



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



BISMARQUES AUGUSTO OLIVEIRA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DA NANOEMULSÃO
CONTENDO β -MIRCENO PARA O TRATAMENTO DE
PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS**

BISMARQUES AUGUSTO OLIVEIRA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DA NANOEMULSÃO
CONTENDO β -MIRCENO PARA O TRATAMENTO DE
PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Silva

Feira de Santana-BA
2025

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

S578i Silva, Bismarques Augusto Oliveira da
Investigação farmacológica da nanoemulsão contendo B-Mirceno para o tratamento de problemas respiratórios / Bismarques Augusto Oliveira da Silva. – 2025.
111 f.: il.

Orientador: Fabricio Souza Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

1. Monoterpenos. 2. Mirceno. 3. Asma. 4. Expectoração.
5. Nanotecnologia. I. Título. II. Silva, Fabricio Souza, orient.
III. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU 615.234

Renata Aline Souza Silva - Bibliotecária - CRB-5/1702

BISMARQUES AUGUSTO OLIVEIRA DA SILVA

“Investigação Farmacológica da Nanoemulsão contendo β -Mirceno para o tratamento problemas respiratórios”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 6 de maio de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **FABRICIO SOUZA SILVA**
Data: 06/05/2025 18:22:59-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. **Fabício Souza Silva**
UNIVASF

Documento assinado digitalmente
 **DIEGO BARBOSA DE QUEIROZ**
Data: 07/05/2025 09:14:29-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Diego Barbosa de Queiroz**
UPE

Documento assinado digitalmente
 **JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA ALMEIDA**
Data: 07/05/2025 08:07:02-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida**
UNIVASF

Documento assinado digitalmente
 **EDRIAN MANIA**
Data: 07/05/2025 21:39:13-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Edrian Mania**
UEFS

Documento assinado digitalmente
 **DANIELLE FIGUEREDO DA SILVA**
Data: 07/05/2025 15:21:49-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Danielle Figuerêdo da Silva**
UEFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas estudantes e professores do Laboratório de Farmacologia Experimental da UNIVASF - LAFEX, ao Programa de Pós-graduação da UEFS, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e a todas as pessoas que contribuíram com a realização deste trabalho. Este trabalho existe por causa da contribuição de todos vocês! O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Mas é preciso ter manha. É preciso ter graça. É preciso ter sonho sempre. Quem traz na pele essa marca, possui a estranha mania, de ter fé na vida.”

(Milton Nascimento)

RESUMO

O β -mirceno é um monoterpeno com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antinociceptivas. Este trabalho teve como objetivos: desenvolver uma nanoemulsão contendo mirceno (NEMC); avaliar a toxicidade aguda da nanoemulsão e investigar os efeitos espasmolítico, antitussígeno, antiasmático e atividade expectorante do mirceno ou da nanoemulsão contendo mirceno. A NEMC foi formulada a partir do método de emulsificação espontânea, pela adição da fase aquosa, consistindo em solução tampão fosfato a uma fase orgânica, formada por óleo triglicerídeo de cadeia média, mirceno, agentes tensoativos em diferentes proporções, sob agitação constante e temperatura ambiente. O tamanho e o índice de polidispersão foram determinados. Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF), registrado com o N° 0002/270121. A avaliação da toxicidade aguda pré-clínica foi realizada de acordo com o guia da OECD. Cada animal recebeu uma única dose de 2.000 mg/kg de NEMC por via oral, sendo observados nos primeiros 30, 60, 120, 180 e 360 min e a cada 24 h durante 14 dias. Para avaliação do comportamento motor e verificação do relaxamento muscular dos camundongos foram realizados os testes de campo aberto e rotarod. A avaliação da atividade espasmolítica em músculo liso de traqueia isolada de ratos foi realizada em banho de órgãos sob contrações induzidas por carbacol ou KCl. A atividade antitussígena foi avaliada pelo método de indução da tosse pelo ácido cítrico. A atividade antitussígena do mirceno administrado por via inalatória também foi avaliada. A avaliação da atividade expectorante foi realizada por meio do modelo de quantificação do vermelho de fenol. A atividade antiasmática foi avaliada pelo método de asma induzida por OVA. NEMC apresentou tamanho de $97,37 \pm 5,844$ nm e IPd de $0,2387 \pm 0,01810$. Testes de toxicidade aguda (2000 mg/kg, via oral) não apresentaram mortalidade nem alterações significativas em parâmetros fisiológicos. Em modelos experimentais, o β -mirceno (75 mg/kg) não afetou a coordenação motora (testes de campo aberto e rota-rod) e induziu relaxamento modesto ($10,41 \pm 5,11\%$ sob contração por carbacol; $19,48 \pm 5,12\%$ por KCl) em traqueia isolada de rato. Na forma nanoemulsionada, a NEMC (75 mg/kg) reduziu significativamente a frequência de tosse induzida por ácido cítrico ($55,62 \pm 16,48\%$ vs. $121,2 \pm 9,41\%$ do controle; $p < 0,05$), com mecanismo envolvendo vias GABAérgicas, opioides e canais de potássio. Ambas as formulações demonstraram atividade expectorante, aumentando a secreção de vermelho de fenol no lavado broncoalveolar (NEMC: $3,38 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$ vs. $1,93 \pm 0,11$ $\mu\text{g/mL}$ da salina). No modelo de asma por ovalbumina, a NEMC reduziu significativamente a migração de células inflamatórias, confirmando efeito antiasmático. Os resultados evidenciam que a nanoemulsão preserva as propriedades farmacológicas do β -mirceno, com vantagens na biodisponibilidade. Ambas as formulações exibiram efeitos antitussígenos, expectorantes e anti-inflamatórios, destacando seu potencial terapêutico para doenças respiratórias, particularmente asma e condições associadas. O estudo revela a nanoemulsão como estratégia promissora para veiculação de compostos lipofílicos.

Palavras-chave: monoterpeno; mirceno; tosse; expectoração; asma; nanotecnologia.

ABSTRACT

β -Myrcene is a monoterpene possessing anti-inflammatory, antioxidant, and antinociceptive properties. This study aimed to develop a myrcene-containing nanoemulsion (NEMC), evaluate its acute toxicity, and investigate the spasmolytic, antitussive, antiasthmatic, and expectorant effects of myrcene or the myrcene-containing nanoemulsion. NEMC was formulated using the spontaneous emulsification method. This involved adding an aqueous phase, consisting of a phosphate buffer solution, to an organic phase. The organic phase was composed of medium-chain triglyceride oil, myrcene, and surfactants in varying proportions, under constant stirring and at room temperature. The size and polydispersity index of the nanoemulsion were determined. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF), registered under No. 0002/270121. Preclinical acute toxicity was evaluated according to OECD guidelines. Each animal received a single oral dose of 2,000 mg/kg of NEMC and was observed at 30, 60, 120, 180, and 360 minutes, and every 24 hours for 14 days. Motor behavior and muscle relaxation in mice were assessed using open-field and rotarod tests. The spasmolytic activity on isolated rat tracheal smooth muscle was evaluated in an organ bath under carbachol or KCl-induced contractions. Antitussive activity was assessed using the citric acid-induced cough method. The antitussive activity of inhaled myrcene was also investigated. Expectorant activity was determined by quantifying phenol red. Antiasthmatic activity was evaluated using an ovalbumin (OVA)-induced asthma model. NEMC exhibited a size of 97.37 ± 5.844 nm and a polydispersity index (PDI) of 0.2387 ± 0.01810 . Acute toxicity tests (2000 mg/kg, oral administration) showed no mortality or significant changes in physiological parameters. In experimental models, β -myrcene (75 mg/kg) did not affect motor coordination (open-field and rotarod tests) and induced modest relaxation ($10.41 \pm 5.11\%$ under carbachol contraction; $19.48 \pm 5.12\%$ under KCl contraction) in isolated rat trachea. In its nanoemulsified form, NEMC (75 mg/kg) significantly reduced citric acid-induced cough frequency ($55.62 \pm 16.48\%$ vs. $121.2 \pm 9.41\%$ of control; $p < 0.05$), with a mechanism involving GABAergic and opioid pathways, and potassium channels. Both formulations demonstrated expectorant activity, increasing phenol red secretion in bronchoalveolar lavage (NEMC: 3.38 ± 0.29 $\mu\text{g/mL}$ vs. 1.93 ± 0.11 $\mu\text{g/mL}$ for saline). In the ovalbumin-induced asthma model, NEMC significantly reduced the migration of inflammatory cells, confirming its antiasthmatic effect. These results indicate that the nanoemulsion preserves the pharmacological properties of β -myrcene, offering advantages in terms of bioavailability. Both formulations exhibited antitussive, expectorant, and anti-inflammatory effects, highlighting their therapeutic potential for respiratory diseases, particularly asthma and associated conditions. The study reveals the nanoemulsion as a promising strategy for delivering lipophilic compounds.

Keywords: monoterpene; myrcene; cough; expectoration; asthma; nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do mirceno.	37
Figura 2 - Preparação das formulações nanoemulsionadas.	39
Figura 3 - Preparação do experimento de atividade espasmolítica.	42
Figura 4 - Protocolo do modelo de tosse em camundongos.	43
Figura 5 - Protocolo de atividade expectorante em camundongos.	46
Figura 6 - Protocolo do modelo de asma em camundongos.	48
Figura 7 - Tamanho e índice de polidispersão das gotículas.	51
Figura 8 - Efeito da administração oral do mirceno 75 mg/kg na coordenação motora de camundongos.	53
Figura 9 - Efeito da administração oral da nanoemulsão contendo mirceno 75 mg/kg na coordenação motora de camundongos.	54
Figura 10 - Efeito da administração oral do mirceno 75 mg/kg no comportamento de camundongos.	55
Figura 11 - Efeito da administração oral da nanoemulsão contendo mirceno 75 mg/kg no comportamento de camundongos.	56
Figura 12 - Atividade espasmolítica do mirceno em músculo liso de traqueia isolada de rato.	57
Figura 13 - Atividade espasmolítica da nanoemulsão contendo mirceno em músculo liso de traqueia isolada de rato.	58
Figura 14 - Efeito antitussígeno do mirceno em camundongos.	59
Figura 15 - Latência do tempo para tosse em camundongos.	60
Figura 16 - Efeito antitussígeno da nanoemulsão contendo mirceno em camundongos.	61
Figura 17 - Latência do tempo para tosse em camundongos tratados com nanoemulsão contendo mirceno.	61
Figura 18 - Efeito da naloxona no efeito antitussígeno do mirceno administrado por via oral em camundongos.	62
Figura 19 - Efeito do flumazenil no efeito antitussígeno do mirceno administrado por via oral em camundongos.	63
Figura 20 - Efeito da glibenclamida no efeito antitussígeno do mirceno administrado por via oral em camundongos.	64

Figura 21 - Efeito do tetraetilamônio no efeito antitussígeno de MC administrado por via oral em camundongos.	65
Figura 22 - Efeito do mirceno ou da nanoemulsão contendo mirceno administrados por via inalatória em camundongos.	66
Figura 23 - Latência do tempo para tosse em camundongos tratados com mirceno ou da nanoemulsão contendo mirceno por via inalatória.	66
Figura 24 - Efeito expectorante do mirceno na secreção de fenol vermelho em camundongos tratados por via oral.	67
Figura 25 - Efeito expectorante da nanoemulsão contendo mirceno na secreção de vermelho fenol em camundongos tratados por via oral.	68
Figura 26 - Efeito da furosemida na atividade expectorante do mirceno administrado por via oral em camundongos.	69
Figura 27 - Efeito da atropina na atividade expectorante do mirceno administrado por via oral em camundongos	70
Figura 28 - Efeito do propranolol na atividade expectorante do mirceno administrado por via oral em camundongos	71
Figura 29 - Efeito da indometacina na atividade expectorante do mirceno administrado por via oral em camundongos	72
Figura 30 - Efeito expectorante do mirceno na secreção de vermelho de fenol em camundongos tratados por via inalatória.	73
Figura 31 - Efeito expectorante da nanoemulsão contendo mirceno na secreção de vermelho de fenol em camundongos tratados por via inalatória.	74
Figura 32 - Efeito do mirceno no número de células inflamatórias no LBA.	75
Figura 33 - Efeito da nanoemulsão contendo mirceno no número de células inflamatórias no LBA.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição em percentual de peso de formulações nanoemulsionadas.	39
Tabela 2: Tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão de formulações de nanoemulsões (média $\pm$ EPM, n = 3).	50
Tabela 3: Avaliação do peso dos órgãos.	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

GABA	Ácido γ -aminobutírico
SABA	Agonistas beta 2 de curta duração
LABA	Agonistas beta 2 de longa duração
ATROP	Atropina
SERCA	Bomba de cálcio-atpase do retículo sarcoplasmático
NCFB	Bronquiectasia não fc
CAM	Calmodulina
BK _{CA}	Canais para potássio sensíveis ao cálcio
KV	Canal de potássio sensível à voltagem
KCA	Canal de potássio sensível ao cálcio
CCH	Carbacol
APC	Células apresentadoras de antígenos
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
KCL	Cloreto de potássio
COD	Codeína
CEUA-UNIVASF	Comitê De Ética No Uso De Animais Da Universidade Federal Do Vale Do São Francisco
NKCC	Cotransportador $Na^+ - K^+ - Cl^-$
DEX	Dexametasona
DAG	Diacilglicerol
DZP	Diazepam
DCP	Discinesia ciliar primária
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EPM	Erro padrão da média
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FC	Fibrose cística
FLZ	Flumazenil

MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
FURO	Furosemida
CFTR	Gene Regulador De Condutância Transmembrana
GLIB	Glibenclamida
GINA	Global initiative for asthma
IGE	Imunoglobulina E
IPD	Índice de polidispersão
IND	Indometacina
IFN- Γ	Interferon- γ
LBA	Lavado broncoalveolar
MC	Mirceno
SML-20	Monolaurato de polioxietileno-20 sorbitano
SMO-20	Monooleato de polioxietileno-20 sorbitano
SMO	Monooleato de sorbitano
NALOX	Naloxona
NEMC	Nanoemulsão contendo mirceno
NEV	Nanoemulsão vazia
NMDA	N-metil- <i>D</i> -aspartato
OECD	<i>Organization for economic co-operation and development</i>
OVA	Ovalbumina
PFE	Pico de fluxo expiratório
PROP	Propranolol
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
B ₂ AR	Receptor β_2 -adrenérgico
DRGE	Refluxo gastroesofágico
SNC	Sistema nervoso central

MYPT1	Subunidade 1 da fosfatase da miosina
TH	T helper
PBS	Tampão fosfato
TEA	Tetraetilamônio
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPA	<i>Transient receptor potential ankyrin</i>
TRPM	<i>Transient receptor potential melastatin</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
IP3	Inositol Trifosfato
MCT	Triglicerídeo de cadeia média
NTS	Tronco cerebral do trato solitário
FEV1	Volume expiratório em 1 segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	FISIOPATOLOGIA E SINTOMAS DA ASMA	21
2.2	DIAGNÓSTICO DA ASMA	24
2.3	SECREÇÃO DE MUCO E OBSTRUÇÃO DAS VIAS AÉREAS	25
2.4	REFLEXO DA TOSSE	28
2.5	PAPEL DO MÚSCULO LISO NA FISIOPATOLOGIA DA ASMA	31
2.6	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE MONOTERPENOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS	34
2.7	PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO MIRCENO	35
2.8	APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS	36
3	METODOLOGIA	38
3.1	DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES EMULSIONADAS CONTENDO MONOTERPENOS	37
3.1.1	Determinação do tamanho e do Índice de polidispersão das gotículas	40
3.2	MODELO ANIMAL E ASPECTOS ÉTICOS	40
3.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA NANOEMULSÃO CONTENDO MIRCENO	40
3.4	ANÁLISE DE COMPORTAMENTO EM MODELOS ANIMAIS	41
3.4.1	Teste de Campo Aberto	41
3.4.2	Teste de Rotarod	41
3.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA EM MÚSCULO LISO DE TRAQUEIA ISOLADA DE RATOS	42
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUSSÍGENA EM CAMUNDONGOS	43
3.6.1	Avaliação do efeito da naloxona no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico	44
3.6.2	Avaliação do efeito do flumazenil no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico	44
3.6.3	Avaliação do efeito da glibenclamida no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico	44

3.6.4	Avaliação do efeito do tetraetilamônio no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico	45
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUSSÍGENA DO MIRCENO ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA	45
3.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EXPECTORANTE EM CAMUNDONGOS	45
3.8.1	Avaliação da via do cotransportador $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} \text{Cl}^-$ (NKCC) no efeito expectorante do mirceno	47
3.8.2	Avaliação da via colinérgica no efeito expectorante do mirceno	47
3.8.3	Avaliação da via adrenérgica no efeito expectorante do mirceno	47
3.8.4	Avaliação do envolvimento de mediadores inflamatórios no efeito expectorante do mirceno	47
3.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EXPECTORANTE DO MIRCENO ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA	47
3.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIASMÁTICA EM CAMUNDONGOS	48
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	49
4.	RESULTADOS	49
4.1	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DA GOTA DA NANOEMULSÃO	49
4.2	TOXICIDADE AGUDA DA NANOEMULSÃO CONTENDO MIRCENO	51
4.3	TESTE DE CAMPO ABERTO	52
4.4	TESTE DE ROTAROD	54
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RELAXANTE DO MIRCENO EM MÚSCULO LISO DE TRAQUEIA ISOLADA DE RATO	56
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUSSÍGENA EM CAMUNDONGOS	59
4.7	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO MIRCENO SOBRE A TOSSE EM CAMUNDONGOS	62
4.7.1	Avaliação do efeito da naloxona no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico	62
4.7.2	Avaliação do efeito do flumazenil no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico	62
4.7.3	Avaliação do efeito da glibenclamida no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico	63

4.7.4	Avaliação do efeito do tetraetilamônio no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico	64
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUSSÍGENA DO MIRCENO ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA	65
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EXPECTORANTE EM CAMUNDONGOS	67
4.10	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EXPECTORANTE DO MIRCENO	68
4.10.1	Avaliação da via do cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (NKCC) no efeito expectorante do mirceno	68
4.10.2	Avaliação da via colinérgica no efeito expectorante do mirceno	69
4.10.3	Avaliação da via adrenérgica no efeito expectorante do mirceno	70
4.10.4	Avaliação do envolvimento de mediadores inflamatórios no efeito expectorante do mirceno	71
4.11	AVALIAÇÃO DO EFEITO EXPECTORANTE DO MIRCENO LIVRE OU EM NANOEMULSÃO ADMINISTRADOS POR VIA INALATÓRIA	72
4.12	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIASMÁTICA EM CAMUNDONGOS	74
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética de Uso de Animais	112

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios respiratórios, entre os quais aqueles que envolvem alterações fisiopatológicas na estrutura normal da parede das vias aéreas, incluindo alterações na composição e organização de seus constituintes celulares e moleculares, afetam milhões de pessoas em todo o mundo (Dhanjal *et al.*, 2022). A asma é uma doença heterogênea, caracterizada pela inflamação das vias aéreas e marcada pela história de sintomas respiratórios, tais como tosse, aperto no peito, chiado, dificuldade ao respirar e limitação variável do fluxo de ar expiratório (Gina, 2022).

Embora a causa da asma ainda esteja indefinida, vários fatores de risco, por sua vez, são identificados: predisposição genética (hereditariedade varia entre 35 a 95%), eventos no início da vida, como baixo peso ao nascer e prematuridade, exposições ambientais transmitidas pelo ar e doenças respiratórias virais (Marques; Vale, 2022). Uma condição importante a ser considerada como fator relacionado à exacerbação e desfechos ruins para a asma é o baixo status socioeconômico - pobreza, que tem razões complexas, as quais incluem má nutrição, pouco ou nenhum acesso a serviços de saúde, assistência médica e medicamentos, além de alta exposição à fumaça de cigarro e/ou poluição (Ramsahai; Hansbro; Wark, 2019).

Em relação à fisiopatologia da asma, em resposta a diferentes estímulos, a hiperresponsividade das vias aéreas, marcada pela reação broncoconstritora exagerada, é uma característica da significativa (Sinyor; Perez, 2022). Outras características do processo asmático incluem remodelamento das vias aéreas, hiperplasia e hipertrofia do músculo liso das vias aéreas e produção excessiva de muco, o que pode ser manifestado pelos sintomas mais proeminentes (Calhoun; Chupp, 2022; Drake *et al.*, 2021).

O tratamento da asma recomendado pela GINA é baseado na administração de corticosteróides inalatórios para controlar os sintomas e prevenir crises, além de agonistas beta 2 de curta duração (SABA) ou de longa duração (LABA) a depender da gravidade do quadro (Levy *et al.*, 2023). A terapêutica da asma também pode incluir anticolinérgicos, antagonistas de leucotrienos e anti-IL-5 (Castillo; Peters; Busse, 2017).

No entanto, observa-se que a incidência de eventos adversos a medicamentos antiasmáticos comuns aumentou na última década, principalmente entre crianças em idade pré-escolar que usavam broncodilatadores, resultando em aumento substancial dos custos de

saúde (Xie *et al.*, 2022). O uso de corticosteroides orais, tanto em curto quanto em longo prazo, é cada vez mais reconhecido por sua associação direta a uma ampla gama de efeitos adversos sistêmicos graves, embora efeitos locais também possam ocorrer, e são frequentemente mais prevalentes dependendo da via de administração. Dada essa preocupação, alternativas poupadoras de corticosteroides são recomendadas a pacientes com asma grave (Casale *et al.*, 2022), mas também são exploradas para casos de asma leve e moderada. Além dos corticosteroides, outras classes de medicamentos como modificadores de leucotrienos, anticorpos monoclonais e broncodilatadores de longa ação são empregadas no manejo da asma, cada qual com seu perfil de segurança e eficácia. Apesar de historicamente conhecido o papel dos agonistas beta 2 de curta duração (SABA) no tratamento da asma, estudos mostram que o aumento da exposição ao SABA está associado ao risco de exacerbação grave, independentemente da terapia de manutenção. Por isso, a GINA não recomenda mais SABA como monoterapia para asma leve (Quint *et al.*, 2022), incentivando a busca por abordagens terapêuticas mais seguras e eficazes para todos os níveis de gravidade da doença.

Os números de óbitos e internações por asma no Brasil vêm diminuindo desde 2009, porém, os números absolutos ainda são elevados, o que resulta em elevados custos diretos e indiretos para o sistema público de saúde (Cardoso *et al.*, 2017). Na adolescência, destaca-se a maior ocorrência de óbitos fora do ambiente hospitalar, demonstrando a possibilidade de subestimar a gravidade da doença e a necessidade de tratamento (Pitchon *et al.*, 2020). Neste contexto, melhorar o controle da asma pode reduzir a demanda por atendimentos de emergência e hospitalizações por exacerbações de asma e pode levar à redução do ônus econômico da asma para a sociedade (Nascimento *et al.*, 2023).

Alternativamente, compostos naturais ou plantas medicinais, têm sido estudadas como potenciais terapias farmacológicas para o tratamento da asma (Borghi *et al.*, 2022; Lee; Shim, 2022). Muitos produtos naturais, como os óleos essenciais ou monoterpenos, apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante, o que os torna fonte de novos compostos para o tratamento da asma ou da doença pulmonar obstrutiva crônica (Feng *et al.*, 2023; Han *et al.*, 2022; Games *et al.*, 2016).

O monoterpeno mirceno, é conhecido por ter propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antimutagênicas e antioxidantes e, recentemente investigado, uma droga promissora para o tratamento de complicações mediadas pela asma em ratos neonatos (Du *et*

al., 2020). Aliado à nanotecnologia, uma tecnologia emergente com boa diversidade de sistemas de entrega de fármacos, é possível o desenvolvimento de uma terapia com melhora significativa do direcionamento do fármaco, redução da toxicidade e melhor biodisponibilidade (Zuo *et al.*, 2022).

Neste contexto, diante das propriedades farmacológicas e potencial efeito antiasmático do mirceno, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito antiasmático do mirceno e das suas preparações nanoemulsionadas em modelos de asma em animais, além do efeito antitussígeno, sua atividade expectorante e atividade espasmolítica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FISIOPATOLOGIA E SINTOMAS DA ASMA

A asma é comumente definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas em que ocorre o influxo de células e mediadores inflamatórios e remodelação do tecido pulmonar, tendo como consequência hiperresponsividade e limitação do fluxo de ar (Gregório *et al.*, 2021). Neste caso, ocorre uma reação do sistema imune inato e adaptativo, levando células de defesa a agirem junto às células epiteliais e células musculares lisas, levando-as a terem uma responsividade elevada em reação a estímulos como exercícios físicos, ar frio ou a alérgenos (Pavón-Romero *et al.*, 2021).

Pode-se classificar a asma em: alérgica, quando mediada pela imunoglobulina E (IgE); asma não alérgica, geralmente desencadeados por infecções virais do trato respiratório superior ou sem causa aparente; asma ocupacional, que ocorre quando a pessoa desenvolve asma a partir da exposição a agente causador de asma no ambiente de trabalho; doença exacerbada pelo uso de aspirina; asma induzida por exercício e asma com tosse variante (Boonpiyathad *et al.*, 2019; Padem; Saltoun, 2019; Eid *et al.*, 2019). Já em relação à classificação fisiopatológica, levando em consideração sua heterogeneidade imunológica, usa-se a estratégia de identificar a celularidade inflamatória em fluidos extraídos da via aérea (escarro ou lavado broncoalveolar - LBA) (Pavón-Romero *et al.*, 2021). De acordo com as evidências fornecidas pela citologia das amostras, podem existir quatro grupos diferentes: eosinofílicos, neutrofílicos, uma mistura de ambos e paucigranulocíticos (Davis; Sheats, 2021; Chen *et al.*, 2021; Kurvilla; Lee; LeE, 2019).

De modo geral, o processo asmático é iniciado quando alérgenos, sejam estes vírus, bactérias ou fungos, são inalados ou aspirados, entrando em contato com epitélio, que por sua vez desencadeia uma produção de citocinas que promovem a ativação e recrutamento de células imunes nas vias aéreas (Bonser; Erle, 2019). Os mecanismos causais da doença são chamados endotipos e são considerados como tipo “T helper” (Th) 1, 2 ou 17 (Potaczek, 2020).

Para sair de um estado de repouso para um estado de expansão clonal e diferenciação em diferentes subtipos de células efectoras, precisa ocorrer o contato das células T CD4 virgens com células apresentadoras de antígenos (APC) ativadas e a ligação a moléculas do complexo de histocompatibilidade de células Th, além de estimulação de determinadas

citocinas no ambiente (Zhao, *et al.*, 2021). Enquanto interferon- γ (IFN- γ) e interleucina 12 iniciam diferenciação de células Th1, regulada pelo fator de transcrição T-box, IL-4 é responsável por células Th2 e IL-6 e IL-23 estimulam a proliferação e diferenciação de células Th17 (Zhu, 2015; Gálvez, 2014).

O processo asmático do tipo Th2 está fortemente associado à atopia e alergia, reações de hipersensibilidade do tipo I, inflamação eosinofílica e resposta a corticosteróides (Wenzel, 2012). Acredita-se que a inflamação induzida por aeroalérgenos seja impulsionada por citocinas Th2, incluindo interleucinas (IL) 4, IL-5 e IL-13 (Tran *et al.*, 2016). Essas interleucinas são centrais na fisiopatologia da asma do tipo Th2. A IL-5 está envolvida na diferenciação, sobrevivência, crescimento, recrutamento e degranulação de eosinófilos para o sítio de exposição ao antígeno; IL-13 na hiperreatividade brônquica na asma, e IL-4 na produção de anticorpos IgG e IgE (Lambrecht; Hammad, 2015; Pelaia *et al.*, 2019; Carr; Zeki; Kraft, 2018).

Os eosinófilos associados com resposta Th2 têm efeitos pleiotrópicos em várias células inflamatórias e são capazes de sintetizar e armazenar proteínas citotóxicas dentro de grânulos intracelulares (Kuruvilla; Lee; Lee; 2019). Além disso, são células inflamatórias dominantes presentes nos pulmões de pacientes asmáticos, sendo ligado também ao aumento da produção de muco e obstrução das vias aéreas (Jacobsen *et al.*, 2021; Dunican *et al.*, 2018). Em modelos de camundongos, os eosinófilos são necessários para o acúmulo de muco pulmonar e a hiperresponsividade das vias aéreas associada à asma (Lee *et al.*, 2004; Jackson, Akuthouta, Roufosse, 2022).

Apesar de ainda ser pouco compreendido, o papel do processo do tipo Th1 pode estar relacionado ao aumento de interferon- γ (IFN γ), o qual é responsável por aumentar as respostas dos mastócitos atraído pelas quimiocinas CXC, induzidas pelo IFN γ no músculo liso (Wenzel, 2012). Respostas antivirais do tipo Th1 também incluem liberação de IFN-alfa/beta de monócitos, epitélio e eosinófilos, promovendo a eliminação viral e uma proteção robusta contra a exacerbação da infecção (Shen, Malter, 2019).

Diferente disso, a inflamação do tipo Th17 tem sido fortemente associada à neutrofilia e considerada um importante alvo terapêutico (Wenzel, 2012; Mckinley *et al.*, 2008). As células Th17 secretam principalmente fatores inflamatórios com IL-17 e IL-22 e são originadas a partir da diferenciação das células T virgens que foram estimuladas por IL-6 e IL-23 (Zhao *et al.*, 2021). A expressão de IL-17A e IL-17F tem sido associada à asma grave e

prejuízo da função pulmonar, mas não associada à inflamação neutrofílica (Lajoie *et al.*, 2010; Doe *et al.*, 2010). Porém, sabe-se que a IL-17A induz o recrutamento e ativação de neutrófilos e que localmente promove a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 (Iwakura *et al.*, 2011).

Juntas, reações inflamatórias e respostas imunológicas, produzem consequências prejudiciais à qualidade de vida da pessoa com asma. O paradigma atual da fisiopatologia da asma estabelece a remodelação, a soma das alterações estruturais da parede das vias aéreas e do parênquima pulmonar para explicar a hiperresponsividade das vias aéreas (King, *et al.*, 2018).

Neste sentido, tais alterações compreendem as células do músculo liso das vias aéreas, as quais passam por um processo de aumento de massa devido à hipertrofia e hiperplasia, além de espessamento das membranas basais, subepiteliais e do epitélio, hipertrofia das glândulas mucosas, fibrose com alteração da composição da matriz extracelular e alterações vasculares linfáticas (Camoretti-Mercado; Lockett, 2021).

