64.
11. Hou T, Sana SS, Li H, Xing Y, Nanda A, Netala VR, et al. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Bioscience*. 2022;47:101716.
12. Swamy MK, Sinniah UR. A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An

Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. *Molecules* [Internet]. 2015; 20(5):[8521-47 pp.].

13. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016;2016:3012462.

14. Becker AJ, Braga A, Magalhães V, Medeiros LM, Ramos PB, Monserrat JM, et al. Examination of the antioxidant effects of linalool and *Lippia alba* essential oil in the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, subjected to eyestalk ablation. *Aquaculture*. 2024;592:741215.

15. Singh B, Singh JP, Kaur A, Yadav MP. Insights into the chemical composition and bioactivities of citrus peel essential oils. *Food Research International*. 2021;143:110231.

16. Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song H-S, Sawamura M, Suganuma N. Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. *Journal of Food Science*. 2010;75(3):H87-H92.

17. Murali R, Karthikeyan A, Saravanan R. Protective Effects of d-Limonene on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013;112(3):175-81.

18. Roberto D, Micucci P, Sebastian T, Graciela F, Anesini C. Antioxidant Activity of Limonene on Normal Murine Lymphocytes: Relation to H₂O₂ Modulation and Cell Proliferation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2010;106(1):38-44.

19. Yu X, Lin H, Wang Y, Lv W, Zhang S, Qian Y, et al. d-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. *OncoTargets and therapy*. 2018;11:1833-47.

20. Ye Z, Liang Z, Mi Q, Guo Y. Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *Journal of BUON*. 2020;25(1):280-5.

21. Hąc-Wydro K, Flasiński M, Romańczuk K. Essential oils as food eco-preservatives: Model system studies on the effect of temperature on limonene antibacterial activity. *Food Chemistry*. 2017;235:127-35.

22. Astani A, Schnitzler P. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. *Iranian Journal of Microbiology*. 2014;6(3):149-55.

23. Luo W, Wang K, Luo J, Liu Y, Tong J, Qi M, et al. Limonene anti-TMV activity and its mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2023;194:105512.
24. do Amaral JF, atilde, Silva MIG, de Aquino Neto MRA, Neto PFT, Moura BA, et al. Antinociceptive Effect of the Monoterpene *(+)-Limonene* in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(7):1217-20.
25. Rhana P, Barros GM, Santos VCdO, Costa AD, Santos DMd, Fernandes-Braga W, et al. S-limonene protects the heart in an experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol: Possible involvement of mitochondrial reactive oxygen species. *European Journal of Pharmacology*. 2022;930:175134.
26. Nascimento GAd, Souza DSd, Lima BS, Vasconcelos CMLd, Araújo AAdS, Durço AO, et al. Bradycardic and Antiarrhythmic Effects of the D-Limonene in Rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2019;113.
27. Durço AO, Souza DS, Rhana P, Costa AD, Marques LP, Santos LABO, et al. d-Limonene complexed with cyclodextrin attenuates cardiac arrhythmias in an experimental model of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2023;474:116609.
28. Kaboudi Z, Peighambardoust SH, Nourbakhsh H, Soltanzadeh M. Nanoencapsulation of Chavir (*Ferulago angulata*) essential oil in chitosan carrier: Investigating physicochemical, morphological, thermal, antimicrobial and release profile of obtained nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;237:123963.
29. Begines B, Ortiz T, Pérez-Aranda M, Martínez G, Merinero M, Argüelles-Arias F, et al. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials* [Internet]. 2020; 10(7).
30. Boostani S, Jafari SM. Chapter Two - Controlled release of nanoencapsulated food ingredients. In: Jafari SM, editor. *Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients*. 5: Academic Press; 2020. p. 27-78.
31. Al-kasmi B, Alsirawan MHDB, Bashimam M, El-zein H. Mechanical microencapsulation: The best technique in taste masking for the manufacturing scale - Effect of polymer encapsulation on drug targeting. *Journal of Controlled Release*. 2017;260:134-41.

32. He J, Hadidi M, Yang S, Khan MR, Zhang W, Cong X. Natural food preservation with ginger essential oil: Biological properties and delivery systems. *Food Research International*. 2023;173:113221.
33. Zhang W, Ezati P, Khan A, Assadpour E, Rhim J-W, Jafari SM. Encapsulation and delivery systems of cinnamon essential oil for food preservation applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2023;318:102965.
34. Omar ZA, Abduljabar RS, Sajadi SM, Mahmud SA, Yahya RO. Recent progress in eco-synthesis of essential oil-based nanoparticles and their possible mechanisms. *Industrial Crops and Products*. 2022;187:115322.
35. Adeyemi SB, Akere AM, Orege JI, Ejeromeghene O, Orege OB, Akolade JO. Polymeric nanoparticles for enhanced delivery and improved bioactivity of essential oils. *Heliyon*. 2023;9(6):e16543.
36. Bhardwaj H, Jangde RK. Current updated review on preparation of polymeric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications. *Next Nanotechnology*. 2023;2:100013.
37. Spirescu VA, Chircov C, Grumezescu AM, Andronesu E. Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An up-to-date Overview. *Polymers [Internet]*. 2021; 13(5).
38. Vasconcelos Silva EdL, Oliveira ACdJ, Moreira LMCdC, Silva-Filho EC, Wanderley AG, Soares MFdLR, et al. Insulin-loaded nanoparticles based on acetylated cashew gum/chitosan complexes for oral administration and diabetes treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;242:124737.
39. Araruna FB, de Oliveira TM, Quelemes PV, de Araújo Nobre AR, Plácido A, Vasconcelos AG, et al. Antibacterial application of natural and carboxymethylated cashew gum-based silver nanoparticles produced by microwave-assisted synthesis. *Carbohydrate Polymers*. 2020;241:115260.
40. Moreira BR, Batista KA, Castro EG, Lima EM, Fernandes KF. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*. 2015;122:69-76.
41. Oliveira ACdJ, Silva EB, Oliveira TCd, Ribeiro FdOS, Nadvorny D, Oliveira JWdF, et al. pH-responsive phthalate cashew gum nanoparticles for improving drugs delivery and anti-*Trypanosoma cruzi* efficacy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;230:123272.

42. Lima MR, Paula HCB, Abreu FOMS, da Silva RBC, Sombra FM, de Paula RCM. Hydrophobization of cashew gum by acetylation mechanism and amphotericin B encapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;108:523-30.
43. Dias SFL, Nogueira SS, de França Dourado F, Guimarães MA, de Oliveira Pitombeira NA, Gobbo GG, et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. *Carbohydrate Polymers*. 2016;143:254-61.
44. do Amaral Rodrigues J, de Araújo AR, Pitombeira NA, Plácido A, de Almeida MP, Veras LMC, et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for the incorporation of alkaloid epiisopiloturine. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;128:965-72.
45. de Andrades EO, da Costa JMAR, de Lima Neto FEM, de Araujo AR, de Oliveira Silva Ribeiro F, Vasconcelos AG, et al. Acetylated cashew gum and fucan for incorporation of lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) in nanostructured systems: Antioxidant and antitumor capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;191:1026-37.
46. Lima I, Moreno L, Dias S, Silva D, Oliveira AC, Soares L, et al. Acetylated cashew gum nanoparticles for mesalazine delivery. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2023;5:100265.
47. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020;578(7794):229-36.
48. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2012;14(1):1-16.
49. Dong Y, Anderson DG. Opportunities and Challenges in mRNA Therapeutics. *Accounts of Chemical Research*. 2022;55(1):1-.
50. Ilhami FB, Erman E, Rahmawati A, Birhan YS, Fitriana, Tiwikrama AH. Self-assembled supramolecular nanoparticle by host-guest interaction for thermo-controlled released of magnolol in cancer chemotherapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;89:105078.
51. Wu JLY, Stordy BP, Nguyen LNM, Deutschman CP, Chan WCW. A proposed mathematical description of in vivo nanoparticle delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2022;189:114520.

52. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2008;26(1):57-64.
53. Hsu C-Y, Rheima AM, Kadhim MM, Ahmed NN, Mohammed SH, Abbas FH, et al. An overview of nanoparticles in drug delivery: Properties and applications. *South African Journal of Chemical Engineering*. 2023;46:233-70.
54. Haddadzadegan S, Dorkoosh F, Bernkop-Schnürch A. Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*. 2022;182:114097.
55. Rizwanullah M, Ahmad J, Amin S, Mishra A, Ain RM, Rahman M. Polymer-Lipid Hybrid Systems: Scope of Intravenous-To-Oral Switch in Cancer Chemotherapy. *Current Nanomedicine*. 2020;10(2):164-77.
56. Afzal O, Rizwanullah M, Altamimi ASA, Alossaimi MA, Kamal M, Ahmad J. Harnessing natural polysaccharides-based nanoparticles for oral delivery of phytochemicals: Knocking down the barriers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;82:104368.
57. Bomfim GHS, Musial DC, Méndez-López I, Jurkiewicz A, Jurkiewicz NH, Padín JF, et al. Chronic resveratrol consumption prevents hypertension development altering electrophysiological currents and Ca(2+) signaling in chromaffin cells from SHR rats. *Cellular signalling*. 2020;76:109811.
58. Młynarczyk M, Kasacka I. The role of the Wnt/ β -catenin pathway and the functioning of the heart in arterial hypertension – A review. *Advances in Medical Sciences*. 2022;67(1):87-94.
59. Organization WH. Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults. Geneva2021.
60. Mohammadipour F, Kiani A, Amin A. The High Potency of Polymeric Nanoparticles in the Drug Delivery System for Hypertension Treatment: A Systematic Review. *Current hypertension reviews*. 2022;18(1):54-63.
61. Nugroho P, Andrew H, Kohar K, Noor CA, Sutrantanto AL. Comparison between the world health organization (WHO) and international society of hypertension (ISH) guidelines for hypertension. *Annals of Medicine*. 2022;54(1):837-45.
62. Yuan J, Guo M, Zhao S, Li J, Wang X, Yang J, et al. Core-shell lipid-polymeric nanoparticles for enhanced oral bioavailability and antihypertensive efficacy of KY5 peptide. *Chinese Chemical Letters*. 2023;34(4):107943.

