



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO
DE NANOEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA CONTENDO
CARVACROL

AMANDA GABRIELLE BARROS DANTAS

CAMPINA GRANDE- PB

2021

AMANDA GABRIELLE BARROS DANTAS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO
DE NANOEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA CONTENDO
CARVACROL**

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

Orientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

CAMPINA GRANDE- PB

2021

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

D192d Dantas, Amanda Gabrielle Barros.
Desenvolvimento, caracterização e avaliação da imunomodulação de nanoemulsão óleo em água contendo carvacrol [manuscrito] / Amanda Gabrielle Barros Dantas. - 2021.

46 p.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.

"Orientação : Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira ,
Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Imunomodulação. 2. Inflamação. 3. Nanoemulsão. 4.
Óleos essenciais. I. Título

21. ed. CDD 615.19

AMANDA GABRIELLE BARROS DANTAS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO
DE NANOEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA CONTENDO
CARVACROL**

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

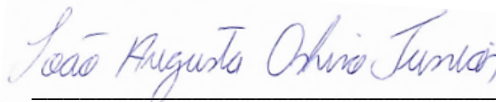
Área de pesquisa: Fármacos e medicamentos

Aprovada em: 27/09/2021

BANCA EXAMINADORA

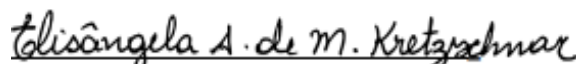


Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. João Oshiro Junior

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof^a. Dr^a, Elisângela Afonso de M. Kretzschmar

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

*Dedico a minha mãe por sempre acreditar e me
incentivar sem medir esforços, todo meu amor e
gratidão.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha mãe e minha avó, Eneida e Edneuzza, por ser meu alicerce, não apenas nesse período mas em toda minha vida. Vocês são meus maiores motivos para ter forças em chegar até aqui.

Aos meus amigos de turma do mestrado, em especial Mariana Dantas, Rafaela Moreno e Demis Melo, por todo suporte emocional, conselhos, e ajudas profissionais. Eu tenho sorte de carregar vocês comigo.

Aos meus amigos do apartamento 203, com quem pude dividir apartamento e a vida por 2 anos, obrigada por terem sido família todos os dias.

A Mariana Ribeiro, por ser irmã, amiga, mãe, companheira, por ter me segurado e me feito levantar quando eu achava que não seria mais capaz. Você é meu presente.

A Lucas Araújo que está ao meu lado em mais uma conquista durante esses 5 anos e nunca mediu esforços para me apoiar no que eu precisasse.

A todos, todo meu amor e gratidão por estarem comigo, não estou nessa conquista sozinha.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr^o Elquio Eleamen Oliveira, pela orientação, pelo senso crítico, aprendizado, e conselhos. Por ter me inspirado como profissional. Por todo zelo que você tem com seus alunos, foi uma honra tê-lo como orientador.

A todos do LSVM, pela recepção e conhecimentos repassados. Em especial a Rafael Limongi por todo apoio, e a Camila Melo que se tornou além de uma parceira científica, mas uma amiga pra vida.

A todos do PPGCF, aos professores, ao secretário, por toda atenção dada, pelos momentos de alegria e diversão, e todo aprendizado.

A Universidade Federal De Pernambuco (UFPE) pela parceria nas análises.

A Isabela Motta Felicio pela contribuição dos experimentos.

A **CAPES** pela bolsa concedida.

“ Não há nada mais corajoso para mim do que uma pessoa anunciar que sua história merece ser contada, sobretudo se essa pessoa é uma mulher.”

Lena Dunham

RESUMO

O carvacrol (CV) é um óleo essencial que apresenta diversas propriedades terapêuticas, incluindo atividade imunomoduladora. No entanto, esse ativo possui algumas propriedades físico-químicas que dificultam o seu uso terapêutico, como lipofilicidade, sensibilidade à degradação quando em contato com luz e fácil oxidação. O processo de nanoemulsificação pode auxiliar nas limitações do CV e melhorar sua atividade imunomoduladora. O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar um sistema nanoemulsionado contendo CV e avaliar sua ação imunomoduladora. A nanoemulsão de carvacrol (CVNE) e a nanoemulsão branca (BNE) foram produzidas pela técnica de sonicação. Foi realizada a caracterização físico-química das nanoemulsões avaliando o potencial zeta, índice de polidispersão e tamanho médio das gotículas ao longo de 90 dias pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). A atividade citotóxica e a quantificação de citocinas (IL-1 β ; IL-2; IL-6; IL-10; IL-17; IFN- γ ; e TNF- α) foram avaliadas em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) usando o ensaio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio], nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M de CV. A nanoemulsão de CV (CVNE) selecionada conteve 5% p/p de fase oleosa, 2% p/p de tensoativos e 93% p/p de água. CVNE apresentou uma eficiência de encapsulação de 83,97% \pm 1,02 a partir do espectrofotometro de ultravioleta-visível. CVNE alcançou tamanho de gotícula de 165,70 \pm 0,46nm, PDI de 0,14 \pm 0,03, potencial zeta de -10,25 \pm 0,52 mV e boa estabilidade por 90 dias. CVNE não apresentou citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico nas concentrações estudadas. Os estudos de imunomodulação demonstraram que a nanoemulsificação do carvacrol melhorou sua resposta biológica, reduzindo os níveis de IL-2, IL-17 e IFN- γ a 50 μ M. Em conclusão, uma nanoemulsão de carvacrol foi produzida apresentando uma melhora na atividade imunomoduladora de CV em PBMCs. Para um melhor entendimento do mecanismo de ação é necessário realizar testes *in vivo*.

Palavras-chave: Imunomodulação. Inflamação. Nanoemulsão. Sistema de liberação. Óleo essencial.

ABSTRACT

Carvacrol (CV) is an essential oil that has several therapeutic properties, including immunomodulatory activity. However, this active has some physicochemical properties that hinder its use in the biological therapeutic environment, such as high lipophilicity, sensitivity to degradation when in contact with light, and easy oxidation. Furthermore, the immunomodulatory effect has not been studied in nanoemulsion systems, which The nanoemulsification process can help to limit the VC and improve its therapeutic immunomodulatory activity. Thus, the aim of this study was to develop and characterize a nanoemulsified system containing CV and evaluate its immunomodulatory action. Carvacrol nanoemulsion (CVNE) and white nanoemulsion (BNE) were produced by the sonication technique. The physicochemical characterization of nanoemulsions was carried out by evaluating the zeta potential, polydispersion index and average droplet size over 90 days by the dynamic light scattering (DLS) technique. Cytotoxic activity and cytokine quantification (IL-1 β ; IL-2; IL-6; IL-10; IL-17; IFN- γ ; and TNF- α) were evaluated in peripheral blood mononuclear cell culture supernatants (PBMCs) using the MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium], at concentrations of 50 μ M, 100 μ M and 200 μ M CV The nanoemulsion of CV (CVNE) is composed of 5% w/w oil phase, 2% w/w surfactants and 93% w/w water. The white nanoemulsion CVNE (BNE) has the same composition without carvacrol, and was obtained an encapsulation efficiency of 83.97% \pm 1.02 from the ultraviolet-visible spectrophotometer. CVNE achieved encapsulation efficiency of 83% \pm 1.02 , droplet size of 165.70 \pm 0.46nm, PDI of 0.14 \pm 0.03, zeta potential of -10.25 \pm 0.52 mV and good stability for 90 days. CVNE did not show relevant cytotoxicity activity up to 200 μ M in peripheral blood mononuclear cells at the concentrations studied. Immunomodulation studies demonstrated that carvacrol nanoemulsification CVNE improved its biological response, reducing the levels of pro-inflammatory cytokines IL-2, IL-17 and IFN- γ to 50 μ M. In conclusion, a carvacrol nanoemulsion was produced showing an improvement in the immunomodulatory activity of CV in PBMCs. However, for a better understanding of the mechanism of action it is necessary to perform in vivo tests, and oral absorption tests.

Keywords: Immunomodulation. Inflammation. Nanoemulsion. Release delivery system. Essential oil.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Molécula do carvacrol.....	18
Tabela 1. Composição das nanoemulsões CVNE e BNE.....	21
Figura 2. Desenho esquemático da preparação das nanoemulsões pelo método de sonicação.....	21
Figura 3. Desenho esquemático do isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico.....	23
Figura 4. Aspecto visual da nanoemulsão descarregada (BNE) e nanoemulsão carregada com carvacrol (CVNE) após 90 dias de armazenamento a 4 ° C.....	25
Figura 5. Curva de calibração do Carvacrol.....	26
Tabela 2. Parâmetros de estabilidade: diâmetro médio da gota, potencial zeta, índice de polidispersividade e pH da nanoemulsão com carvacrol (CVNE) e da nanoemulsão branca (BNE) ao longo de 90 dias.	27
Figura 6. Atividade imunomoduladora de CVNE, BNE e CV em células PBMC	30
Figura 7. Desenho esquemático da influência da nanoemulsão com carvacrol na inibição de citocinas pró-inflamatórias produzidas por células T estimulados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ANOVA	Análise de variância
A/O	Água em óleo
BNE	Nanoemulsão branco
COX-1	Ciclo-oxigenase -1
COX-2	Ciclo-oxigenase -2
cPLA2	Fosfolipase A2
CV	Carvacrol
CVNE	Nanoemulsão de carvacrol
FDA	Federal Drug Administration
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
NE	Nanoemulsão
NO	Óxido Nítrico
O/A	Óleo em água
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PDI	Índice de polidispersão
TGF	Fator de crescimento tumoral
TFN-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	<i>Objetivo geral</i>	13
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	<i>Inflamação e citocinas</i>	14
3.2	<i>Carvacrol</i>	16
3.3	<i>Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de fármacos</i>	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	<i>Materiais</i>	20
4.1.1	<i>Substâncias e reagentes</i>	20
4.1.2	<i>Equipamentos analíticos</i>	20
4.2	<i>Preparação de nanoemulsões de óleo em água</i>	20
4.3	<i>Curva de calibração</i>	21
4.3.1	<i>Eficiência de encapsulação</i>	22
4.5	<i>Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	22
4.6	<i>Medição de pH</i>	22
4.7	<i>Estudo de estabilidade</i>	23
4.8	<i>Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)</i>	23
4.9	<i>Citotoxicidade in vitro</i>	24
4.10	<i>Quantificação de citocinas</i>	24
4.11	<i>Análise estatística</i>	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	<i>Preparação da nanoemulsão de carvacrol (CVNE) e nanoemulsão branca (BNE) e determinação das curvas analíticas</i>	25
5.2	<i>Avaliação do tamanho da gotícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta do CVNE</i>	26
5.3	<i>Atividade de citotoxicidade</i>	29
5.4	<i>Avaliação de citocinas in vitro</i>	29
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo natural do corpo como defesa contra patógenos e início de um processo de cura, podendo ser dividida em duas categorias como aguda ou crônica (AGHASAFARI; GEORGE; PIDAPARTI, 2019). A inflamação aguda age imobilizando a região acometida, mas deixa o sistema imunológico atuar para a cura das lesões, no entanto, tecidos com inflamações crônicas passam a necessitar do auxílio de células imunes da corrente sanguínea para amplificar a resposta inflamatória (AGHASAFARI; GEORGE; PIDAPARTI, 2019).