Essas mudanças têm consequências facilmente perceptíveis na apresentação clínica dos indivíduos asmáticos, tais como: limitação variável do fluxo de ar, tosse, aperto no peito, sibilos ao respirar, respiração curta e chiado (Papi *et al.*, 2018). Tais sintomas podem se agravar mediante existência de comorbidades e fatores de risco tais como obesidade, rinossinusite e pólipos nasais, fumo de tabaco, ansiedade e depressão, refluxo gastroesofágico, desordens respiratórias e osteopenia/osteoporose têm riscos aumentados para asma severa (Jones; Neville; Chauhan, 2018).

As exacerbações da asma também têm ocorrência sazonal, seja pelo frio do inverno, gripe influenza ou, principalmente, quando há infecção por rinovírus em crianças e adultos, sendo este mais comum e com maior gravidade (Ramsahai; Hansbro; Wark, 2019). A persistência e aceleração de ambos os processos inflamatório e remodelamento das vias aéreas na infância, quando modificadas pela exposição a viroses e dieta, pode ser base do desenvolvimento da asma severa e persistente em adultos (King *et al.*, 2018).

Apesar de ainda haver baixa adesão a vacinas das pessoas com asma, ensaios clínicos e estudos observacionais mostram que a vacinação contra influenza é segura e que provavelmente beneficia pessoas com asma contra a infecção por influenza, doenças respiratórias, ataques de asma e complicações da asma relacionadas à influenza (Vasileiou *et al.*, 2017).

2.2 DIAGNÓSTICO DA ASMA

Os principais sintomas da asma são dispneia, espirro, tosse e aperto no peito, sendo estes quase sempre variáveis e com desencadeadores como alérgenos ou infecções virais identificados e tratados sempre que possível (Jones; Neville; Chauhan, 2018). Considerando esse quadro sintomático, um correto diagnóstico é muito importante para se evitar exposição de pessoas, principalmente crianças, a tratamentos desnecessários em caso de subdiagnóstico, falta de tratamento adequado ou perda de outros diagnósticos (Bush; Pavord, 2018; Gina, 2022).

O diagnóstico de asma é baseado na combinação de sintomas respiratórios, como os citados acima, e a limitação variável das vias aéreas, que variam substancialmente ao longo do tempo e em magnitude espontaneamente ou com tratamento (Ullmann *et al.*, 2018). Características como sintomas na infância ou história familiar de alergia aumentam a probabilidade de que o paciente tenha asma, sendo o sibilo expiratório o achado mais comum na ausculta torácica, porém comum também em outras disfunções das vias aéreas como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou infecções (Rothe *et al.*, 2018).

A maioria dos guias clínicos considera que a asma pode ser diagnosticada em crianças nos primeiros anos de vida desde que o quadro clínico seja compatível com a doença, a resposta ao tratamento seja adequada e outros possíveis diagnósticos sejam descartados (Moral *et al.*, 2019). Em crianças e adultos acima de 5 anos, a avaliação de asma deve ter pelo menos alguma confirmação objetiva para apoiar o diagnóstico por meio de testes de função pulmonar e avaliações não invasivas de inflamação das vias aéreas usando óxido nítrico exalado (Saglani; Menzie-Gow, 2019).

O teste de função pulmonar, que auxilia na identificação e quantificação de anormalidades do sistema respiratório pode incluir diversos estudos diferentes, comumente espirometria com fluxo de volume, volume pulmonar e capacidade de difusão do monóxido de carbono (Dempsey; Scanlon, 2018). O volume expiratório em 1 segundo (FEV1), avaliado no exame de espirometria, é confiável para o diagnóstico de asma (Miller *et al.*, 2005). Quando são obtidas evidências de variabilidade excessiva na função pulmonar expiratória em pacientes com sintomas respiratórios típicos, há fortes indicativos desta ser uma componente essencial do diagnóstico de asma (Gina, 2022). Em crianças maiores de 5 (cinco) anos de

idade, o pico de fluxo expiratório (PFE) e a espirometria são comumente usados para avaliar a obstrução e a reversibilidade do fluxo aéreo (Martin; Townshed; Brodlie, 2022).

Com maior dificuldade de diagnóstico comparado a crianças e adultos jovens, devido à pior percepção da dispneia ou problemas na realização de testes objetivos complexos, o diagnóstico de asma em adultos idosos (idade maior que 65 anos) é estabelecido a partir da história clínica detalhada, exame físico e testes de função pulmonar (Nanda *et al.*, 2020).

Diferente da asma, apesar de ter sintomas parecidos, a DPOC tem como características marcantes e importantes para diferenciar do diagnóstico de asma: acometer adultos acima dos 40 anos de idade, causada por fumaça do cigarro ou poluição; pouca resposta aos β_2 -adrenérgicos e aos glicocorticoides; sinais de enfisema pulmonar em exames radiográficos (Yayan; Rasche, 2016).

2.3 SECREÇÃO DE MUCO E OBSTRUÇÃO DAS VIAS AÉREAS

A rápida secreção de muco é a primeira linha de defesa contra a grande quantidade de irritantes que a inalação de ar traz para os pulmões, tais como micróbios, poeira, fuligem e gases que danificam o epitélio das vias aéreas (Rogers, 2007). Por meio de interações dos cílios com a camada de muco durante a propulsão ciliar do muco, as vias aéreas saudáveis detectam e mantêm as concentrações de muco (Anderson *et al.*, 2015). Esse muco é eliminado do pulmão pelos cílios e pelo fluxo de ar, incluindo bombeamento bifásico gás-líquido e mecanismos dependentes da tosse, sendo que as taxas de transporte de muco dependem fortemente da concentração de muco (Hill *et al.*, 2022). Depois que o muco sobe pela traquéia, ele é impulsionado através das cordas vocais pelo epitélio ciliar, entra na faringe e é deglutido, sendo eliminados pelo trato gastrointestinal diariamente (Fahy; Dickey, 2010).

A hidratação da camada de muco, em parte regulada pelos níveis extracelulares de nucleotídeos/nucleosídeos, é um determinante importante da eficácia da depuração do muco, mecanismo esse que protege o pulmão de inalados infecciosos e não-infecciosos (Anderson *et al.*, 2015). Uma depuração mucociliar eficiente, em pessoas saudáveis, ocorre com a hidratação das superfícies das vias aéreas devido a absorção epitelial de sódio (Na^+) bem equilibrada e secreção de ânions cloreto (Cl^-) (Boucher, 2019).

O muco das vias aéreas humanas é um hidrogel composto por aproximadamente 98% de água, 0,9% sal, 0,8% de proteínas globulares e 0,3% de polímeros de mucina de alto peso molecular (Boucher, 2019). Mucinas são proteínas fortemente glicosiladas definidas pela

presença de repetições em tandem de sequências de aminoácidos ricos em serina e treonina, aos quais estão ligados grandes estruturas ramificadas de carboidratos (Widdicombe; Wine, 2015). As mucinas respiratórias majoritariamente secretadas são MUC5AC e MUC5B, as quais possuem uma organização multimérica e alta concentração de carboidrato e são principalmente regulados por dois genes adjacentes entre si no cromossomo 11p15.5 e controlados pelo fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês, *epidermal growth factor*) (Santus; Radovanovic; Chiumello, 2019).

A exocitose das mucinas secretadas é a etapa final em seu processamento intracelular, resultando em sua liberação no lúmen das vias aéreas para interagir com água e íons para formar muco (Jaramillo *et al.*, 2018). A secreção de mucinas, tanto em taxa basal quanto em taxa alta estimulada, é regulada por segundos mensageiros que atuam na maquinaria exocítica (Zhu *et al.*, 2015). Essa maquinaria envolve o transporte do retículo endoplasmático, onde as mucinas são sintetizadas, para o complexo de Golgi, onde ocorre glicosilação, processamento e triagem pós-tradução e, finalmente, do trans-Golgi para a superfície celular (Davis; Dickey, 2008). As células das glândulas mucosas liberam seus grânulos de secreção de maneira gradual em resposta a agentes colinérgicos, adrenérgicos e a uma ampla variedade de outros agentes neuro-humorais, a maioria dos quais se liga a receptores na região basolateral (Widdicombe; Wine, 2015). Após a estimulação por altos níveis desses agonistas extracelulares, como ATP, acetilcolina ou histamina, a taxa de secreção de mucina das vias aéreas pode aumentar milhares de vezes (Jaramillo *et al.*, 2018).

Quando em excesso, seja em quantidade ou densidade, o muco secretado para transportar substâncias inflamatórias não é adequadamente eliminado por ação ciliar, permanece nas vias aéreas e fornece os pré-requisitos para responsividade e obstrução do trato respiratório, o que resulta no bloqueio do fluxo de ar, fornece as condições ideais para a colonização microbiana e leva a uma diminuição da função pulmonar (Ren *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019). Um passo fundamental na patogênese da doença muco-obstrutiva é a compressão osmótica da camada de muco na superfície das vias aéreas com a formação de placas e tampões de muco aderentes, particularmente nas vias aéreas distais (Hill *et al.*, 2022). Devido a essa obstrução, caso persista essa falha na eliminação de muco, a tosse é o principal mecanismo de ajuda, além disso análises viscoelásticas fornecem informações sobre a eficácia da tosse para compensar as ineficiências dependentes da concentração nos cílios e no transporte de muco induzido pela respiração (Hill *et al.*, 2014).

Na asma, devido a forte atuação de mediadores inflamatórios, a hiperplasia e metaplasia epiteliais das vias aéreas resultam em alterações na mucina armazenada e secretada e na produção de muco patológico, culminando em dificuldade do transporte do muco e obstrução das vias aéreas (Bonser; Erle, 2017). Múltiplos mecanismos desarranjam as vias de transporte de íons que normalmente hidratam o muco em doenças pulmonares muco-obstrutivas, por exemplo, fibrose cística (FC), DPOC, bronquiectasia não FC (NCFB) e discinesia ciliar primária (DCP) (Hill *et al.*, 2022).

Como forma de reduzir essa obstrução, expectorantes, incluindo medicamentos mucoativos, expectorantes estimuladores de náusea, mucocinéticos, proteases e nucleases, podem ser adotados como terapia (Zhang; Zhou, 2014). Da mesma forma, são racionais as estratégias e terapias para limpar o muco aderente por meio de agentes hidratantes ou mucolíticos (Hill *et al.*, 2022).

Os medicamentos mucoativos são usados para promover a eliminação de muco e são categorizados de acordo com seus mecanismos e ação (Rubin, 2015). Expectorantes estimuladores de náusea estimulam a mucosa gástrica e as células das glândulas respiratórias a aumentar a secreção de escarro mais fino, facilitando assim sua expulsão (Zhang; Zhou, 2014). Já os mucocinéticos são medicamentos que aumentam o clearance mucociliar por ação nos cílios, por aumentar a frequência de batimento ciliar (Rubin, 2007). No caso de proteases e nucleases, a atividade mucolítica ocorre por meio da degradação de mucinas (Sanders *et al.*, 2007). Nessa linha, mucolíticos degradam estruturas do muco, tornando-o menos espesso e facilitando a sua eliminação por meio da tosse (Wilkinson *et al.*, 2014). Por fim, a hidratação do muco pode ser obtida por hidratação direta, como a administração de agentes osmóticos, usando moduladores de canais, como no caso do gene regulador de condutância transmembrana (CFTR), ou obtida farmacologicamente, por ação em outros canais iônicos nas células epiteliais das vias aéreas (Tildy; Rogers, 2015).

Além das vias clássicas citadas acima, outras vias potenciais para a redução da hipersecreção de muco estão sendo estudadas, como por exemplo o uso de antagonistas de quimiocinas, inibidores da fosfodiesterase 4, antioxidantes, inibidores da tirosina cinase, inibidores de proteases, antagonistas de receptores purinérgicos, dentre outros (Rogers; Barnes, 2006; Zhang *et al.*, 2016).

Em outra direção, há investigações do potencial do muco como biomarcador simples e eficaz de doenças das vias aéreas que se correlacione com propriedades do muco, como

concentração de sólidos, viscosidade, elasticidade, difusividade e frequência de transporte (Hill *et al.*, 2014). Nesse sentido, outro importante meio para o estudo da atividade expectorante é o fluido do lavado broncoalveolar, sobre o qual é possível avaliar sua concentração através do vermelho de fenol como indicador (Menezes *et al.*, 2019).

A secreção traqueal de vermelho de fenol é um método simples de triagem de compostos mucoativos em que após a administração do vermelho de fenol por via intraperitoneal, parte do indicador é secretado para o lúmen traqueal, indicando o efeito expectorante (Engler; Szelenyi, 1984).

2.4 REFLEXO DA TOSSE

O reflexo da tosse é um mecanismo de defesa fisiológico que remove irritantes inalados das vias aéreas (Svajdova; Buday; Brozmanova, 2019). Vários fatores ambientais e do hospedeiro, como infecção respiratória, poluentes atmosféricos, irritantes ocupacionais, alérgenos, eosinófilos ou refluxo, podem sensibilizar e desencadear a tosse (McGovern *et al.*, 2018). Primeiro, a tosse envolve a inspiração para preparar os pulmões com um volume de ar, depois a obstrução das vias aéreas para aumentar a pressão por meio da contração do músculo expiratório contra a glote fechada e, por fim, a subsequente expulsão de ar durante a qual a glote se abre e ocorre o fluxo aéreo expiratório de alta velocidade (Krohn *et al.*, 2023).

A tosse induzida é diferenciada da tosse espontânea que ocorre na doença porque, embora ambas sejam induzidas por estímulos irritantes, a última reflete a tosse de ocorrência natural na qual os gatilhos tussígenos podem ser endógenos (muco, refluxo ou inflamação), exógenos (ar frio, perfume ou fumaça) ou talvez cognitivo (tosse voluntária), mas é improvável que seja homogêneo para todas as pessoas (Lee *et al.*, 2021). Essa tosse pode ser aguda ou crônica, como no caso da infecção por vírus respiratórios (como o rinovírus ou o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2)), que são causas comuns da tosse aguda e geralmente é autolimitada, porém a tosse pós-infecciosa pode persistir por meses em alguns indivíduos (Chung *et al.*, 2022). A tosse crônica, caracterizada por ter uma duração maior que oito semanas, é uma condição comum na síndrome da tosse das vias aéreas superiores, asma variante da tosse, refluxo gastroesofágico (DRGE) e bronquite eosinofílica (Irwin *et al.*, 2006).

Na patologia respiratória, o sistema nervoso sensorial pode ficar desregulado, podendo levar a reflexos autonômicos (broncoespasmo, secreções), vontade de tossir, e dispnéia

desequilibradas e exageradas, como aqueles que envolvem inflamação, incluindo rinite, bronquite, asma e DPOC (Mazzone; Undem, 2016). A maioria dos pacientes com tosse crônica apresenta hipersensibilidade à tosse, caracterizada por aumento da responsividade neural a uma variedade de estímulos que afetam as vias aéreas e os pulmões e outros tecidos innervados por suprimentos nervosos comuns (Chung *et al.*, 2022).

Essa inervação que regula a tosse é constituída principalmente por fibras C broncopulmonares não mielinizadas e um subconjunto de nervos sensoriais Aδ mielinizados mecanicamente sensíveis e reativos à acidez (Canning *et al.*, 2014). Quando localizadas nas grandes vias aéreas ou respondem com latência curta a estimulante químico injetado diretamente na artéria brônquica, as fibras C são denominadas “brônquicas” e acredita-se que terminem em grande parte no interstício pulmonar próximo aos capilares pulmonares (Pecova *et al.*, 2020). Uma fibra C é considerada uma fibra C pulmonar se responder a um estimulante químico com latência curta quando administrado por injeção no átrio direito para a circulação pulmonar (Mazzone; Undem, 2016).

A latência é definida como o período que leva do estímulo até o início da primeira tosse (Ivan *et al.*, 2016). Uma latência curta está relacionada a um maior número de tosse, uma vez que após o estímulo nocivo detectado por receptores e canais iônicos pode ocorrer uma estimulação excessiva do reflexo normal da tosse (Zhuang *et al.*, 2019; Morice *et al.*, 2020).

As fibras Aδ surgem do gânglio nodoso, terminam nos brônquios extrapulmonares, traqueia e laringe e podem gerar o reflexo de tosse quando estimuladas por partículas aspiradas, secreções acumuladas e acidificação da mucosa ou aspiração de conteúdo gástrico (Canning *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2022). Algumas descobertas indiretas sugerem que as fibras Aδ sensíveis ao ácido e insensíveis à capsaicina, chamadas “receptores da tosse”, são responsáveis pela tosse reflexa protetora e podem ser moduladas por meio de inflamação impulsionada pelo sistema imunológico (Foucaud *et al.*, 2019). Esses nervos, por serem do tipo mielinizados, conduzem potenciais de ação em velocidades mais altas do que nervos não mielinizados, com aproximadamente 5 m/s (Mazzone; Undem, 2016).

Experimentos em modelos animais demonstram que a ativação do nervo sensorial das vias aéreas resulta em um potencial de ação sendo transportado ao longo do nervo vago para o sistema nervoso central (SNC) por meio de projeções para o núcleo do tronco cerebral do trato solitário (NTS) e núcleo paratrigeminal (Mazzone; Mcgarvey, 2021). A tosse, então, é

desencadeada pela detecção de um irritante por meio de projeções vagais da laringe ou das vias aéreas inferiores por meio do gânglio jugular para o núcleo paratrigeminal, ou dos pulmões ou vias aéreas inferiores por meio do gânglio nodoso para o NTS (Krohn *et al.*, 2023).

A neurotransmissão por neurônios aferentes vagais é mediada principalmente por sinalização glutamatérgica mediada por receptores não *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), mas também por vias de sinalização mediada por transmissores como por exemplo substância P, neurocinina A, ácido γ -aminobutírico (GABA) e ATP, os quais podem evocar reflexos de tosse (Mutuolo, 2017). Também deve-se observar o envolvimento do cálcio nos mecanismos do reflexo da tosse, do sódio, da molécula de ATP, do canal de sódio sensível à voltagem (NaV), dos receptores de canais de potencial transiente (*transient receptor potential* - TRP), sejam estes últimos *transient receptor potential ankyrin* (TRPA), *transient receptor potential melastatin* (TRPM) e *transient receptor potential vanilloid* (TRPV) (MORICE *et al.*, 2021).

A partir das células epiteliais das vias aéreas, através dos canais da pannexina-1, o ATP pode ser liberado, ativar os canais P2X3 e promover a despolarização cumulativa de magnitude suficiente pode desencadear a abertura dos NaVs expressos pelos nervos sensoriais, levando à geração de um potencial de ação transportado pelo nervo vago para o sistema nervoso central (Mazzone; Mcgarvey, 2021; Makarenkova; Shah; Shestopalov, 2018).

Medicamentos neuromoduladores, como gabapentina, amitriptilina, pregabalina e baclofeno, têm sido usados para tratar a tosse crônica neurogênica, abrindo a possibilidade de investigação de vias alternativas envolvidas no tratamento da tosse (Giliberto; Cohen; Misono, 2017). Há estudos, por exemplo, demonstrando o importante papel da inibição da geração de potencial de ação mediada pela via gabaérgica pelos receptores do tipo A e B no NTS na redução da tosse (Kotmanova *et al.*, 2018).

A eficácia dos neuromoduladores, porém, apresenta limitações pois a tosse tende a aparecer após o tratamento, seja devido à remissão espontânea das causas subjacentes à tosse ou a etiologia subjacente não ter sido eliminada (Zhang, 2023).

A codeína, um dos medicamentos mais populares para o controle da tosse, continua a ser indispensável, mas controverso devido aos seus efeitos adversos, incluindo depressão respiratória ou overdose potencialmente fatal (An, 2024).

2.5 PAPEL DO MÚSCULO LISO NA FISIOPATOLOGIA DA ASMA

Podendo ser classificado de acordo com suas propriedades contráteis em tônico ou fásico, diferindo aí no tempo de manutenção da contração, ambos compartilham as mesmas vias de sinalização e regulação (Álvarez-Santos *et al.*, 2020). No entanto, o músculo liso das vias aéreas torna-se tônico após o nascimento porque não gera contrações espontâneas (Wang *et al.*, 2019).

O músculo liso das vias aéreas tem papel central na patogênese da asma, na hiperresponsividade das vias aéreas e constitui um importante alvo para o seu tratamento (Camoretti-Mercado; Lockett, 2021). O aumento da massa do músculo liso brônquico, uma característica do remodelamento das vias aéreas na asma grave, está associado à resistência ao tratamento e mau prognóstico (Girodet *et al.*, 2015). Pequenas moléculas que visem diretamente às principais vias de sinalização implicadas na contração e proliferação de células do músculo liso podem ser uma oportunidade terapêutica interessante (Hassoun *et al.*, 2022).

A disposição do músculo liso das vias aérea ocorre da seguinte forma: ao longo da extremidade posterior da traqueia e dos brônquios principais, conectando os segmentos de anéis de cartilagem em forma de “U”; nos brônquios de tamanho médio, entre as placas cartilaginosas e o epitélio; entrelaçados como espirais que forma uma malha que fica entre a cartilagem e o epitélio; nos bronquíolos, entre o tecido adventício e o epitélio (Martin *et al.*, 2022). As células musculares lisas se conectam à matriz extracelular nas junções de adesão à membrana que fornecem acoplamento mecânico entre as células musculares lisas dentro do tecido e que detectam sinais ambientais locais e os transduzem para vias de sinalização citoplasmática e nuclear (Zhang; Wu; Gunst, 2023).

A elastase neutrofílica, por exemplo, secretada por neutrófilos e macrófagos durante a inflamação, por degradar vários componentes da matriz extracelular, pode provocar hiper-reatividade das vias aéreas (Lockett; Wu; Gunst, 2018). Evidências sugerem que as alterações nas propriedades contráteis e mecânicas do músculo liso das vias aéreas causadas por perturbações mecânicas resultam em mudanças na organização do citoesqueleto da célula muscular lisa (Zhang; Gunst, 2019).

Neste sentido, características relacionadas ao músculo liso das vias aéreas como aumento do espessamento, remodelamento e estreitamento excessivo e variável das vias aéreas são importantes na busca por estratégias e terapias que visem reduzir os efeitos da

condição asmática (Wang *et al.*, 2020). Uma redução na eosinofilia das vias aéreas, por si só, é insuficiente para explicar a diminuição da massa do músculo liso clinicamente observada sem uma redução concomitante no recrutamento de células musculares lisas ou de seus precursores (Saunders, 2019). Evidências crescentes mostram que o receptor de prostaglandina D2 é expresso não só em células estruturais e inflamatórias, mas também em células musculares lisas, sendo que o seu antagonismo tem efeito significativo na redução da massa muscular lisa das vias aéreas (Chen *et al.*, 2021; Domingo *et al.*, 2018). Outra via interessante com papel importante na remodelação é a via de sinalização Rho/ROCK, em parte por meio da regulação da proliferação e diferenciação de células musculares lisas das vias aéreas, que pode estar conectado com fatores de cotranscrição relacionados à miocardina, um fator chave para o crescimento muscular (Yang; Shi, 2021).

Em resumo, é importante destacar que não só o músculo liso contribui para o remodelamento das vias aéreas, mas também outros fatores, como integridade epitelial, metaplasia das células mucosas, remodelamento da matriz extracelular nas vias aéreas e nos vasos, e angiogênese (Hsieh; Assadinia; Hackett, 2023).

O aumento de massa muscular piora o efeito da broncoconstrição (Martin *et al.*, 2022). A elevação do cálcio intracelular desencadeia a contração do músculo liso, a qual pode ser induzida por diversos fatores (Wicher *et al.*, 2021). Na traqueia, há receptores muscarínicos M3 acoplados à proteína Gq que são estimulados por acetilcolina, liberada de nervos parassimpático ou por administração exógena de metacolina (Proskocil; Calco; Nie, 2021). Quando estimulado, o receptor Gq ativa a fosfolipase C que gera o trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG), promovendo a liberação de cálcio do estoque intracelular após a interação do IP3 com o seu receptor no retículo sarcoplasmático (Kuo; Ehrlich, 2015). O DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila Cpi-17, um inibidor da proteína fosfatase 1, para inibir a fosfatase da cadeia leve da miosina e favorecer a contração (Camoretti-Mercado; Lockey, 2021). Com essa elevação do cálcio intracelular, que também ocorre devido à entrada do cálcio extracelular decorrente da ativação promovida pelo DAG em canais de cálcio operados por receptor, ocorre a ativação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) levando à contração do músculo liso (Croisier *et al.*, 2015). A bomba de cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) tem função de recarregar estoques de cálcio intracelular de volta para retículo sarcoplasmático (Selnø; Sumbayev; Gibbs, 2022).

Além da ativação pelo sistema nervoso, os agonistas endógenos que estimulam a liberação de Ca^{2+} incluem autocóides como histamina e serotonina, mediadores lipídicos como cisteinil leucotrienos C4, D4 e E4, prostanóides como prostaglandinas D2, F2 α e tromboxano A2 (Lam; Lamanna; Bourke, 2019). Metacolina, um β -metil análogo à acetilcolina com duração longa de ação, e carbacol, são duas drogas que mimetizam, são mais estáveis in vivo do que a acetilcolina e são usadas para estudar a broncoconstrição (Martin *et al.*, 2022; Jude, 2019).

Após o aumento da concentração do cálcio intracelular no meio citosólico em respostas a estímulos broncoconstritores, ocorre o acoplamento do cálcio à calmodulina (CaM) e ativação da MLCK, que fosforila o resíduo serina-19 da subunidade da cadeia leve da miosina (MLC20) do músculo liso para induzir uma mudança conformacional na miosina e causa a formação e contração de ponte cruzada da actomiosina, levando à contração das células musculares lisas (Hassoun *et al.*, 2022; Camoretti-Mercado; Lockey, 2021). De modo a manter um equilíbrio com a MLCK, nesse processo de controle há também a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), um regulador chave da contração e que não depende do cálcio para sua ativação (Álvarez-Santos *et al.*, 2020).

A capacidade de resposta do músculo liso das vias aéreas, opondo-se ao estreitamento das vias aéreas, pode ser diminuída por meio da respiração normal, inspiração profunda e administração de β_2 agonistas (Camoretti-Mercado; Lockey, 2021). O agonismo farmacológico do receptor β_2 adrenérgico ($\beta_2\text{AR}$), acoplado à proteína Gs, induz a broncodilatação pela ativação da enzima adenilil ciclase, que tem a função de catalisar a conversão de ATP para gerar o segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que, por sua vez, medeia a ativação da proteína cinase A (PKA) (Ostrom *et al.*, 2022; Harford *et al.*, 2021). Esta proteína é a principal responsável pelo relaxamento do músculo liso das vias aéreas e atua por meio da fosforilação do canal de potássio sensível à voltagem (Kv), um importante regulador da excitabilidade elétrica da célula muscular lisa, fosforilação do canal de potássio sensível ao cálcio (KCa) e também da subunidade 1 da fosfatase da miosina (MYPT1) (Brueggemann *et al.*, 2018; Cattani-Cavaliere, 2023; Kume; Takagi, 1995; Camoretti-Mercado; Lockey, 2019).

Ex vivo, 90% do encurtamento do músculo liso das vias aéreas ocorre nos primeiros 3 segundos de uma duração total de 10 segundos de contração e, quando sensibilizado, o tempo de encurtamento é aumentado e a contração é totalmente concluída em 3 segundos

(Camoretti-Mercado; Lockey, 2021). Não só na asma, mas em outras patologias, o músculo liso desempenha papel importante devido a alterações na contração, como hipercontratibilidade e a hiperresponsividade (Álvarez-Santos *et al.*, 2020).

Assim, em razão dessa importância e dos diversos mecanismos e vias relacionados ao músculo liso das vias aéreas, mais investigações são necessárias a fim de encontrar novos alvos e terapias para o tratamento de doenças respiratórias, como a asma (Prakash, 2016; Koziol-White; Pabettieri, 2019).

2.6 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE MONOTERPENOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS

Os terpenoides, também conhecidos como isoprenoides, são uma família de produtos naturais, principalmente metabólitos secundários de plantas medicinais, compreendendo uma diversidade de estruturas que são classificadas com base na organização e número de unidades de isopreno (C_5H_8) (Ludwiczuk; Skalicka-Wozniak; Georgiev, 2017). Em geral, vias bioquímicas distintas fornecem intermediários metabólicos para a síntese de monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) e (Bergan; Davis; Phillips, 2019).

Os monoterpenos são compostos com uma estrutura de 10 carbonos correspondente a duas unidades de isopreno e podem ser divididos em compostos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e irregulares (Yao; Liu, 2023; Sousa; Mendes, 2022). Esses compostos voláteis são os principais responsáveis pelo aroma característico dos óleos essenciais e considerados marcadores químicos interessantes para a caracterização de plantas medicinais (Lunz, Stappen, 2021; Dehsheikh *et al.*, 2020). Os óleos essenciais são uma classe de metabólitos obtidos pela destilação de material vegetal para obtenção de um extrato hidrofóbico volátil (Bahr *et al.*, 2019).

Estudos mostram que tanto os monoterpenos naturais quanto seus derivados sintéticos são dotados de várias propriedades farmacológicas, incluindo atividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante, anticancerígena, antiarrítmica, antiagregante, anestésica local, antinociceptiva, anti-inflamatória, anti-histamínica e antiespasmódica (Koziol *et al.*, 2014).

Outros exemplos das atividades farmacológicas dos monoterpenos, incluem a atividade do 1,8-cineol, conhecido por ter propriedades anti-inflamatória e antibacteriana, na prevenção de edema cerebral em modelos de malária severa; linalol, geraniol, geraniol,

limoneno, na modulação do perfil lipídico sanguíneo, protegendo contra a aterosclerose; efeito do α -pineno contra infecção por taquizoítos de *Toxoplasma gondii*; efeito analgésico do mentol ao bloquear canais de sódio e influxo de cálcio; efeito do nerolidol na modulação da quimiotaxia de neutrófilos; efeito atenuante da hiperalgesia da cânfora em dor neuropática (Santos *et al.*, 2022; Yang; Zhong; Yu, 2023; Kharazmkia *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022; Schepetkin *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023).