63. Zheng Y, Wang X, Zhuang Y, Li Y, Tian H, Shi P, et al. Isolation of Novel ACE-Inhibitory and Antioxidant Peptides from Quinoa Bran Albumin Assisted with an In Silico Approach: Characterization, In Vivo Antihypertension, and Molecular Docking. *Molecules* [Internet]. 2019; 24(24).
64. Fancher IS, Rubinstein I, Levitan I. Potential Strategies to Reduce Blood Pressure in Treatment-Resistant Hypertension Using Food and Drug Administration-Approved Nanodrug Delivery Platforms. *Hypertension*. 2019;73(2):250-7.
65. Ganguly A, Sharma K, Majumder K. Chapter Four - Food-derived bioactive peptides and their role in ameliorating hypertension and associated cardiovascular diseases. In: Toldrá F, editor. *Advances in Food and Nutrition Research*. 89: Academic Press; 2019. p. 165-207.
66. Gao J, Liu Q, Zhao L, Yu J, Wang S, Cao T, et al. Identification and Antihypertension Study of Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from the Skirt of *Chlamys farreri* Fermented with *Bacillus natto*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(1):146-58.
67. Prysyazhna O, Wolhuter K, Switzer C, Santos C, Yang X, Lynham S, et al. Blood Pressure-Lowering by the Antioxidant Resveratrol Is Counterintuitively Mediated by Oxidation of cGMP-Dependent Protein Kinase. *Circulation*. 2019;140(2):126-37.
68. Nassar SZ, Hassaan PS, Abdelmonsif DA, ElAchy SN. Cardioprotective effect of cerium oxide nanoparticles in monocrotaline rat model of pulmonary hypertension: A possible implication of endothelin-1. *Life Sciences*. 2018;201:89-101.
69. Ahmad S, Beg ZH. Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats. *Food Chemistry*. 2013;138(2):1116-24.
70. Bacanlı M, Başaran AA, Başaran N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;81:160-70.
71. Lin Q, Liang R, Zhong F, Ye A, Singh H. Physical properties and biological fate of OSA-modified-starch-stabilized emulsions containing β -carotene: Effect of calcium and pH. *Food Hydrocolloids*. 2018;77:549-56.
72. Luo S, Chen J, He J, Li H, Jia Q, Hossen MA, et al. Preparation of corn starch/rock bean protein edible film loaded with d-limonene particles and their application in glutinous rice cake preservation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;206:313-24.

73. Zhu Q, Chen Z, Paul PK, Lu Y, Wu W, Qi J. Oral delivery of proteins and peptides: Challenges, status quo and future perspectives. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(8):2416-48.
74. des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*. 2006;116(1):1-27.
75. Khutoryanskiy VV. Beyond PEGylation: Alternative surface-modification of nanoparticles with mucus-inert biomaterials. *Advanced drug delivery reviews*. 2018;124:140-9.
76. Silva FE, Batista KA, Di-Medeiros MC, Silva CN, Moreira BR, Fernandes KF. A stimuli-responsive and bioactive film based on blended polyvinyl alcohol and cashew gum polysaccharide. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;58:927-34.
77. Cheikh D, García-Vill n F, Majdoub H, Viseras C, Zayani MB. Chitosan/beidellite nanocomposite as diclofenac carrier. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;126:44-53.
78. Graziani D, Ribeiro JVV, Cruz VS, Gomes RM, Araújo EG, Santos Júnior ACM, et al. Oxidant and antioxidant effects of a low molecular weight peptide fraction from hardened bean (*Phaseolus vulgaris*) on endothelium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2021;54.
79. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979;95(2):351-8.
80. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
81. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*. 1972;247(10):3170-5.
82. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6.
83. Pitombeira NAO, Veras Neto JG, Silva DA, Feitosa JPA, Paula HCB, de Paula RCM. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate Polymers*. 2015;117:610-5.
84. Silva CN, Di-Medeiros MC, Li o LM, Fernandes KF, Batista KD. Cashew Gum Polysaccharide Nanoparticles Grafted with Polypropylene Glycol as Carriers for Diclofenac Sodium. *Materials [Internet]*. 2021; 14(9).

85. Anandakumar P, Kamaraj S, Vanitha MK. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *Journal of Food Biochemistry*. 2021;45(1):e13566.
86. Yin Win K, Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005;26(15):2713-22.
87. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337-51.
88. Bayat A, Dorkoosh FA, Dehpour AR, Moezi L, Larijani B, Junginger HE, et al. Nanoparticles of quaternized chitosan derivatives as a carrier for colon delivery of insulin: Ex vivo and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;356(1):259-66.
89. Kuznetsova EV, Kuznetsov NM, Kalinin KT, Lebedev-Stepanov PV, Novikov AA, Chvalun SN. The Role of Integrated Approach in the Determination of Nanoparticle Sizes in Dispersions. *Colloid Journal*. 2022;84(6):704-14.
90. Eze FN, Ovatlarnporn C, Nalinbenjapun S, Sripetthong S. Ultra-fast sustainable synthesis, optimization and characterization of guava phenolic extract functionalized nanosilver with enhanced biomimetic attributes. *Arabian Journal of Chemistry*. 2022;15(10):104167.
91. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016;235:337-51.
92. Wong CY, Luna G, Martinez J, Al-Salami H, Dass CR. Bio-nanotechnological advancement of orally administered insulin nanoparticles: Comprehensive review of experimental design for physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;572:118720.
93. Andreani T, Miziara L, Lorenzón EN, de Souza ALR, Kiill CP, Fangueiro JF, et al. Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;93:118-26.
94. Chickering DE, Mathiowitz E. Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa. *Journal of Controlled Release*. 1995;34(3):251-62.

95. Souto EB, Zielinska A, Souto SB, Durazzo A, Lucarini M, Santini A, et al. (+)-Limonene 1,2-Epoxy-Loaded SLNs: Evaluation of Drug Release, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity in an HaCaT Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2020; 21(4).
96. Araujo TDS, da Costa JMAR, de Oliveira Silva Ribeiro F, de Jesus Oliveira AC, do Nascimento Dias J, de Araujo AR, et al. Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;193:100-8.
97. McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate caspase-dependent and -independent neuronal deaths. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2014;63:13-23.
98. Tian X, Gao L, An L, Jiang X, Bai J, Huang J, et al. Pretreatment of MQA, a caffeoylquinic acid derivative compound, protects against H₂O₂-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Neurological Research*. 2016;38(12):1079-87.
99. Dumont M, Beal MF. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(5):1014-26.
100. Piccialli I, Tedeschi V, Caputo L, Amato G, De Martino L, De Feo V, et al. The Antioxidant Activity of Limonene Counteracts Neurotoxicity Triggered by A β (1-42) Oligomers in Primary Cortical Neurons. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2021;10(6).
101. Lee M, Ni N, Tang H, Li Y, Wei W, Kakinen A, et al. A Framework of Paracellular Transport via Nanoparticles-Induced Endothelial Leakiness. 2021;8(21):2102519.
102. Li Z, Jiang H, Xu C, Gu L. A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*. 2015;43:153-64.
103. Sonaje K, Chuang E-Y, Lin K-J, Yen T-C, Su F-Y, Tseng MT, et al. Opening of Epithelial Tight Junctions and Enhancement of Paracellular Permeation by Chitosan: Microscopic, Ultrastructural, and Computed-Tomographic Observations. *Molecular Pharmaceutics*. 2012;9(5):1271-9.
104. Zhang H, Yao M, Morrison RA, Chong S. Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. *Archives of pharmacal research*. 2003;26(9):768-72.
105. Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit J-P. Biopharmaceutical Parameters to Consider in Order to Alter The Fate of Nanocarriers After Oral Delivery. *Nanomedicine*. 2010;5(2):287-306.

106. Wang J, Byrne JD, Napier ME, DeSimone JM. More Effective Nanomedicines through Particle Design. *Small*. 2011;7(14):1919-31.
107. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 2010;145(3):182-95.
108. O' Neill MJ, Guo J, Byrne C, Darcy R, O' Driscoll CM. Mechanistic studies on the uptake and intracellular trafficking of novel cyclodextrin transfection complexes by intestinal epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;413(1):174-83.
109. Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell*. 2004;118(5):591-605.
110. Xu ZP, Nibert M, Porazik K, Walker TL, Cooper HM, Middelberg APJ, et al. Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2008;130(1):86-94.
111. Hao X, Wu J, Shan Y, Cai M, Shang X, Jiang J, et al. Caveolae-mediated endocytosis of biocompatible gold nanoparticles in living Hela cells *. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2012;24(16):164207.
112. Lai SK, Hida K, Man ST, Chen C, Machamer C, Schroer TA, et al. Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. *Biomaterials*. 2007;28(18):2876-84.
113. Qian M, Cai D, Verhey KJ, Tsai B. A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLOS Pathogens*. 2009;5(6):e1000465.
114. Hultström M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2012;30(6):1087-91.
115. Grisk O, Klötting I, Exner J, Spiess S, Schmidt R, Junghans D, et al. Long-term arterial pressure in spontaneously hypertensive rats is set by the kidney. *Journal of Hypertension*. 2002;20(1):131-8.
116. Skov K, Mulvany MJ, Korsgaard N. Morphology of renal afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1992;20(6):821-7.
117. Ahmeda AF, Alzoghaibi M. Factors regulating the renal circulation in spontaneously hypertensive rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(4):441-51.
118. de Oliveira ACF, Brito VGB, Ramos GHAdS, Werlang MLC, Fiais GA, Dornelles RCM, et al. Analysis of salivary flow rate, biochemical composition, and redox status

in orchietomized spontaneously hypertensive rats. *Archives of Oral Biology*. 2023;152:105732.

