

2.10.06 - Farmacologia / Etnofarmacologia

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM CÉLULAS DE MACRÓFAGOS J774

Vitória R. P. Silva¹, Andreia C. Pinheiro², Gisela J. Felice¹, Raquel N. Almeida², Kelly G. Magalhaes³, Graziella A. Joanitti⁴

1. Estudante da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília (FCE-UnB)
2. Pesquisadora do Instituto de Ciências Biológicas Darcy Ribeiro-UnB
3. Professora do Instituto de Ciências Biológicas Darcy Ribeiro-UnB
4. Professora da FCE-UnB/Orientadora

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória terapêutica e preventiva do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) livre (PO) e encapsulado em nanoemulsões (PeNE), utilizando como parâmetros a produção de óxido nítrico e formação de corpúsculos lipídicos *in vitro* em macrófagos (J774) estimulados com lipopolissacarídeo (LPS).

As PeNE apresentaram diâmetro hidrodinâmico <200nm, índice de polidispersão < 0.3 e potencial zeta -15mV, permanecendo estáveis pelo período de 60 dias de estocagem a 4°C. PO e PeNE nas concentrações de 90, 180 e 360µg/mL não foram citotóxicas aos macrófagos, mantendo a viabilidade celular, avaliada pelo teste de MTT, superior a 80%. Observou-se também a indução da formação de corpúsculos lipídicos e liberação de óxido nítrico nos tratamentos preventivo e terapêutico com PO e PeNE (360 µg/mL), efeitos estes acentuados no tratamento com PeNE.

Autorização legal: AC22EF9 (SiSGen)

Palavras-chave: Inflamação; Nanotecnologia; Óleos vegetais

Apoio financeiro: CAPES; CNPq; FAPDF; UnB

Trabalho selecionado para a JNIC: ProIC-UnB

Introdução

A inflamação é um processo fisiológico envolvendo a modulação da atividade de diferentes células do sistema imune, como também, a liberação de moléculas efetoras e sinalizadoras que desempenham um papel crucial na manutenção funcional do organismo frente a danos teciduais e estímulos antigênicos. Alterações na orquestração deste processo é associado com a patogênese de diversas doenças como o acidente vascular cerebral, aterosclerose, carcinogênese, dentre outras. [1]

A utilização de plantas para o tratamento de doenças inflamatórias é uma prática ancestral e avanços em bioprospecção tem sido relevantes para o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos no controle da inflamação feito por produtos naturais e com isso ampliar a sua utilização no tratamento de doenças sendo uma alternativa aos tratamentos convencionais [2].

A árvore *Caryocar brasiliense* nativa do bioma Cerrado dá origem ao fruto Pequi [3]. A presença de uma matriz oleosa em sua polpa permite a extração do óleo composto por ácidos graxos e metabólitos secundários com atividade biológica sendo utilizado na medicina tradicional como agente cicatrizante e no tratamento de infecções do trato respiratório, asma, irritação da pele e dores musculares, doenças estas que compartilham como origem um processo inflamatório ineficiente ou exacerbado [3-4].

A natureza hidrofóbica do óleo de Pequi, reduz a sua biodisponibilidade e conseqüentemente seu potencial terapêutico, contudo, a nanobiotecnologia fornece estratégias para contornar esta limitação [4]. O óleo de Pequi pode ser encapsulado no interior de nanocarreadores de natureza lipídica, como as nanoemulsões, que reduzem a energia termodinâmica existente durante a interação do óleo com fluidos biológicos hidrofílicos, permitindo uma maior dispersão [5].

Com isso, o estudo visa formular e caracterizar nanoemulsões a base de óleo de pequi (PeNE) para avaliação de seus efeitos em células de macrófagos (J774) *in vitro* antes e após serem estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), estabelecendo uma análise comparativa com o óleo de Pequi livre (PO).

Metodologia

As nanoemulsões foram produzidas utilizando lecitina de ovo como surfactante e óleo de pequi como fase oleosa, em uma proporção 1:2 (v/v) diluídos em solução de tampão fosfato salino (PBS) [6]. O método de nanoemulsificação consistiu na ultrasonicação em pulso alternado a 20 kHz em banho de gelo por 6 min. Uma formulação sem óleo de Pequi foi preparada seguindo os mesmos métodos citados. Todas formulações foram

estocadas a 4°C sem exposição a luz.