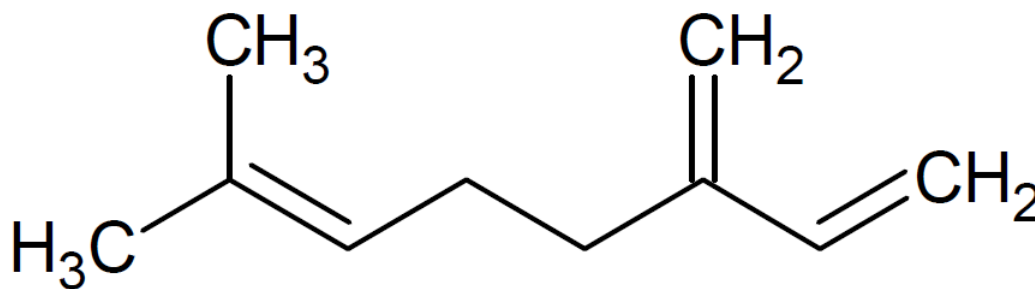
Em doenças que acometem as vias aéreas, pode-se destacar a ação da carvona na redução da inflamação das vias aéreas mediada por IgE, efeito mucolítico e anti-inflamatório do 1,8-cienol ao induzir o fator 3 de regulação do interferon, controlar o fator nuclear kappa B e diminuir genes de mucina (Ribeiro-Filho *et al.*, 2020; Juergens; Worth; Juergens, 2020). O monoterpene limoneno reduziu a inflamação e a reatividade das vias aéreas por meio da ativação de receptores de adenosina em modelo de asma usando camundongos (Patel *et al.*, 2020).

Assim, é importante destacar que os monoterpenos têm sido investigados como potenciais compostos para o tratamento de doenças das vias aéreas, a exemplo da asma, da doença pulmonar obstrutiva crônica e de sintomas respiratórios associados, como tosse, hipersensibilidade das vias aéreas ou obstrução por hipersecreção de muco (Games *et al.*, 2016; Caceres *et al.*, 2017).

2.7 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO MIRCENO

O β -mirceno ($C_{10}H_{16}$) é uma molécula lipofílica da classe dos monoterpenos (**Figura 1**) encontrado em óleos essenciais e que ocorre como constituinte em muitas plantas, incluindo lúpulo, *cannabis*, *Schinopsis brasiliensis*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Mangifera indica* L., dentre outras plantas (Li *et al.*, 2017; Surendran *et al.*, 2021). Usado na indústria de alimentos e bebidas como aditivo alimentar ou de fragrâncias como agente aromatizante ou aditivo, o mirceno também demonstra ter relevantes efeitos farmacológicos como propriedades antioxidante, antitumoral, antinociceptiva e anti-inflamatória (Ohtsubo *et al.*, 2015; Bonamin *et al.*, 2014; Ciftci *et al.*, 2011; Bai; Tang, 2020).

Figura 1 – Estrutura molecular do mirceno.



A figura ilustra a estrutura molecular do mirceno.

Fonte: Próprio autor.

Estudos mostram que o mirceno pode reduzir a nocicepção produzida por estímulos térmicos e mecânicos nocivos, bem como reduzir a inflamação aguda (Mcdougall; Mckenna, 2022). O provável mecanismo de ação para a atividade analgésica do mirceno está relacionado ao canal TRPV1 que, quando ocupado de forma eficaz pelo mirceno, pode ser dessensibilizado (Jansem *et al.*, 2019). Sabe-se também, que TRPV1 está presente em muitos tipos de células inflamatórias, incluindo mastócitos, macrófagos, células T CD4+, e que a sua modulação pode ser benéfica na atenuação da lesão epitelial das vias aéreas (Baker *et al.*, 2016).

O tratamento com mirceno reduziu significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-6, IL-1 β) e metaloprotease-9 da matriz (MMP-9) em modelos animais para neurodegeneração dopaminérgica (Azimullah *et al.*, 2023). Em investigação de efeito in vitro em modelo de osteoartrite, mirceno teve propriedades anti-inflamatórias e anticatabólicas significativas, sugerindo que pode ser útil para interromper ou, pelo menos, retardar a destruição da cartilagem e a progressão da osteoartrite (Rufino *et al.*, 2015).

Deste modo, uma vez que o β -mirceno possui propriedades farmacológicas envolvidas com o processo de inflamação, contração do músculo liso e nocicepção, este monoterpene mostra-se como potencial agente antiasmático, o que torna relevante seu estudo em modelos animais (Du *et al.*, 2020).

2.8 APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS

As propriedades físico-químicas das drogas usadas no tratamento de doenças pulmonares associadas à inflamação (asma, DPOC, fibrose pulmonar) desempenham um papel importante na determinação da eficácia das formulações (Loo; Lee, 2022). O sucesso de

compostos derivados de plantas medicinais ou microrganismos usados como agentes terapêuticos, em parte, é prejudicado devido a características como baixa solubilidade e estabilidade, reduzida biodisponibilidade e índice terapêutico (Watkins *et al.*, 2015).

Assim, para contornar os problemas que limitam a eficácia dos tratamentos convencionais e melhorar a entrega de fármacos, nanoformulações, que são aplicações da nanotecnologia, tem emergido como potencial tecnologia para aplicação na saúde (Pandey; Kohli, 2020).

O uso da nanotecnologia, que pode ser definida como a aplicação de nanomateriais ou interações exclusivas da estrutura em nanoescala, que compreende tamanho entre 1 nm e 100 nm ou faixa entre 100 e 1000 nm, tem demonstrado imenso sucesso no campo da liberação de fármacos (Watkins *et al.*, 2015). A nanotecnologia oferece vários benefícios no tratamento de doenças humanas por meio de sistemas de entrega de medicamentos de forma precisa e específica para o local e orientados para o alvo ou sítio de ação (Patra *et al.*, 2018). Esses sistemas de entrega podem melhorar significativamente o direcionamento, reduzir a toxicidade e melhorar a biodisponibilidade dos fármacos (Zuo *et al.*, 2022).

Estudos sobre os métodos e formulações baseadas em nanotecnologia para administração de medicamentos no tratamento de condições crônicas das vias aéreas foram realizados tanto em modelos pré-clínicos, como em desenvolvimento clínico e translacional (Vij, 2020). Essas tecnologias incluem nanocarreadores do tipo nanolipossomas, nanopartículas, dendrímeros, quantum dots, nanoemulsões e nanosuspensões (Sakae *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2022; Faraj *et al.*, 2019; Scoville *et al.*, 2019; Baker Jr. *et al.*, 2021; Jackson *et al.*, 2017).

Dentre esses sistemas de entrega de fármacos, as nanoemulsões são consideradas adequadas para princípios ativos de óleos essenciais devido à sua fácil preparação, boa estabilidade, alta área superficial, baixo custo de produção e potencial de produção em escala industrial para aplicações farmacológicas e biológicas (GUPTA *et al.*, 2016). Estudo com nanopartículas de poli (etilenoglicol)-poli (ácido láctico-co-glicólico) encapsuladas em β -mirceno, β -cariofileno e nerolidol demonstra ser uma terapêutica promissora para um tratamento mais eficaz da dor devido à atividade em TRPV1 (El-Hammadi *et al.*, 2022).

As nanoemulsões são dispersões coloidais termodinamicamente instáveis que consistem em pelo menos dois líquidos imiscíveis (óleo e água), bem como estabilizadores, incluindo emulsificantes, modificadores de textura, inibidores de amadurecimento e agentes

de peso (Ozogul *et al.*, 2022). Elas têm atraído significativamente a atenção na área de alimentos devido ao potencial de aumentar a funcionalidade dos compostos bioativos nelas contidos (Liu *et al.*, 2019). Além disso, devido às suas propriedades como boa biodisponibilidade, estabilidade e baixa toxicidade, as nanoemulsões também têm sido aplicadas na fabricação de medicamentos (Suresh *et al.*, 2022; Nadja *et al.*, 2022).

O uso de nanoemulsões como carreadoras de drogas no tratamento de doenças das vias aéreas tem mostrado resultados satisfatórios, como no caso da nanoemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess), que aumentou as propriedades anti-inflamatórias do óleo e melhorou a lesão pulmonar induzida por LPS em camundongos (De Sá Coutinho *et al.*, 2020). Em modelos de rinite alérgica induzida por ovalbumina em coelhos, a administração nasal de nanoemulsão contendo loratadina e sulpirida teve um potente efeito no controle dos sintomas de rinite alérgica (Mohamad *et al.*, 2021).

Formulações nanoemulsionadas contendo compostos naturais também demonstram melhorar o efeito terapêutico, como no caso da isoliquiritigenina, um flavonoide que, na forma de nanoemulsão apresentou biodisponibilidade e efeito antiasmático significativamente melhorados ou no caso da nanoemulsão contendo o monoterpeno carvacrol que reduziu os níveis das citocinas inflamatórias IL-2, IL-17 e IFN- γ (Dantas *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2020).

O desenvolvimento, caracterização e estudos farmacológicos de nanoemulsões contendo monoterpenos têm demonstrado diversas aplicações tecnológicas e terapêuticas, compreendendo a atividade antimicrobiana contra patógenos nos alimentos, imunoregulatória, doenças infecciosas (Felício *et al.*, 2021; Dantas *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2021; Xavier *et al.*, 2022).

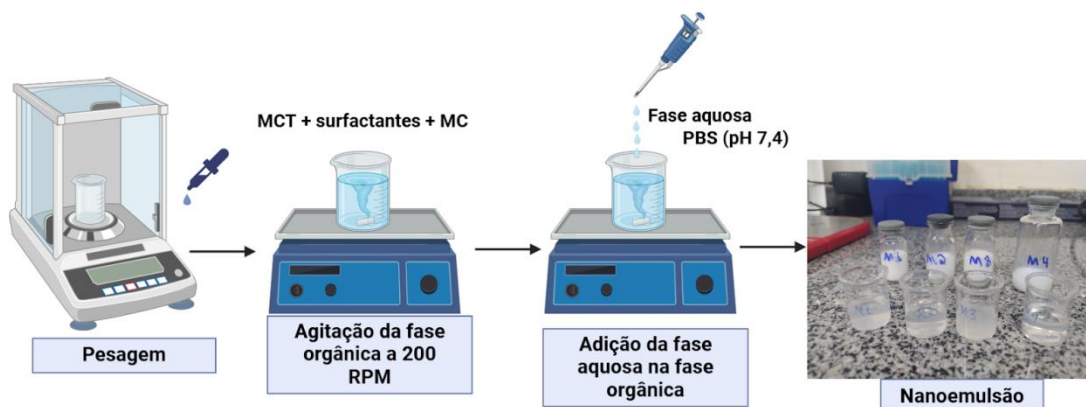
3. METODOLOGIA

3.1 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES EMULSIONADAS CONTENDO MONOTERPENOS

O monoterpeno β -mirceno ($C_{10}H_{16}$, Sigma-Aldrich®, St.Louis, EUA) incorporado nas formulações emulsionadas foi adquirido comercialmente. As nanoemulsões contendo β -mirceno foram preparadas usando o método de emulsificação espontânea descrito por Lima *et al.* (2021) (**Figura 2**). A emulsificação espontânea foi realizada pela adição de uma fase orgânica consistindo em óleo triglicerídeo de cadeia média (MCT, Brasquim, Brasil), β -

mirreno e sorbitano monoleato de polioxietileno-20 (Sigma-Aldrich®, St.Louis, EUA), para uma fase aquosa (solução tampão de fosfato pH 7,4) sob agitação magnética (200 RPM) e temperatura ambiente mantida constante durante todo o processo. A fase aquosa, composta por água ultrapura, foi adicionada gota-a-gota na fase oleosa contendo o lipídio e tensoativos em temperatura e agitação magnética constantes.

Figura 2 - Preparação das formulações nanoemulsionadas.



Os gráficos representam a preparação das formulações de nanoemulsão contendo mirreno. MCT, Triglicerídeos de cadeia média; MC, mirreno; PBS, tampão fosfato.

Fonte: Próprio autor.

Primordialmente, diferentes proporções entre as fases e as misturas de tensoativos foram avaliadas para definir a formulação mais adequada, de modo a resultar na composição final (% em peso) de cinco formulações iniciais. Desta forma, as proporções em peso de óleo para mirreno e óleo para tensoativo foram mantidas constantes em 1,0 e 2,0, respectivamente. A proporção de tensoativo:óleo:água foi fixada em 10:10:80 (% de peso), respectivamente, e para as formulações F1, F3 e F5, as combinações de tensoativos foram mantidas a HBL12 (**Tabela 1**). As formulações foram preparadas em triplicata (n=15) e armazenadas a $4,0 \pm 2,0$ °C. A nanoemulsão vazia (formulação F5) foi obtida a partir da fase orgânica composta apenas com óleo transportador (MCT) e tensoativos, utilizando o mesmo procedimento de preparação de emulsificação espontânea.

Tabela 1: Composição em percentual de peso de formulações nanoemulsionadas.

NE	SML-20	SMO-20	SMO	MCT	MC	PBS
F1	6.2	-	3.8	5.0	5.0	80
F2	10	-	-	5.0	5.0	80
F3	-	7.2	2.8	5.0	5.0	80
F4	-	10	-	5.0	5.0	80
F5	6.2	-	3.8	5.0	-	80

SML-20: monolaurato de polioxietileno-20 sorbitano; SMO-20: monooleato de polioxietileno-20 sorbitano; SMO: monooleato de sorbitano; MCT: triglicéridos de cadeia média; MC: mirceno; PBS: Solução tampão de fosfato 10 mM pH 7,4.

Fonte: Próprio autor.

3.1.1 Determinação do tamanho e do Índice de polidispersão das gotículas

O índice de polidispersão (IPd) e o diâmetro hidrodinâmico das gotículas das formulações de NE foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) a 25 °C e ângulo de espalhamento de 173° (Zetasizer® Nano ZS, Malvern PCS Instruments, Reino Unido). Todas as amostras foram diluídas (1/100) com água ultrapurificada. Foram registrados os valores da média $\pm$ EPM de triplicatas diferentes de cada dispersão coloidal.

3.2 MODELO ANIMAL E ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF), registrado com o N° 0002/270121 (**Anexo A**). Nos modelos experimentais foram utilizados: a) ratos (*Rattus norvegicus*), machos, com 6 a 8 semanas de idade e peso variando de 250 a 300 g para os ensaios de avaliação atividade espasmolítica in vitro em músculo liso de traqueia; e b) camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, com 4 a 8 semanas de idade e peso variando de 30 a 40 g, no teste de toxicidade aguda, teste de campo aberto, teste de rotarod, atividades antitussígena, expectorante e antiasmática. Todos os animais foram providos pelo Biotério Central da UNIVASF, mantidos em caixas adequadas, com ciclo claro escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*.

3.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA NANOEMULSÃO CONTENDO MIRCENO

A avaliação da toxicidade aguda pré-clínica foi realizada de acordo com a *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2001). Camundongos fêmeas foram divididos em dois grupos (n=3), sendo que o grupo controle negativo recebeu solução salina NaCl 0,09% (0,1 mL/10 g, por via oral) e o grupo tratado com a nanoemulsão contendo mirceno, que recebeu uma única dose de 2.000 mg/kg por via oral. Seguido aos tratamentos, os animais foram observados nos primeiros 30, 60, 120, 180 e 360 min e a cada 24 h durante 14 dias.

Os animais foram observados para a verificação da ocorrência de óbitos e dos parâmetros presentes na tabela de Malone, a qual permite avaliar os seguintes parâmetros: ações estimulantes do SNC: coçar o focinho, convulsão clônica e tônica, exoftalmia, aumento da frequência respiratória, lambendo patas, morder cauda, aumento da motilidade, movimentos estereotipados, piloereção, tremores finos e grosseiros. Relacionados às ações depressoras do SNC foram observados em relação a: alienação ao meio, analgesia (por compressão da cauda do animal), anestesia (puxando o pelo e suspendendo o animal), ataxia, diminuição da apreensão da pata, catatonía, dispnéia, exoftalmia, diminuição da frequência respiratória, diminuição da motilidade, diminuição do reflexo corneano, tônus dorsal, ptose palpebral e sedação. Outros parâmetros também foram observados, como: agressividade, contorção, coloração da urina, diâmetro da pupila, diarreia, ereção da cauda, fasciculações, grunhidos, aumento ou diminuição da micção, midríase, orelha (cianótica, hiperêmica ou pálida), passividade, reação de fuga, sialorreia, tremor da cauda, lacrimejamento, sudorese, coma e morte.

3.4 ANÁLISE DE COMPORTAMENTO EM MODELOS ANIMAIS

3.4.1 Teste de Campo Aberto

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar o comportamento motor dos camundongos. Os animais foram tratados com solução salina, mirceno (MC), nanoemulsão contendo mirceno (NEMC) (75 mg/kg, p.o.), ou diazepam (5 mg/kg, i.p., Santisa, Brasil). Trinta minutos após o tratamento, cada rato foi colocado no centro da área de campo aberto e deixado a explorá-la durante 5 minutos. Durante esta sessão, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de cruzamentos, tempo de imobilidade (animal parado), e comportamentos de levantar-se (*rearing*) ou de limpeza (*grooming*). Após cada sessão, foi realizada a limpeza da área de campo aberto com uma solução de etanol a 5% (v/v) (Prut; Belzung, 2003).

3.4.2 Teste de Rotarod

O teste de rotarod foi utilizado para avaliar a coordenação motora e o potencial de relaxamento muscular. Neste teste, os animais foram pré-selecionados durante uma sessão de treino realizada 24 horas antes do teste, com base na sua capacidade de permanecer na haste a 8 rpm durante 1 minuto. Os grupos pré-selecionados foram tratados com solução salina (NaCl 0,9%, p/v, Anidrol®, Brasil), mirceno (MC), nanoemulsão contendo mirceno (NEMC) (75

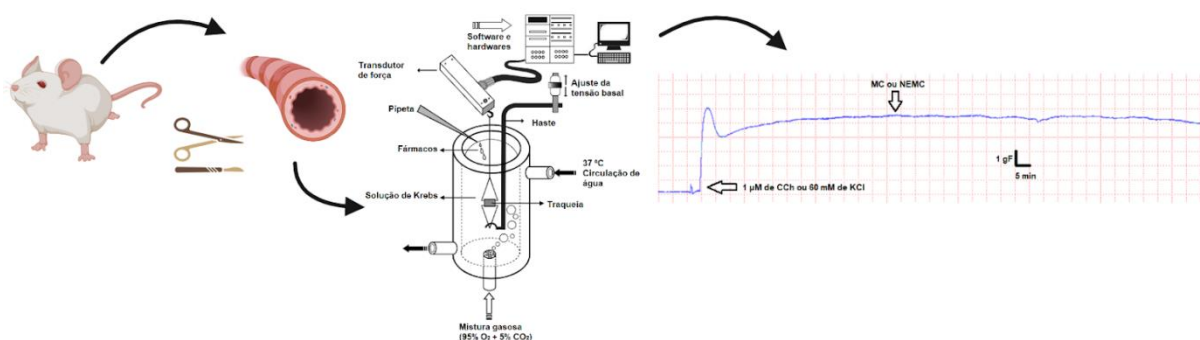
mg/kg, p.o.) ou diazepam (5 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após a administração do tratamento, os animais foram colocados sobre a barra com as quatro patas em contato com a sua superfície. O teste terminava se o animal sofresse três quedas, e o tempo passado na barra era registrado e avaliado durante um período de 3 minutos em intervalos de 30, 60 e 120 minutos após a administração do tratamento (Dunham; Miya, 1957; Tarantino *et al.*, 2000).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA EM MÚSCULO LISO DE TRAQUEIA ISOLADA DE RATOS

Os ratos foram eutanasiados por meio de guilhotina específica para a traqueia retirada e após limpeza de todo o tecido conjuntivo e adiposo, o órgão foi dividido em segmentos contendo 4 a 5 anéis cartilagosos, que foram suspensos individualmente em cubas de vidro, com o auxílio de hastes de aço inoxidável conectadas a transdutores de força através de linhas de algodão.

Os tecidos foram deixados em repouso por 60 minutos, sob uma tensão de 1 gF a 37°C e aeração constante com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), sendo a solução de Krebs substituída a cada 15 minutos. Após o período de estabilização uma primeira contração foi induzida pela adição à cuba de 1 µM de carbacol (CCh, C₂H₁₅N₆O₂⁺, Sigma-Aldrich®, St.Louis, EUA), sendo a solução nutritiva do órgão substituída após atingir a contração máxima e após 15 minutos de repouso (**Figura 3**).

Figura 3 - Preparação do experimento de atividade espasmolítica.



A figura ilustra a preparação para o experimento de atividade espasmolítica.

Fonte: Próprio autor.

Após o tecido estar estabilizado, uma segunda contração foi induzida com 1 µM de CCh ou 60 mM de KCl. Durante o componente tônico da contração foi adicionado individualmente o β-mirceno ou sua nanoemulsão, de maneira cumulativa e em concentrações

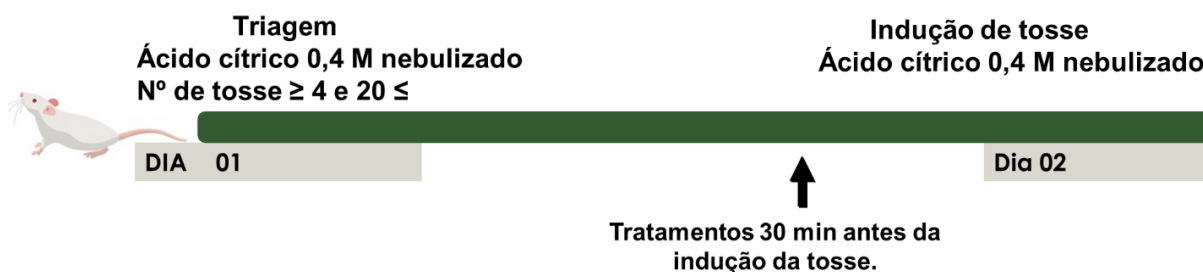
crescentes (10^{-7} a 3×10^{-3} M). Foi investigado também o efeito de MC ou NEMC sobre o tônus basal, sem a presença de agente contracturante, do músculo liso. Os relaxamentos foram expressos como a percentagem reversa da tensão máxima obtida pela adição de CCh ou KCl (Alphatec®, Brasil) à cuba, onde o relaxamento máximo foi obtido quando a tensão registrada foi reduzida aos níveis basais.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUSSÍGENA EM CAMUNDONGOS

Os animais foram divididos em 9 grupos com $n=7$ (sete) animais cada: controle positivo (CP) - Codeína (30 mg/kg – via oral); controles negativos (CN) - solução salina NaCl 0,9%, nanoemulsão vazia, mirceno (MC) 8,5, 25 ou 75 mg/kg administrados por via oral, bem como outros três grupos para as doses relativas à sua nanoemulsão contendo o mirceno. As doses do mirceno foram estabelecidas conforme estudo prévio demonstrando efeito farmacológico da dose intermediária 25 mg/kg nas vias aéreas (Du *et al.*, 2020).

A avaliação da atividade antitussígena foi realizada conforme protocolo experimental adaptado de Tanaka e Maruyama (2005). Cada animal, individualmente, foi colocado em uma câmara de vidro com volume de 500 mL. Nesta, o animal foi exposto a uma solução de ácido cítrico 0,4 M aerossolizada por nebulizador pneumático Pulmonar Plus (Soniclear Ltda., São Paulo, Brasil) durante um período de 3 (três) minutos. Durante este tempo, dois parâmetros foram avaliados: latência da tosse – período que corresponde ao início da exposição ao ácido cítrico até o aparecimento da primeira tosse; e frequência de tosse – número de tosses que o animal exibe no intervalo de tempo de 3 (três) minutos (**Figura 4**).

Figura 4 - Protocolo do modelo de tosse em camundongos.



A figura ilustra o protocolo experimental do modelo de tosse em camundongos.

Fonte: Próprio autor.

O reflexo de tosse, caracterizado por contração abdominal e distinta abertura da boca, foi observado e quantificado. Após 23 horas e 30 minutos da primeira exposição ao ácido

cítrico 0,4 M, os animais foram tratados nos respectivos grupos e, após mais 30 minutos, foram submetidos a uma segunda exposição à solução tussígena já descrita, sendo observadas as variáveis latência e frequência de tosse. Os dados foram apresentados como a porcentagem da frequência de tosse de cada animal, considerando a tosse controle (Tc) e a tosse após o tratamento (Tt), conforme equação abaixo (Menezes *et al.*, 2022).

Equação (2): % TOSSE = $(Tt/Tc) \times 100$

3.6.1 Avaliação do efeito da naloxona no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico

O mecanismo de ação envolvendo os receptores opioides foi investigado com a utilização da naloxona 0,4 mg/kg (Hypolabor, Brasil), um antagonista de receptor μ -opioide, que foi administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do mirceno 25 mg/kg (Simera; Veternik; Poliacek, 2013; Kamei, *et al.*, 2003; Bolser *et al.*, 1995). Os animais foram divididos nos grupos: Salina – NaCl 0,9%; MC25 - mirceno 25 mg/kg; NALOX + MC25 - naloxona 0,4 mg/kg + mirceno 25 mg/kg. Os tratamentos com salina ou mirceno tiveram a administração por via oral. Após 30 minutos dessa administração os animais foram expostos ao ácido cítrico 0,4 M para avaliação da tosse.

3.6.2 Avaliação do efeito do flumazenil no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico

O mecanismo de ação envolvendo a via gabaérgica foi investigado com a utilização do flumazenil (União Química, Brasil), um antagonista de receptor de benzodiazepínicos, que foi administrado por via intraperitoneal 15 minutos após a administração do mirceno 25mg/Kg (Costa *et al.*, 2014; Diniz *et al.*, 2019). Os animais foram divididos nos grupos: Salina – NaCl 0,9%; FLZ + MC25 - flumazenil 2,5 mg/kg + mirceno 25 mg/kg. Os tratamentos com salina ou mirceno tiveram a administração por via oral.

3.6.3 Avaliação do efeito da glibenclamida no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico

O mecanismo de ação envolvendo os canais para potássio sensíveis ao ATP (canal K_{ATP}) foi investigado com a utilização da glibenclamida 10 mg/kg, um bloqueador de canais K_{ATP} , que foi administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do mirceno 25 mg/kg

(Morita; Kamei, 2000). Os animais foram divididos nos grupos: Salina – NaCl 0,9%; MC25 - mirceno 25 mg/kg; GLIB + MC25 - glibenclamida 10 mg/kg (EMS, Brasil) + mirceno 25 mg/kg. Os tratamentos com salina ou mirceno tiveram a administração das drogas por via oral.

3.6.4 Avaliação do efeito do tetraetilamônio no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico

O mecanismo de ação envolvendo os canais para potássio sensíveis ao cálcio (canal BK_{ca}) foi investigado com a utilização do tetraetilamônio 8 mg/kg, um bloqueador de canais BK_{ca}, que foi administrado por via intraperitoneal 20 minutos antes do mirceno 25 mg/kg (Sutovska; Nosalova; Franova, 2007). Os animais foram divididos nos grupos: Salina – NaCl 0,9%; MC25 - mirceno 25 mg/kg; TEA + MC25 - tetraetilamônio 8 mg/kg (Sigma-Aldrich®, St.Louis, EUA) + mirceno 25 mg/kg. Os tratamentos com salina ou mirceno tiveram a administração das drogas por via oral.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUSSÍGENA DO MIRCENO ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA

A atividade antitussígena foi investigada conforme o protocolo descrito anteriormente. No entanto, a administração dos controles ou do mirceno foi por via inalatória por meio de um nebulizador, no qual cada camundongo, individualmente, foi colocado em câmara de vidro com volume de 500 mL exposto ao tratamento por um tempo de 3 min, conforme protocolo adaptado de Wagner *et al.* (2024). Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: Controle positivo (CP) - ambroxol 7,5 mg/mL (Prati Donaduzzi, Brasil); Controle negativo (CN) – solução salina de NaCl 0,9%; mirceno nas doses 0,85, 2,5 ou 7,5 mg/mL; nanoemulsão contendo mirceno nas doses 0,85, 2,5 ou 7,5 mg/mL; nanoemulsão vazia.

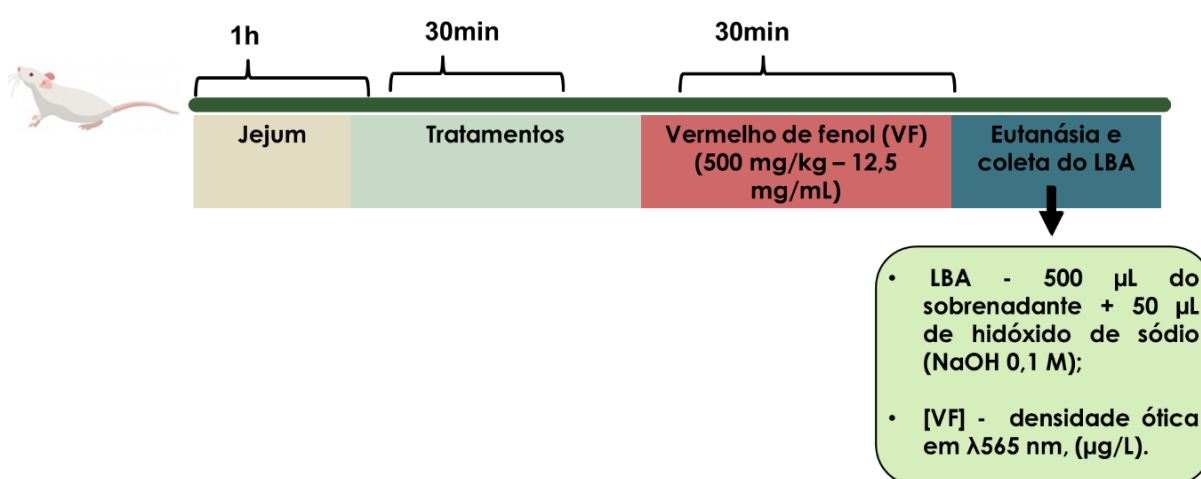
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EXPECTORANTE EM CAMUNDONGOS

A avaliação da atividade expectorante foi realizada por meio do modelo de quantificação do vermelho de fenol (Sigma-Aldrich®, St.Louis, EUA) em traqueia de camundongos, como padronizado por Menezes *et al.* (2019). Neste, os animais ficaram 2 horas para adaptação no local de experimentação, no qual tiveram água e ração à vontade até 1 ou 4 horas do procedimento experimental. Em seguida, foram divididos nos seguintes

grupos: Controle positivo (CP) - ambroxol 120 mg/kg – via oral; Controle negativo (CN) – solução salina de NaCl 0,9%; mirceno nas doses 8,5, 25 ou 75 mg/kg; nanoemulsão contendo mirceno nas doses 8,5, 25 ou 75 mg/kg.