O sistema imunológico é regulado por uma infinidade de citocinas que vão agir para manter a homeostase e para coordenar as respostas imunes inatas e adaptativas aos patógenos e promover uma memória imunológica (KELLY et al., 2017). Células e fatores imunológicos são os principais reguladores e responsáveis na cicatrização de inflamações agudas (SU et al., 2019). Neutrófilos e basófilos são os primeiros a responder ao processo inflamatório, e além disso, outras células imunes inatas e adaptativas, como macrófagos, mastócitos, células T e células B, mostraram estar envolvidas no processo (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019)

Os óleos essenciais são compostos produzidos por algumas plantas com características de serem metabólitos secundários voláteis e possuem diversas atividades terapêuticas comprovadas. O principal constituinte do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) é o carvacrol (CV), um monoterpene fenólico que pode ser obtido de plantas aromáticas dos gêneros *Origanum* e *Thymbra*. O CV possui algumas atividades terapêuticas comprovadas como antibacterianas, antifúngicas, analgésicas, antioxidantes e antiinflamatórias (LAOTHAWEEERUNGSAWAT et al., 2020; LANDA et al., 2009) (FABBRI et al., 2016). Porém, o uso do carvacrol na indústria farmacêutica têm demonstrado limitações tecnológicas devido a sua volatilidade, fotossensibilidade e instabilidade na presença de calor e umidade, dificultando sua aplicação terapêutica (SANTOS et al., 2015).

A nanotecnologia é uma alternativa para a encapsulação de ativos com baixa hidrofiliabilidade, e dentre as opções, temos a nanoemulsão (NE) (ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2018). As nanoemulsões (NEs) são dispersões que podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) estabilizadas por um surfactante (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). As NE apresentam algumas vantagens, como: mascarar o sabor e/ou cheiro do ativo encapsulado, diminuindo as propriedades organolépticas indesejáveis, capacidade de encapsular ativos lipofílicos e hidrofílicos protegendo contra degradação e oxidação, e melhorar a atividade

biológica com o aumento da superfície de contato do sistema nos receptores, devido ao tamanho nanométrico (MCCLEMENTS; RAO, 2011; SABJAN et al., 2019; PATHAK; PATTNAIK; SWAIN, 2018).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma NE contendo carvacrol, bem como realizar a avaliação da atividade imunomodulatória em testes *in vitro* em células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar um sistema nanoemulsionado contendo CV e avaliar sua ação imunomoduladora.

2.2 Objetivos específicos

- a) obter NE com CV pela técnica de sonicação;
- b) quantificar o CV na NE e avaliar a eficiência de encapsulação;
- c) caracterizar os sistemas obtidos, contemplando as análises de aspecto macroscópico, tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e pH;
- d) avaliar a atividade imunomodulatória *in vitro*, através da quantificação da inibição ou aumento das citocinas IL-1B, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, TFN- α , interferon gama (IFN- γ) do CV livre e da nanoemulsão com carvacrol (CVNE);

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Inflamação e citocinas

O mecanismo da resposta inflamatória representa uma cadeia de eventos, incluindo células e vasos sanguíneos com secreções humorais específicas. Essas respostas envolvem mudanças na localização de células brancas para o local inflamado como monócitos, basófilos, eosinófilos e neutrófilos, além de plasma, fluidos e um grupo de substâncias que agem como mediadores que vão ser liberadas pelo sistema imunológico, como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, derivados de oxigênio e nitrogênio, e serotonina (ABDULKHALEQ et al., 2018; ANWIKAR; BHITRE, 2010).

As citocinas são pequenas proteínas que atuam na regulação da resposta imune (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). Algumas citocinas podem ter ações pró ou anti-inflamatórias de acordo com o ambiente em que elas estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-18 e TNF- α , IFN- γ e entre as anti-inflamatórias estão IL-4, IL-10, IL-13, IL-11, e IFN- α (DE OLIVEIRA et al., 2011; RODNEY; OSIER; GILL, 2018; BOSHTAM et al., 2017). A liberação de citocinas pró-inflamatórias levará à ativação de células imunes, além da liberação de outras citocinas (SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015).

A resposta imunológica é tradicionalmente categorizada em sistema inato ou adaptativo. O sistema inato reage ao patógeno liberando mediadores (ZINDEL; KUBES, 2020). Esses mediadores vão produzir uma resposta inflamatória local como vasodilatação, e estímulo de dor, além de atrair macrófagos (BANDO et al., 2017). Os macrófagos liberam citocinas, TNF- α , IL-1 e IL-6, para prolongar ainda mais uma inflamação sistêmica e dar início ao sistema imunológico adquirido por meio da atração de leucócitos e linfócitos no local (ABBAS et al., 2013).

Durante uma resposta inflamatória o TNF- α desempenha um papel central na regulação da cascata de citocinas, seus receptores são essenciais para processos cerebrais incluindo a formação e regulação de sinapses, neurogênese e manutenção do sistema nervoso central (MONTGOMERY; BOWERS, 2012). TNF- α tem como função mediar a progressão da inflamação durante os processos, como a deterioração da barreira hematoencefálica e morte celular (RODNEY; OSIER; GILL, 2018).

A família das citocinas IL-1 desempenha uma função neuroprotetora importante após a lesão, o papel principal dessa família que é regular a produção de outras citocinas, induzir a febre, a fagocitose e morte celular. A família de citocinas IL-1 inclui dois agonistas, IL-1 α e

IL-1 β , e um antagonista de receptor específico, IL-1Ra. IL-1 α e IL-1 β são ligantes agonísticos para o receptor de IL-1 (IL-1R1) e induzem atividades biológicas semelhantes (GELFO et al., 2018). IL-1 α e IL-1 β são, no entanto, expressos por diferentes tipos de células, e sua atividade é controlada por mecanismos distintos ocorrendo algumas diferenças em suas funções, enquanto a IL-1 α é expressa em uma ampla gama de tipos de células, incluindo queratinócitos, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos, a IL-1 β é produzida principalmente por células mieloides (CHAN; SCHRODER, 2020).

A IL-6 possui muitas funções, dentre elas, as propriedades pró e antiinflamatórias a depender da via de sinalização (ROSE-JOHN, 2012). Essa IL é um dos mais precoces e importantes mediadores na indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como infecção, queimadura, trauma, após uma lesão (HONG; LIM, 2008; KATO et al., 1997; LIN; CALVANO; LOWRY, 2000).

Além da TNF- α , IL-1 e IL-6, a IL-10 também participa da resposta imunológica inata, e é produzida por quase todos os subconjuntos de leucócitos, incluindo células dendríticas, macrófagos, células T, células assassinas naturais e células B (OUYANG; O'GARRA, 2019). IL-10 atenua a produção de substâncias mediadores inflamatórias, incluindo citocinas e quimiocinas de neutrófilos. Ela age limitando a inflamação de forma a reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias suprimindo a ativação e expressão dos receptores de citocinas (WANG et al., 2019).

As citocinas da família IL-10 são mediadores imunológicos com funções versáteis. Desde sua descoberta, muitas tentativas têm sido feitas para modular essas citocinas como estratégias terapêuticas para muitas doenças, incluindo autoimunidade e câncer (BEDKE et al., 2019).

A descoberta da IL-2 mudou a compreensão molecular de como o sistema imunológico é controlado (ROSS; CANTRELL, 2018). É uma citocina pleiotrópica produzida por células T efectoras após a ativação do antígeno e está relacionada as respostas efectoras e imunoterapia (PAN; TSOKOS; TSOKOS, 2020). IL-2 é produzida por células T auxiliares (Th) e originalmente descrito como um fator de crescimento de células T que é encontrado em culturas de linfócitos estimuladas por mitogênio (TANG et al., 2019)

A IL-17 é um importante elo entre a imunidade adaptativa mediada por células T e a resposta inflamatória aguda que é uma das principais reações da imunidade inata (SCHÖN; ERPENBECK, 2018). IL-17 pode ser expressa por várias populações de linfócitos, como células T natural killer (NKT), células natural killer (NK) e células linfoides inatas do grupo e

a secreção de IL-17 é induzida nessas células por uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β (VELDHOEN, 2017). IL-17 é uma citocina chave na ativação e indução de neutrófilos (MARZANO et al., 2019). Apesar de apresentar propriedades pró-inflamatórias que são essenciais para a capacidade de proteção, a sinalização ilimitada dessa citocina está associada à doenças autoimunes e progressão de câncer (AMATYA; GARG; GAFFEN, 2017). Além de secretar IL-17, as NK também secretam a citocina IFN- γ e matam células infectadas e danificadas. A citocina IFN- γ constitui-se de uma família que inclui três grupos de IFN (tipo I, II e III) (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004). Ela apresenta atividade antiviral, e além disso, esta citocina tem outras atividades no sistema imunológico em condições de inflamação (TAM et al., 1994; SEDER et al., 1993).

Os mediadores inflamatórios como citocinas, histaminas, serotonina, leucotrienos e prostaglandinas atuam intensificando a atividade inflamatória, entretanto, qualquer inibição desses eventos pode resultar na redução da resposta. Sabe-se que existe uma gama de medicamentos que atuam na diminuição do processo inflamatório, porém, esses medicamentos podem causar reações com efeitos adversos na mucosa gástrica, inibição da função renal, e diminuição da atividade dos diuréticos (KASTURI et al., 2019)

Isto posto, é possível observar que as citocinas conseguem influenciar direta e indiretamente as atividades, proliferação, e diferenciação das células imunológicas, além de regular tanto na produção de outras citocinas que pode aumentar a resposta inflamatória, no caso das citocinas pró-inflamatórias, como atenuar esta resposta com as citocinas anti-inflamatórias.

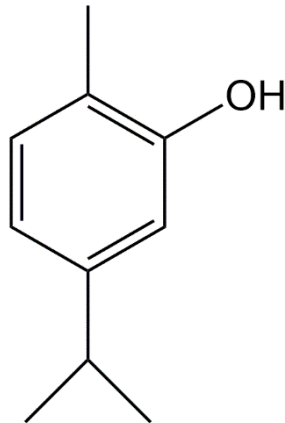
3.2 Carvacrol

Carvacrol é um monoterpenóide fenólico, presente no óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), pimenta (*Lepidium flavum*) e outras plantas (FACHINI-QUEIROZ et al., 2012)(SHARIFI-RAD et al., 2018). CV é uma molécula pequena e conhecida pela sua nomenclatura de acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como 2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol (Figura 1). Ele foi aprovado pela *Federal Drug Administration* (FDA) para consumo humano, além de poder ser utilizado como aditivo alimentar, o carvacrol está incluso na lista de aromatizantes químicos do Conselho da Europa que pode ser encontrado em bebidas alcoólicas, condimentos, refrigerantes, entre outros (KACHUR; SUNTRES, 2020; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).

CV é um componente encontrado com facilidade em diversos óleos essenciais, e nos últimos anos teve muita atenção devido as suas propriedades biológicas, como antimicrobiano (antibacteriano e antiprotozoário), atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antinociceptiva, cardioprotetora e neuroprotetora (MEMAR et al., 2017; KARKABOUNAS et al., 2006; MELO et al., 2011).

A atividade anti-inflamatória do CV já foi relatada por diversos estudos (DE CARVALHO et al., 2020; EZZ-ELDIN; ABOSEIF; KHALAF, 2020). No entanto, existem alguns mecanismos de ação possíveis para o carvacrol. Alguns estudos sugerem que o carvacrol tem atividade anti-inflamatória por interferir na cascata do ácido araquidônico (WAGNER; WIERER; BAUER, 1986; LANDA et al., 2009). A inibição dessa via impede a produção de prostaglandinas (importante agente estimulador de respostas inflamatórias), como tromboxano, prostaglandinas e prostaciclina (LIMA et al., 2013). Outros autores confirmaram essa atividade anti-inflamatória ao longo dos anos e testaram outros mecanismos de ação como a inibição de citocinas pró-inflamatórias (MAHMOODI et al., 2019; GHOLJANI; AMIRGHOFRAN, 2016). O carvacrol demonstrou atividade na inibição de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) α , interleucina (IL) -6, interferon-gama (IFN) γ , IL-17 e IL-1 β , que são mediadores inflamatórios (KARA et al., 2015; MAHMOODI et al., 2019; LI et al., 2016). Além disso os mediadores anti-inflamatório, como fator transformador de crescimento (TGF) β , IL-10 e IFN- γ , aumentaram os níveis em presença CV (KHAZDAIR; BOSKABADY, 2019; MAHMOODI et al., 2019).