A caracterização físico-química das nanoemulsões foi realizada em temperatura ambiente no equipamento ZetaSizer® Nano ZS90 (Malvern, UK), avaliando-se o diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta das nanogotículas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) com angulação de 90°. O pH da formulação foi avaliado utilizando fita indicadora de pH. Os parâmetros físico-químicos foram avaliados nos períodos de 1, 30 e 60 dias após formulação.

Para a realização dos ensaios de viabilidade celular e dosagem óxido nítrico as células de macrófagos murino (J774) foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ e plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de 2x10⁴ células por poço.

A viabilidade celular foi analisada através do ensaio de MTT no período de 24h após tratamento com PeNE, PO e branco nas concentrações de 90, 180 e 360 µg/mL. A absorbância dos cristais de formazan formados e diluídos com solução de DMSO foi determinada em espectrofotômetro com leitor de microplaca (MolecularDevices, USA) no comprimento de onda de 595 nm.

O ensaio de dosagem de óxido nítrico foi realizado através da reação de Griess (Griess Reagent Kit (G-7921)) após tratamento PO e PeNE (360 µg/mL). Na abordagem preventiva, após 24h de tratamento, foram adicionados em cada poço 20µL de LPS na concentração de 0,5 µg/mL diluído em PBS e 0,01 µg de INF-γ. Já na abordagem terapêutica foram adicionados LPS e INF-γ nas mesmas concentrações do tratamento preventivo 6h antes do tratamento com PeNE e PO. Após 6h de incubação, 50 µL do sobrenadante de cada poço e 50 µL da solução de reagentes da reação de Griess foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. Após 10 min a absorbância foi determinada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Para a análise de corpúsculos lipídicos as células foram plaqueadas em placa de 12 poços em uma densidade de 5x10⁵ células por poço e tratadas com PeNE e PO (360 µg/mL). Na abordagem preventiva, após 24h de tratamento, foram adicionados em cada poço 20µL de LPS na concentração de 0,5 µg/mL diluído em PBS e 0,01 µg de INF-γ. Já na abordagem terapêutica foram adicionados LPS e INF-γ nas mesmas concentrações do tratamento preventivo 6h antes do tratamento com PeNE e PO. Após 24h, fixadas com formaldeído a 10% durante 30 min e posteriormente coradas com o corante Oil Red O a 0,5% diluído em isopropanol durante 1h. A quantificação dos corpúsculos lipídicos corados foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 500nm

Resultados e Discussão

As PeNE foram submetidas a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e eletroforético (ELS) que detectou a presença de nanogotículas de diâmetro hidrodinâmico 124.2 nm com índice de polidispersão 0.244 e potencial zeta -15mV. Estas características condizem com a formulação de nanoemulsões monodispersas com campo de repulsão elétrica entre as nanogotículas. Através da análise macroscópica observou-se a manutenção da dispersão homogênea do óleo de Pequi nanoestruturado, sem sinais da ocorrência de separação de fases. Não se observou alterações significativas nos parâmetros físico-químicos durante o período de 60 dias com as nanoemulsões armazenadas a 4°C e protegidas da luz. Complementarmente, não se observou sinais de cremagem e floculação.

A citotoxicidade das PeNE e PO em cultura *in vitro* de macrófagos da linhagem J774 foi analisada através do ensaio de MTT pelo período de 24h. PO na maior concentração testada de 360µg/mL reduziu a viabilidade celular em níveis inferiores a 50%, enquanto que o óleo nanoencapsulado em todas as concentrações testadas (90, 180 e 360µg/mL) não foi citotóxico, mantendo a viabilidade celular em níveis superiores a 80%, demonstrando a biocompatibilidade da PeNE e a otimização da interação do óleo com as células quando interiorizado no sistema nanoestruturado.

O duplo papel dos macrófagos nos processos inflamatórios é determinado pela expressão de dois fenótipos diferentes. O fenótipo M1 é classicamente ativado com estímulos imunogênicos que induzem a produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios que iniciam e mantêm a resposta inflamatória, posteriormente encerrada com os mediadores anti-inflamatórios liberados pelo fenótipo M2, ativado por estímulos de citocinas regulatórias [7]. Essa capacidade de polarização dependente de estímulo caracteriza esta célula como um importante modelo para avaliação do potencial imunomodulatório de compostos bioativos.