Os animais foram pré-tratados via oral após o período de jejum, de acordo com os grupos correspondentes. Após 30 minutos do tratamento, houve administração de suspensão de vermelho de fenol (500 mg/kg – 12,5 mg/mL) por via intraperitoneal. Em seguida, após um período de 30 minutos, os animais foram com dose letal de tiopental sódico 160 mg/kg via intraperitoneal. O lavado bronco alveolar (LBA) foi obtido com 2 mL de NaCl (0.9 %), recuperando cerca de 1 mL de LBA. Deste total recuperado, 600 µL foram postos em recipiente para rotação a 2500 rpm por 10 minutos; 500 µL do sobrenadante foram transferidos para outro recipiente, no qual foram adicionados 50 µL de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) (**Figura 5**).

Figura 5 - Protocolo de atividade expectorante em camundongos.



A figura ilustra o protocolo de atividade expectorante em camundongos.

Fonte: Próprio autor.

A concentração do vermelho de fenol foi mensurada em Espectrofotômetro UV-VIS por densidade ótica em comprimento de onda de 565 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{g/L}$. O parâmetro de linearidade da espectrofotometria foi avaliado medindo-se a relação entre a absorbância e a concentração de vermelho de fenol, onde Y é a absorbância (AU) e X é a concentração ($\mu\text{g/mL}$) de vermelho de fenol (Menezes *et al.*, 2019). A linha de regressão da resposta espectrofotométrica foi obtida como a equação abaixo (Dong *et al.*, 2022).

Equação (1): $Y = 0,174x + 0,0168$ ($R^2 = 0,999$).

3.8.1 Avaliação da via do cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (NKCC) no efeito expectorante do mirceno

A via do NKCC foi investigada utilizando 4 mg/kg de furosemida, um inibidor do NKCC, que foi administrado por via intraperitoneal 60 minutos antes do MC 25 mg/kg (Wang *et al.*, 2011). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Salina (NaCl 0,9%, p/v); mirceno 25 mg/kg; e FURO + MC25 (furosemida 4 mg/kg + mirceno 25 mg/kg).

3.8.2 Avaliação da via colinérgica no efeito expectorante do mirceno

A via colinérgica foi investigada utilizando atropina 1 mg/kg, um anticolinérgico não específico, que foi administrado por via intramuscular 15 minutos antes do MC 25 mg/kg (Nakajima *et al.*, 2023). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Salina (NaCl 0,9%, p/v); MC 25 mg/kg; e ATROP + MC25 (atropina 1 mg/kg + mirceno 25 mg/kg).

3.8.3 Avaliação da via adrenérgica no efeito expectorante do mirceno

O envolvimento da via adrenérgica no efeito expectorante do mirceno foi investigado utilizando propranolol 25 mg/kg, um antagonista dos receptores beta-adrenérgicos, que foi administrado por via oral 30 minutos antes do MC 25 mg/kg (Zhou *et al.*, 2014). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Salina (NaCl 0,9%, p/v); MC 25 mg/kg; e PROP + MC25 (propranolol 25 mg/kg + mirceno 25 mg/kg).

3.8.4 Avaliação do envolvimento de mediadores inflamatórios no efeito expectorante do mirceno

O envolvimento das ciclo-oxigenases no efeito expectorante do mirceno foi investigado utilizando indometacina 8 mg/kg, um inibidor não específico da enzima ciclo-oxigenase (COX), que foi administrado intraperitonealmente 60 minutos antes do MC 25 mg/kg [37]. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Salina (NaCl 0,9%, p/v); MC 25 mg/kg; e IND + MC25 (indometacina 8 mg/kg + mirceno 25 mg/kg).

3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EXPECTORANTE DO MIRCENO ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA

A atividade expectorante foi investigada conforme o protocolo descrito anteriormente. No entanto, a administração dos controles e do mirceno foi por via inalatória por meio de um

nebulizador, no qual cada camundongo, individualmente, foi colocado em câmara de vidro com volume de 500 mL exposto ao tratamento por um tempo de 3 min, conforme protocolo adaptado de Wagner *et al.* (2024). Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: Controle positivo (CP) - ambroxol 7,5 mg/mL; Controle negativo (CN) – solução salina de NaCl 0,9%; mirreno nas doses 0,85, 2,5 ou 7,5 mg/mL; nanoemulsão contendo mirreno nas doses 0,85, 2,5 ou 7,5 mg/mL; nanoemulsão vazia.

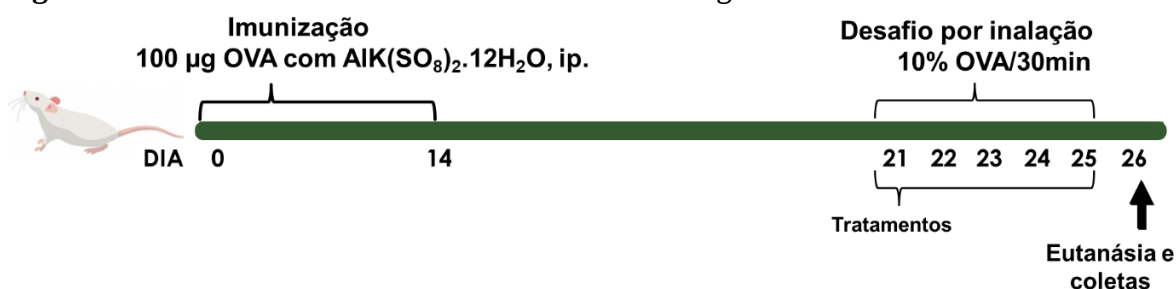
Em seguida, 30 minutos após a nebulização, foi administrado vermelho de fenol (500 mg/kg – 12,5 mg/mL) por via intraperitoneal e o protocolo de avaliação da atividade expectorante foi realizado conforme descrito anteriormente.

3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIASMÁTICA EM CAMUNDONGOS

O desenvolvimento do modelo experimental de asma foi realizado de acordo com o estabelecido com Vasconcelos *et al.* (2008). Camundongos foram imunizados com 100 µg de ovalbumina misturada em 200 µL de sulfato de alumínio e potássio ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a 10% em tampão salina fosfato (PBS), por via intraperitoneal, no dia 0 e o procedimento repetido no dia 14. No dia 21 após a primeira imunização, os animais foram desafiados por inalação de uma solução de 10% ovalbumina (Sigma-Aldrich®, St.Louis, EUA) em solução salina aerossolizada, durante 15 minutos por 5 dias consecutivos (**Figura 6**).

Uma hora antes de cada inalação, os camundongos, divididos em grupos de 6 animais, foram tratados por via oral com mirreno (8,5, 25 ou 75 mg/kg), com a formulação contendo o monoterpeno β-mirreno, ou por via intraperitoneal com dexametasona 10 mg/kg (controle positivo) (Hypolabor, Brasil), salina ou nanoemulsão vazia como controle negativo. Foi mantido um grupo controle de animais que não foram imunizados por OVA, mas que receberam apenas a solução salina via intraperitoneal e também desafiados por inalação com solução salina, para comparação dos parâmetros basais.

Figura 6 - Protocolo do modelo de asma em camundongos.



A figura ilustra o protocolo experimental do modelo de asma em camundongos.

Fonte: Próprio autor.

Os camundongos foram eutanasiados por injeção letal de tiopental sódico por via intraperitoneal (80 mg/kg). Posteriormente, um volume de 1 a 2 mL de PBS gelado foi injetado na traqueia e o líquido recuperado, lavado broncoalveolar (LBA), foi utilizado para contagem de células.

3.11 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados numéricos obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($X \pm$ EPM) ou mediana e 1º e 3º interquartis com n representando o número de animais utilizados ou experimentos realizados em um dado protocolo. Os dados obtidos dos registros dos experimentos em traqueia isolada de rato foram plotados em curvas concentração-resposta e estas ajustadas por regressão não-linear no *software* Prism 8 for Windows (*GraphPad Software Inc.*), para obtenção do valor de $E_{\text{máx}}$ (valor médio, em porcentagem, do efeito máximo obtido pela substância em relação ao maior valor possível num dado tecido) servindo como parâmetro de eficácia relativa de duas amostras.

Diferenças entre as médias ou mediana foram comparadas estatisticamente usando o teste t de Student não-pareado, análise de variância (ANOVA *one-way*) com pós-teste de Dunnet ou Tukey, no caso de dados paramétricos ou teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn, para dados não paramétricos. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Prism 8 for Windows, sendo as diferenças consideradas significativas quando o valor calculado de p for menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DA GOTA DA NANOEMULSÃO

As emulsões obtidas apresentaram uma variação da aparência visual entre as dispersões fluidas nanoemulsionadas de ligeiramente turvo com reflexo azulado a dispersão opaca, de modo a refletir a fase dispersa formada em cada formulação coloidal. Das 5 (cinco) formulações analisadas, a formulação “F4”, obtida a partir dos componentes monooleato de polioxietileno-20 sorbitano - SML20 (10%), triglicerídeos de cadeia média - MCT (5%), Mirceno - MC (5%) e solução tampão fosfato - PBS (80%), foi a que apresentou os melhores

resultados para os parâmetros tamanho, 97,37 ($\pm$ 5,844) nm, e distribuição da frequência de tamanho representada pelo índice de polidispersão (IPd), 0,2387 ($\pm$ 0,01810) (**Tabela 2**). Esta, portanto, foi a formulação escolhida para a realização dos experimentos farmacológicos.

Tabela 2: Tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão de formulações de nanoemulsões (média $\pm$ EPM, n = 3).

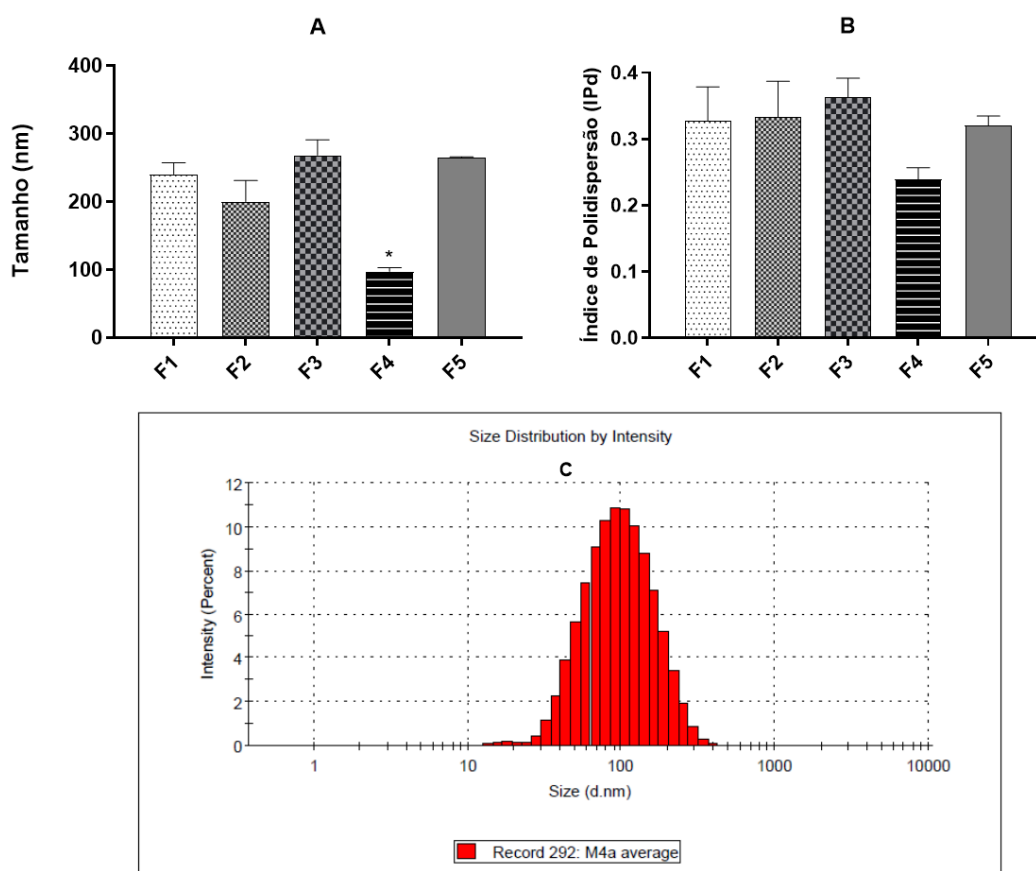
NE	Tamanho (nm)	IPd
F1	240,5 ($\pm$ 16,75)	0,3273 ($\pm$ 0,05149)
F2	200,2 ($\pm$ 30,98)	0,3333 ($\pm$ 0,05399)
F3	268,6 ($\pm$ 22,46)	0,3627 ($\pm$ 0,02913)
F4	97,37 ($\pm$ 5,844) ^a	0,2387 ($\pm$ 0,01810) ^b
F5	264.5 ($\pm$ 1.17)	0.321 ($\pm$ 0.014)

Tabela mostra os parâmetros tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico) e o índice de polidispersão (IPd) das formulações (média $\pm$ SEM, n = 3). ^a Significativo para $p < 0,05$ (ANOVA One-Way , seguido de teste de Tukey: F4 vs F1, F2, F3, F5), em relação ao tamanho. ^b Significativo para $p < 0,05$ (ANOVA One-Way , seguido de teste de Tukey: F4 vs F1, F2, F3, F5), em relação ao IPd.

Fonte: Próprio autor.

As demais formulações apresentaram um tamanho maior do que 200 nm e IPd maior que 0.23 (**Figura 7**). Em relação ao diâmetro médio das gotículas, houve diferença significativa quando F4 foi comparada com as outras formulações (**Figura 7 - A**) ($p < 0,05$). Porém, em relação ao IPd, não houve diferença significativa (**Figura 7 - B**).

Figura 7 - Tamanho e índice de polidispersão das gotículas.



Os gráficos representam o A) Diâmetro médio das gotículas, B) Índice de Polidispersão e C) tamanho e distribuição da frequência de tamanho da formulação 4. F1, formulação 1; F2, formulação 2; F3, formulação 3; F4, formulação 4; F5, formulação 5. * $p < 0,05$ (ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey: F4 vs F1, F2, F3, F5). Dados expressos como média $\pm$ EPM.

Fonte: Próprio autor.

4.2 TOXICIDADE AGUDA DA NANOEMULSÃO CONTENDO MIRCENO

Os estudos de toxicidade aguda por via oral demonstraram que a nanoemulsão vazia (NEV) ou nanoemulsão contendo mirceno (NEMC), administradas em dose única de 2000 mg/kg, não causaram mortalidade nas 24h seguintes à exposição.

Os animais não apresentaram sinais clínicos de letargia, nem mostraram diferença significativa quanto ao peso corporal (NEV: 26.62 ± 0.28 g; NEMC: 26.32 ± 0.35 g), consumo de alimento (NEV: 5.72 ± 0.33 g; NEMC: 6.63 ± 0.30 g) ou consumo de água (NEV: 12.76 ± 1.51 mL; NEMC: 10.38 ± 0.97 mL).

A necropsia não revelou alterações macroscópicas significativas. Além disso, não houve diferença significativa entre os pesos dos órgãos dos animais que receberam o veículo (NEV) e os que receberam NEMC (**Tabela 3**).

Tabela 3: Avaliação do peso dos órgãos.

ÓRGÃOS	NEV (g/100g)	NEMC (g/100g)
Coração	0.57 ± 0.0	0.47 ± 0.0
Pulmão	0.81 ± 0.1	0.69 ± 0.0
Fígado	5.4 ± 0.3	0.53 ± 0,2
Rim	1.3 ± 0.0	1.25 ± 0.0
Baço	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.2
Estômago	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.0

Tabela mostra o peso dos órgãos (coração, pulmão, fígado, rim, baço e estômago) em relação ao peso corpóreo final (g/100g). Análise estatística por Teste t não pareado. Dados expressos como média ± erro padrão da média (EPM), com n = 3.

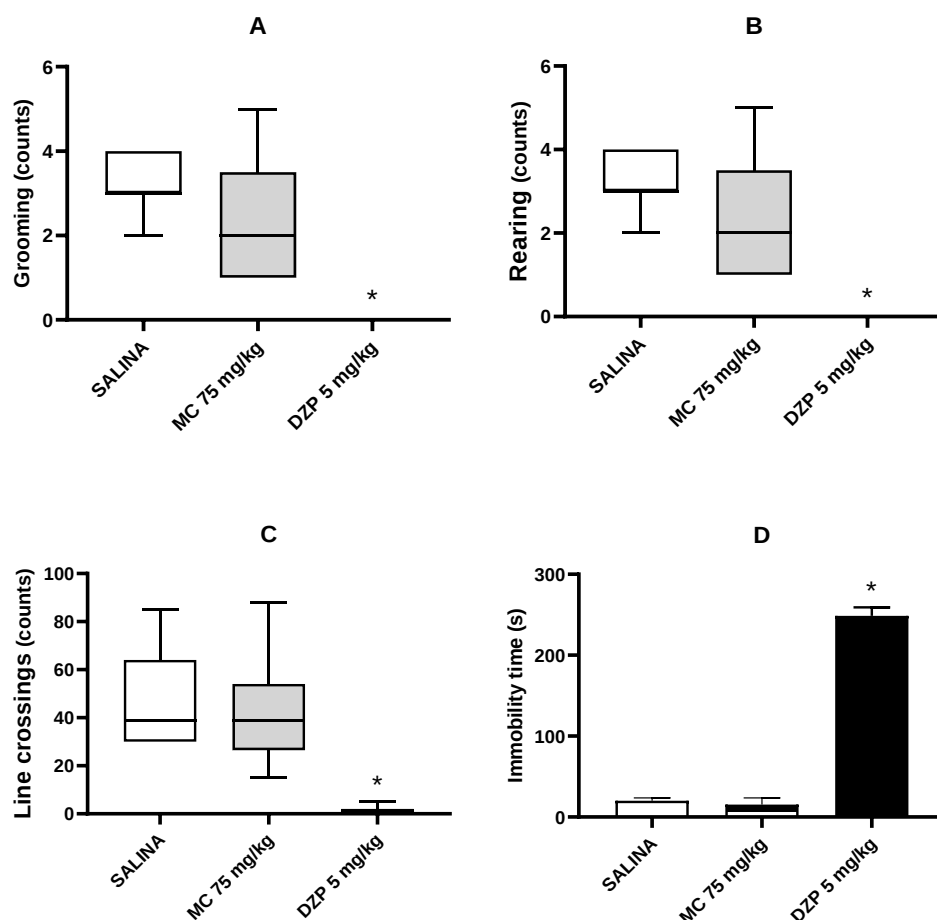
Fonte: Próprio autor.

4.3 TESTE CAMPO ABERTO

O mirceno foi testado em camundongos na maior dose com efeito farmacológico nesse trabalho (75 mg/kg) para avaliar seus efeitos sobre a coordenação motora e o comportamento no teste de campo aberto. Neste teste, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado com mirceno e o grupo salina em relação aos parâmetros de *grooming* [2,0 (1,0-3,5) vs. 3,0 (3,0-4,0)], *rearing* [2,0 (1,0-5,0) vs. 3,0 (3,0-4,0)], *line crossings* [39,0 (26,5-88,0) vs. 39,0 (30,0-85,0)], ou *immobility time* (15,29 ± 8,23 s vs. 20,21 ± 3,40 s). Portanto, o mirceno na dose de 75 mg/kg não afetou a coordenação motora, a ansiedade ou o comportamento exploratório dos camundongos neste teste (**Figura 8**).

Por outro lado, o grupo tratado com diazepam (5 mg/kg) apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo salina em termos de *grooming* [0,0 (0,0-0,0) vs. 1,5 (3,0-4,0)], *rearing* [0,0 (0,0-0,0) vs. 3,0 (3,0-4,0)], *line crossings* [1,0 (0,0-5,0) vs. 39,0 (30,0-85,0)], e *immobility time* (248,7 ± 10,43 s), demonstrando seu efeito sobre a atividade motora e o comportamento do animal.

Figura 8 – Efeito da administração oral de MC 75 mg/kg na coordenação motora de camundongos.

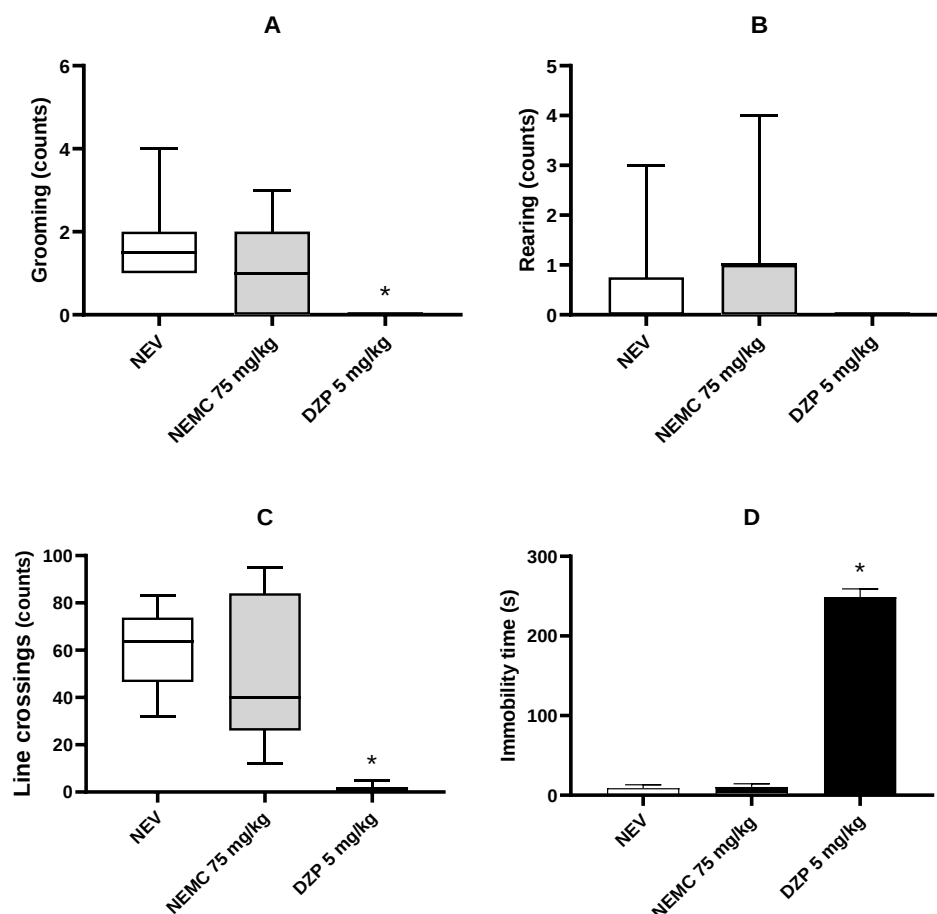


O gráfico ilustra o efeito do mirceno (75 mg/kg) na coordenação motora, avaliado pela quantificação dos seguintes comportamentos: A) *grooming*; B) *rearing*; C) *line crossings*; e D) *immobility time* em segundos. * $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn: SALINA vs DZP 5 mg/kg). Dados expressos como mediana e valores de 25% -75% dos percentis, para os gráficos A, B, C ou média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para o gráfico D, com $n = 6$.

Fonte: Próprio autor.

O efeito da nanoemulsão contendo mirceno (75 mg/kg) também foi avaliado sobre a coordenação motora e comportamental no teste de campo aberto. Neste teste, não foram detectadas diferenças significativas entre o grupo tratado com NEMC comparado com o grupo nanoemulsão vazia para os parâmetros *grooming* [1,0 (0,0-3,0) vs. 1,5 (1,0-4,0)], *rearing* [1,0 (0,0-4,0) vs. 0,0 (0,0-3,0)], *line crossings* [40,0 (26,0-95,0) vs. 63,5 (46,5-83,0)], ou *immobility time* ($10,40 \pm 4,03$ s vs $8,76 \pm 4,30$ s). Dessa forma, os resultados mostram que a nanoemulsão contendo mirceno 75 mg/kg não afetou a coordenação motora ou o comportamento exploratório dos camundongos (**Figura 9**).

Figura 9 – Efeito da administração oral de NEMC 75 mg/kg na coordenação motora de camundongos.



O gráfico representa o efeito da nanoemulsão contendo mirrceno 75 mg/kg, na coordenação motora, observados por meio da contagem dos comportamentos de A) *grooming*; B) *rearing*; C) *line crossings*; e D) *immobility time* em segundos. NEMC 75 mg/kg, nanoemulsão contendo mirrceno 75 mg/kg; DZP 5 mg/kg, diazepam 5 mg/kg. *p < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn: SALINA vs DZP 5 mg/kg). Dados expressos como mediana e valores de 25% -75% dos percentis, para os gráficos A, B, C ou média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para o gráfico D, com n = 6.

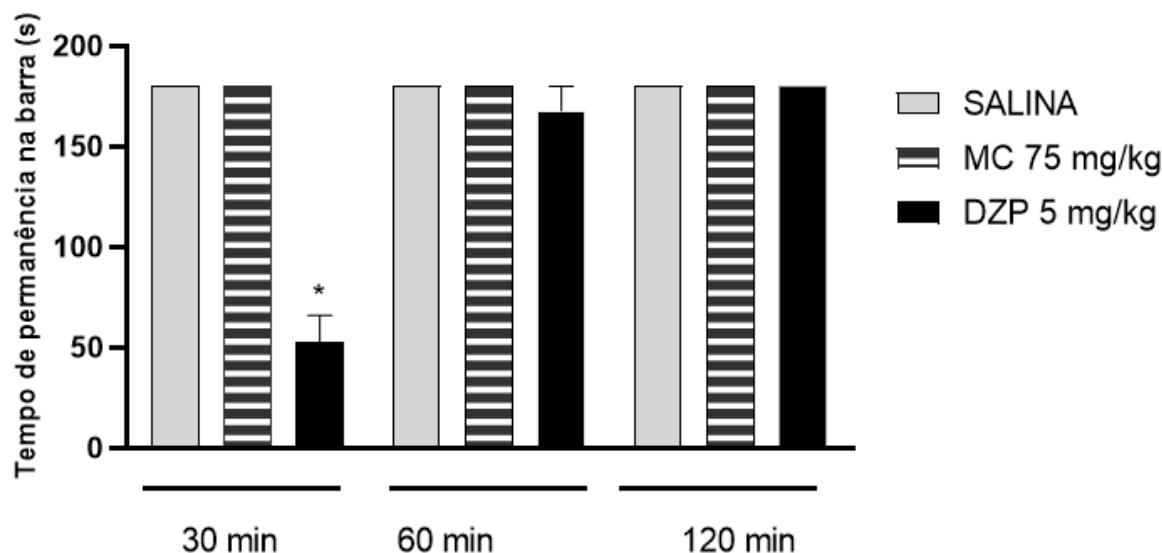
Fonte: Próprio autor.

4.4 TESTE DE ROTAROD

Nenhuma alteração significativa foi observada no tempo gasto no rota-rod pelo grupo de animais tratados com MC (75 mg/kg) durante os períodos de avaliação de 30 minutos ($180,0 \pm 0,0$), 60 minutos ($180,0 \pm 0,0$) ou 120 minutos ($180,0 \pm 0,0$), em comparação com o grupo salina nos mesmos períodos de avaliação: 30 minutos ($180,0 \pm 0,0$), 60 minutos ($180,0 \pm 0,0$) ou 120 minutos ($180,0 \pm 0,0$) (**Figura 10**). Em contraste, o grupo DZP (diazepam 5 mg/kg) apresentou uma diferença significativa em comparação com o grupo salina, reduzindo o tempo gasto no rota-rod no intervalo de 30 minutos ($52,57 \pm 13,47$, p < 0,05), mas não

foram observadas diferenças significativas em 60 minutos ($167,9 \pm 12,14$) ou 120 minutos ($180,0 \pm 0,0$).

Figura 10 – Efeito da administração oral de MC 75 mg/kg no comportamento de camundongos.

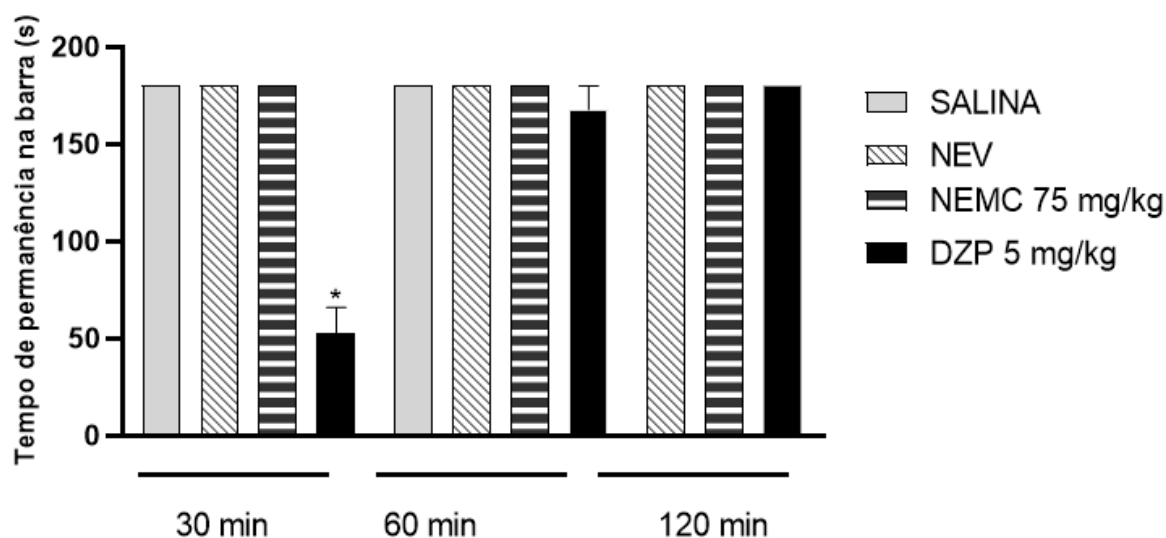


O gráfico representa o tempo (em segundos) que os animais permaneceram no rota-rod. SALINA, NaCl 0,9%; MC 75 mg/kg, mirceno 75 mg/kg; DZP 5 mg/kg, diazepam 5 mg/kg. * $p < 0,05$ (ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Dunnett, SALINA vs DZP 5 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 6$.