De acordo com estudos realizados em coelhos, o CV é lentamente absorvido no intestino após a administração oral, com mais de 30% permanecendo no trato gastrointestinal e cerca de 25% da dose total excretada na urina 22 horas depois da administração (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015). CV apresenta propriedades físico-químicas como baixa solubilidade em água (0,11mg/ml), limitando a biodisponibilidade, e facilidade de oxidação, que pode dificultar a sua absorção em meio biológico (NAGHDI BADI et al., 2017).

Figura 1: Molécula do carvacrol

Fonte: dados do autor

3.3 Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de fármacos

Os estudos com nanotecnologia nos últimos anos tiveram um grande impacto em diversos campos da ciência, afetando também a construção da indústria farmacêutica (NASROLLAHZADEH; SAJADI; SAJJADI, 2019). A nanotecnologia pode ser definida, em termos gerais, como a capacidade de criar novas estruturas em menor escala, utilizando de ferramentas e técnicas que vão permitir manipular a matéria em nanoescala (ZHU; BARTOS; PORRO, 2004). No entanto, apesar dessa ser a definição mais utilizada, existe uma limitação de tamanho para uma faixa abaixo de 100nm que exclui vários materiais principalmente na área farmacêutica, por este motivo, alguns especialistas discordam de uma definição rígida (SILVESTRE; SILVESTRE; DE BRITO, 2016).

A nanotecnologia aplicada à farmácia abrange aplicações como dispositivos de entrega de insumos farmacêuticos ativos, diagnósticos de imagem mais apurados, materiais biossensores, tratamentos em nível molecular, auxílio na detecção de antígenos associados a doenças como câncer, doenças neurodegenerativas, além de detecção de microorganismos e vírus associados a infecções. Além disso, a redução do tamanho tem como vantagem o aumento do desempenho dos medicamentos produzidos em uma ampla variedade de formas farmacêuticas. Alguns dos sistemas mais conhecidos são: as nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, e NEs (MARAVAJHALA; BANDLAPALLI, 2012).

Nanoemulsões consistem em uma dispersão de pequenas gotículas de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um surfactante (MCCLEMENTS, 2011; MCCLEMENTS; RAO, 2011). Os dois líquidos imiscíveis mais amplamente usados nas aplicações comerciais são óleo

e água e, portanto, as NEs são tipicamente do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O). Os sistemas O/A são pequenas gotículas de óleo dispersas em um meio aquoso, enquanto A/O consistem em pequenas gotículas de água dispersas em um meio oleoso (JAFARI; MCCLEMENTS, 2017). As NEs têm características físico-químicas que são diferentes daquelas das emulsões: elas podem ser opticamente claras devido à fraca dispersão de luz por pequenas gotas, são altamente estáveis à separação gravitacional devido a forças gravitacionais fracas e efeitos de movimento browniano, podem ter uma biodisponibilidade maior do que as emulsões devido a digestão mais rápida, e por fim, tem uma reatividade química maior do que as emulsões devido à maior área interfacial óleo-água (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

De forma sucinta, as NEs podem ser fabricadas usando duas técnicas: as de alta energia e baixa energia (GUTIÉRREZ et al., 2008; MCCLEMENTS, 2011; KOROLEVA; NAGOVITSINA; YURTOV, 2018). Os métodos de baixa energia são utilizadas para algumas aplicações, como por exemplo, na formação de sistemas de entrega de drogas (KUMAR et al., 2019). As abordagens de alta energia utilizam de equipamentos, geralmente homogeneizadores, que geram intensos campos de energia que quebram as gotículas e misturam a fase oleosa com a aquosa na presença de um surfactante (MCCLEMENTS; RAO, 2011; ABBAS et al., 2013; DUMAY et al., 2013). A maioria dos homogeneizadores utilizados para produção de NEs são os de válvula de alta pressão, microfluidizador e sonicador (ABOALNAJA et al., 2016).

Uma das principais vantagens do uso de NEs para melhorar a entrega de bioativos é a grande flexibilidade que pode ser usada na sua composição (MCCLEMENTS, 2015; DONSI et al., 2011; KOTTA et al., 2012). Bioativos hidrofóbicos, hidrofílicos ou anfifílicos podem ser incorporados em NE, a incorporação de ativos nas gotículas de lipídios podem protegê-los da degradação química iniciada por componentes na fase aquosa (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2015). Além disso, esse sistema também pode alterar os perfis de biodisponibilidade dos agentes encapsulados, alterando sua absorção (ABOALNAJA et al., 2016).

Dessa forma, essa tecnologia demonstra ser uma boa alternativa para o uso de substâncias como o carvacrol que possuem limitações quanto a sua solubilidade, degradação química e melhor explorar as suas atividades terapêuticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 *Substâncias e reagentes*

Carvacrol (5-isopropiril-2-metilfenol, pureza 98%) e monoestearato de sorbitano 80 (Span 80®) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Polissorbato 80 (Tween 80®) foi fornecido pela Vetec Química Fina LTDA (Brasil). O triglicerídeo de cadeia média (MCT; Mygliol 812®) foi adquirido da Sasol (Alemanha). O etanol foi fornecido pela Merck (Brasil) e o dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido pela NEON (Brasil). Os anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 foram adquiridos da Ebiosciences (EUA), o Ficoll Paque Plus foi adquirido da GE Healthcare Biosciences (EUA) e os meios de cultura foram adquiridos da Gibico (Thermofisher Scientific). Os kits HUMAN ELISA foram fornecidos pela BD Biosciences (EUA, para INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10), eBioscience (EUA, para IL-2 e IL-17) e Invitrogen (EUA para IL-1 β).

4.1.2 *Equipamentos analíticos*

Aparelho de sonicação – High intensity ultrasonic (**modelo QR200 - ULTRONIQUE**);

Banho de ultrassom (**modelo 14000^a – Unique**);

Balança analítica (**modelo AUW220D- SHIMADZU**);

Espectrofotômetro (**modelo SP-2000 UV, Spectrum**);

Zetasizer (**modelo Nano-ZS- Malvern Instruments, UK**);

Phâmetro digital (**modelo MPT -2, Malvern**);

Leitor de microplaca (**Elx808, Biotek, EUA**);

4.2 Preparação de nanoemulsões de óleo em água

A nanoemulsão de carvacrol (CVNE) foi composta por 5% v/v de fase oleosa (0,05 g CV + 0,45 g MCT), 2% w/w de surfactantes (0,12 g Tween 80® + 0,08 g Span 80®) e 93% v/v de água, na nanoemulsão branca (BNE) o carvacrol foi substituído pelo MCT (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das nanoemulsões CVNE e BNE

Nanoemulsões	Fase aquosa	Fase oleosa
Com CV (CVNE)	0,12g Tween 80 + 0,08g Span 80 + 9,3g Água Milli-Q	0,05g CV + 0,45g MCT
Sem CV (BNE)	0,12g Tween 80 + 0,08g Span 80 + 9,3g Água Milli-Q	0,5g MCT

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de sonicação, em que todos os componentes, da fase aquosa e oleosa, foram submetidos a quatro ciclos de homogeneização em aparelho de sonicação (modelo QE200, Ultronique, Brasil) por 1 min a 300 W em banho de gelo, seguido de banho ultrassônico por 1 min (Figura 2) (MOTTA FELÍCIO et al., 2020).

Figura 2. Desenho esquemático da preparação das nanoemulsões pelo método de sonicação.

Fonte: dados do autor.

4.3 Curva de calibração

Para curva de calibração, foi realizada a pesagem de 12,5 mg de CV. O CV foi diluído em balão de 25 mL, com concentração final da Solução Mãe de 500 µg/mL. As análises foram feitas em triplicata, no mesmo equipamento e com a mesma marca de metanol. As diluições foram feitas nas concentrações de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 µg/mL. Onde, as alíquotas adicionada em cada balão volumétrico de 10 mL foram 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 e 900

μL . A absorbância máxima para o doseamento do CV no comprimento de onda de 276 nm foi determinada após varredura entre os comprimentos de onda de 200 a 900 nm.

4.3.1 Eficiência de encapsulação

O teor de carvacrol na nanoemulsão foi determinado por espectrofotometria ultravioleta-visível (modelo Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Germany). A concentração de carvacrol na nanoemulsão foi calculada usando uma curva de calibração ((n = 7) $y = 0,01646x - 0,02384$; $R^2 = 0,9992$). O CVNE foi diluído em metanol (1: 2000) e filtrado usando filtro de membrana de 0,2 μm (Kasvi, Brasil) (LANDA et al., 2009). Todas as medições foram feitas em triplicata.

A concentração do fármaco e o rendimento foram calculados de acordo com as equações (1) e (2), respectivamente.

$$\text{Concentração do fármaco (CF)} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Quantidade do CV na CVNE}}{\text{Quantidade total da CVNE}} \quad (1)$$

$$\text{Rendimento \%} \left(\frac{w}{v} \right) = \left(\frac{\text{Quantidade de CV inicial}}{\text{Quantidade de CV final}} \right) \times 100 \quad (2)$$

4.5 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho de partícula, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram determinados no equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, UK) pela técnica de espalhamento dinâmico de luz a 25 ° C (adicionar o ângulo). O potencial zeta foi avaliado a partir da mobilidade eletroforética sob um campo elétrico no mesmo equipamento. Antes da medição, as nanoemulsões foram diluídas com água deionizada em uma proporção de 1:25 v/v. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média com desvio padrão (\pm).

4.6 Medição de pH

O pH da CVNE e da BNE foi medido sem diluição em autotitulado multiuso (modelo MPA-210, Tecnopon Instruments, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

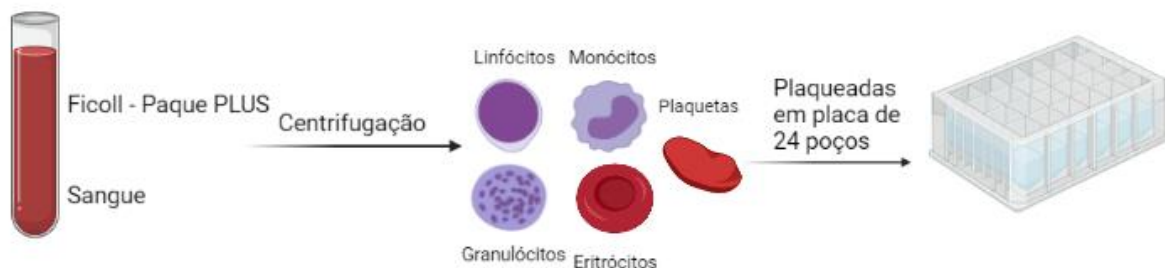
4.7 Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade foram realizados usando CVNE e BNE durante um período de 90 dias. A CVNE e a BNE foram mantidas em frascos de vidro de 10mL que foram lacrados com tampas de plástico e mantidos em refrigeração a 4 ± 2 °C. As formulações foram avaliadas quanto a mudanças no tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e pH, nos dias 1, 7, 20, 3, 60 e 90.