Um dos produtos dos macrófagos M1 é o óxido nítrico, um gás de curta meia-vida produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) [8]. Em um estudo desenvolvido por Wu e colaboradores, observou-se que a inibição da produção de óxido nítrico através do NMMA, um inibidor da iNOS, reduziu em 54% e 76% os níveis de TNF-alfa e IL-1beta, respectivamente, e aumentou em 70% os níveis de IL-10 em macrófagos estimulados LPS [9].

Devido ao impacto significativo do óxido nítrico no desenvolvimento da inflamação, a sua dosagem foi realizada no presente estudo em macrófagos estimulados com LPS e tratados com a PeNE e PO em abordagem preventiva e terapêutica. Tanto o PO quanto a PeNE (360µg/mL) induziram a produção de óxido nítrico em macrófagos tratados antes e após a estimulação com LPS. Entretanto, sendo mais acentuado no tratamento com a PeNE (Gráficos 1 e 2).

As nanogotículas quando em contato com a superfície celular interagem com a bicamada lipídica, desorganizando-a de modo a liberar o conteúdo oleoso no interior das células. Esse fenômeno característico promovido pelo surfactante permite uma maior internalização dos compostos bioativos presentes no óleo, resultando na potencialização dos efeitos biológicos [10].

A composição do óleo de Pequi foi analisada em estudo prévio e se baseia em dois principais ácidos graxos: ácido oleico (~51%) e ácido palmítico (~40%) [6]. Ambas moléculas possuem atividade imunomodulatória

descrita na literatura, tendo como mecanismo de ação a interação com receptores do tipo toll-like (TLR4) expressos na superfície de macrófagos [11].

Quando ativados estes receptores estimulam o fator de transcrição NF- κ B associado a genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α que sinalizam para a polarização dos macrófagos no fenótipo M1. O LPS é um agonista TLR4, e em menor proporção o ácido palmítico. Em contrapartida, o ácido oleico atua como um antagonista TLR4 sendo associado com a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 [11-12].

É possível observar um paradoxo entre a imunomodulação produzida pelos principais componentes do óleo de Pequi e acentuada com a presença em concentrações semelhantes. Contudo, em um estudo desenvolvido por Santamaria et al, observou-se que o ácido oleico foi capaz de reduzir a expressão de fatores de transcrição regulados por receptores (PPAR γ) responsáveis pela ativação da produção de mediadores anti-inflamatórios [12-13]. Com isso, a sua expressão reduzida pode se somar aos efeitos pró-inflamatórios do ácido palmítico o que resulta na polarização dos macrófagos no fenótipo M1 e consequente produção de óxido nítrico.

Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas constituídas por um núcleo lipídico envolto por uma hemimembrana fosfolipídica. Em leucócitos estimulados com moléculas imunogênicas, estas organelas aumentam em quantidade e ativam vias metabólicas associadas a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e ácido araquidônico presente na membrana fosfolipídica, formando mediadores pró-inflamatórios de natureza lipídica da classe dos eicosanoides com o aumento nos níveis de prostaglandinas e leucotrienos [14].

Os macrófagos tratados com PeNE e PO (360 μ g/mL) tiveram a produção de corpúsculos lipídicos aumentada tanto na abordagem preventiva quanto terapêutica, sendo acentuada em células não estimuladas com LPS. Isso demonstra a incorporação dos ácidos graxos presentes no óleo de Pequi ao núcleo dos corpúsculos lipídicos. Nas células tratadas com PeNE é possível observar a produção dos corpúsculos ocorrendo em maior proporção que em células tratadas com PO, que pode ser resultado de uma maior internalização das PeNE (Gráficos 3 e 4).

No estudo realizado por Nanhuck et al, foram testados 20 diferentes ácidos graxos avaliando-se a capacidade de formação de corpúsculos lipídicos e observaram uma relação diretamente proporcional entre o número de insaturações na cadeia graxa e a indução de formação dos corpúsculos. O ácido palmítico, um ácido graxo saturado não induz a formação da organela [15].

A síntese de eicosanoides envolve uma cascata de mecanismos enzimáticos que inicia com a liberação de cadeias de ácidos graxos, principalmente o ácido araquidônico pela enzima fosfolipase A2. Lipoxigenases e ciclooxigenases convertem o ácido araquidônico em eicosanoides específicos: leucotrienos e prostaglandinas, respectivamente. A formação de corpúsculos lipídicos não tem relação direta com a produção de eicosanóides, a composição química dos ácidos graxos presentes no núcleo dos corpúsculos lipídicos influencia na ativação das vias de produção dos mediadores inflamatórios [14]. No mesmo estudo de Nanhuck citado anteriormente observou-se que óleo de oliva, soja e óleo de peixe não aumentaram a produção de LTB4 *in vitro* em cultura de células polimorfonucleares do sangue periférico humano, mesmo tendo aumentado a presença de corpúsculos lipídicos [15].