Fonte: Próprio autor.

Nenhuma alteração significativa foi observada no tempo gasto no rotarod pelo grupo de animais tratados com NEMC (75 mg/kg) durante os períodos de avaliação de 30 minutos ($180,0 \pm 0,0$), 60 minutos ($180,0 \pm 0,0$) ou 120 minutos ($180,0 \pm 0,0$), em comparação com o grupo NEV nos mesmos períodos de avaliação: 30 minutos ($180,0 \pm 0,0$), 60 minutos ($180,0 \pm 0,0$) ou 120 minutos ($180,0 \pm 0,0$) (**Figura 11**).

Figura 11 – Efeito da administração oral de NEMC 75 mg/kg no comportamento de camundongos.



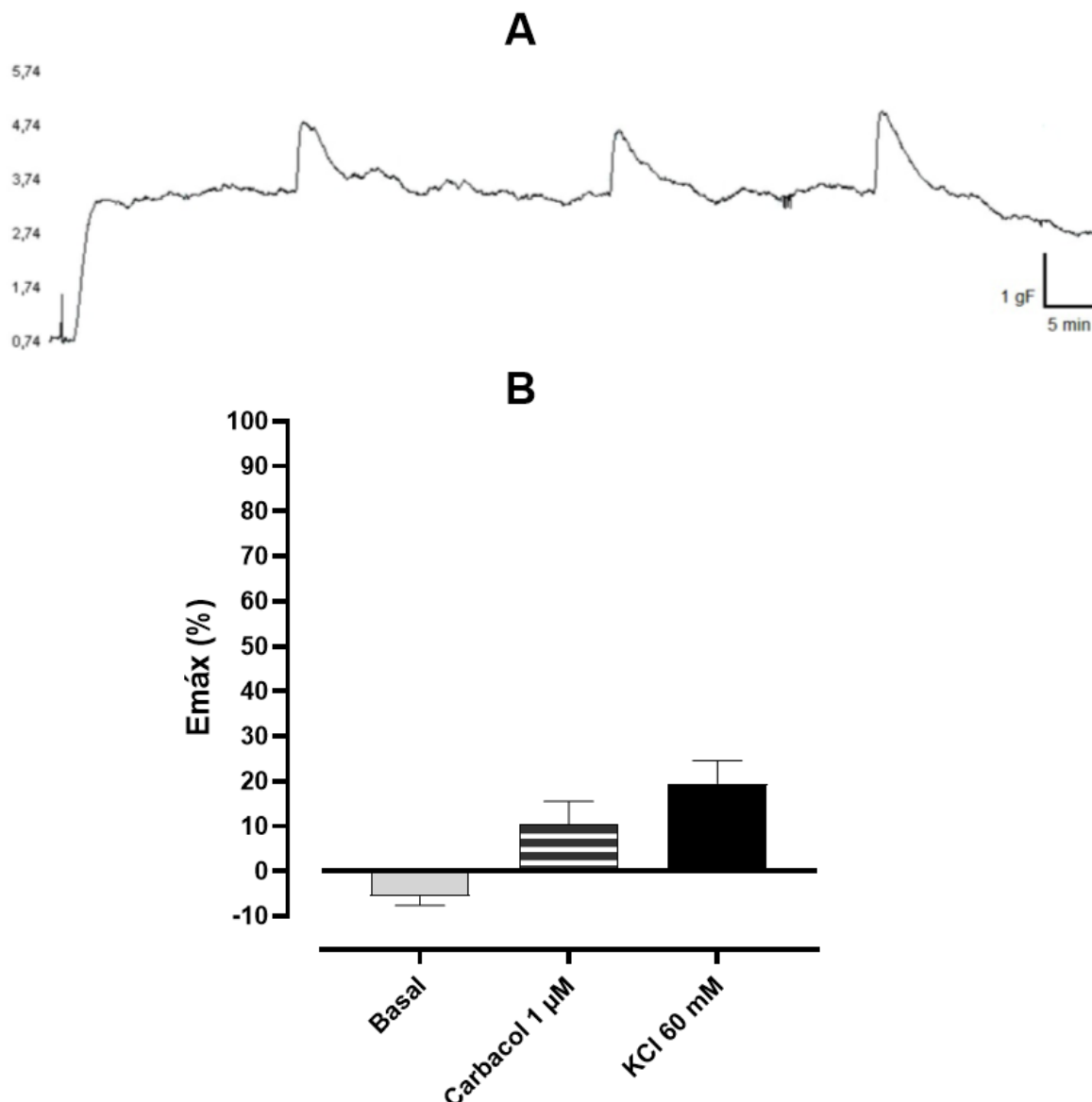
O gráfico representa o tempo (em segundos) que os animais permaneceram no rota-rod. SALINA, solução de NaCl 0,9%; NEV: nanoemulsão vazia; NEMC 75 mg/kg: nanoemulsão contendo mirceno 75 mg/kg; DZP 5 mg/kg: diazepam 5 mg/kg. * $p < 0,05$ (ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Dunnett, SALINA vs DZP 5 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 6$.

Fonte: Próprio autor.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RELAXANTE DO MIRCENO EM MÚSCULO LISO DE TRAQUEIA ISOLADA DE RATO

O mirceno exibiu um pequeno efeito relaxante sobre o músculo liso de traqueia isolado de rato pré-contráido com carbacol (CCh) ou cloreto de potássio (KCl), com efeito máximo (Emáx) de relaxamento de $10,41 \pm 5,11\%$ e $19,48 \pm 5,12\%$, respectivamente (**Figura 12**). Na ausência de um agente contrátil, o efeito do mirceno na atividade basal do músculo liso da traqueia foi de $-5,59 \pm 1,99\%$.

Figura 12 – Atividade espasmolítica do mirceno em músculo liso de traqueia isolada de rato.



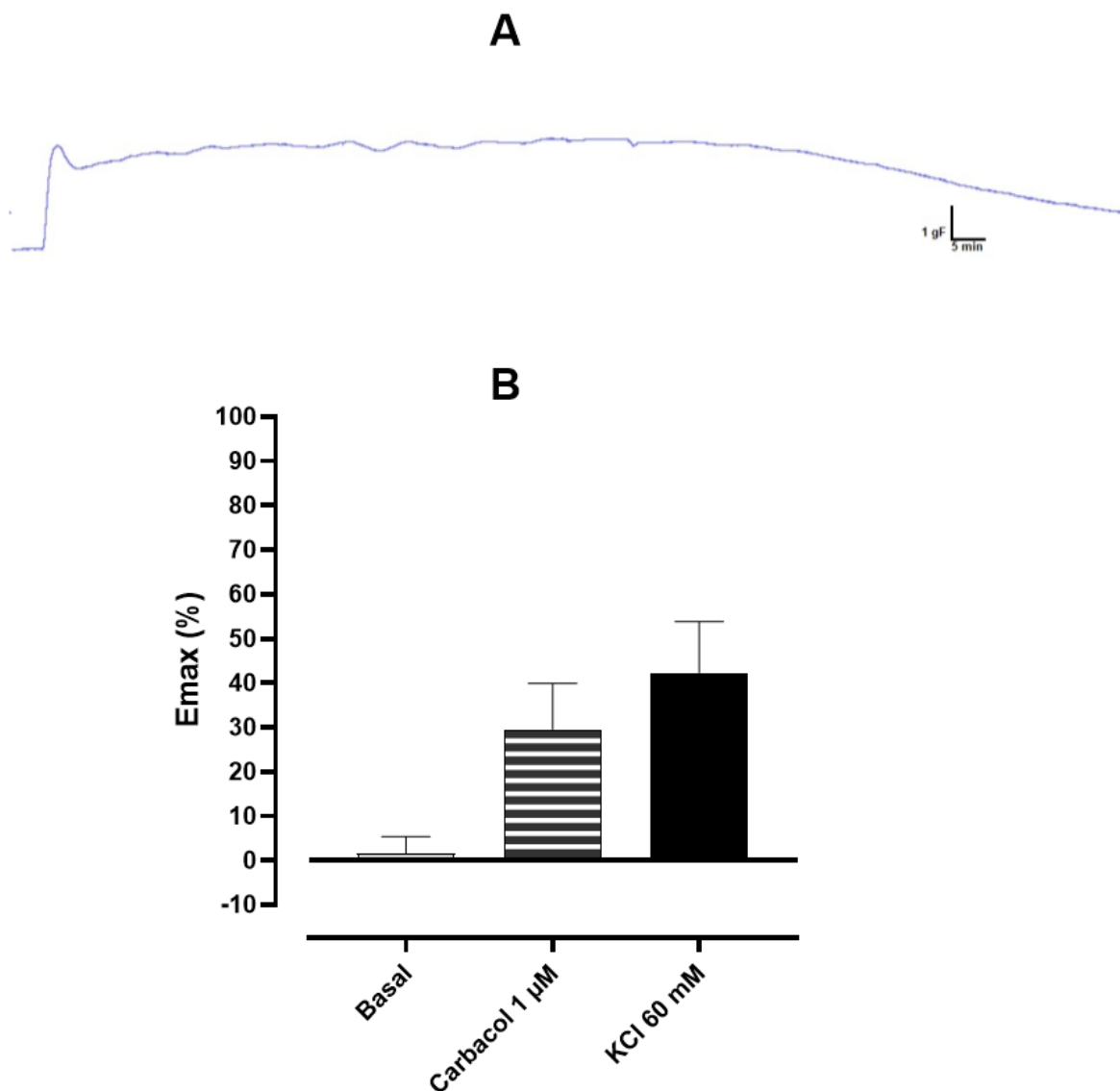
O gráfico ilustra o efeito relaxante do mirceno em músculo liso de traqueia isolada de rato. A) Efeito do mirceno na contração induzida por carbacol (CCh). B) Efeito máximo (%) do mirceno no tônus basal, sob contração induzida por carbacol (CCh) ou cloreto de potássio (KCl). Análise estatística utilizando Teste t não pareado. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$.

Fonte: Próprio autor.

A nanoemulsão contendo mirceno em concentração igual a 10^{-3} M também exibiu um pequeno efeito relaxante sobre o músculo liso de traqueia isolada de rato pré-contraído com carbacol (CCh) ou cloreto de potássio (KCl), com porcentagens máximas de relaxamento de $29,60 \pm 10,31\%$ e $42,31 \pm 11,54\%$, respectivamente (**Figura 13**). O efeito da nanoemulsão

contendo mirceno na atividade basal do músculo liso traqueal, na ausência de um agente contrátil, foi de $1,62 \pm 3,77\%$.

Figura 13 – Atividade espasmolítica da nanoemulsão contendo mirceno em músculo liso de traqueia isolada de rato.



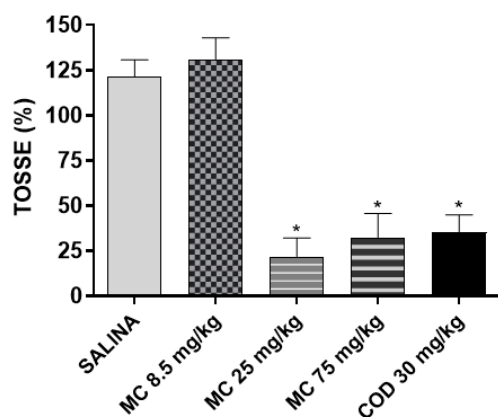
O gráfico ilustra o efeito relaxante da nanoemulsão contendo mirceno em músculo liso de traqueia isolada de rato. A) Efeito da nanoemulsão contendo mirceno na contração induzida por carbacol (CCh). B) Efeito máximo (%) da nanoemulsão contendo mirceno no tônus basal, sob contração induzida por carbacol (CCh) ou cloreto de potássio (KCl). Análise estatística utilizando Teste t não pareado. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$.

Fonte: Póprio Próprio autor.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUSSÍGENA EM CAMUNDONGOS

O efeito de MC nas doses de 8,5, 25 ou 75 mg/kg administrado por via oral na tosse induzida por ácido cítrico em camundongos é demonstrado na **Figura 14**. A administração de MC na dose de 8,5 mg/kg não exibiu efeito antitussígeno, pois manteve o percentual de tosse elevado ($131,1 \pm 11,80\%$) e sem diferença significativa em relação ao controle negativo que recebeu apenas salina como tratamento ($121,1 \pm 9,44\%$). Em contraste, a administração de MC nas doses de 25 ou 75 mg/kg mostrou um efeito antitussígeno significativo, evidenciado pela redução na frequência de tosse para $21,83 \pm 10,19\%$ e $32,37 \pm 13,31\%$, respectivamente ($p < 0,05$, Figura 9). O controle positivo, codeína, na dose de 30 mg/kg, demonstrou efeito antitussígeno e reduziu a frequência de tosse para $35,39 \pm 9,57\%$, com diferença significativa comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Figura 14 – Efeito antitussígeno do MC em camundongos.

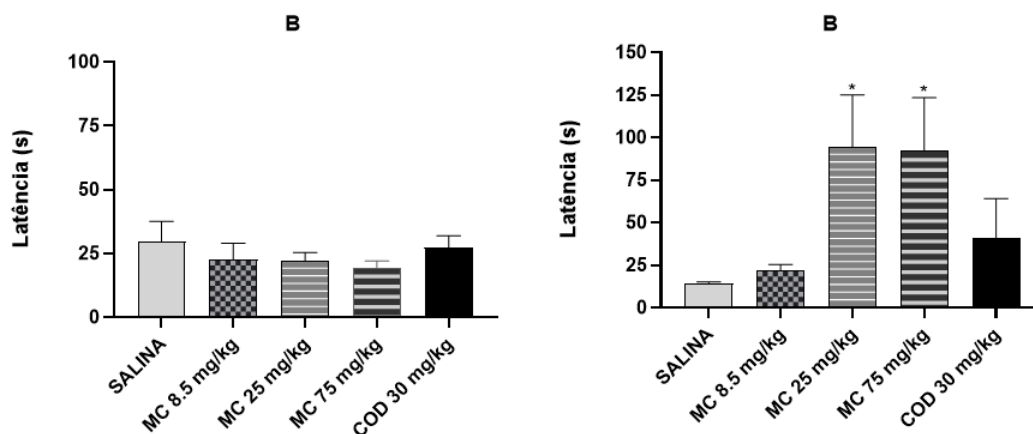


O gráfico ilustra a frequência de tosse (%) em animais expostos ao ácido cítrico (0,4 M). SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 8,5 mg/kg, mirceno 8,5 mg/kg; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC 75 mg/kg, mirceno 75 mg/kg; COD 30 mg/kg, codeína 30 mg/kg. * $p < 0,05$ (ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Dunnett, SALINA vs MC 25 mg/kg, MC 75 mg/kg, COD 30 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

Na análise da latência da tosse no dia de triagem, quando os animais não receberam tratamento, não houve diferença estatística entre as latências dos grupos (**Figura 15-A**). No entanto, no segundo dia, os animais que receberam MC por via oral nas doses de 25 ou 75 mg/kg resultaram em aumento do tempo, em segundos, que o animal levou para dar a primeira tosse, apresentando tempos de latência de $94,71 \pm 30,35$ e $92,14 \pm 30,35$ segundos, respectivamente, mostrando uma diferença significativa em comparação com o grupo salina ($p < 0,05$) (**Figura 15-B**).

Figura 15 – Latência do tempo para tosse em camundongos.

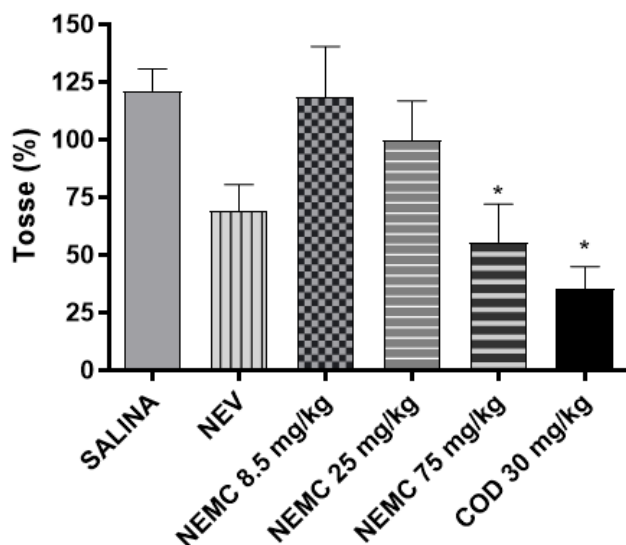


Gráficos representam tratamento versus latência de tosse por 3 minutos (180 segundos), sendo **A)** latência da tosse avaliada no dia da triagem e **B)** latência da tosse avaliada após os tratamentos. SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 8,5 mg/kg, mirceno 8,5 mg/kg; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC 75 mg/kg, mirceno 75 mg/kg; COD 30 mg/kg, codeína 30 mg/kg. * $p < 0,05$ (Teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn: Salina vs MC 25 mg/kg, MC 75 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

Em relação ao efeito da nanoemulsão contendo mirceno, NEMC 75 mg/kg reduziu a tosse para $55,62 \pm 16,48\%$, mostrando diferença significativa quando comparada com a frequência de tosse do grupo salina ($121,2 \pm 9,41\%$). Entretanto, ao comparar o percentual de tosse observado após a administração das nanoemulsões contendo mirceno 8,5 ou 25 mg/kg ($118,2 \pm 22,17\%$ e $55,62 \pm 16,48\%$, respectivamente) com o controle negativo da formulação, nanoemulsão vazia ($68,87 \pm 11,62\%$) ou o controle negativo para o modelo de tosse, solução salina de NaCl (0,9%), não houve diferença significativa (**Figura 16**).

Figura 16 – Efeito antitussígeno da nanoemulsão contendo mirceno em camundongos.

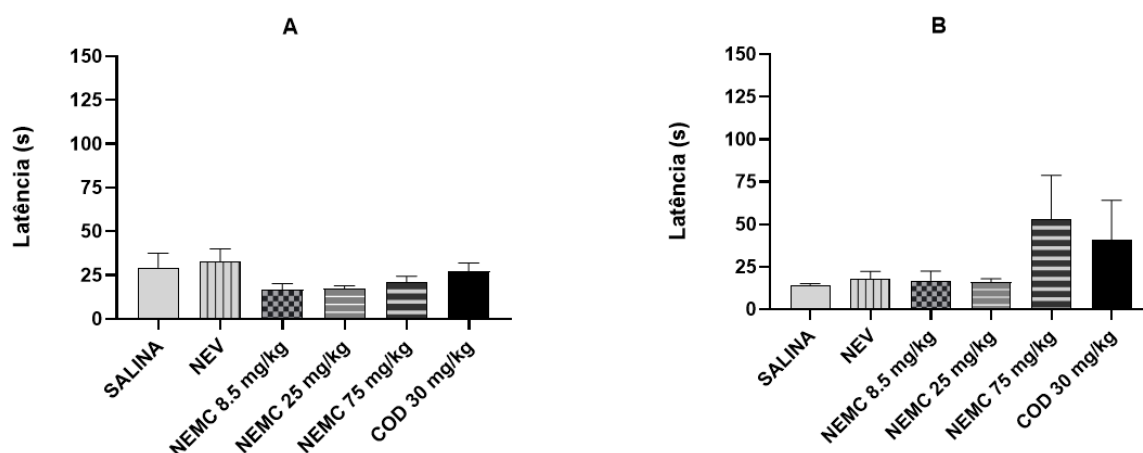


O gráfico ilustra a frequência de tosse (%) em animais expostos ao ácido cítrico (0,4 M). SALINA, solução de NaCl 0,9%; NEV, nanoemulsão contendo mirceno; NEMC 8,5 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 8,5 mg/kg; NEMC 25 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 25 mg/kg; NEMC 75 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 75 mg/kg. * $p < 0,05$ (ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Dunnett, SALINA vs NEMC 75 mg/kg, COD 30 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

Na análise da latência da tosse no dia de triagem, quando os animais não receberam tratamento, ou no segundo dia, após os tratamentos com nanoemulsão contendo mirceno ou nanoemulsão vazia, não houve diferença estatística entre as latências dos grupos (**Figura 17**).

Figura 17 – Latência do tempo para tosse em camundongos.



Gráficos representam tratamento versus latência de tosse por 3 minutos (180 segundos), sendo **A**) Latência da tosse avaliada no dia da triagem e **B**) latência da tosse avaliada após os tratamentos. Salina, solução de NaCl 0,9%; NEV, nanoemulsão vazia; NEMC 8,5 mg/kg; NEMC 25 mg/kg; NEMC 75 mg/kg; NEMC 75 mg/kg; COD 30 mg/kg, codeína 30 mg/kg. Análise estatística por Teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn:

Salina or NEV vs NEMC 8,5 mg/kg, NEMC 25 mg/kg, NEMC 75 mg/kg, COD 30 mg/kg) Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

4.7 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO MIRCENO SOBRE A TOSSE EM CAMUNDONGOS

4.7.1 Avaliação do efeito da naloxona no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico

O antagonista do receptor μ -opioide, naloxona, reverteu o efeito antitussígeno do MC 25 mg/kg com diferença significativa, resultando em uma porcentagem de tosse de $68,86 \pm 14,00\%$ (Figura 18).

Figura 18 – Efeito da naloxona no efeito antitussígeno do mirceno administrado por via oral em camundongos.

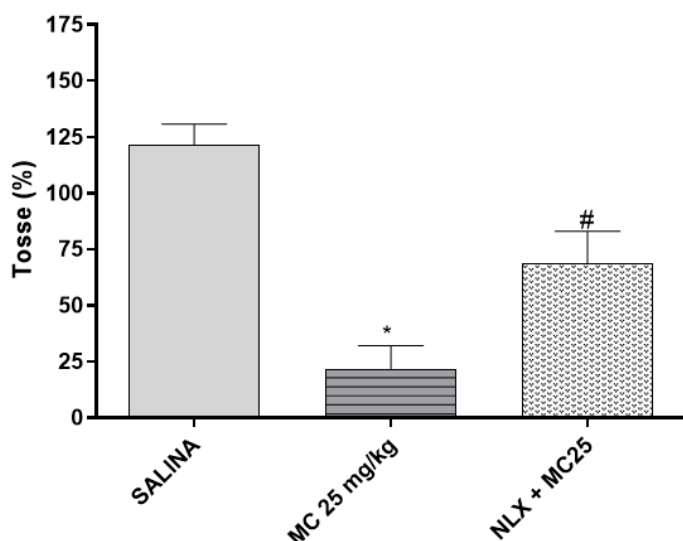


Gráfico representa a frequência de tosse (%) em animais expostos ao ácido cítrico (0,4 M). SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; NLX + MC25, naloxona 0,4 mg/kg + mirceno 25 mg/kg. * $p < 0,05$ (test t de Student não pareado: SALINA vs MC 25 mg/kg) e # $p < 0,05$ (test t de Student não pareado: MC 25 mg/kg vs NLX + MC25). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

4.7.2 Avaliação do efeito do flumazenil no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico

O antagonista do receptor de benzodiazepínicos, flumazenil, reverteu o efeito antitussígeno do MC 25 mg/kg, aumentando a porcentagem de tosse de $21,83 \pm 10,19\%$ para

166,00 $\pm$ 13,86%, mostrando uma diferença significativa comparada ao MC 25 mg/kg ($p < 0,05$, **Figura 19**).

Figura 19 – Efeito do flumazenil no efeito antitussígeno do mirceno administrado por via oral em camundongos.

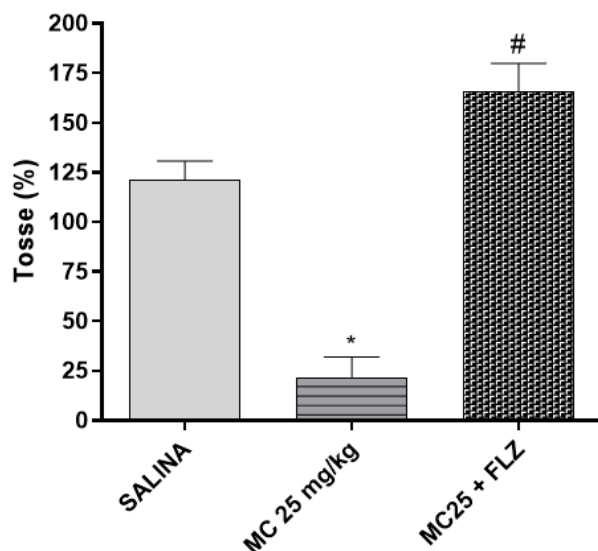


Gráfico representa a frequência de tosse (%) em animais expostos ao ácido cítrico (0,4 M). SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; FLZ + MC25, flumazenil 2,5 mg/kg + mirceno 25 mg/Kg. * $p < 0,05$ (test t de Student não pareado: SALINA vs MC 25 mg/kg) e # $p < 0,05$ (test t de Student não pareado: MC 25 mg/kg vs FLZ + MC25). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

4.7.3 Avaliação do efeito da glibenclamida no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico

Os animais tratados com glibenclamida 10 mg/kg e MC 25 mg/kg exibiram uma redução no número de tosse, equivalente a uma porcentagem de 44,19 $\pm$ 9,68%, sem diferença significativa em comparação com os animais tratados apenas com MC 25 mg/kg (21,83 $\pm$ 10,19%) (**Figura 20**).

Figura 20 – Efeito da glibenclamida no efeito antitussígeno do mirceno administrado por via oral em camundongos.

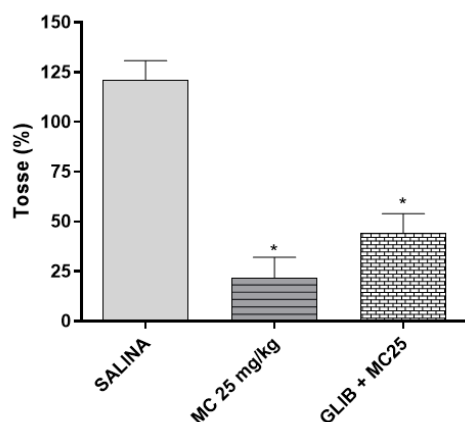


Gráfico representa a frequência de tosse (%) em animais expostos ao ácido cítrico (0,4 M). SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; GLIB + MC25, glibenclamida 10 mg/kg + mirceno 25 mg/kg. * $p < 0,05$ (test t de Student não pareado: SALINA vs MC 25 mg/kg, GLIB + MC25). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

4.7.4 Avaliação do efeito do tetraetilamônio no efeito do mirceno sobre a tosse induzida por ácido cítrico

Os animais tratados com tetraetilamônio (TEA) e MC 25 mg/kg mostraram uma reversão significativa da frequência de tosse para $79,81 \pm 17,10\%$, em comparação com os animais tratados apenas com MC 25 mg/kg ($21,83 \pm 10,19\%$) ($p < 0,05$, **Figura 21**). Esse resultado demonstra a participação da via BKCa no efeito antitussígeno do mirceno.

Figura 21 – Efeito do tetraetilamônio no efeito antitussígeno do mirceno administrado por via oral em camundongos.

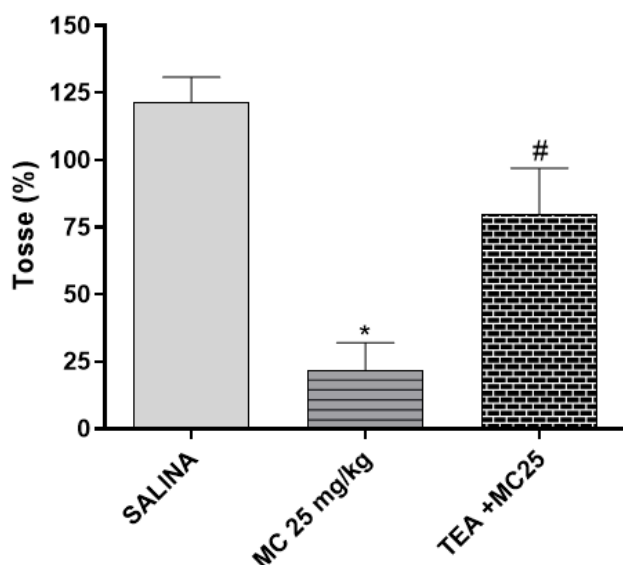


Gráfico representa a frequência de tosse (%) em animais expostos ao ácido cítrico (0,4 M). SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; GLIB + MC25, glibenclamida 10 mg/kg + mirceno 25 mg/Kg. * $p < 0,05$ (test t de Student não pareado: SALINA vs MC 25 mg/kg) e # $p < 0,05$ (test t de Student não pareado: MC 25 mg/kg vs GLIB + MC25). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUSSÍGENA DO MIRCENO ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA

Não foi observado redução significativa no percentual de tosse em nenhum grupo tratado por via inalatória (**Figura 22**).

Figura 22 – Efeito do mirceno e da nanoemulsão contendo mirceno administrados por via inalatória em camundongos.