119. Fukuda N, Katakawa M, Ito H, Hara T, Otsuka N, Ishizuka M, et al. 5-Aminolevulinic acid hydrochloride enhances bupivacaine-induced hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2023;152(1):22-9.

120. Wang Y, Zhang Y, Wang W, Liu X, Chi Y, Lei J, et al. Effects of circadian rhythm disorder on the hippocampus of SHR and WKY rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2020;168:107141.

121. Santiago JVA, Jayachitra J, Shenbagam M, Nalini N, editors. d-limonene attenuates blood pressure and improves the lipid and antioxidant status in high fat diet and L-NAME treated rats 2010.

122. Wyer A, Nellutla R, Rajalingam S, Prasad P, Ponnoth DS. Limonene restores A2AAR mediated-vascular relaxation in asthmatic mice via nitric oxide. *The FASEB Journal*. 2022;36(S1).

123. Liao J-T, Huang Y-W, Hou C-Y, Wang J-J, Wu C-C, Hsieh S-L. D-Limonene Promotes Anti-Obesity in 3T3-L1 Adipocytes and High-Calorie Diet-Induced Obese Rats by Activating the AMPK Signaling Pathway. *Nutrients* [Internet]. 2023; 15(2).

124. Fantin F, Giani A, Zoico E, Rossi AP, Mazzali G, Zamboni M. Weight Loss and Hypertension in Obese Subjects. *Nutrients* [Internet]. 2019; 11(7).

125. Cohen JB. Hypertension in Obesity and the Impact of Weight Loss. *Current Cardiology Reports*. 2017;19(10):98.

126. Sarker U, Oba S. Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Scientific Reports*. 2018;8(1):16496.

127. Ortiz PA, Garvin JL. Intrarenal transport and vasoactive substances in hypertension. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):621-4.

128. Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*. 2002;15(1):78-84.

129. Bruic M, Grujic-Milanovic J, Miloradovic Z, Jovovic D, Zivkovic L, Mihailovic-Stanojevic N, et al. DNA, protein and lipid oxidative damage in tissues of

spontaneously hypertensive versus normotensive rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2021;141:106088.

130. Hu X, Zhao W, Deng J, Du Z, Zeng X, Zhou B, et al. Mangiferin alleviates renal inflammatory injury in spontaneously hypertensive rats by inhibiting MCP-1/CCR2 signaling pathway. *Chinese Herbal Medicines*. 2023;15(4):556-63.

ANEXO 1 – Artigo submetido à revista *European Food Research and Technology* (Qualis CAPES – A2)

O artigo em anexo compreende uma vertente das avaliações do potencial bioativo das nanopartículas de PEJUac@OE. Os resultados foram apresentados no exame de qualificação, mas em função do volume de informações obtidas nos testes em modelo animal, optamos por remover os testes do corpo da tese e adicionar o artigo produzido e submetido à revista *European Food Research and Technology* como anexo.

Acetylated cashew gum polysaccharide nanoparticles as a promising green label nanomaterial for encapsulation of D-limonene: Physicochemical, structural and antimicrobial properties

Cassio N.S. Silva^{1#}, Richard D.R. Ferreira^{1#}, Ivan T.N. Campos¹, Kátia F. Fernandes¹,

Luciano M. Lião¹, Maria Carolina B. Di Medeiros¹, Karla A. Batista^{1,2,*}

¹Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia-GO, 74690-900, Brazil

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Campus Goiânia Oeste, Goiânia-GO, 74395-160, Brazil

[#]These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author:** Karla A Batista

e-mail: karla.batista@ifg.edu.br

Tel.: +55 62 3237-1857

Abstract

The main novelty of this research lies in combining hydrophobised natural polysaccharides from cashew gum (acCGP) and D-limonene (DL) to create sustainable nanoparticles with enhanced physicochemical and antimicrobial properties, offering promising applications in diverse fields of the food industry requiring eco-friendly and high-performance components to develop bioactive coatings and packaging. This study investigates the production and characterisation of a green label nanoparticle of DL-loaded acCGP (acCGP@DL), focusing on antibacterial properties and structural integrity. acCGP@DL nanoparticles had a smooth and spheric microstructure, achieving 75.2% of DL encapsulation. X-ray diffraction, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analyses evidenced the success of encapsulation in improving the physicochemical properties of DL. The antibacterial potency was evaluated against the most common foodborne pathogens. Results evidenced that acCGP@DL nanoparticles showed higher antibacterial activity against *Escherichia coli* (CDC O55) (MIC = 14.2 mg mL⁻¹ of nanoparticle; effective DL concentration of 2.2 mg mL⁻¹), *Salmonella enteritis* (S64) (MIC = 7.1 mg mL⁻¹ of nanoparticle; effective DL concentration of 1.1 mg mL⁻¹) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565) (MIC = 14.2 mg mL⁻¹ of nanoparticle; effective DL concentration of 2.2 mg mL⁻¹). The SEM images of bacterial cells treated with acCGP@DL nanoparticles showed significant morphological changes, with the appearance of shallow depression, disruption of the cell membranes, and liberation of cytoplasmic content. This study underscores the potential of acetylated cashew gum polysaccharides as nanocarriers and evidence that the produced acCGP@DL nanoparticles have excellent antimicrobial and structural properties for advanced applications as a bioactive preservative for developing active coatings and packaging.

Keywords: *Citrus sinensis*; nanoencapsulation; antibacterial activity; bioactive packaging.

INTRODUCTION

Pathogenic microorganisms could naturally contaminate foods during their preparation and distribution, and the foodborne diseases associated with these contaminations constitute a serious public health burden for developed and developing countries (Erarslan and Yuka 2024). Foodborne pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. have emerged as a threat to public health, and different strategies have been applied to minimise the risk of contamination of human food from pathogenic microorganisms (Ali *et al.*, 2021, María Bonilla-Luque *et al.*, 2024). In general, the most common preservation approach relies on the addition of synthetic antimicrobials and chemicals in food as preservatives, which can have detrimental effects on human health, such as hypersensitivity, allergy or even the development of antimicrobial resistance against specific pathogens (Ndwandwe *et al.*, 2022, Erarslan and Yuka 2024).

In recent years, the increasing public health concerns associated with the use of certain chemicals and antimicrobial agents as preservatives in edible coatings and packaging have stimulated the search for natural compounds that can be used as alternatives to synthetic preservatives in the food industry (Yazgan *et al.*, 2024). Therefore, plant extracts and essential oils with bioactive properties can be a possible substitute for traditional antimicrobials being an alternative to overcome the development of antimicrobial resistance and also aligning with current consumer demands for “green label foods” (María Bonilla-Luque *et al.*, 2024, Innocente *et al.*, 2023).

D-limonene is a monoterpene found in citrus essential oil that has significant health benefits and figures as a good food preservative because of its antimicrobial properties (Khoshakhlagh *et al.*, 2017). These features allow us to suggest using this molecule as a natural conservative in bioactive and edible coatings and packaging, protecting food from microbial spoilage and increasing the covered foodstuff's nutraceutical potential. However, due to some

inherent properties of D-limonene, such as hydrophobicity, oxidative susceptibility, chemical destruction in the presence of light and high temperatures, and high volatility, its application at an industrial scale is considered limited (Liu *et al.*, 2024). Additionally, direct contact of D-limonene with the skin can cause significant irritation (Santos *et al.*, 2024).

To overcome these drawbacks, encapsulation techniques can be applied to protect and increase the biological potential of D-limonene. Nanoencapsulation is an effective alternative to increase the physicochemical stability of D-limonene, thereby enhancing its performance and broadening its applications. In recent years, the use of polymeric nanoparticles as carriers for bioactive compounds to be used for edible coverages and packaging has been growing since the use of natural polymers is an eco-friendly approach, providing a controlled release, reducing volatility and improving the biological activities of the biomolecules (Khoshakhlagh *et al.*, 2017, Tiwari *et al.*, 2022, Liu *et al.*, 2024, Kusuma *et al.*, 2024). In previous studies, we demonstrated that native cashew gum polysaccharides and acetylated cashew gum polysaccharides are promising polymers to be used in association with polypropylene glycol or chitosan to develop nanocarriers to hydrophobic drugs and plant extracts, presenting high physicochemical stability and improving the efficacy of the encapsulated biomolecule (Silva *et al.*, 2021, Ferreira *et al.*, 2024).

Thus, the present study aimed to evaluate the effectiveness of acetylated cashew gum polysaccharides (acCGP) as a nanocarrier to D-limonene (DL) and to study the effects of nanoencapsulation on the antibacterial potency of the DL. To achieve this, nanoparticles were prepared using the nanoprecipitation technique and characterised in terms of their capacity to encapsulate DL, morphological, physicochemical, and thermal properties. Non-encapsulated DL, DL-unloaded and DL-loaded acCGP nanoparticles were further evaluated concerning their antibacterial potency against the most common Gram-positive (*S.aureus*) and Gram-negative (*E.coli* and *S.enteritidis*) foodborne pathogens. The results provide a solid theoretical basis for

applying acCGP@DL nanoparticles as green label preservatives for coatings and edible packaging.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of acCGP and acCGP-DL nanoparticles

The nanoparticles were synthesised using the nanoprecipitation technique according to the proposed method by Andrades *et al.*, (2021), with some modifications. The organic phase was prepared by mixing 100 mg of acCGP and 50 μL of DL with 10 mL of acetone (P.A., ACS reagent). The aqueous phase comprised 100 mL of aqueous solution containing 1.17 mg mL^{-1} of Tween 80. acCGP and acCGP@DL synthesis were performed by dropping the organic phase into the aqueous phase, followed by ultrasonication for 5 min at an amplitude of 100% and a frequency of 20 kHz, using a sonicator (Ultronique, Indaiatuba, SP, Brazil) equipped with a tip of 4 mm in diameter. For the synthesis of DL-unloaded acCGP nanoparticles, the organic phase was prepared without DL. The residual organic solvent was removed in a vacuum concentrator (EppendorfTM Concentrator Plus, Hamburg, Germany).

Encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC)

The percentage encapsulation efficiency (%EE) and loading capacity (%LC) of the produced nanoparticles were determined according to Khodadadi *et al.*, (2024), by measuring the equilibrium absorption of DL in the supernatant using a UV-VIS spectrophotometer (model K37-UV/VIS, Kasvi, São Paulo, SP). The detailed method was described in the experimental section of the supplementary file S1.

Nanoparticles characterisation

The produced nanoparticles were thoroughly characterised using light scattering analyses, X-ray diffractometry (XRD) analyses, Differential scanning calorimetry (DSC), Thermogravimetric analysis (TG) and Transmission Electron Microscopy (TEM). DSC and TG were conducted at the Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Regional (CRTI) at the Universidade Federal de Goiás, GO, Brazil. TEM experiments and analyses were performed in the Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) at the Universidade Federal de Goiás, GO, Brazil. The detailed methods were described in the experimental section of the supplementary file S1.

Antibacterial activity

Minimum inhibitory concentration (MIC)

The antibacterial potential of non-encapsulated DL, DL-unloaded acCGP and acGP@DL nanoparticles was assessed by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) against strains of gram-negative (*Escherichia coli* EPEC (CDC O55), *Salmonella enteritidis* (S64)) and gram-positive (*Staphylococcus aureus* (ATCC 13565)) bacteria. The MIC tests were performed according to the methodology described by Behzadi *et al.*, (2018), based on a standard broth microdilution process (CLSI 2015). The detailed method was described in the experimental section of the supplementary file S1.

Scanning electron microscopy (SEM) of bacterial strains

The impact of acCGP@DL treatment on the morphology of *E.coli*, *S.enteritidis*, and *S.aureus* was evaluated by SEM at the Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta

Resolução (LabMic) at the Universidade Federal de Goiás, GO, Brazil. The detailed method was described in the experimental section of the supplementary file S1.

Statistical analysis

All tests were performed at least in triplicate, with repetition. The data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's test for comparison between averages using GraphPadPrism 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California USA), with a significance level of 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

acCGP nanoparticles were synthesised carrying D-limonene (DL) through nanoprecipitation. The formation of nanoparticles was confirmed by the Tyndall effect, characterised by the visualisation of an opalescent suspension. Unloaded and DL-loaded acCGP nanoparticles were deeply characterised and evaluated as antibacterial agents. Together with the physicochemical, morphological and thermal characteristics of a nanosystem, its ability to encapsulate the bioactive is a critical issue in bio-applications for nanocarrier performance. The encapsulation efficiency and loading capacity of DL in the acCGP@DL nanoparticles were 75.2% and 15.2%, respectively.

Evaluation of particle size distribution, zeta potential and polydispersity index of acCGP and acCGP@DL nanoparticles

Results from the hydrodynamic diameter determination evidenced that the encapsulation of DL changed the size of the nanosystem (Table 1). The particle size was

obtained by dynamic light scattering, and an unimodal particle size distribution was observed. DL-unloaded acCGP nanoparticles presented a hydrodynamic diameter of 126 nm and a polydispersity index of 0.298. However, for the acCGP@DL nanoparticles, an increase in size values to 161 nm was observed, which indicates that DL was included in the nanoparticle structure. Similar results were obtained for (Dias *et al.*, 2016) and (Andrades *et al.*, 2021) using acCGP to encapsulate hydrophobic bioactive compounds. Additionally, including DL in the inner part of the nanostructure reduced the system's heterogeneity, with a PDI value 52% lower for acCGP@DL (Table 1). This can be due to the high miscibility between DL and acCGP, which improved the uniformity of size distribution and the stability of the produced nanoparticles.

Table 1. DLS characterisation, size (nm) determination, entrapment efficiency (EE) and loading capacity (LC) of the D-unloaded and DL-loaded acCGP nanoparticles.

	acCGP	acCGP@DL
Entrapment efficiency (%)	-	75.2
Loading capacity (%)	-	15.2
Hydrodynamic diameter (nm)	126 ± 1.70	161 ± 1.48
Size by TEM (nm)	98 ± 11.57	133 ± 12.4
Polydispersity index	0.298 ± 0.02	0.141 ± 0.01
Zeta potential (mV)	-33.35 ± 0.57	-19.17 ± 0.83

The zeta potential of nanoparticles indicates their surface charge, being an important indicator of stability. The zeta potential values (Table 1) demonstrate that acCGP and acCGP@DL present negatively charged functional groups at their surface that could exert electrostatic repulsion forces between particles, helping to avoid coalescence or clumping of the produced nanoparticles. The results also indicate that the absolute value of the zeta potential

decreased with the addition of DL into the nanostructure. This can be related to a necessity of reorganisation of the acCGP chains to encapsulate DL molecules inside of the nanostructure, probably exposing hydrophilic non-charged branches of acCGP molecule on the surface of acCGP@DL nanoparticles, consequently reducing the negative charge density on the surface of nanoparticles and decreasing the values of zeta potential.

Morphostructural characterisation of DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles

TEM images for DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles show spherical particles (Figure 1). The sizes determined by TEM were in the range of 84-115 nm for DL-unloaded acCGP nanoparticles and 116-154 nm for acCGP@DL nanoparticles. The smaller values of diameter observed by TEM compared to those from DLS analysis (Table 1) can be explained since the TEM method only estimates the diameter of the nanoparticle core, which is significantly smaller than the average particle diameter in the solvated stage (Kuznetsova *et al.*, 2022, Eze *et al.*, 2022).

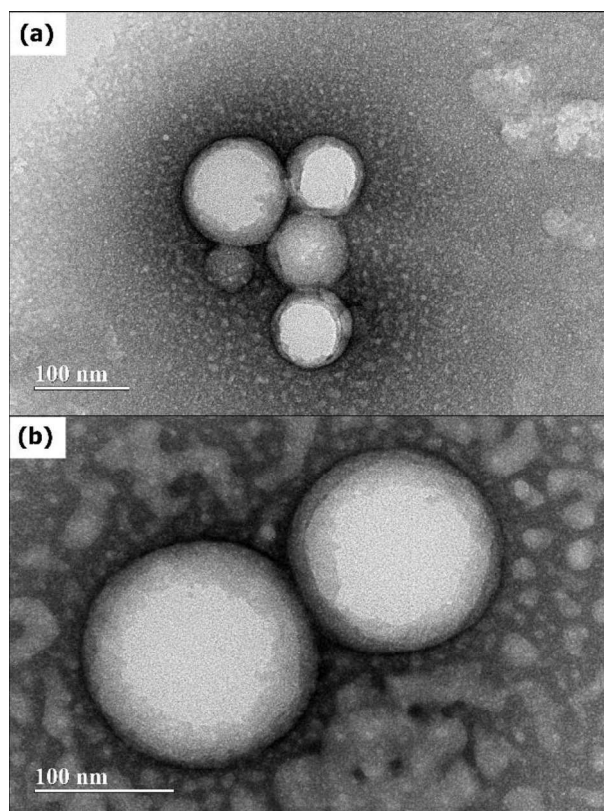


Figure 1. Representative TEM micrographs for (a) DL-unloaded acCGP nanoparticles (magnification of 40,000x) and (b) acCGP@DL nanoparticles (magnification of 60,000x).

X-ray diffraction analysis (XRD)

The XRD patterns of acetylated cashew gum polysaccharide, DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles are presented in Figure 2. The curve of the non-nanostructured polymer (Figure 2a) reveals two broad diffraction peaks centred around 2θ 11.18° and 21.17° , indicating the amorphous structure of this polymer. On the other hand, DL-unloaded acCGP (Figure 2b) and acCGP@DL (Figure 2c) nanoparticles showed only one broad diffraction peak, revealing that the formation of a nanostructure interferes with the crystal structure of the native polymer. The changes in the diffraction curves of the produced nanoparticles evidence a certain increase in the structural order of the nanomaterial. Additionally, the inclusion of DL into the acCGP nanoparticles leads to an increase in the microcrystallinity of the nanosystem

(crystallinity = 41%), with a reduction of 12% of the amorphous pattern of the DL-unloaded acCGP nanoparticle (crystallinity = 33%) and 21% of the non-nanostructured acCGP (crystallinity = 25%). This increase in the structural order in the acCGP@DL nanoparticles could be explained by the interactions between DL and acCGP, which can contribute to organising the internal crystal network and conferring to the nanosystem a more crystalline structure.

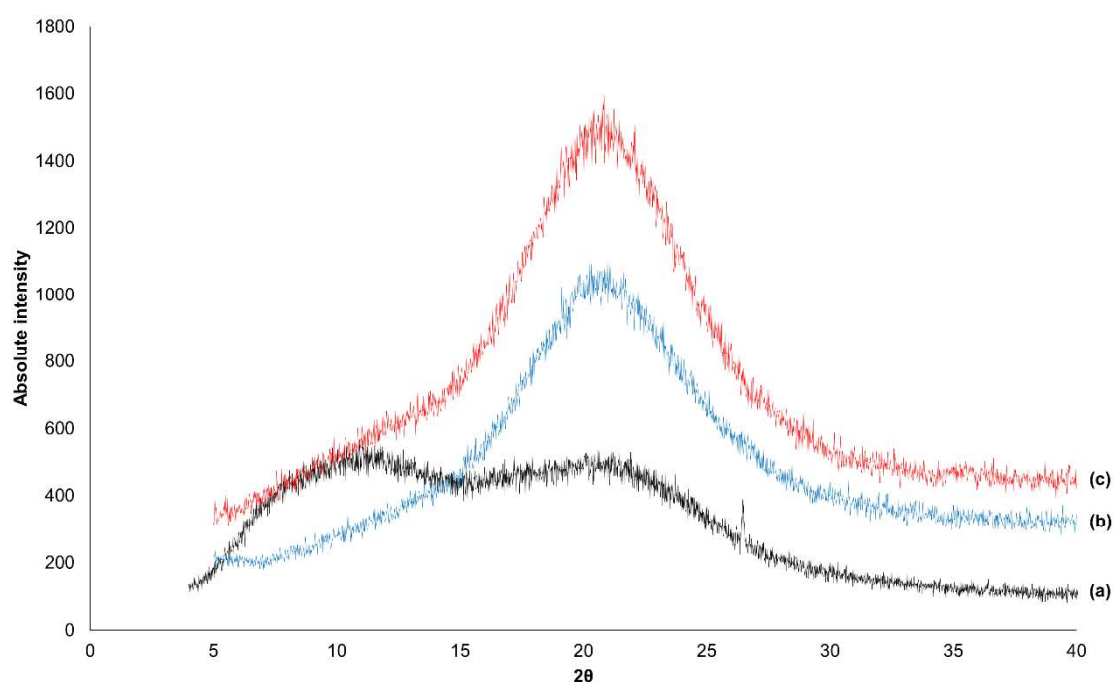


Figure 2. X-ray diffraction (XRD) of (a) acetylated cashew gum polysaccharide, (b) unloaded acCGP nanoparticles, and (c) DL-loaded acCGP nanoparticles (acCGP@DL).