Entretanto, a análise de corpúsculos lipídicos no presente estudo restringiu-se ao aspecto quantitativo da presença dessas organelas em macrófagos e a utilização dos ácidos graxos nessas vias não foi analisada, consequentemente não é possível correlacionar o aumento da presença de corpúsculos lipídicos com a atividade pró-inflamatória do óleo de Pequi e PeNE.

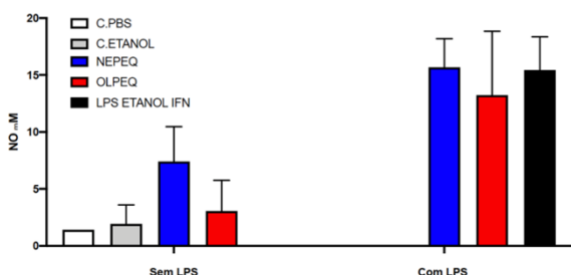


Gráfico 1: Ensaio de dosagem de óxido nítrico por Reação de Griess em macrófagos (J774) tratados preventivamente com óleo de Pequi, PeNE e controles na concentração de 360 μ g/mL no período de 24 horas. Após período de tratamento as células foram estimuladas com LPS na concentração de 0,5 μ g/mL (abordagem preventiva).

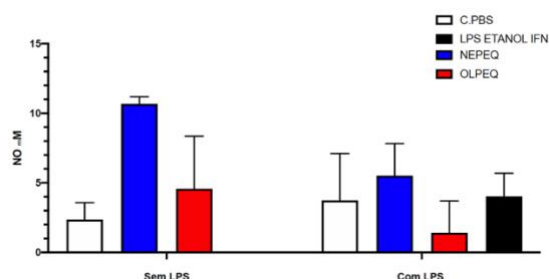


Gráfico 2: Ensaio de dosagem de óxido nítrico por Reação de Griess em macrófagos (J774) estimulados com LPS na concentração de 0,5 μ g/mL e após 6h tratados com óleo de Pequi, PeNE e controles na concentração de 360 μ g/mL no período de 6 horas (abordagem terapêutica).

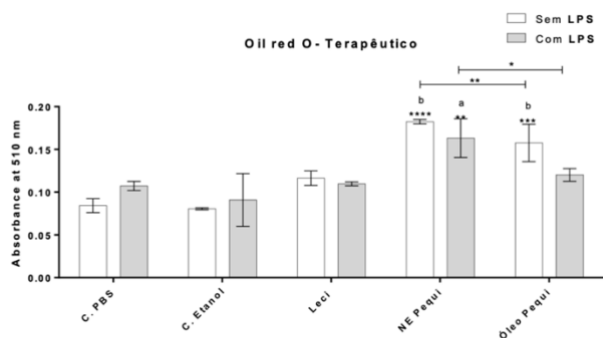


Gráfico 3: Ensaio de detecção de corpúsculos lipídicos através do corante Oil Red O em macrófagos murinos (J774) estimulados LPS na concentração de 0,5µg/mL e após 6h tratados com PO, PeNE e controles (360 µg/mL) no período de 24 horas (abordagem terapêutica). a: p 0,05 comparação com C. Etanol; b: p,001 comparação com C. Etanol; *:p 0,05 comparação com C. PBS

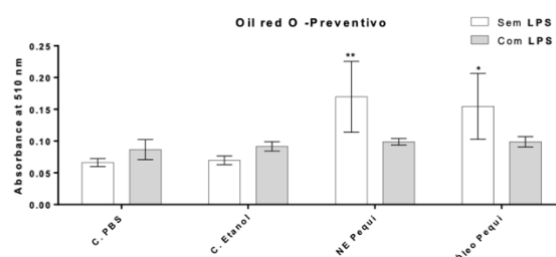


Gráfico 4: Ensaio de detecção de corpúsculos lipídicos através do corante Oil Red O em macrófagos murinos (J774) tratados preventivamente com PO, PeNE e controles (360 µg/mL) no período de 24 horas. Após período de tratamento as células foram estimuladas com LPS na concentração de 0,5µg/mL (abordagem preventiva). a: p 0,05 comparação com C. Etanol; b: p,001 comparação com C. Etanol; *:p 0,05 comparação com C. PBS