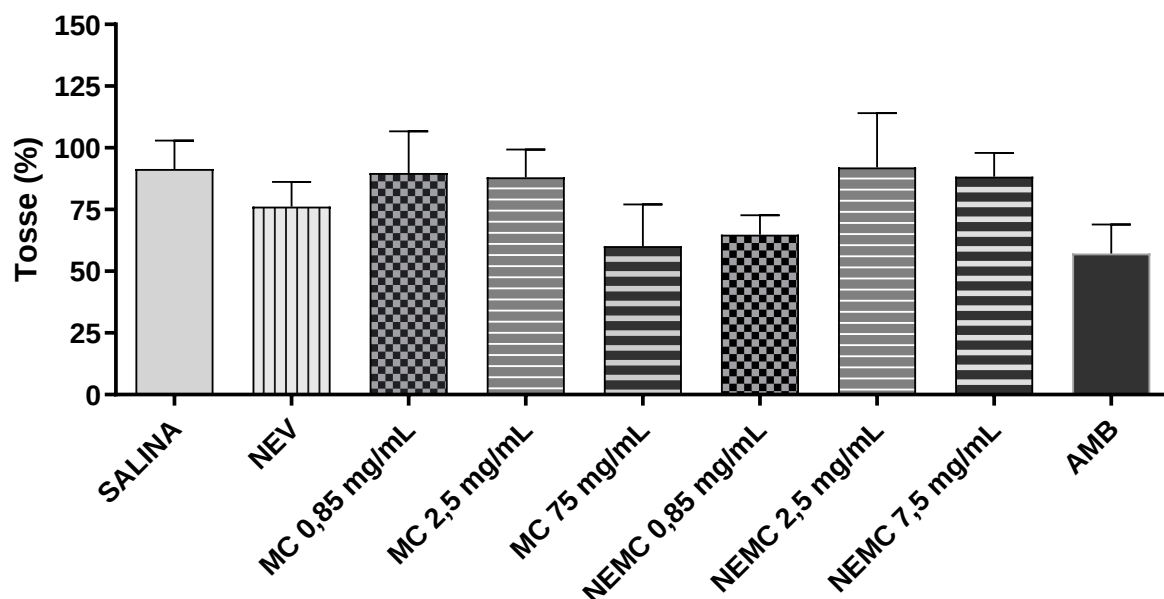
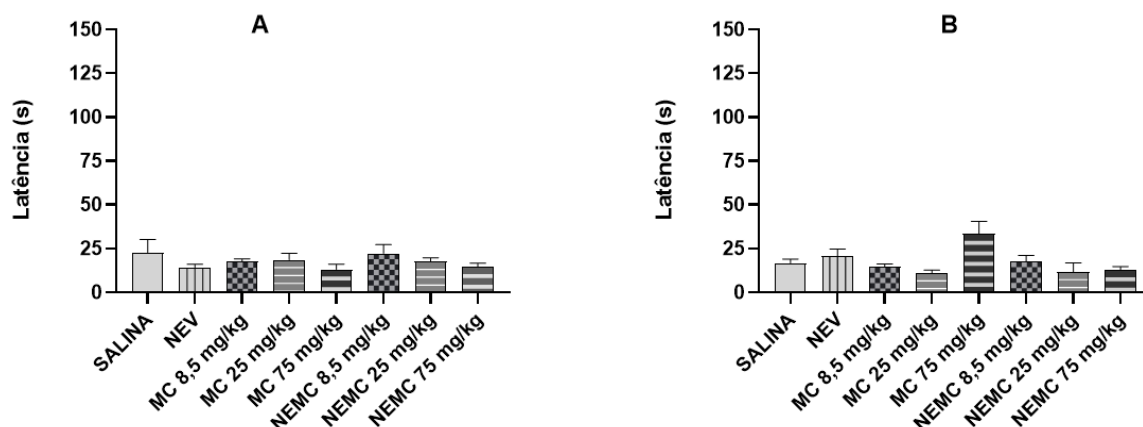


Gráfico representa a frequência de tosse (%) em animais expostos ao ácido cítrico (0,4 M). SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 0,85 mg/mL, mirceno 0,85 mg/mL; MC 2,5 mg/mL, mirceno 2,5 mg/mL; MC 7,5 mg/mL, mirceno 7,5 mg/mL; NEMC 0,85 mg/mL, nanoemulsão contendo mirceno 0,85 mg/mL; MC 2,5 mg/mL, nanoemulsão contendo mirceno 2,5 mg/mL; MC 7,5 mg/mL, nanoemulsão contendo mirceno 7,5 mg/mL; NEV, nanoemulsão vazia; AMB, ambroxol 7,5 mg/mL. Análise estatística com ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Dunnett. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

Na análise da latência da tosse no dia de triagem, quando os animais não receberam tratamento, ou no segundo dia, após os tratamentos com nanoemulsão contendo mirceno ou nanoemulsão vazia, não houve diferença estatística entre as latências dos grupos (**Figura 23**).

Figura 23 – Latência do tempo para tosse em camundongos.



Gráficos representam tratamento versus latência de tosse por 3 minutos (180 segundos), sendo **A**) latência da tosse avaliada no dia da triagem e **B**) latência da tosse avaliada após os tratamentos. Salina, solução de NaCl

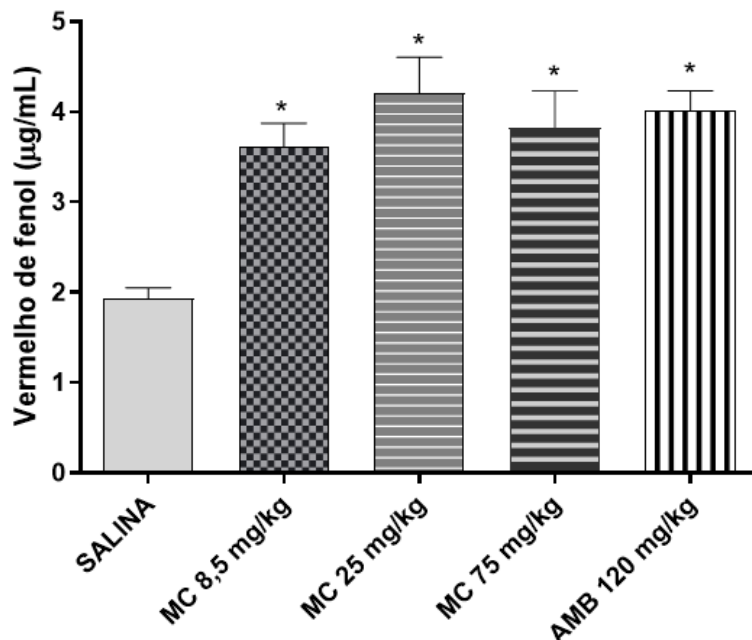
0,9%; NEV, nanoemulsão vazia; MC 8,5 mg/kg, mirceno 8,5 mg/kg; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC 75 mg/kg, mirceno 75 mg/kg; NEMC 8,5 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 8,5 mg/kg; NEMC 25 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 25 mg/kg; NEMC 75 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 75 mg/kg; COD 30 mg/kg, codeína 30 mg/kg. Análise estatística por Teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EXPECTORANTE EM CAMUNDONGOS

Neste protocolo experimental, os animais tratados com MC nas doses de 8,5, 25 ou 75 mg/kg por via oral exibiram concentrações de vermelho de fenol no lavado broncoalveolar de $3,60 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$, $4,20 \pm 0,39 \mu\text{g/mL}$ ou $3,82 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já os animais que receberam ambroxol na dose de 120 mg/kg por via oral apresentaram uma concentração de fenol vermelho no lavado de $4,01 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$. Um aumento estatisticamente significativo na atividade expectorante foi observado em todos os grupos tratados em comparação com o grupo controle negativo, que recebeu uma solução de NaCl 0,9% ($1,93 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 24**).

Figura 24 – Efeito expectorante do mirceno na secreção de fenol vermelho em camundongos tratados por via oral.

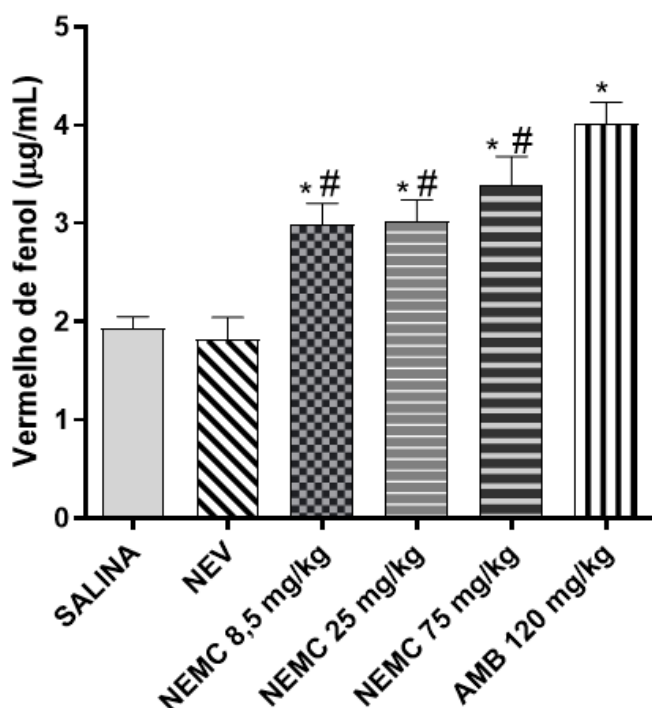


O gráfico ilustra a concentração de vermelho de fenol no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais. SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 8,5 mg/kg, mirceno 8,5 mg/kg; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC 75 mg/kg, mirceno 75 mg/kg; AMB 120 mg/kg, ambroxol 120 mg/kg. * $p < 0,05$ (ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Dunnett: SALINA vs MC 8,5, 25, 75 mg/kg, AMB 120 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$.

Fonte: Próprio autor.

Os animais que receberam NEMC nas doses de 8,5, 25 ou 75 mg/kg por via oral também exibiram concentrações de vermelho fenol no lavado broncoalveolar de $2,98 \pm 0,21$ $\mu\text{g/mL}$, $3,02 \pm 0,21$ $\mu\text{g/mL}$ ou $3,38 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses valores foram significativamente maiores do que o grupo tratado apenas com solução de NaCl 0,9% ($1,93 \pm 0,11$ $\mu\text{g/mL}$) ou nanoemulsão vazia ($1,81 \pm 0,22$ $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 25**). Além disso, os animais que receberam ambroxol 120 mg/kg por via oral apresentaram uma concentração de vermelho fenol no lavado de $4,01 \pm 0,21$ $\mu\text{g/mL}$, com diferença significativa em comparação com o grupo salina.

Figura 25 – Efeito expectorante da nanoemulsão contendo mirceno na secreção de vermelho fenol em camundongos tratados por via oral.



O gráfico ilustra a concentração de vermelho de fenol no LBA dos animais. SALINA, solução de NaCl 0,9%; NEV, nanoemulsão vazia; NEMC 8,5 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 8,5 mg/kg; NEMC 25 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 25 mg/kg; NEMC 75 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 75 mg/kg; AMB 120 mg/kg, ambroxol 120 mg/kg. Para análise estatística com ANOVA one-way, seguida por teste de Dunnett. * $p < 0,05$ (One-Way ANOVA, seguido de teste de Dunnett, SALINA vs NEMC 8,5, 25, 75 mg/kg, AMB 120 mg/kg). # $p < 0,05$ (One-Way ANOVA, seguido de teste de Dunnett, NEV vs NEMC 8,5, 25, 75 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$.

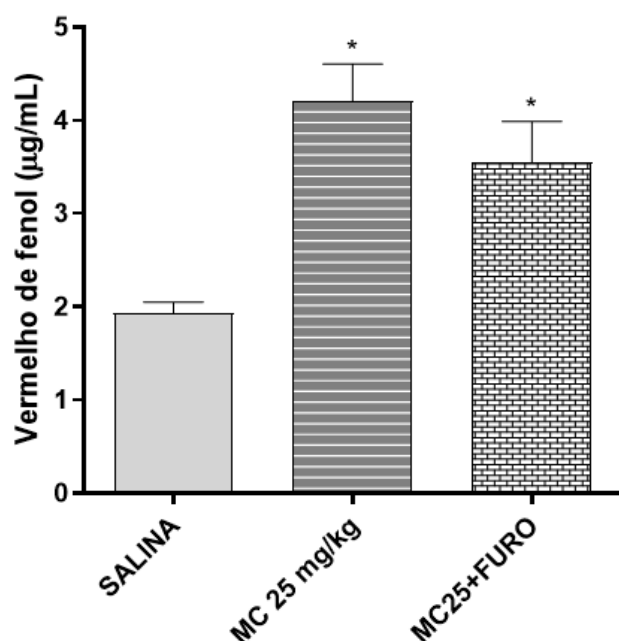
Fonte: Próprio autor.

4.10 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EXPECTORANTE DO MIRCENO

4.10.1 Avaliação da via do cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ (NKCC) no efeito expectorante do mirceno

A secreção de vermelho de fenol no LBA dos animais tratados com MC 25 mg/kg foi igual a $4.20 \pm 0.39 \mu\text{g/mL}$, enquanto que no grupo que recebeu furosemida 4 mg/kg + MC 25 mg/kg foi igual a $3,54 \pm 0.44 \mu\text{g/mL}$. Portanto, ambos apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$). Porém, quando comparados entre si, não apresentaram diferença significativa (**Figura 26**).

Figura 26 – Efeito da furosemida na atividade expectorante do mirceno administrado por via oral em camundongos.



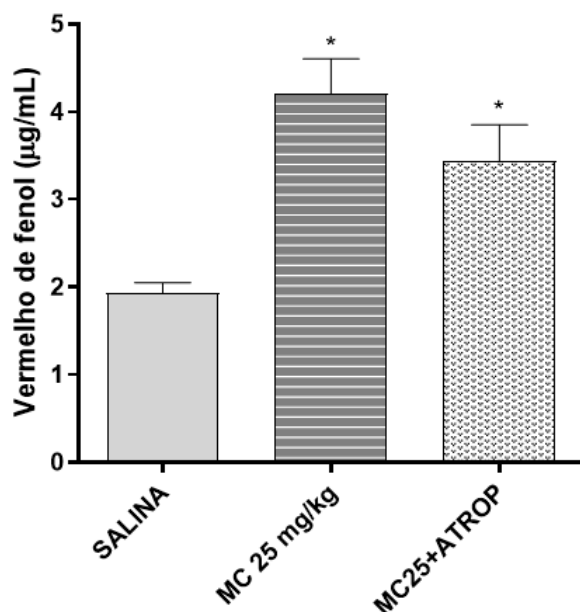
O gráfico ilustra a concentração de vermelho de fenol no LBA dos animais. SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC25+FURO, mirceno 25 mg/kg + furosemida 4 mg/kg. * $p < 0,05$ (teste t de Student não pareado: SALINA vs MC 25 mg/kg, MC25+FURO). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$.

Fonte: Próprio autor.

4.10.2 Avaliação da via colinérgica no efeito expectorante do mirceno

Da mesma forma, os animais que receberam MC 25 mg/kg ou atropina 1 mg/kg + MC 25 mg/kg ($3,44 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$) demonstraram diferença significativa quando comparado com a salina. Porém, quando comparado com o grupo MC 25mg/kg, não houve diferença significativa (**Figura 27**).

Figura 27 – Efeito da atropina na atividade expectorante do mirceno administrado por via oral em camundongos.



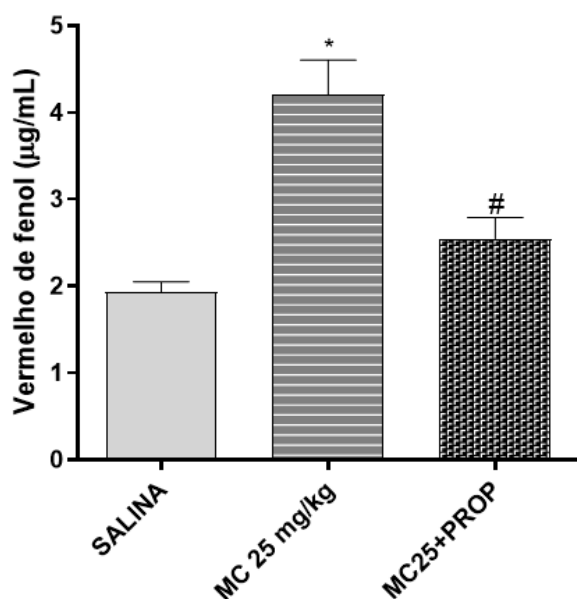
O gráfico ilustra a concentração de vermelho de fenol no LBA dos animais. SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC25+ATROP, mirceno 25 mg/kg + atropina 1 mg/kg. * $p < 0,05$ (teste t de Student não pareado: SALINA vs MC 25 mg/kg, MC25+ATROP). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$.

Fonte: Próprio autor.

4.10.3 Avaliação da via adrenérgica no efeito expectorante do mirceno

Os animais que receberam propranolol 25 mg/kg + MC 25 mg/kg exibiram secreção de vermelho de fenol em LBA igual a $2,54 \pm 0,24$ µg/mL, com diferença significativa comparado ao grupo MC 25 mg/kg ($4,20 \pm 0,39$ µg/mL). Entretanto, não demonstraram diferença significativa quando comparado com a salina ($1,93 \pm 0,11$ µg/mL) (**Figura 28**).

Figura 28 – Efeito do propranolol na atividade expectorante do mirceno administrado por via oral em camundongos.



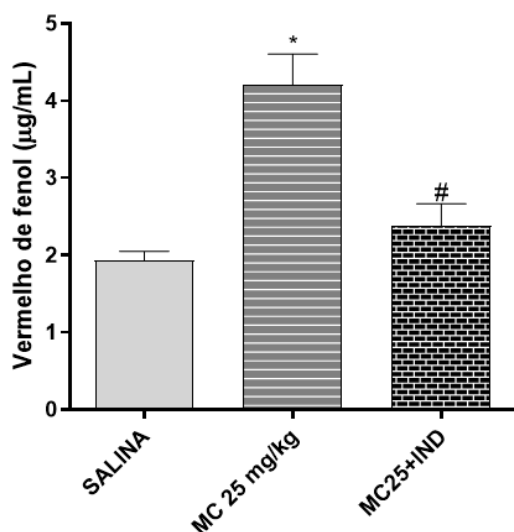
O gráfico ilustra a concentração de vermelho de fenol no LBA dos animais. SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC25+PROP, mirceno 25 mg/kg + propranolol 25 mg/kg. * $p < 0,05$ (teste t de Student não pareado: SALINA vs MC 25 mg/kg, MC25+PROP). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$.

Fonte: Próprio autor.

4.10.4 Avaliação do envolvimento de mediadores inflamatórios no efeito expectorante do mirceno

Os animais que receberam indomethacina 8 mg/kg + MC 25 mg/kg exibiram secreção de vermelho de fenol em LBA igual a $2,37 \pm 0,28$ µg/mL, com diferença significativa comparado ao grupo MC 25 mg/kg ($4,20 \pm 0,39$ µg/mL). Entretanto, não demonstraram diferença significativa quando comparado com a salina ($1,93 \pm 0,11$ µg/mL) (**Figura 29**).

Figura 29 – Efeito da indometacina na atividade expectorante do mirceno administrado por via oral em camundongos.



O gráfico ilustra a concentração de vermelho de fenol no LBA dos animais. SALINA, solução de NaCl 0,9%; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC25+IND, mirceno 25 mg/kg + indometacina 1 mg/kg. * $p < 0,05$ (teste t de Student não pareado: SALINA vs MC 25 mg/kg, MC25+FURO). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$.

Fonte: Próprio autor.

4.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO EXPECTORANTE DO MIRCENO LIVRE OU EM NANOEMULSÃO ADMINISTRADOS POR VIA INALATÓRIA

Na investigação do efeito expectorante do mirceno administrado por via inalatória, foi observado que nenhuma concentração de mirceno foi capaz de aumentar a secreção de vermelho de fenol e que somente o ambroxol 7,5 mg/mL ($2,97 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$), que é o controle positivo, apresentou efeito expectorante significativo quando comparado com o grupo que recebeu salina ($1,00 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 30**).

Figura 30 – Efeito expectorante do mirceno na secreção de vermelho de fenol em camundongos tratados por via inalatória.

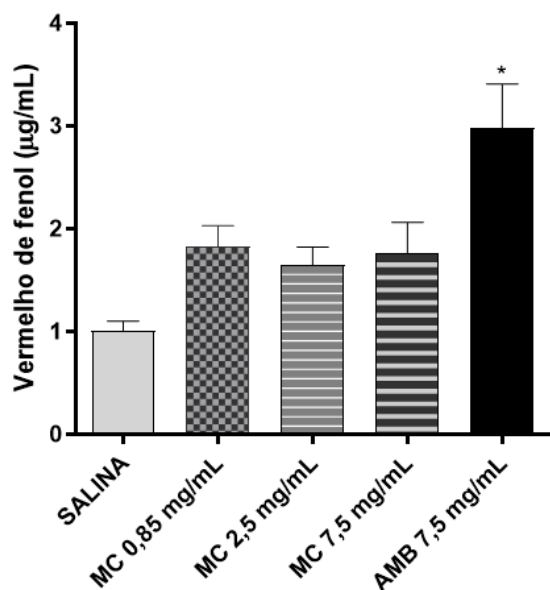


Gráfico representa tratamento versus a concentração de secreção de vermelho de fenol presente no lavado broncoalveolar. MC 0,85 mg/mL, Mirceno 0,85 mg/mL; MC 2,5 mg/mL, Mirceno 2,5 mg/mL; MC 7,5 mg/mL, Mirceno 7,5 mg/mL; SALINA, solução salina NaCl 0,9%; AMB 7,5 mg/mL, ambroxol 7,5 mg/mL. * $p < 0,05$ (One-Way ANOVA, seguido de teste de Dunnett: SALINA vs MC 0,85 mg/mL; MC 2,5 mg/mL; MC 7,5 mg/mL; AMB 7,5 mg/mL). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

Por outro lado, quando a nanoemulsão contendo mirceno foi administrada por via inalatória, as concentrações 0,85 mg/mL ou 75 mg/mL de NEMC aumentaram a secreção de vermelho de fenol no LBA para valores equivalentes a $4,39 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$ e $2,77 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, demonstrando efeito expectorante significativo quando comparado com o grupo salina ($1,00 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$). No entanto, apenas NEMC 0,85 mg/mL teve diferença significativa quando comparado com a nanoemulsão vazia $1,74 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ (Figura 31).

Figura 31 – Efeito expectorante da nanoemulsão contendo mirceno na secreção de vermelho de fenol em camundongos tratados por via inalatória.

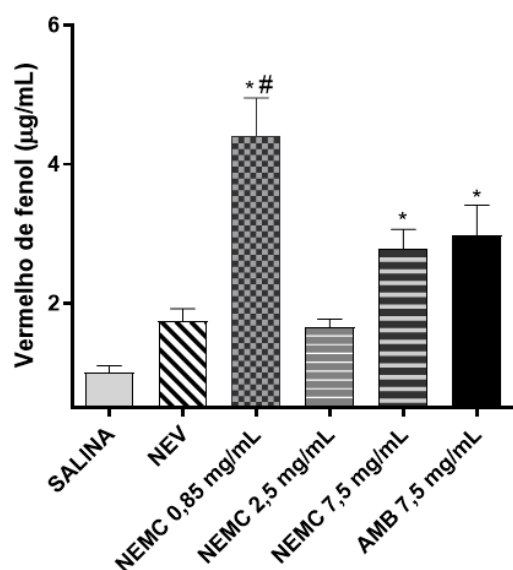


Gráfico representa tratamento versus a concentração de secreção de vermelho de fenol presente no lavado broncoalveolar. SALINA, solução salina NaCl 0,9%; NEV, nanoemulsão vazia; NEMC 0,85 mg/mL, nanoemulsão contendo mirceno 0,85 mg/mL; NEMC 2,5 mg/mL, nanoemulsão contendo mirceno 2,5 mg/mL; NEMC 7,5 mg/mL, nanoemulsão contendo mirceno 7,5 mg/mL; AMB 7,5 mg/mL, ambroxol 7,5 mg/mL. * $p < 0,05$ (One-Way ANOVA, seguido de teste de Dunnett: SALINA vs NEMC 0,85 mg/mL; NEMC 7,5 mg/mL; AMB 7,5 mg/mL). # $p < 0,05$ (One-Way ANOVA, seguido de teste de Dunnett: NEV vs NEMC 0,85 mg/mL). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIASMÁTICA EM CAMUNDONGOS

O grupo basal, representado pelos camundongos não imunizados por OVA, apresentou reduzida contagem total de células igual a $5,07 \times 10^4 \pm 8,03 \times 10^3$ células/mL, com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo de animais sensibilizados por OVA e que receberam apenas salina como tratamento ($2,43 \times 10^6 \pm 4,53 \times 10^5$ células/mL) (**Figura 32**).

Resultado semelhante foi demonstrado em camundongos asmáticos pré-tratados com dexametasona 10 mg/kg ($4,36 \times 10^5 \pm 1,11 \times 10^5$ células/mL) por via intraperitoneal ou mirceno nas doses de 8,5, 25 ou 75 mg/kg ($1,01 \times 10^6 \pm 2,18 \times 10^5$, $5,71 \times 10^6 \pm 9,90 \times 10^4$, $3,50 \times 10^5 \pm 1,11 \times 10^5$ células/mL, respectivamente) por via oral (**Figura 32**).

Figura 32 - Efeito de MC no número de células inflamatórias no LBA.

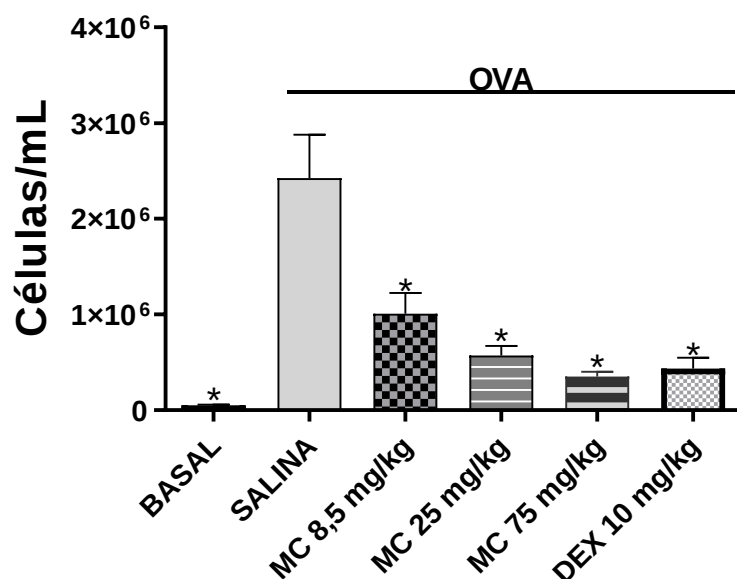


Gráfico representa tratamento versus o número de células inflamatórias no LBA. BASAL, animais não imunizados com OVA; SALINA, animais imunizados com OVA e tratados com solução de NaCl 0,9%; MC 8,5 mg/kg, mirceno 8,5 mg/kg; MC 25 mg/kg, mirceno 25 mg/kg; MC 75 mg/kg, mirceno 75 mg/kg; DEX 10 mg/kg, dexametasona 10 mg/Kg. * $p < 0,05$ (ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Dunnett: SALINA vs BASAL, MC 8,5 mg/kg, MC 25 mg/kg, MC 75 mg/kg. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

As nanoemulsões carregadas com mirceno, administradas nas doses 8,5, 25 ou 75 mg/kg também reduziram significativamente a contagem total de células ($7,65 \times 10^5 \pm 3,58 \times 10^5$, $2,20 \times 10^5 \pm 7,69 \times 10^4$, $2,74 \times 10^5 \pm 8,50 \times 10^4$ células/mL, respectivamente) em camundongos imunizados por OVA (**Figura 33**) comparados aos grupos imunizados por OVA e que receberam salina ou NEV ($2,06 \times 10^6 \pm 4,03 \times 10^5$ células/mL). Esses últimos, grupos Salina e NEV, não exibiram diferença significativa comparados entre si.

Figura 33 - Efeito de NEMC no número de células inflamatórias no LBA.

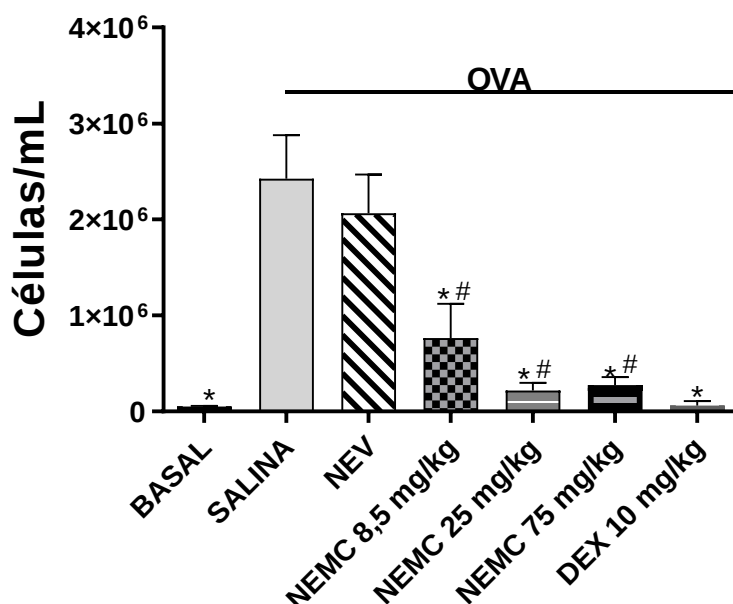


Gráfico representa tratamento versus o número de células inflamatórias no LBA. Basal, animais não imunizados com OVA; SALINA, animais imunizados com OVA e tratados com solução de NaCl 0,9%; NEV, nanoemulsão vazia; NEMC 8,5 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 8,5 mg/kg; NEMC 25 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 25 mg/kg; NEMC 75 mg/kg, nanoemulsão contendo mirceno 75 mg/kg; DEX 10 mg/kg, dexametasona 10 mg/Kg. * $p < 0,05$ (ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Dunnett: Salina vs Basal, NEMC 8,5 mg/kg, NEMC 25 mg/kg, NEMC 75 mg/kg, DEX 10 mg/kg). # $p < 0,05$ (*One-Way ANOVA*, seguido de teste de Dunnett: NEV vs NEMC 8,5 mg/kg, NEMC 25 mg/kg, NEMC 75 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Fonte: Próprio autor.

5. DISCUSSÃO

A preparação da nanoemulsão de mirceno utilizou o método de emulsificação espontânea como abordagem isotérmica aplicada a compostos voláteis e hidrofóbicos (Lima *et al.*, 2021). Como fase aquosa, para preparar dispersões coloidais contendo mirceno, foi utilizado PBS (pH 7,4), enquanto a fase oleosa consistiu em uma mistura de mirceno e MCT (1:1 w/w), além de diferentes surfactantes.

Os parâmetros de tamanho de partícula e distribuição de tamanho (IPd) que foram avaliados variaram de acordo com os tipos de surfactantes não iônicos utilizados e com a composição da fase oleosa. O surfactante não iônico SMO-20 (wt. 10%), utilizado na formulação 4, demonstrou influência considerável sobre o diâmetro médio das gotículas e a distribuição de tamanho das dispersões coloidais, de modo a formar gotículas menores ($< 97,87$ nm) e com moderada distribuição de tamanho (IPd $< 0,23$) ($p < 0,05$).

Entretanto, nanoemulsões preparadas com SML-20 e SMO, SMO-20 e SMO, ou apenas com SML-20 como surfactantes apresentaram as maiores gotículas (> 200 nm) e ampla distribuição de tamanho ($IPd > 0,23$). Apresentando estruturas moleculares diferentes, enquanto SML-20 tem uma cadeia de ácido graxo saturada, SMO-20 tem uma cadeia de ácido graxo insaturada e essa dupla ligação é que o torna mais flexível e eficiente em reduzir a tensão superficial entre a interface óleo/água de modo a formar gotículas menores (Komaiko; Mcclements, 2015). Importante controlar o tamanho das gotículas da emulsão, enquanto o surfactante SML-20 em concentração insuficiente leva à aglomeração e aumento do tamanho das partículas, SML-20 suficiente estabiliza a emulsão e o tamanho das partículas diminui (Devi *et al.*, 2025).