Differential scanning calorimetry (DSC) and Thermogravimetric analysis (TGA)

DSC analysis is an important technique for assessing the thermal properties of nanomaterials, establishing a correlation between temperature and specific physical characteristics of the nanosystem Mathavan and Hafiz bin Hassan (2024). The thermal

behaviour of DL, non-nanostructured acCGP, DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles are depicted in Figure 3.

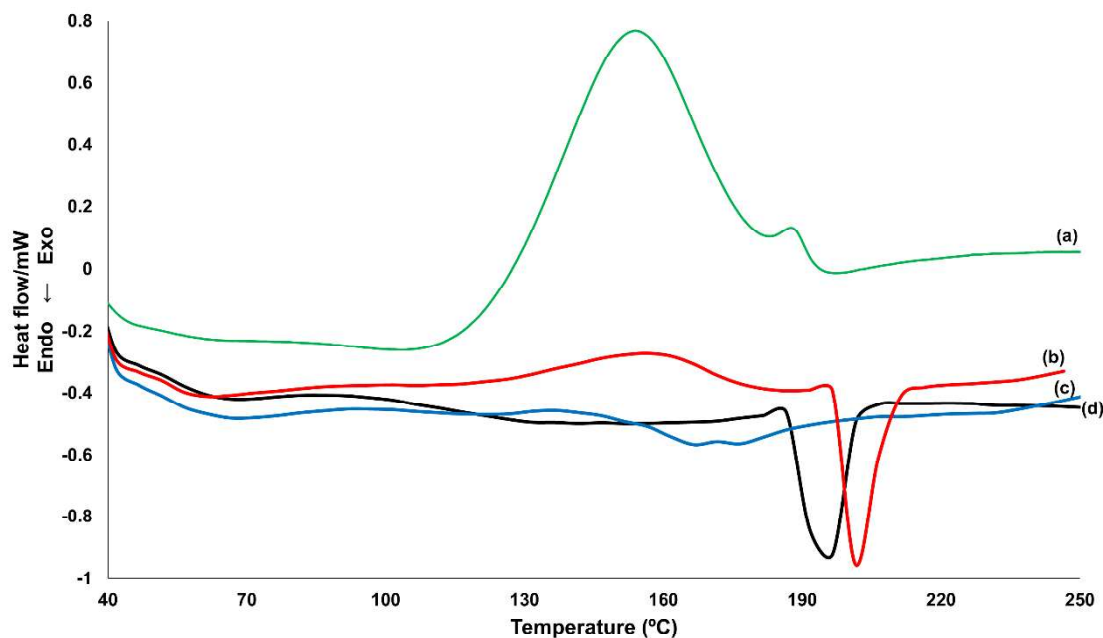


Figure 3. Differential scanning calorimetry thermograms were obtained for (a) D-limonene, (b) acCGP@DL nanoparticles, (c) DL-unloaded acCGP nanoparticles, and (d) non-nanostructured acCGP.

The hydrophobic characteristics of non-nanostructured acCGP, DL, DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles are confirmed by the absence of a definite endothermic peak in the range of 80-100 °C, commonly related to the interfacial water loss (hydrogen-bounded or physically adsorbed water). The exothermic (heat liberation) peak around 123.9 °C to 192.4°C observed in the thermogram for DL (Figure 3a) is related to an exothermic transition of degradation, with an enthalpy change of 155 J/g, indicating the loss of 155J of heat as 1g of DL undergoes degradation.

Considering the native acCGP (Figure 3d) and the produced nanoparticles, the endothermic peaks can be attributed to the polymer's melting, and the broader nature of the endothermic peaks for non-nanostructured acCGP (Figure 3d) and DL-unloaded acCGP

nanoparticles (Figure 3c) compared to that from acCGP@DL (Figure 3b) suggests a less organized packing acCGP nanoparticles in the absence of DL. Furthermore, the sharper peak observed for acCGP@DL confirms the more crystalline nature of the DL-loaded nanoparticles, as seen in XRD results. It is possible that the encapsulation of DL into the acCGP@DL nanoparticles (1) contributed to protecting DL against thermal degradation, being observed an absence of heat liberation peaks in the acCGP@DL thermogram; and (2) enhanced the hydrophobic forces driving the nanoparticle organization, which improved the thermal stability of the produced nanosystem. This inference can be confirmed by the shift of the melting peak from 166.6 °C to 202.6 °C and the increase of the enthalpy change from 7.27 J/g to 22.65 J/g after DL encapsulation.

To confirm the protection against thermal degradation conferred for the DL encapsulation into the acCGP@DL nanoparticles, the TGA profile of unloaded and loaded DL (acCGP@DL) were evaluated (Figure S1, Supplementary File 1). As evidenced by TGA analysis, the phase decomposition related to the evaporation of water molecules and moisture absorbed on the surface of hydrophilic polymers is missing in the acCGP@DL nanoparticles, confirming their hydrophobic nature. Furthermore, evaporation and decomposition of the non-nanostructured DL begin around 93 °C (Figure S1a), while acCGP @DL nanoparticles showed a decomposition phase starting around 320 °C (Figure S1b), indicating that the interactions between DL and acCGP created a cohesive and robust structure with improved thermal stability and resistance to degradation.

Antibacterial effect

Minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentrations (MIC) for DL, DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles are shown in Table 2. DL and acCGP@DL nanoparticles had varied antibacterial activity against the tested foodborne pathogens, while the DL-unloaded acCGP nanoparticles only showed a bactericidal effect on the highest tested concentration. It is possible that at higher concentrations, the DL-unloaded acCGP nanoparticles decreased cell permeability by interacting with the cell membrane components as a covering, affecting the gas and nutrient permeability through the cell membrane and blocking the biochemical pathways involved in bacteria growth (Spirescu *et al.*, 2021). The treatment with DL showed similar MIC values for *S. aureus* and *E. coli*, whereas it was observed a lower bactericidal potency against *S. enteritidis*. This lower antibacterial potency against *S. enteritidis* could be explained by the differences in the cell membrane structure and composition of this bacteria, especially regarding the presence of specific virulence factors that could act avoiding the interaction and disruption of cell membrane caused by DL or even increasing the efflux of internalised DL through efflux pumps (Wang *et al.*, 2015). In this case, a higher content of DL would be necessary to guarantee an effective bactericidal dosage, which could be achieved by nanoencapsulation.

Table 2. MICs values for DL, DL-unloaded acCGP, and acCGP@DL nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

	D-limonene (DL)	Nanoparticles	
		acCGP	acCGP@DL
<i>S. aureus</i> (ATCC 13565)	8.6 mg mL ⁻¹	227 mg mL ⁻¹	14.2 (2.2)* mg mL ⁻¹
<i>E. coli</i> EPEC (CDC O55)	8.6 mg mL ⁻¹	227 mg mL ⁻¹	14.2 (2.2) mg mL ⁻¹
<i>S. enteritidis</i> (S64)	> 34.5 mg mL ⁻¹	227 mg mL ⁻¹	7.1 (1.1) mg mL ⁻¹

*Values in parentheses correspond to the amount of DL (milligrams) in the acCGP@DL nanoparticles.

The results from the antibacterial potency of acCGP@DL nanoparticles evidenced that the produced nanosystem was more effective than both DL and DL-unloaded acCGP nanoparticles. DL nanoencapsulation into acCGP nanoparticles increased its antimicrobial potency, with lower MIC values being observed for *S. enteritidis*. This increased antibacterial effect for acCGP@OE could be related to, first, the impact of nanoencapsulation in increasing the effective concentration of DL in the microenvironment close to the cell membrane of the bacterial strains. The acCGP@OE nanoparticles could adhere to the cell membrane and release the DL molecules in a prolonged manner, providing a more potent effect than the unloaded DL. Additionally, the hydrophobic characteristic of acCGP nanoparticles contributed to improving the capacity of adhesion and insertion of the nanosystem to the cytoplasmic membrane and maximising the interference with the tridimensional organisation of the cell membrane of the tested bacteria.

Growth profile of bacteria non-treated and treated with DL and accGP@DL

The growth profile of *S. aureus*, *E. coli*, and *S. enteritidis* before and after treatment with different concentrations of DL and acCGP@DL is shown in Figure 4. For all studied microorganisms, in the absence of DL or acCGP@DL nanoparticles, bacteria density rose in a typical sigmoidal pattern, with the absorbance at 600 nm increasing rapidly after 1h. Considering the treatment with unloaded-DL, results evidenced that by increasing the concentration of DL, the maximum population density (OD_{max}) for *S.aureus* (Figure 4a) and *E.coli* (Figure 4c) was reduced, while the lag phase duration was prolonged, indicating a good antibacterial performance against these bacteria. However, it was not observed a bactericidal effect against *S. enteritis* on the tested concentrations (Figure 4e), with a bacteriostatic effect being noted during the treatment with the highest concentration of this compound (34.5 mg mL^{-1}

¹), characterised by an increase in the lag phase and a substantial reduction in the optical density (Figure 4e).