4.8 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas do sangue de indivíduos saudáveis. A coleta foi feita em tubos heparinizados e o sangue foi centrifugado em Ficoll Paque Plus para separação de PBMC. Após a centrifugação e a separação, as células foram plaqueadas e contadas em placas de 24 poços (1×10^6 células/poço) em meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco), HEPES 10 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico) e 200 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) (Figura 3).

Figura 3. Desenho esquemático do isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico.



Fonte: dados do autor

Posteriormente, as células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e tratadas ou não com CV, CVNE ou BNE nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M de carvacrol. O estudo foi realizado com a coleta de sangue de oito indivíduos saudáveis. Os critérios de exclusão dos controles foram o uso regular de medicamentos, doença inflamatória crônica e/ou consumo de álcool ou cigarro nos últimos 15 dias. Todo este procedimento foi submetido e

aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE/CAAE nº 63517517.1.0000.5208).

4.9 Citotoxicidade in vitro

O método MTT foi utilizado para avaliar a atividade citotóxica das nanoemulsões e do carvacrol em PBMC nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e expostas as diferentes concentrações citadas anteriormente por 48 horas. A viabilidade celular foi avaliada pela capacidade das células em reduzir o MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2 -) - 2,5-difeniltetrazólio) ao azul de formazano. Após o período de exposição das células, 20 μ l de MTT (0,5mg / mL) foram adicionados a cada poço da placa e após 3 horas foram adicionados 130 μ l de SDS (dodecilsulfato de sódio) a 20%. A absorbância foi medida 24 horas depois no comprimento de onda de 570 nm, usando um leitor de microplaca (Elx808, Biotek, EUA). Quatro experimentos independentes foram realizados. Este experimento foi realizado em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.10 Quantificação de citocinas

As citocinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β foram quantificadas no sobrenadante das culturas de PBMC. A quantificação das citocinas foi realizada com kits de Ensaio imunossorvente ligado a enzima humana (ELISA) (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 (eBioscience, San Diego, CA, EUA), IL-2 e IL-17 e (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA para IL-1 β). Todos os testes foram realizados de acordo com as recomendações dos fabricantes. Este experimento foi realizado em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.11 Análise estatística

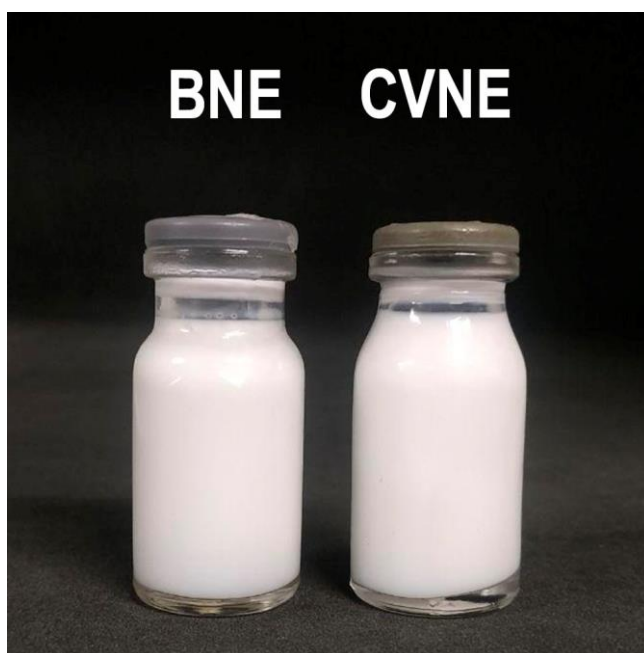
O software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) foi usado para a análise dos dados. No estudo de estabilidade, foram aplicadas análises de variância unilateral (ANOVA). No estudo *in vitro*, as diferenças entre as condições foram calculadas usando o teste de classificação sinalizada de Wilcoxon. Os resultados das variáveis contínuas são expressos como erro padrão médio da média. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação da nanoemulsão de carvacrol (CVNE) e nanoemulsão branca (BNE) e determinação das curvas analíticas

Neste estudo, a CVNE e BNE foram produzidas usando um método de alta energia. É possível observar na Figura 4 que após 90 dias de formulação, as nanoemulsões mostraram-se macroscopicamente estáveis e preservando a aparência leitosa sem formação de creme ou separação de fases. A sonicação foi escolhida como técnica para desenvolver a nanoemulsão neste trabalho. Neste método, são usados ultrasons, que consistem em uma sonda que emite ondas ultrassônicas, que podem variar a entrada de energia ultrassônica e o tempo para alcançar o tamanho de partícula desejado, nesse processo o cisalhamento físico é fornecido principalmente pelo processo de cavitação acústica (KUMAR et al., 2019). Esta técnica requer baixa concentração de surfactantes, possui baixo custo de produção e maior facilidade de operação e limpeza (KOMAIKO; SASTROSUBROTO; MCCLEMENTS, 2015). Além disso, fez-se uso do banho de gelo para que o sistema não aquecesse e ocorresse interferência quanto a viscosidade, consequentemente no tamanho de partícula, como também evitar degradação do carvacrol (ASADINEZHAD et al., 2019).

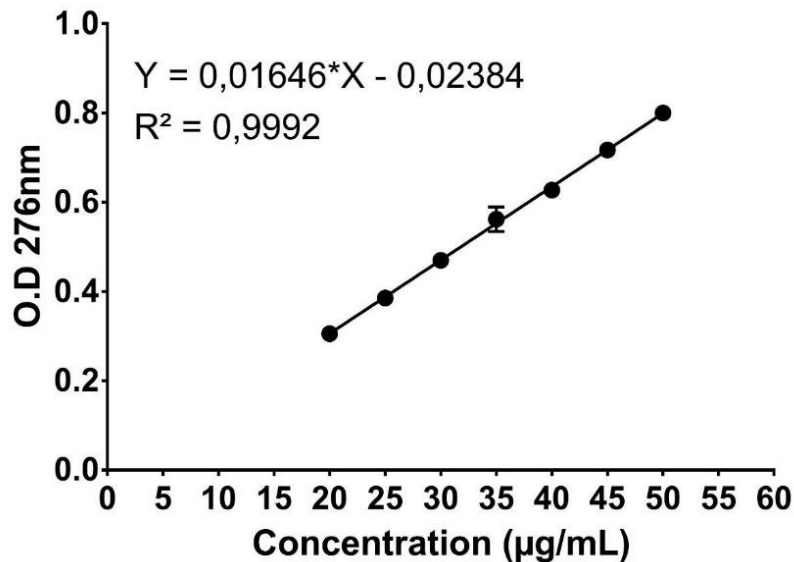
Figura 4: Aspecto visual da nanoemulsão descarregada (BNE) e nanoemulsão carregada com carvacrol (CVNE) após 90 dias de armazenamento a 4 ° C.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

A fim de obter uma maior confiabilidade dos resultados e demonstrar que o método é apropriado para a análise de teor do sistema emulsionado, foi avaliada a linearidade do método de doseamento por espectroscopia de Ultravioleta Visível como mostrado na **Figura 5**.

Figura 5: Curva de calibração do Carvacrol



Fonte: Dados da pesquisa (2021)

Na equação obtida o x representa a concentração em µg/mL e y o valor da absorvância. Foi obtido um coeficiente de determinação (R^2) acima de 0,99, o que significa que existe uma resposta linear na faixa de concentração trabalhada (BRASIL, 2003). Assim, o resultado encontrado demonstra que as curvas analíticas podem ser utilizadas para quantificar a amostra contendo CV, conferindo a validade do método de acordo com a linearidade.

Foi realizada a concentração do fármaco na CVNE de acordo com a equação 1 exposta anteriormente e obtido 5mg/ml, e para a taxa de eficiência de encapsulação foi realizada a partir da equação 2 e obtida um valor de 83,97%.

5.2 Avaliação do tamanho da gotícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta do CVNE

Os parâmetros do tamanho da gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta foram avaliados por 90 dias para CVNE e BNE, e são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros de estabilidade: diâmetro médio da gota, potencial zeta, índice de polidispersividade e pH da nanoemulsão com carvacrol (CVNE) e da nanoemulsão branca (BNE) ao longo de 90 dias.

Análise do dia	Diâmetro médio da gota (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)	Ph
	CVNE BNE	CVNE BNE	CVNE BNE	CVNE BNE
D1	165.70±0.46 123.67±1.24	0.14±0.03 0.18±0.02	-10.25±0.52 -13±0.66	5.60 5.62
D7	163.56±0.60 121.87±0.59*	0.14±0.03 0.18±0.01	NA	5.70 5.78
D20	166.56±1.22 128.27±0.50*	0.16±0.01 0.22±0.01	NA	5.94 5.97
D30	186.03±1.27* 128.23±0.68*	0.25±0.01 0.22±0.00	-10.83±0.42 -12.63±0.38	5.87 5.75
D60	164.43±0.81 127.73±0.06*	0.14±0.01 0.19±0.02	-14.60±0.44* -16.93±0.55*	5.85 5.90
D90	169.06±1.10* 124.47±0.45	0.14±0.00 0.18±0.01	-14.67±0.55* -17.8±0.00*	5.85 5.88

NA: não avaliado; *p < 0,05

O tamanho da gota de uma nanoemulsão resulta das condições de processamento empregadas, das interações dos componentes e da adsorção dos surfactantes com a fase oleosa (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015). A distribuição do tamanho de partícula da CVNE e BNE foi determinada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. A CVNE apresentou diâmetro médio de gota de 169nm após 90 dias de preparo, com pequena variação quando comparado ao tamanho médio de gota no dia 1 (166 nm), confirmando a boa estabilidade da nanoemulsão. No D30 é possível observar que houve uma mudança estatisticamente significativa, apesar disso, a formulação não apresentou nenhuma mudança macroscópica.

BNE mostra o diâmetro médio da gota próximo a 124 nm, que apesar das alterações estatisticamente significativas, não apresentou nenhuma mudança macroscopicamente. Comparando os tamanhos médios de gotículas de CVNE e BNE, observou-se um incremento no tamanho de gotículas de CVNE. A fase oleosa da CVNE consiste em uma mistura de CV e MCT. A interação do MCT e do CV na fase oleosa do CVNE pode ter contribuído para o aumento do tamanho das gotas em relação a BNE. Já foi relatado que o tamanho da gota de nanoemulsões carregadas com carvacrol pode variar de acordo com a proporção da razão CV/MCT na fase oleosa (RYU et al., 2018). A proporção de CV/MCT, surfactantes e parâmetros ultrassônicos foram responsáveis pelo tamanho do CVNE.

O índice de polidispersão (PDI) também foi utilizado para avaliar a estabilidade das nanoemulsões. Este termo “polidispersividade” é usado para descrever o grau de uniformidade

da distribuição do tamanho das gotas dentro de um sistema (DANAEI et al., 2018). Além disso, o PDI pode ser avaliado em relação ao tempo. Se forem observadas variações nos valores de PDI, isso pode sugerir uma indicação de desestabilização da formulação, como fenômenos de coalescência ou agregação de gotículas. O CVNE obteve o PDI no dia 1 de $0,14 \pm 0,03$, e ao final da avaliação no dia 90, não houve alteração estatística no resultado ($p < 0,05$). Nanoemulsões contendo gotículas relativamente pequenas (<200 nm) com valores de PDI $<0,3$ são consideradas populações monodispersas (AHMED et al., 2012; SINGH et al., 2017). Assim, a CVNE e a BNE foram consideradas monodispersas de acordo com os parâmetros descritos acima. Outro estudo de nanoemulsão CV contendo MCT apresentou resultados semelhantes (RYU et al., 2018).