Além disso, esses parâmetros também foram maiores quando a composição da fase oleosa foi modificada para conter apenas o óleo veicular MCT, como mostra a diferença significativa ao comparar as formulações F4 e F5 ($p < 0,05$). O óleo MCT funciona como inibidor de maturação, pois é uma molécula altamente hidrofóbica que é adicionada à fase dispersa da nanoemulsão para inibir a expansão de gotículas, interrompendo o efeito de mistura (Liu *et al.*, 2019). Gotículas maiores são formadas ao aumentar a concentração de óleo MCT, que tem influência significativa na curvatura espontânea e solubilidade do surfactante (Guttoff; Saberi; Mcclements, 2015; Saberi; Fang; Mcclements, 2014).

A escolha do surfactante é fundamental para controlar as propriedades da nanoemulsão, como tamanho das gotículas, estabilidade e comportamento em diferentes condições (Liu *et al.*, 2019). A formulação 4, que apresentou as melhores características, foi utilizada nos estudos farmacológicos em modelos animais desse trabalho.

Antes disso, nas investigações para identificar possíveis efeitos adversos do mirceno ou sua nanoemulsão, observou-se que a administração oral de mirceno numa dose de 75 mg/kg não alterou significativamente o comportamento ou a coordenação motora de camundongos submetidos a testes de campo aberto ou rotarod. Relativamente à via sedativo-hipnótica, o mirceno, embora existam provas que sugerem o seu papel potencial no equilíbrio de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato para mediar indiretamente o sono em camundongos, como demonstrado num estudo de Chen *et al.* (2024).

Noutro estudo, a vaporização aguda de mirceno a 5% a cada 6 segundos durante 30 minutos demonstrou efeitos na atividade locomotora e no comportamento ansiolítico em camundongos, com diferenças observadas entre machos e fêmeas: aumento da atividade

locomotora e efeitos ansiolíticos nas fêmeas, e redução da atividade locomotora sem efeitos ansiolíticos nos machos (Wagner *et al.*, 2024).

Não foram encontradas evidências para o efeito do mirceno a 1 g/kg por via oral no comportamento exploratório e emocional ou na atividade ansiolítica em camundongos (Da-Silva *et al.*, 1991), o que se alinha com os resultados observados nos testes de rotarod e de campo aberto neste estudo.

Na avaliação do efeito sobre a coordenação motora, efeito relaxante ou sobre o comportamento de camundongos por meio dos testes de campo aberto e rotarod, NEMC 75mg/kg não teve efeito significativo, indicando que essa formulação é segura e não afeta o sistema nervoso central. Como observado em outros estudos, os monoterpenos em geral não têm um efeito negativo no sistema locomotor (Costa *et al.*, 2023).

Ao ser analisado o efeito sobre o músculo liso de traqueia isolada de rato, embora não tenha apresentado efeito significativo sobre o tônus muscular fisiológico basal, verificou-se que a nanoemulsão contendo mirceno teve uma atividade espasmolítica reduzida, seja na contração induzida por carbacol ou por KCl, sugerindo que essa formulação não tem potencial como broncodilatador. O músculo liso das vias aéreas, além do aumento do espessamento, remodelamento e estreitamento excessivo e variável das vias aéreas são importantes na busca por estratégias e terapias que visem reduzir os efeitos da condição asmática (Wang *et al.*, 2020).

A formulação de NEMC 75 mg/kg não deixou de ter atividade antitussígena quando comparada com o do modelo de tosse que recebeu apenas solução salina. Porém, quando comparado com a nanoemulsão vazia, nenhuma dose teve efeito antitussígeno significativo, sugerindo que a formulação possivelmente esteja limitando o efeito do mirceno. Mais estudos são necessários para verificar o componente da formulação que esteja relacionado a essa limitação.

Após esses resultados, foi investigado o mecanismo de ação do mirceno na dose de 25 mg/kg. Para investigar a via opióide foi utilizada a naloxona, que demonstrou reverter o efeito antitussígeno do mirceno. Este resultado indica que essa via possivelmente esteja relacionada ao mecanismo de ação do mirceno. Em um estudo de atividade antinociceptiva em camundongos pelo método da placa quente e teste de contorções induzidas por ácido acético, mirceno nas doses de 10 ou 20 mg/kg inibiu significativamente a nocicepção, porém com efeito antagonizado pela naloxona, dado este que corrobora com os resultados obtidos neste

trabalho (Rao; Menezes; Viana, 1990). O mesmo efeito antinociceptivo foi observado com mirceno 10 mg/kg, em teste de formalina e teste de placa quente, porém também com efeito revertido com a pela naloxona, indicando participação do sistema opióide (Paula-Freire *et al.*, 2013). Recentemente, no entanto, estudo de propriedades analgésicas do mirceno em artrite em ratos, o efeito antinociceptivo do mirceno foi bloqueado por um antagonista do receptor CB1 ou um CB2, indicando o envolvimento do sistema endocanabinóide além da via opioide já sugerida em outros trabalhos (Mcdougall; Mckenna, 2022). A ativação do receptor subtipo CB2 inibiu a ativação de nervos sensoriais em cobaias e nervo vago humano, bem como a tosse induzida por ácido cítrico em cobaias, sugerindo envolvimento a participação da via CB2 (PATEL *et al.*, 2003). Os receptores CB1 ou um CB2 provocam sua ação acoplando-se principalmente às proteínas Gi/0, inibindo a sinalização da adenilato ciclase e do AMP cíclico, mas CB1 também pode se acoplar a Gs ou Gq (Soethoudt *et al.*, 2017; Mukhopadhyay; Howlett, 2005; Eldeeb; Leone-Kabler; Howlett, 2017).

Acredita-se que os medicamentos antitussígenos de ação central atuem apenas no tronco cerebral (OLSEN *et al.*, 2021). Outra via antitussígena importante estudada foi a gabaérgica, com a utilização do flumazenil, um antagonista de benzodiazepínico. Com esse antagonista houve reversão do efeito antitussígeno do mirceno, o que também demonstra que esse monoterpene também pode atuar por meio da via gabaérgica. O ácido gama aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso, com receptores GABAB encontrados no cérebro, nas vias aéreas e no trato gastrointestinal, modulatório, circuitos integrativos centrais, bem como motores inspiratórios (BADRI *et al.*, 2021). Estudos pré-clínicos sugerem que a ativação dos receptores GABAB nos sistemas nervoso periférico e central inibe a tosse (Badri *et al.*, 2021). O flumazenil, porém, é uma ferramenta farmacológica potente para prever a farmacologia específica do subtipo do receptor GABAA e para determinar a ocupação de receptores sensíveis ao diazepam, que foi a ferramenta farmacológica utilizada como controle positivo na investigação do mecanismo de ação do mirceno (Herde *et al.*, 2021). Os receptores γ -aminobutíricos tipo A (GABAARs) são canais aniônicos seletivos para íons cloreto, controlados por ligantes e que podem aumentar a condutância de ânions e levar à hiperpolarização celular (Masiulis *et al.*, 2019; Sigel; Steinmann, 2012).

Nos experimentos em que foram utilizados bloqueadores de canais para potássio, não houve diferença reversão do efeito antitussígeno do mirceno pela glibenclamida, um

bloqueador de canais para potássio sensíveis ao ATP. Isto sugere que o efeito antitussígeno do mirceno não seja periférico (Xu *et al.*, 2007). A abertura de canais para potássio é um mecanismo que medeia o efeito inibitório dos opioides (Ramnarine; Rogers, 1998; Olorukooba, 2019). Em contraste, sabe-se que canais de grande condutância ativados por cálcio (BKCa) não estão envolvidos nessa via de transdução (Rodrigues; Duarte, 2000).

Nesse sentido, foi investigado a participação dos canais BKCa no mecanismo de ação do mirceno por meio do bloqueador TEA. Foi observado que TEA reverteu o efeito antitussígeno do mirceno, sugerindo a participação da via dos canais BKCa no efeito. Estudo relata que a ativação de canais BKCa implica hiperpolarização e redução do cálcio intracelular, causando o relaxamento do músculo liso traqueal de rato (SHI *et al.*, 2019). Os canais BKCa estão co-localizados com fontes de cálcio como canais para cálcio sensíveis à voltagem ou canais do tipo TRPV (vanilóides), podendo ser modulados alostericamente por sensores ou pelos locais de ligação ao cálcio, que levam à abertura dos canais BKCa (Guntur *et al.*, 2021).

Nos estudos da atividade expectorante, as três doses do mirceno ou da nanoemulsão contendo mirceno administradas por via oral, bem como o controle positivo ambroxol, administrado por via oral, foi observado significativo aumento da concentração de vermelho de fenol no lavado broncoalveolar quando comparado com o grupo tratado somente com solução fisiológica. Fármacos com atividade expectorante induzem secreção aquosa e promovem a acidificação do muco (Menezes *et al.*, 2019). Devido a esse aumento na hidratação, o muco secretado torna o trato respiratório lubrificado e alivia vários distúrbios respiratórios (Hu *et al.*, 2021).

Estudos têm evidenciado que formulações em nanoemulsão aumentam significativamente a absorção oral de drogas pouco solúveis, o que pode melhorar a biodisponibilidade e elevar a atividade farmacológica (Ei-Hong *et al.*, 2014). As nanoemulsões contendo monoterpenos têm sido investigadas principalmente em atividades antimicrobianas e doenças infecciosas (Xavier *et al.*, 2022; Zaho *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). Embora haja poucas investigações sobre o efeito de nanoemulsões contendo monoterpenos nas vias aéreas, o caráter inovador da tecnologia e sua potencial aplicação na terapia de problemas respiratórios têm ganhado relevância (Freitas *et al.*, 2021).

O ambroxol é um fármaco expectorante, metabólito do cloridrato de bromexina, com propriedades farmacológicas importantes como efeito estimulante da secreção de surfactantes

pulmonares e secreção serosa das vias aéreas, anti-inflamatório, antioxidante e anestésico local, além de efeitos mucocinéticos e mucociliares (Gupta, 2014; Yoshida *et al.*, 2018).

Semelhante ao resultado por via oral, a administração do ambroxol por via inalatória também aumentou significativamente a secreção do vermelho de fenol no lavado broncoalveolar quando comparado com o grupo tratado somente com salina. Em modelo animal de atividade expectorante foi observado que o ambroxol 7,5 mg/mL, administrado por via inalatória por um período de 20 minutos, inibiu a expressão de MUC5AC, reduziu os níveis de glicosaminoglicanos, melhorou a função da depuração mucociliar e promoveu a expectoração em camundongos (Zhang *et al.*, 2016).

Diferente dos resultados das investigações da atividade expectorante do mirceno e sua nanoemulsão administrados por via oral, a administração do mirceno ou da nanoemulsão contendo mirceno nas concentrações 2,5 ou 7,5 mg/mL por via inalatória não apresentou atividade expectorante significativa comparada ao grupo que recebeu salina ou nanoemulsão vazia, respectivamente. A inalação de mirceno ou da sua nanoemulsão nas três concentrações avaliadas também não apresentou efeito antitussígeno. Para chegar aos alvéolos e ser absorvido, os fármacos precisam ultrapassar barreiras dispostas pela própria anatomia do pulmão ou conteúdo fisiológico, como muco ou surfactante pulmonar, que podem bloquear o acesso de partículas indesejadas (Voelker; Numata, 2019; Usharani; Kanth; Saravanan, 2022). Além disso, as propriedades físico-químicas das nanopartículas inaladas, incluindo tamanho, carga e hidrofobicidade superficial, podem influenciar significativamente nas vias de eliminação pulmonar, como eliminação por muco, macrófagos ou translocação para circulação sistêmica (Liu *et al.*, 2020).

No entanto, a inalação por 3 minutos da nanoemulsão contendo mirceno na concentração de 0,85 mg/mL elevou a secreção de vermelho de fenol no lavado broncoalveolar comparado à nanoemulsão vazia. Seja para terapia local ou sistêmica, a inalação de uma formulação facilita a dispersão do fármaco em meio adequado e o transporte na forma de aerossol para as vias aéreas, melhorando a biodisponibilidade e a potência do fármaco (Zhang *et al.*, 2019).

Nesse contexto, uma preparação para inalação pode ajudar a superar algumas desvantagens das preparações por via oral ou intravenosa, as quais necessitam de maior quantidade da dose e podem estar associadas a maior incidência de eventos adversos (Zhang *et al.*, 2016). Devido a essas dificuldades da via oral, como efeito de barreira causado pela

barreira epitelial, degradação de fármacos durante a digestão, transporte e distribuição, a via inalatória tem sido considerada por evitar efeitos adversos e ser eficaz no tratamento local de doenças pulmonares (Zhong *et al.*, 2021).

O efeito expectorante da nanoemulsão contendo mirceno pode estar associado aos mecanismos de mediadores inflamatórios na produção de muco, conforme indicado por estudos conduzidos por Kanaan *et al.* (1997) ou como resultado do aumento na hidratação, contribuindo para a lubrificação do trato respiratório (Hu *et al.*, 2021). No entanto, estudos adicionais são importantes para investigar o efeito da nanoemulsão contendo mirceno sobre os níveis de interleucinas e a avaliação sobre o dano tecidual em pulmão asmático.

Os modelos animais reproduzem com sucesso muitas das características da inflamação alérgica das vias aéreas, tornando-se assim, importantes para a pesquisa, uma vez que os estudos clínicos não são suficientes para entender o mecanismo biológico da asma (Casaro *et al.*, 2019). Em relação a outros animais, o modelo murino tem como vantagens a facilidade de reprodução, disponibilidade de reagentes moleculares e celulares específicos, e ampla diversidade de linhagens de camundongos (Kips *et al.*, 2003).

Neste estudo, a inflamação alérgica das vias aéreas foi induzida pela sensibilização e desafio dos animais a um antígeno estranho, a ovalbumina. Os animais imunizados e que receberam apenas solução salina, apresentaram elevada contagem de células inflamatórias comparado com o grupo não imunizado com OVA e que também não foi desafiado com OVA. Foi estabelecido com êxito o modelo de asma induzida por OVA, considerado o primeiro modelo de asma em camundongos, com mais de 100 anos e que replica várias características da asma alérgica (Tiwary; Samarasinghe, 2021).

Para mimetizar a patogênese da asma humana, protocolos para desenvolvimento de modelos animais geralmente incluem fases de A) sensibilização, que usualmente requer múltiplas imunizações sistêmicas por OVA com adjuvantes e B) desafio, que é a exposição dos animais em estudo ao alérgeno (Fang *et al.*, 2021). Basicamente, a inflamação alérgica das vias aéreas é induzida por sensibilização intraperitoneal e desafio com OVA, modelo este que mimetiza as características da asma aguda, incluindo produção excessiva de muco, hiperresponsividade e inflamação eosinofílica das vias aéreas (Casaro *et al.*, 2019). A imunização de camundongos por OVA juntamente com o adjuvante Alum (hidróxido de alumínio) é uma abordagem descrita na literatura para induzir uma resposta imune tipo t nas

vias aéreas, incluindo imunoglobulinas IgEs, respostas de hipersensibilidade e remodelação das vias aéreas (Özkan; Eskiocak; Wingender, 2021).

Por outro lado, os animais imunizados com OVA e tratados com dexametasona, demonstraram redução expressiva do número total de células inflamatórias. Está bem estabelecido em modelos experimentais que a dexametasona inibe *in vitro* ou *in vivo* a hiperresponsividade bem como a infiltração de eosinófilos induzida por antígenos (DE BIE *et al.*, 1996). Sabe-se que este glicocorticoide diminui significativamente os eosinófilos e neutrófilos, infiltração inflamatória ao redor dos brônquios e vasos sanguíneos em camundongos asmáticos (Niu *et al.*, 2019; Guan *et al.*, 2020). A dexametasona é um potente glicocorticoide sintético de longa duração conhecido por inibir a cascata inflamatória, inibir a expressão de COX-2, citocinas inflamatórias (Patil *et al.*, 2018).

O monoterpeno mirceno ou sua nanoemulsão, nas três doses administradas nos animais em modelo de asma, reduziu a contagem total de células inflamatórias em camundongos com asma induzida por ovalbumina. Estudos com ratos neonatos mostraram que o mirceno exerce efeito antiasmático ao reduzir os efeitos da inflamação, incluindo redução da infiltração de leucócitos no lavado broncoalveolar, redução profunda nas citocinas IL-2, IL-4, IL-18 e IL-21, e a subsequente alteração estrutural no processo de remodelamento das vias aéreas (Du *et al.*, 2020). Esse efeito anti-inflamatório também foi observado em modelo celular de osteoartrite, no qual o mirceno inibiu a produção de óxido nítrico induzido por IL-1 β e em modelo de tecido renal de rato diabético, em que mirceno teve efeito inibitório IL-6 e TNF- α (Rufino *et al.*, 2015; Yang; Liao, 2021). O mirceno tem potentes efeitos anti-inflamatórios ao suprimir citocinas, MAP cinases e a regulação negativa das vias NF- κ B (Almarzooqi *et al.*, 2022).

Devido ao seu potente efeito antioxidante, anti-inflamatório e propriedades anti-apoptóticas, o mirceno atenua a perda neuronal dopaminérgica em ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson por estresse oxidativo (Azimullah *et al.*, 2023). Isto reforça o potencial terapêutico do mirceno e a importância da sua investigação farmacológica.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que foi possível superar as limitações de solubilidade do mirceno por meio do desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo o monoterpeno, caracterizada com tamanho médio da gotícula de $97,37 \pm 5,84$ nm e IPd de $0,23 \pm 0,01$. O perfil de segurança do mirceno livre (75mg/kg) ou de NEMC foi comprovado por meio dos ensaios comportamentais em campo aberto e rotarod, pois não afetaram a coordenação motora ou nem apresentaram efeitos depressores sobre o sistema nervoso central.

A ausência de mortalidade, alterações fisiológicas ou sinais de toxicidade após a administração de NEMC, revelados em testes de toxicidade aguda (2000 mg/kg, via oral), reforçaram a segurança da nanoemulsão. Nos ensaios farmacológicos, tanto para o mirceno livre quanto para a nanoemulsão carregada, observou-se um efeito espasmolítico reduzido em músculo liso de traqueia isolada de rato contraído com Cch ou KCl, mas sem efeito significativo sobre o tônus basal.

No modelo de tosse induzida por ácido cítrico, MC 25 ou 75 mg/kg ou NEMC 75 mg/kg reduziram significativamente a frequência de tosse. O mecanismo de ação para o efeito antitussígeno, possivelmente, envolve as vias GABAérgicas, opioides e canais para potássio. O aumento significativo da secreção do vermelho de fenol no lavado broncoalveolar, após administração por via oral de MC ou NEMC, reforça o seu efeito expectorante e sugere o potencial clínico para condições com hipersecreção de muco.

Por fim, MC ou NEMC demonstraram marcante atividade anti-inflamatória em modelo de asma induzida por ovalbumina, reduzindo o recrutamento de células inflamatórias para as vias aéreas.

O monoterpeno mirceno ou sua nanoemulsão, conforme demonstrado nesse trabalho, apresentam-se como estratégia terapêutica inovadora e segura para condições respiratórias, integrando as vantagens da nanoemulsão com as propriedades farmacológicas do mirceno. Estudos futuros são necessários para otimizar a formulação e superar as limitações desse trabalho quanto ao estudo de outras vias de administração e detalhamento dos efeitos sobre os mediadores inflamatórios ou perfil histopatológico.

REFERÊNCIAS

- ALAVINEZHAD, Azan, KHAZDAIR, Mohammad Reza, BOSKABADY, Mohammad Hhossein. Possible therapeutic effect of carvacrol on asthmatic patients: A randomized, double blind, placebo-controlled, Phase II clinical trial. **Phytotherapy research**, v. 32, n. 1, p. 151-159, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.5967>. Acesso em: 02 ago. 2024.
- ALBUQUERQUE, Agnes Afrodite Sumarelli *et al.* In vitro reactivity (“organ chamber”) of guinea pig tracheal rings—methodology considerations. **Annals of translational medicine**, v. 4, n. 11, p. 1-6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/atm.2016.05.18>. Acesso em: 28 fev. 2025.
- ALMARZOOQI, Saeeda *et al.* β -Myrcene Mitigates Colon Inflammation by Inhibiting MAP Kinase and NF- κ B Signaling Pathways. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8744, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27248744>. Acesso em: 28 fev. 2021.
- ÁLVAREZ-SANTOS, Mayra D. *et al.* Regulation of myosin light-chain phosphatase activity to generate airway smooth muscle hypercontractility. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 701, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00701>. Acesso em: 28 fev. 2021.
- ANDERSON, Wayne H. *et al.* The relationship of mucus concentration (hydration) to mucus osmotic pressure and transport in chronic bronchitis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 192, n. 2, p. 182-190, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201412-2230oc>. Acesso em: 28 mar. 2021.
- AZIMULLAH, Sheikh *et al.* Myrcene Salvages Rotenone-Induced Loss of Dopaminergic Neurons by Inhibiting Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, and Autophagy. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 685, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28020685>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- BADRI, Huda *et al.* Effect of centrally and peripherally acting GABAB agonism on the healthy human cough reflex. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 71, p. 102079, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2021.102079>. Acesso em: 15 jan. 2022.
- BAHR, Tyler A. *et al.* The effects of various essential oils on epilepsy and acute seizure: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/6216745>. Acesso em: 07 jan. 2022.
- BAI, Xudong; TANG, Jin. Myrcene exhibits antitumor activity against lung cancer cells by inducing oxidative stress and apoptosis mechanisms. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 9, p. 1934578X20961189, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578X20961189>. Acesso em: 09 jan. 2021.
- BAKER JR, James R. *et al.* Intranasal delivery of allergen in a nanoemulsion adjuvant inhibits allergen-specific reactions in mouse models of allergic airway disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 51, n. 10, p. 1361-1373, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cea.13903>. Acesso em: 09 de jan. 2022.

BAKER, Katie *et al.* Role of the ion channel, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), in allergic asthma. **Respiratory research**, v. 17, p. 1-10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.091>. Acesso em: 09 jan. 2019.

BANASAZ, Shahin *et al.* Encapsulation of lipid-soluble bioactives by nanoemulsions. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3966, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25173966>. Acesso em: 20 mar. 2024.

BASSO, Lilian *et al.* TRPV1 promotes opioid analgesia during inflammation. **Science signaling**, v. 12, n. 575, p. eaav0711, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav0711>. Acesso em: 02 ago. 2024.

BATEMAN, Jordan T.; LEVITT, Erica S. Opioid suppression of an excitatory pontomedullary respiratory circuit by convergent mechanisms. **eLife**, v. 12, p. e81119, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.81119>. Acesso em: 09 jan. 2024.

BEJESHK, Mohammad Abbas. *et al.* Anti-inflammatory and anti-remodeling effects of myrtenol in the lungs of asthmatic rats: histopathological and biochemical findings. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 47, n. 2, p. 185-193, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.09.003>. Acesso em: 01 ago. 2021.

BERGMAN, Matthew E.; DAVIS, Benjamin; PHILLIPS, Michael A. Medically useful plant terpenoids: Biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3961, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24213961>. Acesso em: 01 ago. 2021.

BOLSER, Donald C. *et al.* Pharmacological studies of allergic cough in the guinea pig. **European journal of pharmacology**, v. 277, n. 2-3, p. 159-164, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00076-w](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00076-w). Acesso em: 01 ago. 2020.

BONAMIN, Flávia. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-biological interactions**, v. 212, p. 11-19, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.009>. Acesso em: 28 mar. 2024.

BONSER, Luke R.; ERLE, David J. Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B. **Journal of clinical medicine**, v. 6, n. 12, p. 112, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm6120112>. Acesso em: nov. 2021.

BOONPIYATHAD, Tadech. *et al.* Immunologic mechanisms in asthma. In: **Seminars in Immunology**. p. 101333. Academic Press, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101333>. Acesso em: 11 mai. 2021.

BORGHI, Sergio M. *et al.* Therapeutic Potential of Controlled Delivery Systems in Asthma: Preclinical Development of Flavonoid-Based Treatments. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010001>. Acesso em: 28 mar. 2024.

BOUCHER, Richard C. Muco-obstructive lung diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 20, p. 1941-1953, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2025.103267>. Acesso em: 28 jan. 2021.

BRUEGGEMANN, Lyubov I. *et al.* Mechanisms of PKA-dependent potentiation of Kv7. 5 channel activity in human airway smooth muscle cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2223, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19082223>. Acesso em: 15 fev. 2021.

BUSH, Andrew; PAVORD, Ian D. The Lancet Asthma Commission: treating children in primary care. **Prescriber**, v. 29, n. 11, p. 28-32, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/psb.1719>. Acesso em: 11 fev. 2021.

BUTTON, Brian *et al.* Roles of mucus adhesion and cohesion in cough clearance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 49, p. 12501-12506, 2018. Disponível em: https://ui.adsabs.harvard.edu/link_gateway/2018PNAS..11512501B/doi:10.1073/pnas.1811787115. Acesso em: 10 ago. 2024.

CACERES, Ana I. *et al.* Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 channels mediate the anti-inflammatory effects of eucalyptol. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 9, p. 867-879, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13760>. Acesso em: 02 ago. 2024.

CALHOUN, William J.; CHUPP, Geoffrey L. The new era of add-on asthma treatments: where do we stand?. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 18, n. 1, p. 42, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13223-022-00676-0>. Acesso em: 28 mar. 2024.

CÂMARA, Carlos C. *et al.* Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. **Planta Medica**, v. 69, n. 12, p. 1080-1085, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2003-45186>. Acesso em: 28 fev. 2025.

CAMORETTI-MERCADO, Blanca; LOCKEY, Richard F. Airway smooth muscle pathophysiology in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 6, p. 1983-1995, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.035>. Acesso em: 28 mai. 2022.

CAMORETTI-MERCADO, Blanca; LOCKEY, Richard F. The β -adrenergic theory of bronchial asthma: 50 years later. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 144, n. 5, p. 1166-1168, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.07.010>. Acesso em: 06 mai. 2022.

CANNING, Brendan J. *et al.* Anatomy and neurophysiology of cough: CHEST Guideline and Expert Panel report. **Chest**, v. 146, n. 6, p. 1633-1648, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1378/chest.14-1481>. Acesso em: 06 mai. 2020.

CANNING, Brendan J. *et al.* Identification of the tracheal and laryngeal afferent neurones mediating cough in anaesthetized guinea-pigs. **The Journal of physiology**, v. 557, n. 2, p.

543-558, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.057885>. Acesso em: 12 mar. 2020.

CAO, Mingzhuo *et al.* Development of an orally bioavailable isoliquiritigenin self-nanoemulsifying drug delivery system to effectively treat ovalbumin-induced asthma. **International journal of nanomedicine**, p. 8945-8961, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/ijn.s269982>. Acesso em: 05 mar. 2021.

CARDOSO, Thiago de Araujo *et al.* The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. **Jornal brasileiro de pneumologia**, v. 43, p. 163-168, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000352>. Acesso em: 25 mar. 2021.

CARR, Tara F.; ZEKI, Amir A.; KRAFT, Monica. Eosinophilic and noneosinophilic asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 197, n. 1, p. 22-37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201611-2232PP>. Acesso em: 22 jul. 2021.

CASALE, Thomas B. *et al.* Oral corticosteroid-sparing effects of mepolizumab in severe eosinophilic asthma: evidence from randomized controlled trials and real-world studies. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 16, p. 17534666221107313, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/17534666221107313>. Acesso em: 28 mar. 2024.

CASARO, Mateus *et al.* OVA-induced allergic airway inflammation mouse model. **Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols**, p. 297-301, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_28. Acesso em: 05 out. 2024.

CASTILLO, Jamee R.; PETERS, Stephen P.; BUSSE, William W. Asthma exacerbations: pathogenesis, prevention, and treatment. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 5, n. 4, p. 918-927, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.05.001>. Acesso em: 05 abr. 2020.

CATTANI-CAVALIERI, Isabella *et al.* Quantitative phosphoproteomic analysis reveals unique cAMP signaling pools emanating from AC2 and AC6 in human airway smooth muscle cells. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 307, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1149063>. Acesso em: 05 jan. 2024.

CHEN, Liyan *et al.* Detection of mouse cough based on sound monitoring and respiratory airflow waveforms. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59263, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059263>. Acesso em: 02 abr. 2021.

CHEN, Luge *et al.* Beta-Myrcene as a Sedative-Hypnotic Component from Lavender Essential Oil in DL-4-Chlorophenylalanine-Induced-Insomnia Mice. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 9, p. 1161, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph17091161>. Acesso em: 28 abr. 2025.

CHEN, Meng *et al.* Overlap of allergic, eosinophilic and type 2 inflammatory subtypes in moderate-to-severe asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 51, n. 4, p. 546-555, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cea.13790>. Acesso em: 05 abr. 2023.

- CHEN, Wentao *et al.* The roles of type 2 cytotoxic t cells in inflammation, tissue remodeling, and prostaglandin (PG) D2 production are attenuated by PGD2 receptor 2 antagonism. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 11, p. 2714-2724, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001245>. Acesso em: 08 mai. 2023.
- CHUNG, Kian Fan *et al.* Cough hypersensitivity and chronic cough. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 8, n. 1, p. 45, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00370-w>. Acesso em: 11 nov. 2023.
- CIFTCI, O. *et al.* Curcumin, myrecen and cineol modulate the percentage of lymphocyte subsets altered by 2, 3, 7, 8-Tetracholorodibenzo-p-dioxins (TCDD) in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 12, p. 1986-1994, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0960327111404909>. Acesso em: 28 mar. 2024.
- COSTA, A. O. C. *et al.* Evaluation of the antinociceptive effect generated by citronellal monoterpene isomers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e271781, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.271781>. Acesso em: 27 mar. 2024.
- COSTA, Jéssica Pereira *et al.* Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain research**, v. 1547, p. 34-42, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.003>. Acesso em: 27 mar. 2024.
- CROISIER, Huguette *et al.* Ryanodine receptor sensitization results in abnormal calcium signaling in airway smooth muscle cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 703-711, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0386oc>. Acesso em: 27 mar. 2024.
- DANTAS, Amanda Gabrielle Barros *et al.* Development, characterization, and immunomodulatory evaluation of carvacrol-loaded nanoemulsion. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3899, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26133899>. Acesso em: 06 nov. 2024.
- DA-SILVA, V. A. *et al.* Neurobehavioral study of the effect of beta-myrcene on rodents. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 8, p. 827-831, 1991. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1797273>. Acesso em: 28 fev. 2025.
- DAVIS, C. William; DICKEY, Burton F. Regulated airway goblet cell mucin secretion. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 70, p. 487-512, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100638>. Acesso em: 21 fev. 2025.
- DAVIS, Kaori Uchiumi; SHEATS, M. Katie. The role of neutrophils in the pathophysiology of asthma in humans and horses. **Inflammation**, v. 44, n. 2, p. 450-465, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01362-2>. Acesso em: 21 fev. 2025.
- DE BIE, J. J. *et al.* Effect of dexamethasone and endogenous corticosterone on airway hyperresponsiveness and eosinophilia in the mouse. **British journal of pharmacology**, v. 119, n. 7, p. 1484-1490, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb16062.x>. Acesso em: 17 fev. 2025.