When bacteria strains were exposed to acCGP@DL nanoparticles, bacteria development was delayed, especially for *S. enteritidis* (Figure 4f). Furthermore, as compared to the DL-unloaded group, the addition of acCGP@DL resulted in slower growth and a reduced cell density in the stationary state phase (Figures 4b, 4d and 4f), evidencing that acCGP@DL nanoparticles have the potency to inhibit the growth of the tested bacteria at lower concentrations (bacteriostatic effect) and kill the cells (bactericidal effect) at concentrations of MIC and above.

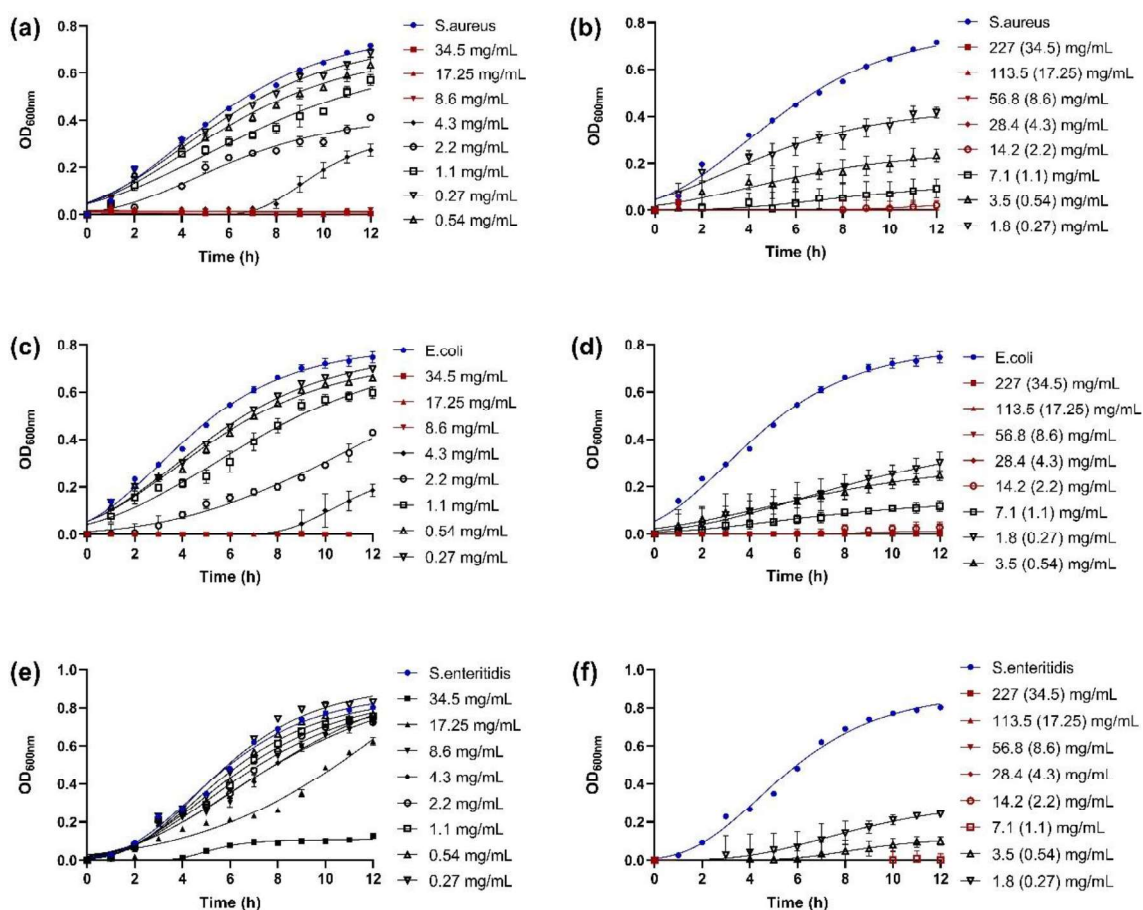


Figure 4. Effects of different concentrations of DL and acCGP@DL on the growth profile of *S. aureus*, *E. coli*, and *S. enteritidis*. The symbols represent the means obtained in triplicate from

three independent experiments, and the lines represent fitting results of the Gompertz model obtained with Prisma software.

Morphology of the bacteria treated with acCGP/CS@PEP nanoparticles

acCGP@DL nanoparticles were chosen for further investigation to get insight into the mechanisms of action in exerting their antibacterial effect. The effects of acCGP@DL at MIC values on the bacteria cells were clearly observed under SEM (Figure 5). The control bacteria cells which were not exposed to the acCGP@DL nanoparticles were tightly packed smooth cocci (Figure 5a) and rods (Figures 5c and 5e), with plump morphology, uniform size, and no membrane damage. The SEM images of bacterial cells treated with acCGP@DL showed significant morphological changes, with the appearance of shallow depressions in the membrane surface (Figures 5b, 5d and 5e, red arrows) and the presence of disruption of the integrity of the cell membranes (Figures 5b, 5d and 5e, blue arrows). Considering that the integrity of cell membrane and bacterial structure are imperative to maintaining the vitality and virulence of bacteria, the ultrastructural changes in the bacterial cell after treatment with acCGP@DL nanoparticles lead to profound biochemical alterations in the cell functions with disruption of the native organisation of the bacterial membrane, cell lysis and outflow of intracellular components (Figures 5b, 5d and 5e, inserts). Altogether, these alterations suggest that the acCGP@DL nanoparticles adhere to the surface of the bacteria, interfering with the integrity of the cell membrane and causing irreparable breaches in the membrane, which leads to cell death. Since acCGP@DL nanoparticles adhere to the surface of the bacteria, there is a controlled and prolonged release of DL that will act by increasing the outer and inner membrane permeability, which leads to a leakage of proteins, lipids, metabolites and ions that are essential to the maintenance of the bacterial metabolism. Additionally, considering the hydrophobic nature of DL, it is possible that this molecule could be transported by porin channels with the

help of chaperon proteins, being responsible for toxic metabolic imbalance triggered by the interaction of the internalised DL with several functionally related enzymes, affecting cell respiration, signalling, growth regulation and membrane biosynthesis (Gupta *et al.*, 2021).

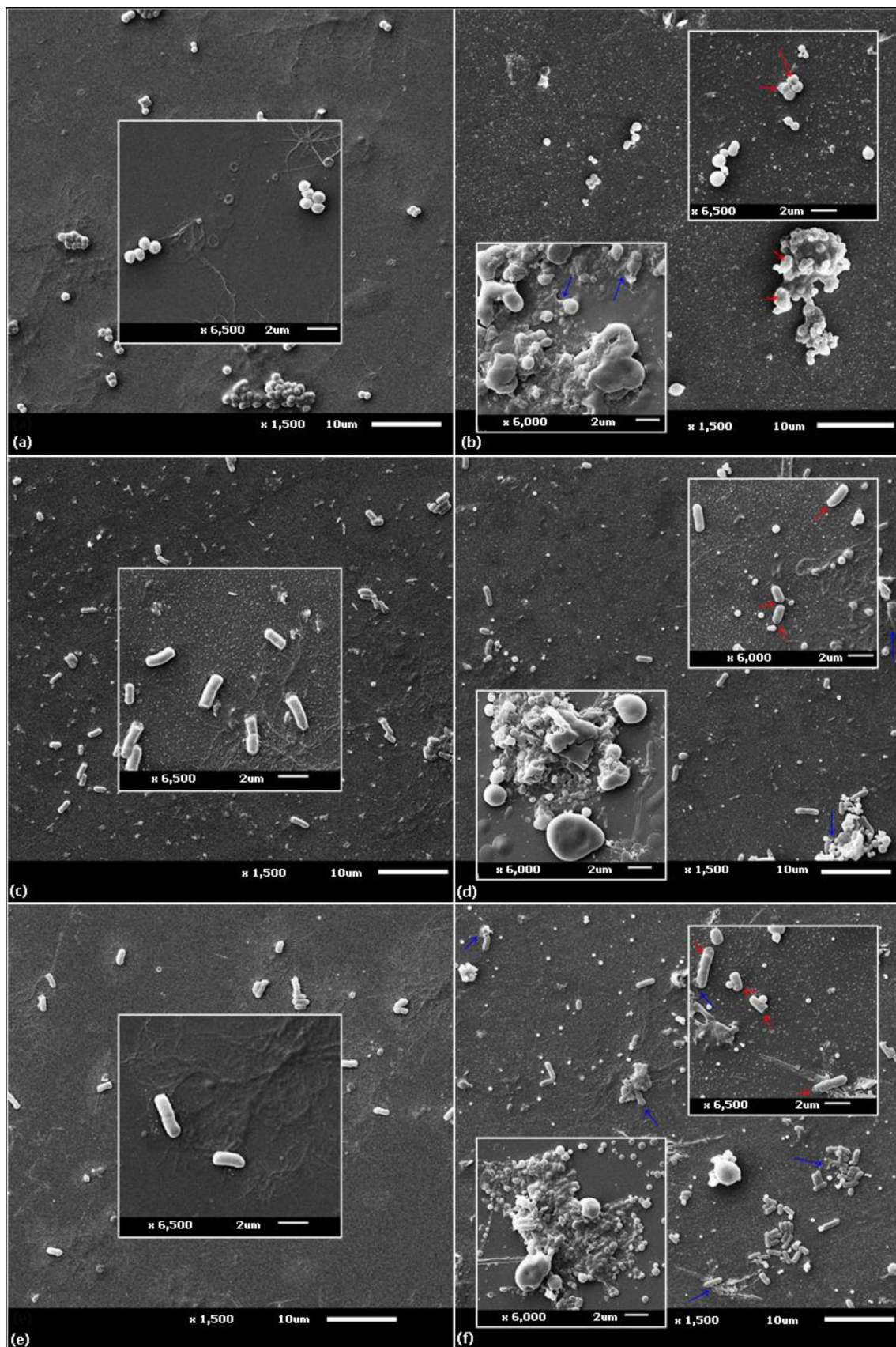


Figure 5. Scanning electron micrographs of Gram-positive and Gram-negative bacteria before and after treatment with acCGP@DL nanoparticles at MIC values for 12h. Bacteria without treatment: (a) *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565); (c) *Escherichia coli* EPEC (CDC O55); and (e) *Salmonella enteritidis* (S64). Bacteria after treatment: (b) *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565); (d) *Escherichia coli* EPEC (CDC O55); and (f) *Salmonella enteritidis* (S64).