Outro parâmetro de estabilidade importante a ser observado é o potencial zeta das nanoemulsões. No desenvolvimento das nanoemulsões neste estudo foram utilizados dois surfactantes não iônicos. Observou-se que CVNE e BNE apresentam valores ligeiramente negativos para o potencial zeta. Quanto mais positivo ou negativo for o potencial zeta, melhor é a estabilidade da nanoemulsão (SINGH et al., 2017). Esses valores podem ser atribuídos à presença de íons aniônicos (como OH^-) liberados pelos componentes do óleo e surfactantes (CHEN et al., 2013; HSU; NACU, 2003). Outro estudo de nanoemulsão do tipo O/A carregada com carvacrol contendo MCT e um surfactante não iônico (Tween 20) também mostrou valores de potencial zeta semelhantes, entre $-15,3 \pm 1,0$ mV e $-24,7 \pm 2,0$ mV, tais valores são justificados devido ao MCT ser composto por ácidos graxos livres e sais, e estar presente na interface do surfactante gerando uma troca contínua de moléculas entre o interior das gotículas, a fase contínua e a interface (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2015). Além dos valores de potencial zeta, o mesmo estudo apresenta valores de PDI semelhante a CVNE.

Os valores de pH apresentados variaram entre 5,62 e 5,85 para CVNE e 5,62 e 5,88 para BNE. O pH levemente ácido do CVNE pode ser postulado como não tendo grande relevância com relação a irritabilidade gástrica (GORAIN et al., 2014). Compreender a estabilidade da nanoemulsão ao longo do tempo é um parâmetro importante para viabilizar os estudos biológicos. Essa estabilidade do tamanho de gotícula do CVNE pode ser atribuída à seleção dos surfactantes, que apresentam um valor de HLB próximo ao HLB ideal da fase oleosa e à presença de triglicerídeo de cadeia média (MCT) (DAVIS et al., 2019; MCCLEMENTS, 2011; KOROLEVA; NAGOVITSINA; YURTOV, 2018). O MCT foi selecionado por ser um bom inibidor de amadurecimento de Ostwald e contribuir para a produção de nanoemulsões com

gotas de tamanho pequeno (RYU et al., 2019; CHANG; MCLANDBOROUGH; MCCLEMENTS, 2012).

5.3 Atividade de citotoxicidade

A citotoxicidade *in vitro* de CVNE, BNE e CV foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) usando o ensaio MTT.

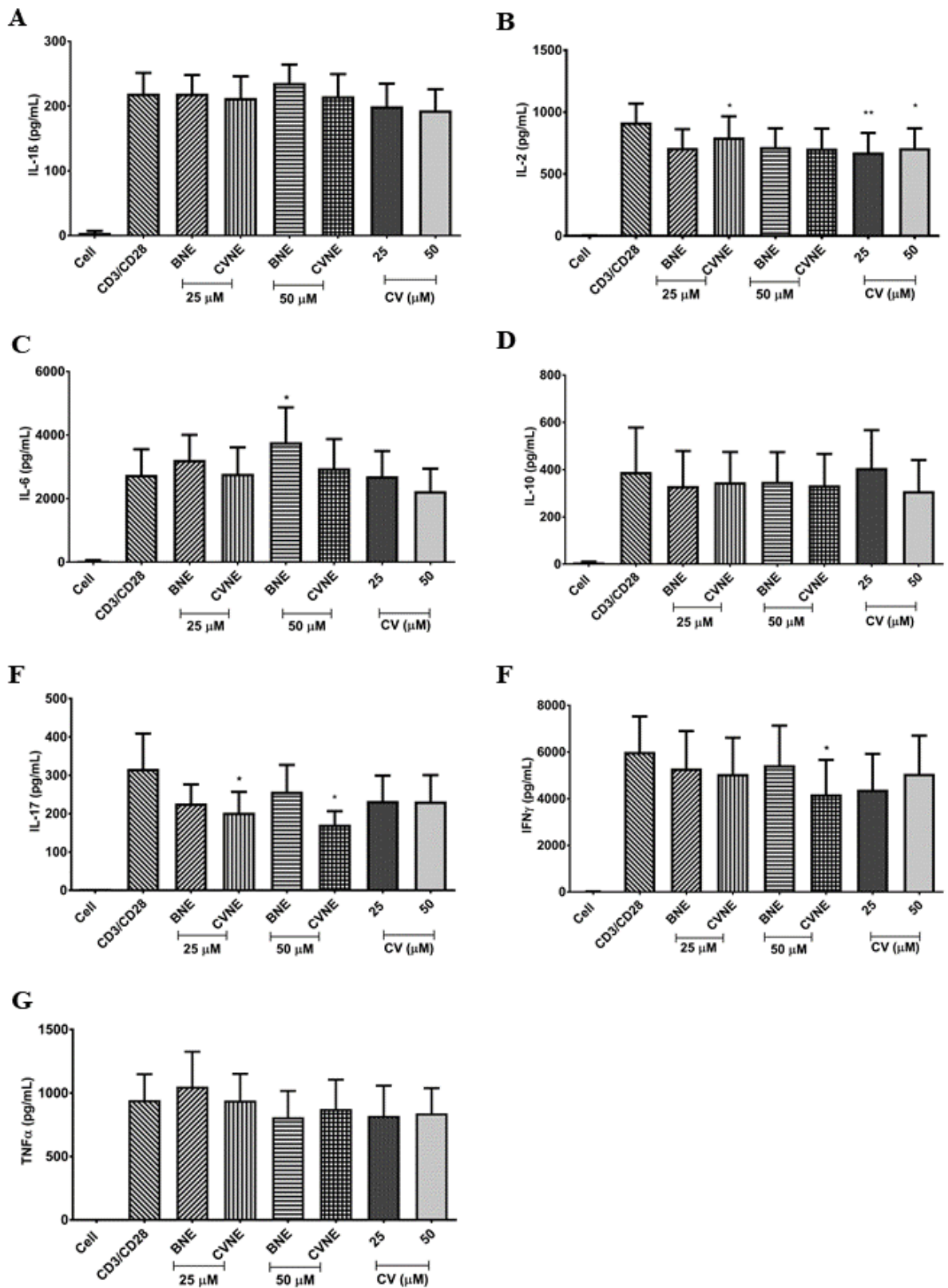
CVNE e BNE mostraram viabilidade celular média maior que 95% em todas as concentrações testadas (50 μ M, 100 μ M e 200 μ M). O CV mostrou uma viabilidade celular média superior a 99% na concentração de 50 μ M e superior a 90% nas concentrações de 100 e 200 μ M. Com base nestes resultados, as concentrações de 25 μ M e 50 μ M foram selecionadas para os ensaios de atividade imunomoduladora.

5.4 Avaliação de citocinas *in vitro*

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram usadas em nosso estudo para avaliar os níveis de citocinas *in vitro*. Estas células podem servir de modelo para a compreensão das expressões de citocinas (CALTON et al., 2015). PBMCs consistem em um grupo de células, incluindo linfócitos e monócitos/macrófagos, com um papel importante na resposta inflamatória (STEPIEN; NUGENT; BRENNAN, 2014). Assim, essas células podem ser utilizadas em modelos *in vitro* para quantificar citocinas envolvidas em processos inflamatórios (DE OLIVEIRA et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2019). Porém, é importante ressaltar que nossos resultados refletem principalmente as citocinas produzidas pelas células T, devido ao estímulo *in vitro* utilizado.

A citocina imunossupressora (IL-10), mediador inflamatório (IL-6) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-17, IFN- γ e TNF- α) foram quantificados em PBMCs de indivíduos saudáveis estimulados com anti-CD3 e anticorpos anti-CD28 (Figura 6).

Figura 6. Atividade imunomoduladora de CVNE, BNE e CV em células PBMC



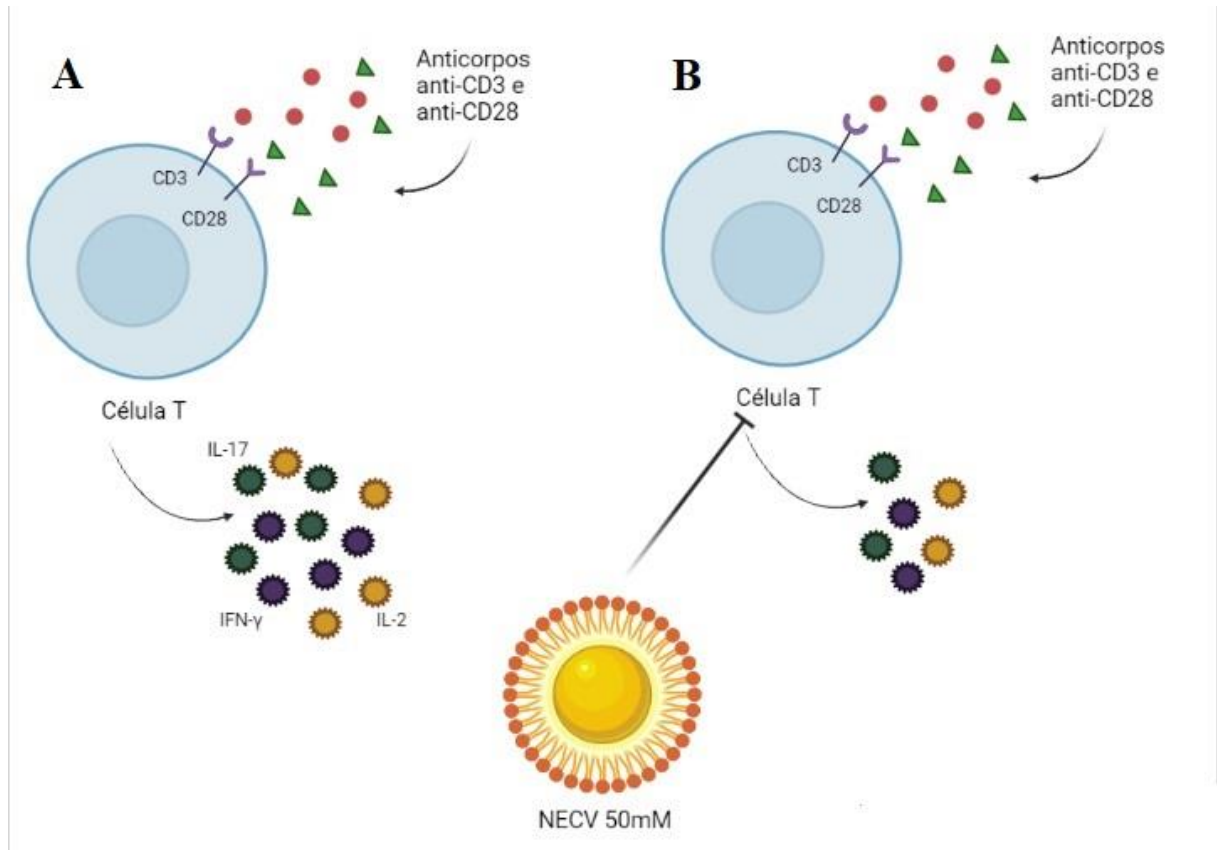
Fonte: dados da pesquisa. As barras representam os níveis de citocinas: IL-1 β (A); IL-2 (B); IL-6 (C); IL-10 (D); IL-17 (E); IFN- γ (F); e TNF- α (G) em duas concentrações diferentes (25 e 50 μ M). Não

estimulado (célula); e condições de células estimuladas (anticorpos anti-CD3 e anti-CD28). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Média \pm SEM, seguido pelo teste dos postos sinalizados de Wilcoxon).