Conclusões

No presente estudo, a metodologia de nanoemulsificação por ultrassonicação foi eficaz na produção de nanoemulsão com tamanho de nanogotículas <200 nm, sendo estável cineticamente durante todo o período analisado e biocompatível. A nanoestruturação garantiu ainda ao óleo de Pequi atividades imunomodulatórias relacionadas com a indução da formação de corpúsculos lipídicos e a liberação de óxido nítrico, tanto no tratamento preventivo como no terapêutico em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), mais acentuadas em comparação com o óleo não nanoestruturado evidenciando uma maior internalização celular do óleo nanoestruturado. Com isso, é possível concluir que o PO e PeNE estimulam a liberação de óxido nítrico, e podem estar relacionados à ativação de processos inflamatórios. Já a formação de corpúsculos lipídicos não é um evento diretamente relacionado com a produção de mediadores pró-inflamatórios, sendo necessário outros ensaios de detecção de mediadores e citocinas para a determinação do padrão de imunomodulação de PO e PeNE.

Referências bibliográficas

- 1- Tasneem, Shumaila et al. "Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents." *Pharmacological research* vol. 139 (2019): 126-140. doi:10.1016/j.phrs.2018.11.001
- 2- Ribeiro Neto, José Antônio et al. "Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach." *Journal of ethnopharmacology* vol. 260 (2020): 112547. doi:10.1016/j.jep.2020.112547
- 3- Junior, Armando Jorge et al. "Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Caryocar brasiliense." *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry* vol. 19,3 (2020): 313-322. doi:10.2174/1871523018666190408144320
- 4- Sá Coutinho, Diego et al. "Pequi (Caryocar brasiliense Cambess)-Loaded Nanoemulsion, Orally Delivered, Modulates Inflammation in LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice." *Pharmaceutics* vol. 12,11 1075. 11 Nov. 2020, doi:10.3390/pharmaceutics12111075
- 5- Singh, Yuvraj et al. "Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery." *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* vol. 252 (2017): 28-49. doi:10.1016/j.jconrel.2017.03.008
- 6- Ombredane, A. S. et al. "Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (Caryocar brasiliense Cambess.) in breast cancer cells." *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 58, 2020, 101819, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101819.
- 7- Hu, Guorong et al. "Nanoparticles Targeting Macrophages as Potential Clinical Therapeutic Agents Against Cancer and Inflammation." *Frontiers in immunology* vol. 10 1998. 21 Aug. 2019, doi:10.3389/fimmu.2019.01998
- 8- Yang, Youzhe et al. "Development of a novel nitric oxide (NO) production inhibitor with potential therapeutic effect on chronic inflammation." *European journal of medicinal chemistry* vol. 193 (2020): 112216. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112216
- 9- Wu, Chih-Hsiung et al. "Nitric oxide modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages." *The Journal of trauma* vol. 55,3 (2003): 540-5. doi:10.1097/01.TA.0000033496.62796.3B
- 10- Elzayat, Asmaa et al. "Nanoemulsions for synthesis of biomedical nanocarriers." *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* vol. 203 (2021): 111764. doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111764
- 11- Korbecki, Jan, and Karolina Bajdak-Rusinek. "The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms." *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* vol. 68,11 (2019): 915-932. doi:10.1007/s00011-019-01273-5
- 12- Santamarina, Aline B et al. "Anti-inflammatory effects of oleic acid and the anthocyanin keracyanin alone and in combination: effects on monocyte and macrophage responses and the NF-κB pathway." *Food & function* vol. 12,17 (2021): 7909-7922. doi:10.1039/d1fo01304a
- 13- Bensinger, Steven J, and Peter Tontonoz. "Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors." *Nature* vol. 454,7203 (2008): 470-7. doi:10.1038/nature07202
- 14- Melo, Rossana C N, and Peter F Weller. "Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses." *Experimental cell research* vol. 340,2 (2016): 193-7. doi:10.1016/j.yexcr.2015.10.028
- 15- Nanhuck, Renata M et al. "Effects of lipid emulsions on lipid body formation and eicosanoid production by human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells." *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* vol. 28,5 (2009): 556-64. doi:10.1016/j.clnu.2009.05.008