These findings evidence the potent bacteriostatic and bactericidal effect of acCGP@OE nanoparticles against gram-positive and gram-negative foodborne pathogens. Altogether, the results of this work demonstrated that the encapsulation of limonene from *C.sinensis* (DL) improves its physicochemical stability and potentializes its antibacterial effect, confirming the advantages of nanoparticles as a novel approach for applications in active packaging and covering to prevent microbial spoilage.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) [grant numbers: Finance Code 001] for the fellowship support.

REFERENCES

- Ali, S., Chen, X., Ajmal Shah, M., Ali, M., Zareef, M., Arslan, M., Ahmad, S., Jiao, T., Li, H. & Chen, Q. (2021). The avenue of fruit wastes to worth for synthesis of silver and gold nanoparticles and their antimicrobial application against foodborne pathogens: A review. *Food Chemistry*, **359**, 129912.
- Andrades, E. O., Costa, J. M. A. R., Lima Neto, F. E. M., Araujo, A. R., Oliveira Silva Ribeiro, F., Vasconcelos, A. G., Jesus Oliveira, A. C., Sobrinho, J. L. S., Almeida, M. P., Carvalho, A. P., Dias, J. N., Silva, I. G. M., Albuquerque, P., Pereira, I. S., Amaral Rabello, D., Graças Nascimento Amorim, A., Souza de Almeida Leite, J. R. & Silva, D. A. (2021). Acetylated cashew gum and fucan for incorporation of lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) in nanostructured systems: Antioxidant and

- antitumor capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **191**, 1026-1037.
- Behzadi, F., Darouie, S., Alavi, S. M., Shariati, P., Singh, G., Dolatshahi-Pirouz, A. & Arpanaei, A. (2018). Stability and Antimicrobial Activity of Nisin-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles: A Game-Changer in the War against Maleficent Microbes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 4233-4243.
- CLSI (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. In: CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dias, S. F. L., Nogueira, S. S., de França Dourado, F., Guimarães, M. A., de Oliveira Pitombeira, N. A., Gobbo, G. G., Primo, F. L., de Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A., Tedesco, A. C., Nunes, L. C. C., Leite, J. R. S. A. & da Silva, D. A. (2016). Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. *Carbohydrate Polymers*, **143**, 254-261.
- Erarslan, A. & Yuka, S. A. (2024). Exploring ethyl pyruvate as an antifungal and antibacterial agent for food preservation: an in vitro and in silico study. *International Journal of Food Science & Technology*, **59**, 6580-6589.
- Eze, F. N., Ovatlarnporn, C., Nalinbenjapun, S. & Sripetthong, S. (2022). Ultra-fast sustainable synthesis, optimization and characterization of guava phenolic extract functionalized nanosilver with enhanced biomimetic attributes. *Arabian Journal of Chemistry*, **15**, 104167.
- Ferreira, R. D. R., Paula, L. C., Sora, G. T. S., Bernardo, R. A., Cruz, M. V., Leles, M. I. G., Fernandes, K. F. & Batista, K. A. (2024). Production and characterisation of antioxidant and antibacterial polymeric nanoparticles loaded with *Oenocarpus bataua* phenolic extract. *International Journal of Food Science & Technology*, **n/a**.
- Gupta, A., Jeyakumar, E. & Lawrence, R. (2021). Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, **11**, 13816.
- Innocente, N., Calligaris, S., Di Filippo, G., Melchior, S., Marino, M. & Nicoli, M. C. (2023). Process design for the production of peptides from whey protein isolate with targeted antimicrobial functionality. *International Journal of Food Science & Technology*, **58**, 2505-2517.
- Khodadadi, F., Nikzad, M. & Hamed, S. (2024). Lignin nanoparticles as a promising nanomaterial for encapsulation of Rose damascene essential oil: Physicochemical, structural, antimicrobial and in-vitro release properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **687**, 133580.
- Khoshakhlagh, K., Koocheki, A., Mohebbi, M. & Allafchian, A. (2017). Development and characterization of electrosprayed *Alyssum homolocarpum* seed gum nanoparticles for encapsulation of d-limonene. *Journal of Colloid and Interface Science*, **490**, 562-575.
- Kusuma, G., Marcellino, V., Wardana, A. A., Wigati, L. P., Liza, C., Wulandari, R., Setiarto, R. H. B., Tanaka, F., Tanaka, F. & Ramadhan, W. (2024). Biofunctional features of Pickering emulsified film from citrus peel pectin/limonene oil/nanocrystalline cellulose. *International Journal of Food Science & Technology*, **n/a**.
- Kuznetsova, E. V., Kuznetsov, N. M., Kalinin, K. T., Lebedev-Stepanov, P. V., Novikov, A. A. & Chvalun, S. N. (2022). The Role of Integrated Approach in the Determination of Nanoparticle Sizes in Dispersions. *Colloid Journal*, **84**, 704-714.
- Liu, Y., Zhou, W., Gao, H., Chen, M., Li, R., Dai, Y., Zou, Y., Yuan, Y., Zhang, C. & Li, J. (2024). Temperature-responsive palm oil-based-oleogels for encapsulation of D-limonene: effect of fat crystallisation and melting point. *International Journal of Food Science & Technology*, **59**, 2535-2546.

- María Bonilla-Luque, O., Nunes Silva, B., Ezzaky, Y., Possas, A., Achemchem, F., Cadavez, V., Gonzales-Barron, Ú. & Valero, A. (2024). Meta-analysis of antimicrobial activity of *Allium*, *Ocimum*, and *Thymus* spp. confirms their promising application for increasing food safety. *Food Research International*, **188**, 114408.
- Mathavan, J. J. & Hafiz bin Hassan, M. (2024). Thermal – chemical - mechanical characterization of *Anacardium occidentale* tree gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, **271**, 132396.
- Ndwandwe, B. K., Malinga, S. P., Kayitesi, E. & Dlamini, B. C. (2022). Selenium nanoparticles–enhanced potato starch film for active food packaging application. *International Journal of Food Science & Technology*, **57**, 6512-6521.
- Santos, J. S., Galvão, J. G., Mendonça, M. R. C., Costa, A. M. B., Silva, A. R. S. T., Oliveira, D. S., Santos, A. d. J., Lira, A. A. M., Scher, R., Sales Júnior, P. A., Pereira, V. R. A., Formiga, F. R. & Nunes, R. S. (2024). Encapsulation of *Citrus sinensis* essential oil and R-limonene in lipid nanocarriers: A potential strategy for the treatment of leishmaniasis. *International Journal of Pharmaceutics*, **662**, 124464.
- Silva, C. N., Di-Medeiros, M. C., Lião, L. M., Fernandes, K. F. & Batista, K. A. (2021). Cashew gum polysaccharide nanoparticles grafted with polypropylene glycol as carriers for diclofenac sodium. In: *Materials*.
- Spirescu, V. A., Chircov, C., Grumezescu, A. M. & Andronescu, E. (2021). Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An Up-To-Date Overview. *Polymers (Basel)*, **13**.
- Tiwari, S., Upadhyay, N., Singh, B. K., Dubey, N. K., Dwivedy, A. K. & Singh, V. K. (2022). Nanoencapsulated *Lippia origanoides* essential oil: physiochemical characterisation and assessment of its bio-efficacy against fungal and aflatoxin contamination as novel green preservative. *International Journal of Food Science & Technology*, **57**, 2216-2225.
- Wang, C., Chang, T., Yang, H. & Cui, M. (2015). Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **47**, 231-236.
- Yazgan, H., Kuley, E., Ozogul, Y., Ozogul, F., Bartkiene, E. & Rocha, J. M. (2024). The effectiveness of garlic extracts on biogenic amine formation by foodborne pathogens and fish spoilage bacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, **59**, 5576-5586.

Supplementary material

Acetylated cashew gum polysaccharide nanoparticles as a promising green label nanomaterial for encapsulation of D-limonene: Physicochemical, structural and antimicrobial properties

Cassio N.S. Silva, Richard D.R. Ferreira, Ivan TN Campos, Kátia F. Fernandes, Luciano Lião, Maria Carolina B Di Medeiros, Karla A. Batista*

***Corresponding author:** Karla A Batista

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Goiânia-GO, 74395-160, Brazil

e-mail: karla.batista@ifg.edu.br; Tel.: +55 62 3237-1857

1 Experimental section

1.1 Chemical and reagents

D-limonene (DL, 95% purity) was gently provided by Agroterenas Industrial Citrus Ltda, Santa Cruz do Rio Pardo, SP, Brazil. Ethanol, acetone, pyridine, formamide, tween 80, and acetylic anhydride were purchased from Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda (Suzano, SP, Brazil). The cashew gum polysaccharide was isolated according to the method described by Silva *et al.*, (2021) and acetylated as described by Pitombeira *et al.*, (2015). All other reagents were of analytical grade.