O CV nas concentrações de 25 e 50 μ M reduziu os níveis de IL-2 ($p = 0,007$ e $p = 0,023$) no sobrenadante de cultura de PBMCs (Figura 6). Ensaio *in vivo* demonstraram que o CV reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-6 e IL-17 em modelos de encefalomielite autoimune e asma (MAHMOODI et al., 2019)(EZZ-ELDIN; ABOSEIF; KHALAF, 2020)(KHAZDAIR; BOSKABADY, 2019). Em um ensaio clínico realizado por Kianmehr e colaboradores (2016) foi demonstrado que o tratamento com CV por dois meses reduziu os níveis de citocinas inflamatórias IL-4, TGF- β e IL-17 (KIANMEHR; REZAEI; BOSKABADY, 2016). Outros trabalhos descrevem a atividade do CV, ou óleo essencial contendo CV, para diminuir citocinas pró-inflamatórias e biomarcadores inflamatórios (JALALI et al., 2013)(KARA et al., 2015)(HAN; PARKER, 2017)(ZOU et al., 2016)(PENSADO et al., 2014).

A CVNE na concentração de 25 μ M reduziu os níveis de IL-17 ($p = 0,015$) enquanto na concentração de 50 μ M reduziu os níveis de IL-2 ($p = 0,015$), IFN- γ ($p = 0,015$) e IL-17 ($p = 0,031$) (**Figura 7**).

Figura 7. Desenho esquemático da influência da nanoemulsão com carvacrol na inibição de citocinas pró-inflamatórias produzidas por células T estimuladas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28.



Fonte: dados do autor. A: liberação de citocinas pelas células T sem tratamento com CVNE. B: liberação de citocinas pelas células T com tratamento da CVNE na concentração de 50mM.

O aumento de citocinas que foram inibidas pela CVNE em relação ao CV pode ser atribuído ao tamanho da nanoemulsão. A IL-17 tem um papel importante na indução e manutenção da inflamação crônica, estimulando outras células a secretar mais citocinas e fatores de crescimento (JALALI et al., 2013). Além disso, a IL-17 e o IFN- γ têm papel fundamental no desenvolvimento e agravamento de doenças autoimunes (MAHMOODI et al., 2019). O IFN- γ contribui para o desencadeamento de macrófagos M1 e indução da síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (NOS) por células apresentadoras de antígenos (MAHMOODI et al., 2019). Esses achados podem oferecer bons resultados em testes *in vivo*. Algumas patologias inflamatórias apresentam níveis elevados dessas citocinas, como Esclerose Sistêmica, Esclerose Múltipla e Asma (DE ALMEIDA et al., 2019; MAHMOODI et al., 2019; JALALI et al., 2013).

A BNE foi formulada sem bioativos para analisar se os constituintes da formulação poderiam ser tóxicos ou interferir na produção de citocinas. Observou-se que o BNE não apresentou atividade citotóxica e não interferiu na produção de citocinas, exceto pelo aumento ($p = 0,039$) na expressão de IL-6. A fase oleosa da BNE era composta por MCT. O MCT pode ser misturado com outros óleos, pois não tem atividade biológica (DANTAS et al., 2021). Além disso, foram utilizados dois tensoativos não iônicos na fase aquosa, Span 80 e Tween 80. Esses tensoativos foram escolhidos devido à baixa toxicidade (PENSADO et al., 2014)(DAVIS et al., 2019). A diferença entre os valores obtidos pela BNE e CVNE são relevantes pois ~~Os resultados obtidos pelo BNE são significativos~~ ressaltam que a atividade inibitória obtida pela CVNE se deu devido às propriedades do CV.

A inflamação sistêmica pode ser caracterizada por altos níveis de biomarcadores inflamatórios na corrente sanguínea produzidos por PBMCs, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e outras citocinas (CALTON et al., 2015). Bioativos que apresentam redução na produção de citocinas pró-inflamatórias são bons candidatos a antiinflamatórios.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, observamos que foi possível formular uma nanoemulsão com carvacrol com estabilidade mínima de 90 dias, com taxa de eficiência de encapsulação de 84% . CVNE não apresentou atividade citotóxica nas concentrações avaliadas (até 200 μM) mostrando uma viabilidade celular média acima de 90%. Além disso, o CVNE melhorou a atividade biológica com relação ao CV, inibindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-17 e IFN- γ) em uma concentração de 50 μM e o nível de IL-2 na concentração de 25 μM , quantificadas no sobrenadante de cultura de PBMC. Dessa forma, pudemos obter um potencial imunomodulador do CV em sistema nanoemulsionado, e sugerimos que novos estudos sejam realizados, como os testes *in vivo* e testes de absorção oral, para melhor compreender o desempenho do CVNE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Shabbar; HAYAT, Khizar; KARANGWA, Eric; BASHARI, Mohanad; ZHANG, Xiaoming. An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. **Food Engineering Reviews**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 139–157, 2013. DOI: 10.1007/s12393-013-9066-3.
- ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, Rasedee; HEZMEE, M. N. M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation : A review. [S. l.], v. 11, p. 627–635, 2018. DOI: 10.14202/vetworld.2018.627-635.
- ABOALNAJA, Khaled Omer; YAGHMOOR, Soonham; KUMOSANI, Taha Abdullah; MCCLEMENTS, David Julian. Utilization of nanoemulsions to enhance bioactivity of pharmaceuticals, supplements, and nutraceuticals: Nanoemulsion delivery systems and nanoemulsion excipient systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1327–1336, 2016. DOI: 10.1517/17425247.2016.1162154.
- AGHASAFARI, Parya; GEORGE, Uduak; PIDAPARTI, Ramana. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflammation Research**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 59–74, 2019. DOI: 10.1007/s00011-018-1191-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-018-1191-2>.
- AHMED, Kashif; LI, Yan; MCCLEMENTS, David Julian; XIAO, Hang. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin : Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 132, n. 2, p. 799–807, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039>.
- AMATYA, Nilesh; GARG, Abhishek V.; GAFFEN, Sarah L. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 310–322, 2017. DOI: 10.1016/j.it.2017.01.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.01.006>.
- ANWIKAR, Shraddha; BHITRE, Milind. Study of the synergistic anti-inflammatory activity of Solanum xanthocarpum Schrad and Wendl and Cassia fistula Linn. **International Journal of Ayurveda Research**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 167, 2010. DOI: 10.4103/0974-7788.72489.
- ASADINEZHAD, Shabnam; KHODAIYAN, Faramarz; SALAMI, Maryam; HOSSEINI, Hedayat; GHANBARZADEH, Babak. Effect of different parameters on orange oil nanoemulsion particle size: combination of low energy and high energy methods. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 2501–2509, 2019. DOI: 10.1007/s11694-019-00170-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00170-z>.
- BANDO, Tomoyuki; FUJITA, Setsuko; NAGANO, Naoko; YOSHIKAWA, Soichiro. Differential usage of COX-1 and COX-2 in prostaglandin production by mast cells and basophils. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [S. l.], v. 10, n. December 2016, p. 82–87, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.03.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.004>.
- BEDKE, Tanja; MUSCATE, Franziska; SOUKOU, Shiwa; GAGLIANI, Nicola; HUBER, Samuel. Seminars in Immunology IL-10-producing T cells and their dual functions. **Seminars in Immunology**, [S. l.], v. 44, n. November, p. 101335, 2019. DOI:

10.1016/j.smim.2019.101335. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101335>.

BOSHTAM, Maryam; ASGARY, Seddigheh; KOUHPAYEH, Shirin; SHARIATI, Laleh; KHANAHMAD, Hossein. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. **Inflammation**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 340–349, 2017. DOI: 10.1007/s10753-016-0477-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-016-0477-1>.

CALTON, Emily K.; KEANE, Kevin N.; NEWSHOLME, Philip; SOARES, Mario J. The impact of Vitamin D levels on inflammatory status: A systematic review of immune cell studies. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1–12, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0141770.

CAÑEDO-DORANTES, Luis; CAÑEDO-AYALA, Mara. Skin acute wound healing: A comprehensive review. **International Journal of Inflammation**, [S. l.], v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/3706315.

CHAN, Amy H.; SCHRODER, Kate. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 217, n. 1, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1084/jem_20190314.

CHANG, Yuhua; MCLANDBOROUGH, Lynne; MCCLEMENTS, David Julian. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: Influence of ripening inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 48, p. 12056–12063, 2012. DOI: 10.1021/jf304045a.

CHEN, Jialun; GAO, Dongxiao; YANG, Letian; GAO, Yanxiang. Effect of micro fluidization process on the functional properties of insoluble dietary fiber. **FRIN**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 1821–1827, 2013. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.09.025.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.

DANTAS, A. G. B.; DE SOUZA, R. L.; DE ALMEIDA, A. R.; XAVIER JÚNIOR, F. H.; PITTA, M. G. da R.; RÊGO, M. J. B. de M.; OLIVEIRA, E. E. Development, characterization, and immunomodulatory evaluation of carvacrol-loaded nanoemulsion. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 13, 2021. DOI: 10.3390/molecules26133899.

DAVIDOV-PARDO, Gabriel; MCCLEMENTS, David Julian. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 167, p. 205–212, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.082. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.082>.

DAVIS, Kirsten; ROVER, Marjorie R.; SALVACHÚA, Davinia; SMITH, Ryan G.; BECKHAM, Gregg T.; WEN, Zhiyou; BROWN, Robert C.; JARBOE, Laura R. Promoting microbial utilization of phenolic substrates from bio-oil. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 46, n. 11, p. 1531–1545, 2019. DOI: 10.1007/s10295-019-02208-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02208-z>.

DE ALMEIDA, Anderson Rodrigues; DANTAS, Andréa Tavares; PEREIRA, Michelly Cristiny; CORDEIRO, Marina Ferraz; GONÇALVES, Rafaela Silva Guimarães; DE MELO RÊGO, Moacyr Jesus Barreto; DA ROCHA PITTA, Ivan; DUARTE, Angela Luzia Branco Pinto; DA ROCHA PITTA, Maira Galdino. Dexamethasone inhibits cytokine production in PBMC from systemic sclerosis patients. **Inflammopharmacology**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 723–730, 2019. DOI: 10.1007/s10787-019-00600-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00600-w>.

DE CARVALHO, Fernanda Oliveira et al. Anti-inflammatory and antioxidant activity of carvacrol in the respiratory system: A systematic review and meta-analysis. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 2214–2229, 2020. DOI: 10.1002/ptr.6688.

DE OLIVEIRA, Caio Marcio Barros; SAKATA, Rioko Kimiko; ISSY, Adriana Machado; GEROLA, Luis Roberto; SALOMÃO, Reynaldo. Cytokines and Pain. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011. DOI: 10.1016/s0034-7094(11)70029-0.

DE OLIVEIRA PEDROSA ROLIM, Michelle et al. Design, synthesis and pharmacological evaluation of CVIB, a codrug of carvacrol and ibuprofen as a novel anti-inflammatory agent. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 76, n. July, p. 105856, 2019. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105856. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105856>.

DONSÌ, Francesco; SESSA, Mariarenata; MEDIOUNI, Houda; MGAIDI, Arbi; FERRARI, Giovanna. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery systems. **Procedia Food Science**, [S. l.], v. 1, p. 1666–1671, 2011. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.246. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.246>.

DUMAY, Eliane; CHEVALIER-LUCIA, Dominique; PICART-PALMADE, Laëtitia; BENZARIA, Amal; GRÀCIA-JULIÀ, Alvar; BLAYO, Claire. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 13–26, 2013. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.03.005.

EZZ-ELDIN, Yousra M.; ABOSEIF, Ali A.; KHALAF, Marwa M. Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats. **Life Sciences**, [S. l.], v. 242, p. 117222, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117222. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117222>.

FABBRI, Julia; MAGGIORE, Marina A.; PENSEL, Patricia E.; DENEGRI, Guillermo M.; GENDE, Liesel B.; ELISSONDO, María C. In vitro and in vivo efficacy of carvacrol against *Echinococcus granulosus*. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 164, p. 272–279, 2016. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.09.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.001>.

FACHINI-QUEIROZ, Fernanda Carolina; KUMMER, Raquel; ESTEVÃO-SILVA, Camila Fernanda; CARVALHO, Maria Dalva De Barros; CUNHA, Joice Maria; GRESPAN, Renata; BERSANI-AMADO, Ciomar Aparecida; CUMAN, Roberto Kenji Nakamura. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/657026.

GELFO, Valerio et al. A novel role for the interleukin-1 receptor axis in resistance to anti-

EGFR therapy. **Cancers**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 1–16, 2018. DOI: 10.3390/cancers10100355. GHOLIJANI, Nasser; AMIRGHOFAN, Zahra. Effects of thymol and carvacrol on T-helper cell subset cytokines and their main transcription factors in ovalbumin-immunized mice.

Journal of Immunotoxicology, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 729–737, 2016. DOI: 10.3109/1547691X.2016.1173134.

GORAIN, Bapi; CHOUDHURY, Hira; KUNDU, Amit; SARKAR, Lipi; KARMAKAR, Sanmoy; JAISANKAR, P.; PAL, Tapan Kumar. Nanoemulsion strategy for olmesartan medoxomil improves oral absorption and extended antihypertensive activity in hypertensive rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 115, p. 286–294, 2014. DOI:

10.1016/j.colsurfb.2013.12.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.016>.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 245–251, 2008. DOI: 10.1016/j.cocis.2008.01.005.

HAN, Xuesheng; PARKER, Tory L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. **Biochimie Open**, [S. l.], v. 4, p. 73–77, 2017. DOI:

10.1016/j.biopen.2017.02.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopen.2017.02.005>.

HONG, Jeong Yeon; LIM, Kyung T. Effect of Preemptive Epidural Analgesia on Cytokine Response and Postoperative Pain in Laparoscopic Radical Hysterectomy for Cervical Cancer. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 44–51, 2008. DOI:

10.1016/j.rapm.2007.07.010.

HSU, Jyh Ping; NACU, Anca. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 259, n. 2, p. 374–381, 2003. DOI: 10.1016/S0021-9797(02)00207-2.

JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. **Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. v. 81 DOI:

10.1016/bs.afnr.2016.12.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.008>.

JALALI, Sediqeh; BOSKABADY, Mohammad Hossein; HAERI-ROHANI, Ali; EIDI, Akram. The effect of carvacrol on serum cytokines and endothelin levels of ovalbumin sensitized guinea-pigs. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 607–611, 2013. DOI: 10.22038/ijbms.2013.720.

KACHUR, Karina; SUNTRES, Zacharias. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 60, n. 18, p. 3042–3053, 2020. DOI: 10.1080/10408398.2019.1675585. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>.

KANY, Shinwan; VOLLRATH, Jan Tilmann; RELJA, Borna. Cytokines in inflammatory disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 23, p. 1–31, 2019. DOI: 10.3390/ijms20236008.

KARA, Mehmet; USLU, Sema; DEMIRCI, Fatih; TEMEL, Halide Edip; BAYDEMIR, Canan. Supplemental Carvacrol Can Reduce the Severity of Inflammation by Influencing the Production of Mediators of Inflammation. **Inflammation**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 1020–1027, 2015. DOI: 10.1007/s10753-014-0066-0.

KARKABOUNAS, S. et al. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. **Experimental Oncology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 121–125, 2006.

KASTURI, Jahnavi; PALLA, Pavani Reddy; BAKSHI, Vasudha; BOGGULA, Narender. Journal of Drug Delivery and Therapeutics Non-steroidal anti-inflammatory drugs : an overview. [S. l.], v. 9, p. 442–448, 2019.

KATO, Masato; SUZUKI, Hitoshi; MURAKAMI, Mamoru; AKAMA, Mitsuhiko; MATSUKAWA, Shuh; HASHIMOTO, Yasuhiko. Elevated plasma levels of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor during and after major abdominal surgery. **Journal of Clinical Anesthesia**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 293–298, 1997. DOI: 10.1016/S0952-8180(97)00006-8.

KELLY, Aoife; HOUSTON, Stephanie A.; SHERWOOD, Eleanor; CASULLI, Joshua; TRAVIS, Mark A. Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF β . **Advances in Immunology**, [S. l.], v. 134, p. 137–233, 2017. DOI: 10.1016/bs.ai.2017.01.001.

KHAZDAIR, Mohammad Reza; BOSKABADY, Mohammad Hossein. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial on the effect of carvacrol on serum cytokine levels and pulmonary function tests in sulfur mustard induced lung injury. **Cytokine**, [S. l.], v. 113, n. April, p. 311–318, 2019. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.07.031. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.07.031>.

KIANMEHR, Majid; REZAEI, Abdolrahim; BOSKABADY, Mohammad Hossein. Effect of carvacrol on various cytokines genes expression in splenocytes of asthmatic mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 402–410, 2016. DOI: 10.22038/ijbms.2016.6812.

KOMAIKO, Jennifer; SASTROSUBROTO, Ashtri; MCCLEMENTS, David Julian. Formation of Oil-in-Water Emulsions from Natural Emulsifiers Using Spontaneous Emulsification: Sunflower Phospholipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 45, p. 10078–10088, 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03824.

KOROLEVA, M.; NAGOVITSINA, T.; YURTOV, E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: Stability and degradation mechanisms. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S. l.], v. 20, n. 15, p. 10369–10377, 2018. DOI: 10.1039/c7cp07626f.

KOTTA, Sabna; KHAN, Abdul Wadood; PRAMOD, Kannissery; ANSARI, Shahid H.; SHARMA, Rakesh Kumar; ALI, Javed. Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 585–598, 2012. DOI: 10.1517/17425247.2012.668523.

KUMAR, Manish; BISHNOI, Ram Singh; SHUKLA, Ajay Kumar; JAIN, Chandra Prakash. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. **Preventive Nutrition and Food Science**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019. DOI:

10.3746/pnf.2019.24.3.225.

LANDA, Premysl; KOKOSKA, Ladislav; PRIBYLOVA, Marie; VANEK, Tomas; MARSIK, Petr. In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 75–78, 2009. DOI: 10.1007/s12272-009-1120-6.

LAOTHAWEEERUNGSAWAT, Natnaree; NEIMKHUM, Waranya; ANUCHAPREEDA, Songyot; SIRITHUNYALUG, Jakkapan; CHAIYANA, Wantida. Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 579, p. 119052, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119052.

LI, Zhenlan; HUA, Cong; PAN, Xiaoqiang; FU, Xijia; WU, Wei. Carvacrol Exerts Neuroprotective Effects Via Suppression of the Inflammatory Response in Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. **Inflammation**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 1566–1572, 2016. DOI: 10.1007/s10753-016-0392-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-016-0392-5>.

LIMA, Milena Da Silva; QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo J.; DE SANTANA, Wagno Alcântara; MARTINS KANETO, Carla; PEREIRA SOARES, Milena Botelho; VILLARREAL, Cristiane Flora. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 699, n. 1–3, p. 112–117, 2013. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.040.

LIN, Edward; CALVANO, Steve E.; LOWRY, Stephen F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, [S. l.], v. 127, n. 2, p. 117–126, 2000. DOI: 10.1067/msy.2000.101584.

MAHMOODI, Merat; AMIRI, Houshang; AYOobi, Fatemeh; RAHMANI, Mehdi; TAGHIPOUR, Zahra; GHAVAMABADI, Raziéh Taghizadeh; JAFARZADEH, Abdollah; SANKIAN, Mojtaba. Carvacrol ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through modulating pro- and anti-inflammatory cytokines. **Life Sciences**, [S. l.], v. 219, p. 257–263, 2019. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.11.051. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.051>.

MARAVAJHALA, Vidyavathi; BANDLAPALLI, Sandya Papishetty and Sarika. Maravajhala et al. ., [S. l.], v. 3, n. 1, p. 84–96, 2012.

MARZANO, Angelo V.; ORTEGA-LOAYZA, Alex G.; HEATH, Michael; MORSE, Daniel; GENOVESE, Giovanni; CUGNO, Massimo. Mechanisms of inflammation in neutrophil-mediated skin diseases. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. MAY, p. 1–8, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01059.

MCCLEMENTS, David Julian. Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 2011. DOI: 10.1039/c0sm00549e. MCCLEMENTS, David Julian. Nanoscale Nutrient Delivery Systems for Food Applications: Improving Bioactive Dispersibility, Stability, and Bioavailability. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 80, n. 7, p. N1602–N1611, 2015. DOI: 10.1111/1750-3841.12919.

MCCLEMENTS, David Julian; JAFARI, Seid Mahdi. **General Aspects of Nanoemulsions**

and Their Formulation. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1>.

MCCLEMENTS, David Julian; RAO, Jiajia. Food-Grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, Biological fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011. DOI: 10.1080/10408398.2011.559558.

MELO, Francisca Helvira Cavalcante; MOURA, Brinell Arcanjo; DE SOUSA, Damião Pergentino; DE VASCONCELOS, Silvânia Maria Mendes; MACEDO, Danielle Silveira; FONTELES, Marta Maria de França; VIANA, Glauce Socorro de Barros; DE SOUSA, Francisca Cléa Florenço. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: Involvement of dopaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 362–367, 2011. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2010.00850.x.

MEMAR, Mohammad Y.; RAEI, Parisa; ALIZADEH, Naser; AGHDAM, Masoud Akbari; KAFIL, Hossein Samadi. Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 63–68, 2017. DOI: 10.1097/MRM.000000000000100.

MONTGOMERY, Sara L.; BOWERS, William J. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 42–59, 2012. DOI: 10.1007/s11481-011-9287-2.

NAGHDI BADI, H.; ABDOLLAHI, M.; MEHRAFARIN, A.; GHORBANPOUR, M.; TOLYAT, M.; QADERI, A.; GHIACI YEKTA, M. An overview on two valuable natural and bioactive compounds, thymol and carvacrol, in medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants**, [S. l.], v. 16, n. 63, p. 1–32, 2017.

NASROLLAHZADEH, Mahmoud; SAJADI, S. Mohammad; SAJJADI, Mohaddeseh. **An Introduction to Nanotechnology**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Ltd., 2019. v. 28 DOI: 10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8>.

OUYANG, Wenjun; O’GARRA, Anne. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>.

PAN, Wenliang; TSOKOS, Maria G.; TSOKOS, George C. PPP2R2D suppresses interleukin-2 production and regulatory T cell function Find the latest version : [S. l.], 2020.

PATHAK, Kamla; PATTNAIK, Satyanarayan; SWAIN, Kalpana. **Application of Nanoemulsions in Drug Delivery**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-811838-2.00013-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00013-8>.

PENSADO, A.; FERNANDEZ-PIÑEIRO, I.; SEIJO, B.; SANCHEZ, A. Anionic

nanoparticles based on Span 80 as low-cost, simple and efficient non-viral gene-transfection systems. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 476, n. 1, p. 23–30, 2014. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.032. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.032>.

PESTKA, Sidney; KRAUSE, Christopher D.; WALTER, Mark R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 202, p. 8–32, 2004. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x.

RODNEY, Tamar; OSIER, Nicole; GILL, Jessica. Pro- and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: A review. **Cytokine**, [S. l.], v. 110, n. October 2017, p. 248–256, 2018. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.01.012.

ROSE-JOHN, Stefan. Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. **International Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 1237–1247, 2012. DOI: 10.7150/ijbs.4989.

ROSS, Sarah H.; CANTRELL, Doreen A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. [S. l.], p. 411–433, 2018.