1.2 Encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC)

The percentage of encapsulation efficiency (%EE) and loading capacity (%LC) of the produced nanoparticles were spectrophotometrically determined. The DL absorption was determined in the range of 200 nm to 400 nm, and the maximum absorption wavelength was achieved at 231 nm. Then, an analytical curve was prepared ($r^2 = 0.996$) and used to determine the concentration of the unloaded DL in the supernatants. The absorbance of the freshly prepared DL-unloaded acCGP (used as a blank) and acCGP@DL nanoparticles were evaluated, and EE% and LC were calculated using the following equations:

$$\text{Encapsulation efficiency (\%EE)} = \frac{\text{amount of loaded DL in acCGP@DL}}{\text{inicial amount of DL}} \cdot 100$$

$$\text{Loading capacity (\%LC)} = \frac{\text{amount of encapsulated DL in acCGP@DL}}{\text{amount of produced acCGP@DL}} \cdot 100$$

1.3 Particle size distribution and zeta potential

The particle size distribution, polydispersity index (PDI), and Zeta potential of DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles were determined using a Malvern ZetaSizer Nano equipment (ZEN 1600, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Each sample was

measured six times for four replicate samples. To perform the determinations, the samples were diluted in distilled water.

1.4 X-ray diffraction (XRD)

X-ray diffraction analyses of acCGP non-nanostructured, DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles were performed using an XRD diffractometer (D8 Discover, Bruker AXS, Billerica, MA, USA) with Cu-K α radiation ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$), diffraction angle (2θ) in the range of 5° to 40° , with a scan rate of 0.01° .

1.5 Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetric analysis (TG)

Thermal characteristics of non-nanostructured acCGP, DL, DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles were obtained through DSC and TG analyses using a simultaneous thermal analyser (STA 449 F3 Nevio, Netzsch, São Paulo, Brazil). DSC analyses were carried out in the temperature range of 25 to 250 $^\circ\text{C}$, with a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, under a nitrogen flow of 60 mL min^{-1} , in an 85 μL aluminium crucible. TG analysis was carried out in the temperature range of 35 to 500 $^\circ\text{C}$ under a dynamic nitrogen atmosphere ($60 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) and a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Approximately 6 mg of sample was used for each analysis. The analyses were conducted in the Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Regional (CRTI) at the Universidade Federal de Goiás, GO, Brazil.

1.6 Transmission Electronic Microscopy (TEM)

The morphology of the DL-unloaded acCGP and acCGP@DL nanoparticles were evaluated by TEM. A transmission electron microscope (JEM-2100, Jeol, Tokyo, Japan) equipped with EDS (Thermo Scientific) was used to obtain the images. A drop of the diluted samples (1:10, using ultrapure water) was placed under parafilm, and the grid was poured over

the drop. The excess water was removed with filter paper, and the sample was covered with a 2% uranyl acetate solution. The excess of uranyl acetate solution was removed with filter paper, and the grid was left to dry at room temperature. After the analysis by TEM, the particle size was determined using ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012).

1.7 Antibacterial activity

1.7.1 Minimum inhibitory concentration (MIC)

The antimicrobial activities of the samples were evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method in culture broth (CLSI 2015). To perform the MIC tests, bacterial inoculums (*Escherichia coli* EPEC (CDC O55), *Salmonella enteritidis* (S64) and (*Staphylococcus aureus* (ATCC 13565)) diluted to a concentration of 10^8 CFU.mL⁻¹ were used. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined using a two-fold serial dilution of DL, DL-unloaded acCGP, and acCGP@DL nanoparticles. For this, 150 μ L of DL (34.5 mg mL⁻¹), acCGP (227 mg mL⁻¹) or acCGP@DL solutions (227 mg mL⁻¹, reaching an effective DL concentration of 34.5 mg mL⁻¹), prepared in TSB (Tryptone Soy Broth - TBS, HiMedia, Kelton, PA, USA), were serially diluted in a 96-well microplate and 10 μ L of bacterial suspension with 10^8 CFU mL⁻¹ was added in each well. Additionally, negative and positive controls for growth inhibition were used: (1) wells containing only TBS inoculated with each bacterial strain solution were used as a negative control for antibacterial activity, and (2) wells containing only TBS were used as a positive control. Plates were incubated at 37°C for 12 h, and the absorbance was read at a wavelength of 600 nm. The MIC was defined as the minimum sample concentration that did not present alterations in the absorbance at 660 nm compared to the positive control for inhibition. The experiment was carried out in triplicate, and the average value was calculated.

1.7.2 Scanning electron microscopy of bacterial strains

The scanning electron microscopy was recorded using a Jeol-JSM-IT300 field emission microscope (JEOL JSM-IT300, Jeol Ltd., Welwyn Garden City, Hertfordshire, UK). Bacterial strains treated at MIC level were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde solution for 24 h, washed three times with PBS buffer to remove the excess glutaraldehyde, and dehydrated using an ethanol gradient from 30% to 100% for 10 minutes. A drop of bacterial suspension was placed in a glass coverslip, dried, and coated with gold. The SEM analysis was carried out using a secondary electron detector with an accelerating voltage of 8 kV.

2 Results section

2.1 Thermogravimetric analysis of DL and acCGP@DL nanoparticles

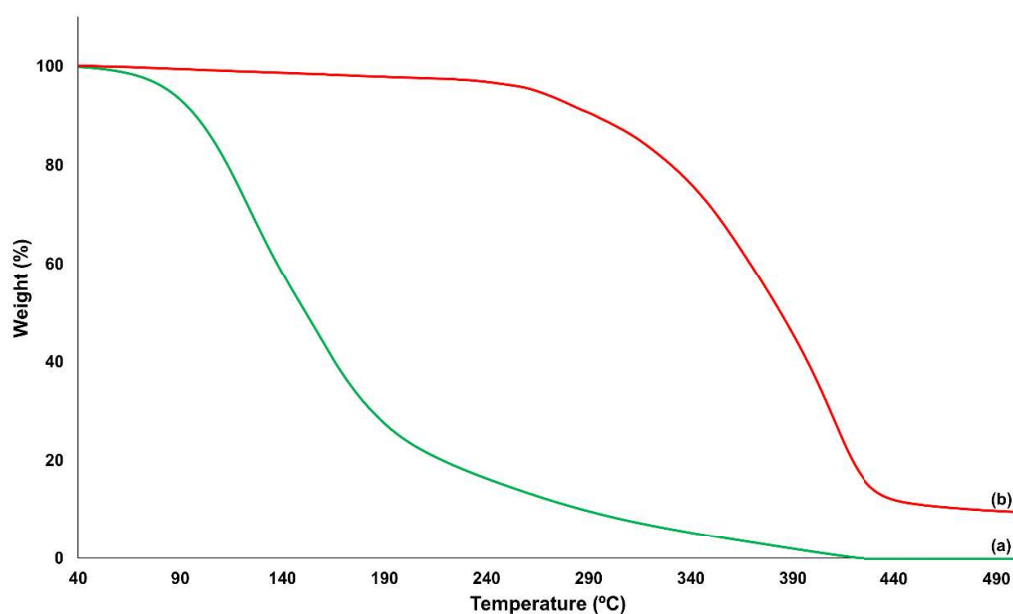


Figure S1. Thermogravimetric curves of (a) D-limonene (DL) and (b) acCGP@DL nanoparticles.

REFERENCES

CLSI (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. In: CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Pitombeira, N. A. O., Veras Neto, J. G., Silva, D. A., Feitosa, J. P. A., Paula, H. C. B. & de Paula, R. C. M. (2015). Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate Polymers*, **117**, 610-615.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **9**, 671-675.
- Silva, C. N., Di-Medeiros, M. C., Lião, L. M., Fernandes, K. F. & Batista, K. A. (2021). Cashew gum polysaccharide nanoparticles grafted with polypropylene glycol as carriers for diclofenac sodium. In: *Materials*.

Goiânia, 04 de julho de 2022.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 049/22

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 11/05/2022
- Data de término do projeto:** 30 de junho de 2025
- Data do atendimento da pendência:** 29/06/2022
- Título do projeto:**

Avaliação do potencial terapêutico de nanopartículas contendo óleo essencial de Citrus sinensis para tratamento das comorbidades associadas à hipertensão arterial

- Pesquisador Coordenador no SIGAA/ Unidade:** Kátia Flávia Fernandes – ICB- UFG
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Cassio Nazareno da Silva – ICB- UFG
- Pesquisadores Participantes/ Unidade:** Fernanda Cristina Alcantara dos Santos – ICB- UFG, Carlos Henrique de Castro– ICB- UFG, Carlos Henrique Xavier Custódio– ICB- UFG, Karla de Aleluia Batista – IFG- Campus Goiânia Oeste, Paulo César Ghedini– ICB- UFG, Cíntia Rio Branco da Silva – ICB- UFG, Richard Douglas Rodrigues Ferreira – ICB- UFG.
- Médico Veterinário/CRMV:** Taís Andrade Dias de Souza / CRMV-GO: 4830.
- Unidade onde será realizada a pesquisa:** ICB-UFG

III – Respostas as pendências:

Solicitação da CEUA:

- ✓ Relatar qual equipamento será utilizado para decapitação.

Resposta do Pesquisador Responsável:

Guilhotina para roedores

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(s) pesquisador(es) responsável(is) deverá(ão) encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **30/06/2025**.

VII - Data da reunião: 04/07/2022.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do potencial terapêutico de nanopartículas contendo óleo essencial de Citrus sinensis para tratamento das comorbidades associadas à hipertensão arterial**”, registrada com o protocolo nº **049/22**, sob a responsabilidade de **Katia Flavia Fernandes/ICB-UFG** e **Cassio Nazareno da Silva/ ICB-UFG** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **04/07/2022**

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 01/06/2022 a 30/06/2025.
- Espécie/linhagem/raça: *Rattus norvegicus*/ Wistar e *Rattus norvegicus*/ SHR
- Nº de animais autorizados: 76 sendo 46 wistar e 30 SHR
- Peso/Idade: 250 gramas /16 semanas
- Sexo: Machos
- Instalação onde serão mantidos os animais: Biotério Setorial ICB 2
- Origem (fornecedor): Biotério Central da UFG



Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com