RYU, Victor; CORRADINI, Maria G.; MCCLEMENTS, David J.; MCLANDBOROUGH, Lynne. Impact of ripening inhibitors on molecular transport of antimicrobial components from essential oil nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 556, p. 568–576, 2019. DOI: 10.1016/j.jcis.2019.08.059.

RYU, Victor; MCCLEMENTS, David J.; CORRADINI, Maria G.; YANG, Jason Szuhao; MCLANDBOROUGH, Lynne. Natural antimicrobial delivery systems: Formulation, antimicrobial activity, and mechanism of action of quillaja saponin-stabilized carvacrol nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 82, p. 442–450, 2018. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.04.017.

SABJAN, Khaleel Basha; MUNAWAR, Syed Muzammil; RAJENDIRAN, Dhandayuthabani; VINOJI, Sugantha Kumari; KASINATHAN, Kaviyarasu. Nanoemulsion as Oral Drug Delivery - A Review. **Current Drug Research Reviews**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 4–15, 2019. DOI: 10.2174/2589977511666191024173508.

SALVIA-TRUJILLO, Laura; ROJAS-GRAÜ, Alejandra; SOLIVA-FORTUNY, Robert; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 43, p. 547–556, 2015. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.07.012.

SANTOS, Emerson H.; KAMIMURA, Juliane A.; HILL, Laura E.; GOMES, Carmen L. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 583–592, 2015. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.08.046. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.046>.

SCHAPER, Fred; ROSE-JOHN, Stefan. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 475–487, 2015. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.004. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.004>.

SCHÖN, Michael P.; ERPENBECK, Luise. The interleukin-23 / interleukin-17 Axis Links Adaptive and innate immunity in Psoriasis. *[S. l.]*, v. 9, n. June, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01323.

SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W. E. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *[S. l.]*, v. 90, n. 21, p. 10188–10192, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.21.10188.

SHARIFI-RAD, Mehdi et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, *[S. l.]*, v. 32, n. 9, p. 1675–1687, 2018. DOI: 10.1002/ptr.6103.

SILVA, Hélder D.; CERQUEIRA, Miguel A.; VICENTE, António A. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. **Journal of Food Engineering**, *[S. l.]*, v. 167, p. 89–98, 2015. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2015.07.037.

SILVESTRE, J.; SILVESTRE, N.; DE BRITO, J. Review on concrete nanotechnology. **European Journal of Environmental and Civil Engineering**, *[S. l.]*, v. 20, n. 4, p. 455–485, 2016. DOI: 10.1080/19648189.2015.1042070.

SINGH, Yuvraj; MEHER, Jaya Gopal; RAVAL, Kavita; KHAN, Farooq Ali; CHAURASIA, Mohini; JAIN, Nitin K.; CHOURASIA, Manish K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, *[S. l.]*, v. 252, p. 28–49, 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.

STEPIEN, Magdalena; NUGENT, Anne; BRENNAN, Lorraine. Metabolic Profiling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Influence of Vitamin D Status and Gender. **Metabolites**, *[S. l.]*, v. 4, n. 2, p. 248–259, 2014. DOI: 10.3390/metabo4020248.

SU, Linlin; ZHENG, Jianping; WANG, Yang; ZHANG, Wei; HU, D. Emerging progress on the mechanism and technology in wound repair. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, *[S. l.]*, v. 117, n. March, p. 109191, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109191. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109191>.

SUNTRES, Zacharias E.; COCCIMIGLIO, John; ALIPOUR, Misagh. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, *[S. l.]*, v. 55, n. 3, p. 304–318, 2015. DOI: 10.1080/10408398.2011.653458.

TAM, Schuman; HUEY, Bing; LI, Ying; MING, Ge; HUNT, C. Anthony; GAROVOY, Marvin R. 1-S2.0-0966327494900043-Main.Pdf. *[S. l.]*, p. 285–292, 1994.

TANG, Xiaoqian; GUO, Ming; DU, Yang; XING, Jing; SHENG, Xiuzhen; ZHAN, Wenbin. Fish and Shellfish Immunology Interleukin-2 (IL-2) in fl ounder (Paralichthys olivaceus): Molecular cloning , characterization and bioactivity analysis. **Fish and Shellfish Immunology**, *[S. l.]*, v. 93, n. May, p. 55–65, 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.07.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.023>.

VELDHOEN, Marc. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 612–621, 2017. DOI: 10.1038/ni.3742.

WAGNER, Hildebert; WIERER, Michael; BAUER, Rudolf. In vitro -Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese durch etherische Öle und phenolische Verbindungen . **Planta Medica**, [S. l.], v. 52, n. 03, p. 184–187, 1986. DOI: 10.1055/s-2007-969117.

WANG, Xiaoting; WONG, Kit; OUYANG, Wenjun; RUTZ, Sascha. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 1–30, 2019. DOI: 10.1101/cshperspect.a028548.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, María L.; GONZÁLEZ-REZA, Ricardo; MENDOZA-MUÑOZ, Néstor; MIRANDA-LINARES, Verónica; BERNAL-COUOH, Tania F.; MENDOZA-ELVIRA, Susana; QUINTANAR-GUERRERO, David. Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 3, 2018. DOI: 10.3390/ijms19030705.

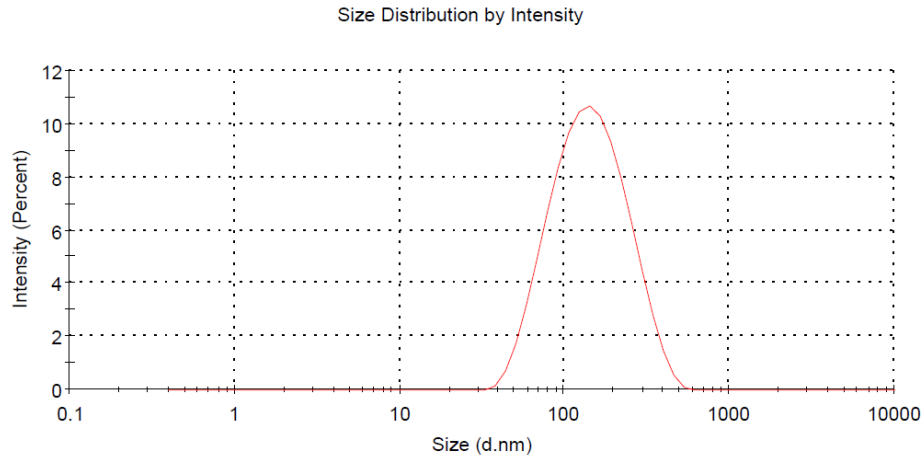
ZHU, W.; BARTOS, P. J. M.; PORRO, A. Application of nanotechnology in construction Summary of a state-of-the-art report. **Materials and Structures/Materiaux et Constructions**, [S. l.], v. 37, n. 273, p. 649–658, 2004. DOI: 10.1617/14234.

ZINDEL, Joel; KUBES, Paul. DAMPs , PAMPs , and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S. l.], 2020.

ZOU, Yi; XIANG, Quanhang; WANG, Jun; PENG, Jian; WEI, Hongkui. Oregano Essential Oil Improves Intestinal Morphology and Expression of Tight Junction Proteins Associated with Modulation of Selected Intestinal Bacteria and Immune Status in a Pig Model. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/5436738.

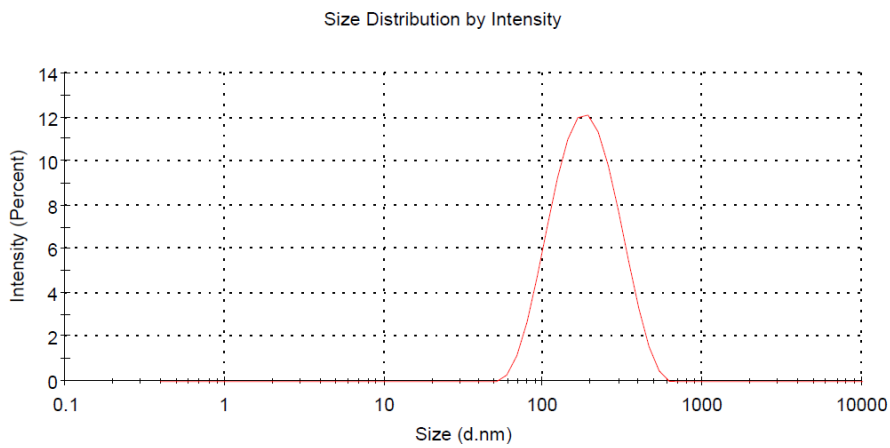
APÊNDICE A

Figura: Distribuição de tamanho por intensidade de nanoemulsão sem carga (BNE) no D1.



Fonte: dados da pesquisa (2020)

Figura: Distribuição de tamanho por intensidade de nanoemulsão carregada com carvacrol (CVNE) em D1.



Fonte: dados da pesquisa (2020)

APÊNDICE B



Article

Development, Characterization, and Immunomodulatory Evaluation of Carvacrol-loaded Nanoemulsion

Amanda Gabrielle Barros Dantas ¹, Rafael Limongi de Souza ¹, Anderson Rodrigues de Almeida ², Francisco Humberto Xavier Júnior ³, Maira Galdino da Rocha Pitta ², Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo ² and Elquio Eleamen Oliveira ^{1,*}

¹ Laboratory of Synthesis and Drug Delivery, State University of Paraíba, João Pessoa 58071-160, PB, Brazil; amandagabrielle6@gmail.com (A.G.B.D.); limongi.rafael@gmail.com (R.L.d.S.)

² Laboratory of Immunomodulation and Novel Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil; andersonr.almeida@hotmail.com (A.R.d.A.); mgrpitta@gmail.com (M.G.d.R.P.); moacyr.rego@ufpe.br (M.J.B.d.M.R.)

³ Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; ffxjunior@yahoo.com.br

* Correspondence: elquioeleamen@yahoo.com.br; Tel.: +55-(83)-3223-1128

Citation: Dantas, A.G.B.; Souza, R.L.; Almeida, A.R.; Xavier Júnior, F.H.; Pitta, M.G.R.; Rêgo, M.J.B.M.; Oliveira, E.E. Development, Characterization, and Immunomodulatory Evaluation of Carvacrol-loaded Nanoemulsion. *Molecules* **2021**, *26*, 3899. <https://doi.org/10.3390/molecules26133899>

Academic Editor: Laura De Martino and Francesca Mancianti

Abstract: Carvacrol (CV) is an essential oil with numerous therapeutic properties, including immunomodulatory activity. However, this effect has not been studied in nanoemulsion systems. The objective of this study was to develop an innovative carvacrol-loaded nanoemulsion (CVNE) for immunomodulatory action. The developed CVNE comprised of 5% *w/w* oily phase (medium chain triglycerides + CV), 2% *w/w* surfactants (Tween 80®/Span 80®), and 93% *w/w* water, and was produced by ultrasonication. Dynamic light scattering over 90 days was used to characterize CVNE. Cytotoxic activity and quantification of cytokines were evaluated in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) culture supernatants. CVNE achieved a drug loading of 4.29 mg/mL, droplet size of 165.70 ± 0.46 nm, polydispersity index of 0.14 ± 0.03 , zeta potential of -10.25 ± 0.52 mV, and good stability for 90 days. CVNE showed no cytotoxicity at concentrations up to 200 μ M in PBMCs. CV diminished the production of IL-2 in the PBMC supernatant. However, CVNE reduced the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-2, IL-17, and IFN- γ at 50 μ M. In conclusion, a stable CVNE was produced, which improved the CV immunomodulatory activity in PBMCs.

Keywords: carvacrol; cytokine; immunoregulation; nanoemulsion.