DE SÁ COUTINHO, Diego *et al.* Pequi (Caryocar brasiliense Cambess)-loaded nanoemulsion, orally delivered, modulates inflammation in LPS-induced acute lung injury in mice. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1075, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111075>. Acesso em: 15 fev. 2022.

DEHSHEIKH, Anahita B. *et al.* Monoterpenes: Essential oil components with valuable features. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 20, n. 11, p. 958-974, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557520666200122144703>. Acesso em: 15 ago. 2024.

DEMPSEY, Timothy M.; SCANLON, Paul D. Pulmonary function tests for the generalist: a brief review. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2018. p. 763-771. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.04.009>. Acesso em: 15 fev. 2022.

DEVI, Geeta *et al.* Synthesis, characterization and toxicity assessment of chlorantraniliprole nanoemulsion against *Helicoverpa armigera*. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 4140, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88104-2>. Acesso em: 27 mar. 2024.

DHANJAL, Daljeet Singh *et al.* Concepts of advanced therapeutic delivery systems for the management of remodeling and inflammation in airway diseases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 271-288, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc-2021-0081>. Acesso em: 22 mar. 2024.

DINIZ, Tamara Coimbra *et al.* Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074-1087, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.114>. Acesso em: 27 fev. 2024.

DOE, Camille *et al.* Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. **Chest**, v. 138, n. 5, p. 1140-1147, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1378/chest.09-3058>. Acesso em: 20 fev. 2024.

DOMINGO, Christian *et al.* The prostaglandin D₂ receptor 2 pathway in asthma: a key player in airway inflammation. **Respiratory research**, v. 19, p. 1-8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0893-x>. Acesso em: 20 set. 2019.

DONG, Zhengqi *et al.* Preparation of naringenin nanosuspension and its antitussive and expectorant effects. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 741, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27030741>. Acesso em: 27 fev. 2024.

DRAKE, Matthew G. *et al.* Airway sensory nerve plasticity in asthma and chronic cough. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 720538, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.720538>. Acesso em: 28 mar. 2024.

DU, Yanhui *et al.* Myrcene exerts anti-asthmatic activity in neonatal rats via modulating the matrix remodeling. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 34, p. 2058738420954948, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2058738420954948>. Acesso em: 27 fev. 2024.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. 1957. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.3030460322>. Acesso em: 07 fev. 2024.

DUNICAN, Eleanor M. *et al.* Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 3, p. 997-1009, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci95693>. Acesso em: 27 dez. 2024.

DURBIN, R. P.; JENKINSON, D. H. The effect of carbachol on the permeability of depolarized smooth muscle to inorganic ions. **The Journal of physiology**, v. 157, n. 1, p. 74-89, 1961. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1961.sp006706>. Acesso em: 07 fev. 2023.

EID, R. C. *et al.* Poor control of asthma symptoms with interleukin-5 inhibitors in four patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.09.023>. Acesso em: 07 dez. 2022.

ELDEEB, Khalil; LEONE-KABLER, Sandra; HOWLETT, Allyn C. Mouse Neuroblastoma CB1 Cannabinoid Receptor-Stimulated [35S] GTP γ S Binding: Total and Antibody-Targeted G α Protein-Specific Scintillation Proximity Assays. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2017. p. 1-21. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.06.028>. Acesso em: 07 dez. 2022.

EL-HAMMADI, Mazen M. *et al.* Potential use for chronic pain: Poly (Ethylene Glycol)-Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) nanoparticles enhance the effects of Cannabis-Based terpenes on calcium influx in TRPV1-Expressing cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 616, p. 121524, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121524>. Acesso em: 07 dez. 2022.

ENGLER, Heidrun; SZELENYI, Istvan. Tracheal phenol red secretion, a new method for screening mucosecretolytic compounds. **Journal of pharmacological methods**, v. 11, n. 3, p. 151-157, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(84\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0160-5402(84)90033-0). Acesso em: 07 dez. 2022.

FAHY, John V.; DICKEY, Burton F. Airway mucus function and dysfunction. **New England journal of medicine**, v. 363, n. 23, p. 2233-2247, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910061>. Acesso em: 07 dez. 2022.

FANG, Lei *et al.* A mouse allergic asthma model induced by shrimp tropomyosin. **International Immunopharmacology**, v. 91, p. 107289, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107289>. Acesso em: 20 dez. 2022.

FARAJ, Janine *et al.* Novel cystamine-core dendrimer-formulation rescues Δ F508-CFTR and inhibits *Pseudomonas aeruginosa* infection by augmenting autophagy. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 2, p. 177-186, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1575807>. Acesso em: 08 jan. 2022.

FEDAN, J. S.; VAN SCOTT, M. R.; JOHNSTON, R. A. Pharmacological techniques for the in vitro study of airways. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 45, n. 2, p. 159-174, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(01\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(01)00154-X). Acesso em: 07 fev. 2023.

FELÍCIO, MOTTA I. *et al.* Development and characterization of a carvacrol nanoemulsion and evaluation of its antimicrobial activity against selected food-related pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 299-306, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.13411>. Acesso em: 08 jan. 2022.

FELTER, Susan P. *et al.* How the 62-year old Delaney Clause continues to thwart science: case study of the flavor substance β -myrcene. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 115, p. 104708, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104708>. Acesso em: 27 mar. 2024.

FENG, Siwen *et al.* Exploring the Mechanism of Bergamot Essential Oil against Asthma Based on Network Pharmacology and Experimental Verification. **ACS Omega**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07366>. Acesso em: 28 mar. 2024.

FOUCAUD, Laurent *et al.* Modulation of protective reflex cough by acute immune driven inflammation of lower airways in anesthetized rabbits. **Plos one**, v. 14, n. 12, p. e0226442, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226442>. Acesso em: 28 mar. 2024.

FREITAS, Máira M. *et al.* Investigation of the relaxing effect of a camphor nanoemulsion on rat isolated trachea. **Chemico-Biological Interactions**, v. 348, p. 109656, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109656>. Acesso em: 27 mai. 2024.

GÁLVEZ, Julio. Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/928461>. Acesso em: 21 jun. 2021.

GAMES, Ellen *et al.* Structurally related monoterpenes p-cymene, carvacrol and thymol isolated from essential oil from leaves of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) protect mice against elastase-induced emphysema. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1390, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21101390>. Acesso em: 28 jul. 2022.

GAO, Xiuping *et al.* Cross-effect of TRPV1 and EP3 receptor on coughs and bronchopulmonary C-neural activities. **PloS one**, v. 16, n. 2, p. e0246375, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246375>. Acesso em: 12 ago. 2024.

GARDINER, Samantha J. *et al.* Codeine versus placebo for chronic cough in children. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011914.pub2>. Acesso em: 27 jan. 2024.

GILIBERTO, John Paul; COHEN, Seth M.; MISONO, Stephanie. Are neuromodulating medications effective for the treatment of chronic neurogenic cough?. **The Laryngoscope**, v. 127, n. 5, p. 1007, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/lary.26393>. Acesso em: 27 set. 2020.

GINA. **Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention**, 2022. Disponível em: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2022/07/GINA-Main-Report-2022-FINAL-22-07-01-WMS.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2023.

GIRODET, Pierre-Olivier *et al.* Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma. A proof-of-concept study. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 191, n. 8, p. 876-883, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1874oc>. Acesso em: 25 nov. 2020.

GRAVIELLE, María Clara. Regulation of GABAA receptors by prolonged exposure to endogenous and exogenous ligands. **Neurochemistry International**, v. 118, p. 96-104, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.05.015>. Acesso em: 15 set. 2021.

GREGÓRIO, Juliana Fabiana *et al.* Asthma: role of the angiotensin-(1-7)/Mas (MAS1) pathway in pathophysiology and therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. 22, p. 4428-4439, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.15619>. Acesso em: 27 fev. 2024.

GUAN, Minglong *et al.* Dexamethasone alleviate allergic airway inflammation in mice by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome. **International Immunopharmacology**, v. 78, p. 106017, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106017>. Acesso em: 27 fev. 2024.

GUNTUR, Divya *et al.* Revisiting the large-conductance calcium-activated potassium (BKCa) channels in the pulmonary circulation. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1629, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom11111629>. Acesso em: 15 fev. 2024.

GUPTA, Ankur *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>. Acesso em: 15 fev. 2024.

GUPTA, Govind *et al.* Silver nanoparticles with excellent biocompatibility block pseudotyped SARS-CoV-2 in the presence of lung surfactant. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1083232>. Acesso em: 14 fev. 2024.

GUPTA, P. R. Ambroxol hydrochloride in the management of idiopathic pulmonary fibrosis: Clinical trials are the need of the hour. **Lung India: Official Organ of Indian Chest Society**, v. 31, n. 1, p. 43, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0970-2113.125899>. Acesso em: 14 fev. 2024.

GUTTOFF, Marrisa; SABERI, Amir Hossein; MCCLEMENTS, David Julian. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability. **Food chemistry**, v. 171, p. 117-122, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.087>. Acesso em: 27 mar. 2024.

HAN, Jae Min *et al.* Exploring the Potential Effects and Mechanisms of Asarum sieboldii Radix Essential Oil for Treatment of Asthma. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 558, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030558>. Acesso em: 28 mar. 2024.

HARFORD, Terri J. *et al.* Respiratory syncytial virus induces β 2-adrenergic receptor dysfunction in human airway smooth muscle cells. **Science signaling**, v. 14, n. 685, p. eabc1983, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.087>. Acesso em: 27 mar. 2024.

HASSOUN, Dorian *et al.* Bronchial smooth muscle cell in asthma: where does it fit?. **BMJ open respiratory research**, v. 9, n. 1, p. e001351, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2022-001351>. Acesso em: 27 mar. 2024.

HERDE, Adrienne Müller *et al.* GABAA receptor subtypes in the mouse brain: Regional mapping and diazepam receptor occupancy by in vivo [^{18}F] flumazenil PET. **Neuroimage**, v. 150, p. 279-291, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.02.022>. Acesso em: 27 fev. 2024.

HERMAN, Melissa A. *et al.* μ -Opioid receptor stimulation in the medial subnucleus of the tractus solitarius inhibits gastric tone and motility by reducing local GABA activity. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 2, p. G494-G506, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00038.2010>. Acesso em: 27 fev. 2024.

HILL, David B. *et al.* A biophysical basis for mucus solids concentration as a candidate biomarker for airways disease. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e87681, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087681>. Acesso em: 27 fev. 2021.

HILL, David B. *et al.* Physiology and pathophysiology of human airway mucus. **Physiological Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1757-1836, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2021>. Acesso em: 07 fev. 2024.

HSIEH, Aileen; ASSADINIA, Najmeh; HACKETT, Tillie-Louise. Airway remodeling heterogeneity in asthma and its relationship to disease outcomes. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 24, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1113100>. Acesso em: 07 fev. 2024.

HU, Jin-Ryul *et al.* Anti-inflammatory, expectorant, and antitussive properties of Kyeongok-go in ICR mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 59, n. 1, p. 319-332, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13880209.2021.1892155>. Acesso em: 22 fev. 2024.

IRWIN, Richard S. *et al.* Diagnosis and management of cough executive summary: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, v. 129, n. 1, p. 1S-23S, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1378/chest.129.1_suppl.1s. Acesso em: 22 fev. 2024.

IVAN, Políacek *et al.* Cough modulation by upper airway stimuli in cat—potential clinical application?. **Open journal of molecular and integrative physiology**, v. 6, n. 3, p. 35, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ojmpi.2016.63004>. Acesso em: 27 fev. 2024.

IWAKURA, Yoichiro *et al.* Functional specialization of interleukin-17 family members. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 149-162, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.012>. Acesso em: 27 fev. 2024.

JACKSON, David J.; AKUTHOTA, Praveen; ROUFOSSE, Florence. Eosinophils and eosinophilic immune dysfunction in health and disease. **European Respiratory Review**, v. 31, n. 163, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/16000617.0150-2021>. Acesso em: 27 fev. 2023.

JACKSON, Isabel L. *et al.* BIO 300, a nanosuspension of genistein, mitigates pneumonitis/fibrosis following high-dose radiation exposure in the C57L/J murine model. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 24, p. 4738-4750, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/16000617.0150-2021>. Acesso em: 27 fev. 2024.

JACOBSEN, Elizabeth A. *et al.* Eosinophil knockout humans: uncovering the role of eosinophils through eosinophil-directed biological therapies. **Annu Rev Immunol**, v. 39, n. 1, p. 719-57, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-125918>. Acesso em: 27 fev. 2024.

JANSEN, C. *et al.* Myrcene and terpene regulation of TRPV1. **Channels**, v. 13, n. 1, p. 344-366, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080%2F19336950.2019.1654347>. Acesso em: 27 fev. 2024.

JARAMILLO, Ana M. *et al.* Airway mucin secretion. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 15, n. Supplement 3, p. S164-S170, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201806-371AW>. Acesso em: 27 fev. 2024.

JONES, Thomas L.; NEVILLE, Daniel M.; CHAUHAN, Anoop J. Diagnosis and treatment of severe asthma: a phenotype-based approach. **Clinical Medicine**, v. 18, n. Suppl 2, p. s36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-2s-s36>. Acesso em: 15 fev. 2023.

JUDE, Joseph *et al.* Salicylic acid amplifies Carbachol-induced bronchoconstriction in human precision-cut lung slices. **Respiratory Research**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1034-x>. Acesso em: 15 fev. 2023.

JUERGENS, Lisa Joy; WORTH, Heinrich; JUERGENS, Uwe R. New perspectives for mucolytic, anti-inflammatory and adjunctive therapy with 1, 8-cineole in COPD and asthma: review on the new therapeutic approach. **Advances in therapy**, v. 37, n. 5, p. 1737-1753, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01279-0>. Acesso em: 15 fev. 2023.

KAMEI, J. *et al.* Antitussive principles of Glycyrrhizae radix, a main component of the Kampo preparations Bakumondo-to (Mai-men-dong-tang). **European journal of pharmacology**, v. 469, n. 1-3, p. 159-163, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01728-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01728-x). Acesso em: 27 fev. 2024.

KANAAN, Salim A. *et al.* Effects of Various Analgesic and Anti-Inflammatory Drugs on Endotoxin-Induced Hyperalgesia in Rats and Mice. **Pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 285-297, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000139498>. Acesso em: 27 fev. 2024.

KAUR, Prabhjot *et al.* Development, optimization and evaluation of surfactant-based pulmonary nanolipid carrier system of paclitaxel for the management of drug resistance lung

cancer using Box-Behnken design. **Drug delivery**, v. 23, n. 6, p. 1912-1925, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.993486>. Acesso em: 21 fev. 2024.

KHARAZMKIA, Ali *et al.* Potential effects of alpha-pinene, a monoterpene commonly found in essential oils against *Toxoplasma gondii* infection; an in vitro and in vivo study. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 46, n. 4, p. 1055-1061, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12639-022-01514-1>. Acesso em: 21 fev. 2024.

KING, Gregory G. *et al.* Pathophysiology of severe asthma: We've only just started. **Respirology**, v. 23, n. 3, p. 262-271, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/resp.13251>. Acesso em: 21 fev. 2024.

KIPS, Johan C. *et al.* Murine models of asthma. **European Respiratory Journal**, v. 22, n. 2, p. 374-382, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00026403>. Acesso em: 12 fev. 2024.

KOMAIKO, Jennifer; MCCLEMENTS, David Julian. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of food engineering**, v. 146, p. 122-128, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.003>. Acesso em: 27 fev. 2024.

KOTMANOVA, Z. *et al.* GABA-ergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract modulates cough in the cat. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 257, p. 100-106, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.02.009>. Acesso em: 12 fev. 2024.

KOZIOL, Agata *et al.* An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1156-1168, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557514666141127145820>. Acesso em: 12 fev. 2024.

KOZIOL-WHITE, Cynthia J.; PANETTIERI, Reynold A. Modulation of bronchomotor tone pathways in airway smooth muscle function and bronchomotor tone in asthma. **Clinics in chest medicine**, v. 40, n. 1, p. 51-57, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2018.10.003>. Acesso em: 12 fev. 2024.

KROHN, Friedrich *et al.* The integrated brain network that controls respiration. **Elife**, v. 12, p. e83654, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.83654>. Acesso em: 12 fev. 2024.

KUME, H.; TAKAGI, K. Involvement of G proteins between receptors and KCa channels in the regulation of airway tone by the autonomic nervous system. **Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi**, v. 33, p. 116-124, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8752494/>. Acesso em: 12 fev. 2024.

KUO, Ivana Y.; EHRLICH, Barbara E. Signaling in muscle contraction. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 2, p. a006023, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006023>. Acesso em: 12 fev. 2024.

KURUVILLA, Merin E.; LEE, F.; LEE, Gerald B. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 56, n.

2, p. 219-233, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>. Acesso em: 12 fev. 2024.

LAJOE, Stephane *et al.* Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. **Nature immunology**, v. 11, n. 10, p. 928-935, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.1926>. Acesso em: 12 ago. 2024.

LAM M., Lamanna E., BOURKE J. E. Regulation of airway smooth muscle contraction in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1124, 381–422. doi:10.1007/978-981-13-5895-1_16, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_16. Acesso em: 13 ago. 2024.

LAMBRECHT, Bart N.; HAMMAD, Hamida. The immunology of asthma. **Nature immunology**, v. 16, n. 1, p. 45-56, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.3049>. Acesso em: 13 aug. 2024.

LEE, H. S. *et al.* Effect of 1,8-cineole in dermatophagoides pteronyssinus-stimulated bronchial epithelial cells and mouse model of asthma. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 946-952, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00876>. Acesso em: 02 aug. 2024.

LEE, James J. *et al.* Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. **Science**, v. 305, n. 5691, p. 1773-1776, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1099472>. Acesso em: 02 aug. 2024.

LEE, Kai K. *et al.* Global physiology and pathophysiology of cough: part 1: cough phenomenology–CHEST guideline and expert panel report. **Chest**, v. 159, n. 1, p. 282-293, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.08.2086>. Acesso em: 02 aug. 2024.

LEE, Kyung-Dong; SHIM, Sun-Yup. Anti-Inflammatory Food in Asthma Prepared from Combination of Raphanus sativus L., Allium hookeri, Acanthopanax sessiliflorum, and Dendropanax morbiferus Extracts via Bioassay-Guided Selection. **Foods**, v. 11, n. 13, p. 1910, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11131910>. Acesso em: 28 mar. 2024.

LEVY, Mark L. *et al.* Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. **npj Primary Care Respiratory Medicine**, v. 33, n. 1, p. 7, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41533-023-00330-1>. Acesso em: 28 mar. 2024.

LI, Jianming *et al.* Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. **Food chemistry**, v. 232, p. 191-197, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.147>. Acesso em: 26 mar. 2024.

LI, Li *et al.* Profiling of volatile fragrant components in a mini-core collection of mango germplasms from seven countries. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0187487, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187487>. Acesso em: 28 mar. 2024.

- LI, Yu *et al.* Study on mechanism of Qinbaohong oral liquid in anti-inflammation, stopping cough, eliminating phlegm and relieving asthma based on network pharmacology. **Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 46, n. 22, p. 5902-5911, 2021.
- LI, Ziping *et al.* The distinctive role of menthol in pain and analgesia: Mechanisms, practices, and advances. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1006908>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- LI, Ziyuan *et al.* Camphor Attenuates Hyperalgesia in Neuropathic Pain Models in Mice. **Journal of Pain Research**, p. 785-795, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/jpr.s398607>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- LIMA, T. S. *et al.* Cineole-containing nanoemulsion: Development, stability, and antibacterial activity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 239, p. 105113, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105113>. Acesso em: 15 aug. 2024.
- LIU, Qiaoyu *et al.* Physicochemical properties affecting the fate of nanoparticles in pulmonary drug delivery. **Drug discovery today**, v. 25, n. 1, p. 150-159, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.023>. Acesso em: 15 aug. 2024.
- LIU, Qingqing *et al.* Food-grade nanoemulsions: Preparation, stability and application in encapsulation of bioactive compounds. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4242, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24234242>. Acesso em: 27 mar. 2024.
- LIU, Wei *et al.* Antitussive, expectorant, and bronchodilating effects of quinazoline alkaloids ($\pm$)-vasicine, deoxyvasicine, and ($\pm$)-vasicinone from aerial parts of *Peganum harmala* L. **Phytomedicine**, v. 22, n. 12, p. 1088-1095, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.08.005>. Acesso em: 15 aug. 2024.
- LOCKETT, Angelia D.; WU, Yidi; GUNST, Susan J. Elastase alters contractility and promotes an inflammatory synthetic phenotype in airway smooth muscle tissues. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 314, n. 4, p. L626-L634, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00334.2017>. Acesso em: 15 aug. 2024.
- LOO, Ching-Yee; LEE, Wing-Hin. Nanotechnology-based therapeutics for targeting inflammatory lung diseases. **Nanomedicine**, v. 17, n. 12, p. 865-879, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0447>. Acesso em: 15 aug. 2024.
- LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. Terpenoids. **Pharmacognosy: Fundamentals, applications and strategies**, p. 233-266, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1>. Acesso em: 15 aug. 2024.
- LUNZ, Karin; STAPPEN, Iris. Back to the roots—an overview of the chemical composition and bioactivity of selected root-essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3155, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26113155>. Acesso em: 02 aug. 2024.

MAJUMDER, Joydeb; TARATULA, Oleh; MINKO, Tamara. Nanocarrier-based systems for targeted and site specific therapeutic delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 144, p. 57-77, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.07.010>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MAKARENKOVA, Helen P.; SHAH, Sameer B.; SHESTOPALOV, Valery I. The two faces of pannexins: new roles in inflammation and repair. **Journal of inflammation research**, p. 273-288, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/jir.s128401>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MARQUES, Lara; VALE, Nuno. Salbutamol in the Management of Asthma: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14207, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms232214207>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MARTIN, James G. *et al.* Airway smooth muscle function in asthma. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.993406>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MARTIN, Joanne; TOWNSHEND, Jennifer; BRODLIE, Malcolm. Diagnosis and management of asthma in children. **BMJ Paediatrics Open**, v. 6, n. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.993406>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MASIULIS, Simonas *et al.* GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. **Nature**, v. 565, n. 7740, p. 454-459, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0832-5>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MAZZONE, Stuart B.; MCGARVEY, Lorcan. Mechanisms and rationale for targeted therapies in refractory and unexplained chronic cough. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 619-636, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpt.2003>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MAZZONE, Stuart B.; UNDEM, Bradley J. Vagal afferent innervation of the airways in health and disease. **Physiological reviews**, v. 96, n. 3, p. 975-1024, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2015>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MCDOUGALL, Jason J.; MCKENNA, Meagan K. Anti-Inflammatory and Analgesic Properties of the Cannabis Terpene Myrcene in Rat Adjuvant Monoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7891, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23147891>. Acesso em: 27 fev. 2024.

MCGOVERN, Alice E. *et al.* Translational review: neuroimmune mechanisms in cough and emerging therapeutic targets. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 142, n. 5, p. 1392-1402, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.004>. Acesso em: 27 fev. 2023.

MCKINLEY, Laura *et al.* TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 4089-4097, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.4089>. Acesso em: 27 fev. 2020.

MENEZES, Pedro Modesto Nascimento *et al.* Analytical and pharmacological validation of the quantification of phenol red in a mouse model: An optimized method to evaluate expectorant drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 98, p. 106586, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106586>. Acesso em: 27 fev. 2024.

MENEZES, Pedro Modesto Nascimento *et al.* Chemical analysis by LC-MS of Cannabis sativa root samples from Northeast Brazil and evaluation of antitussive and expectorant activities. **Planta Medica**, v. 88, n. 13, p. 1223-1232, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/a-1628-2299>. Acesso em: 27 fev. 2024.

MILLER, Martin R. *et al.* Standardisation of spirometry. **European respiratory journal**, v. 26, n. 2, p. 319-338, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00034805>. Acesso em: 27 fev. 2024.

MOHAMAD, Soad A. *et al.* A novel nasal co-loaded loratadine and sulpiride nanoemulsion with improved downregulation of TNF- α , TGF- β and IL-1 in rabbit models of ovalbumin-induced allergic rhinitis. **Drug delivery**, v. 28, n. 1, p. 229-239, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1872741>. Acesso em: 27 fev. 2022.

MOHAMMADI, A. *et al.* Immunomodulatory effects of Thymol through modulation of redox status and trace element content in experimental model of asthma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 856-861, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.154>. Acesso em: 02 Aug. 2024.

MORAL, L. *et al.* Asthma diagnosis in infants and preschool children: a systematic review of clinical guidelines. **Allergologia et immunopathologia**, v. 47, n. 2, p. 107-121, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.05.002>. Acesso em: 12 aug. 2024.

MORICE, Alyn *et al.* Chronic cough: new insights and future prospects. **European Respiratory Review**, v. 30, n. 162, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/16000617.0127-2021>. Acesso em: 12 aug. 2024.

MORICE, Alyn H. *et al.* ERS guidelines on the diagnosis and treatment of chronic cough in adults and children. **European Respiratory Journal**, v. 55, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/13993003.01136-2019>. Acesso em: 12 aug. 2024.

MORITA, Kayo; KAMEI, Junzo. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the anti-tussive effect of moguisteine. **European journal of pharmacology**, v. 395, n. 2, p. 161-164, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00197-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00197-7). Acesso em: 02 aug. 2020.

MUKHOPADHYAY, Somnath; HOWLETT, Allyn C. Chemically distinct ligands promote differential CB1 cannabinoid receptor-Gi protein interactions. **Molecular pharmacology**, v. 67, n. 6, p. 2016-2024, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/mol.104.003558>. Acesso em: 02 aug. 2020.

MUTOLO, Donatella. Brainstem mechanisms underlying the cough reflex and its regulation. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 243, p. 60-76, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.05.008>. Acesso em: 02 aug. 2020.

NAJDA, Agnieszka *et al.* Woodfordia fruticosa extract nanoemulsion: Influence of processing treatment on droplet size and its assessment for in vitro antimicrobial and anti-inflammatory activity. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.944856>. Acesso em: 02 jul. 2023.

NAKAJIMA, Yuta *et al.* Atropine facilitates water-evoked swallows via central muscarinic receptors in anesthetized rats. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 325, n. 2, p. G109-G121, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00039.2023>. Acesso em: 02 aug. 2024.

NANDA, Anil *et al.* Asthma in the older adult. **Journal of Asthma**, v. 57, n. 3, p. 241-252, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02770903.2019.1565828>. Acesso em: 02 jul. 2023.

NASCIMENTO, Oliver A. *et al.* The economic impact of asthma on private healthcare system in Brazil: Economic impact of asthma in Brazil. **Medicine**, v. 102, n. 12, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000033077>. Acesso em: 08 jan. 2024.

NIU, Chao *et al.* Enhanced pause correlates with airway neutrophils and airway-epithelial injury in asthmatic mice treated with dexamethasone. **Journal of Asthma**, v. 56, n. 1, p. 11-20, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02770903.2018.1494190>. Acesso em: 08 jan. 2024.

OHTSUBO, S. *et al.* Inhibition of the compound action potentials of frog sciatic nerves by aroma oil compounds having various chemical structures. **Pharmacology research & perspectives**, v.3, n. 2, p. 1-13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prp2.127>. Acesso em: 28 mar. 2024.

OLIVER, Maria Plaza *et al.* Donepezil Nanoemulsion Induces a Torpor-like State with Reduced Toxicity in Nonhibernating *Xenopus laevis* Tadpoles. **ACS nano**, v. 18, n. 35, p. 23991-24003, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c02012>. Acesso em: 27 mar. 2024.

OLORUKOOBA, A. B.; ODOMA, S. Elucidation of the possible mechanism of analgesic action of methanol stem bark extract of *Uapaca togoensis* pax in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 245, p. 112156, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112156>. Acesso em: 17 jan. 2024.

OLSEN, Wendy L. *et al.* Intra-arterial, but not intrathecal, baclofen and codeine attenuates cough in the cat. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 640682, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.640682>. Acesso em: 17 jan. 2024.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION/DEVELOPMENT. OECD guideline (423) for testing of chemicals-acute oral toxicity-acute toxic class method. 2001. Disponível

em: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en.html. Acesso em: 15 aug. 2024.

OSTROM, Katrina F. *et al.* Physiological roles of mammalian transmembrane adenylyl cyclase isoforms. **Physiological Reviews**, v. 102, n. 2, p. 815-857, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.640682>. Acesso em: 17 jan. 2024.

ÖZKAN, Müge; ESKIOCAK, Yusuf Cem; WINGENDER, Gerhard. Macrophage and dendritic cell subset composition can distinguish endotypes in adjuvant-induced asthma mouse models. **Plos one**, v. 16, n. 6, p. e0250533, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250533>. Acesso em: 17 jan. 2022.

OZOGUL, Yesim *et al.* Recent developments in industrial applications of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 102685, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102685>. Acesso em: 17 jan. 2024.

PADEM, N.; SALTOUN, C. Classification of asthma. In: **Allergy and asthma proceedings**. 2019. p. 385-388. Disponível em: <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4253>. Acesso em: 11 jan. 2024.

PANDEY, Vikas; KOHLI, Seema. Nanoformulations in human health conditions: the paradigm shift. **Nanoformulations in Human Health: Challenges and Approaches**, p. 13-42, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-41858-8_2. Acesso em: 02 jan. 2024.

PAPI, A. *et al.* Seminar Asthma. **Lancet**, v. 391, p. 783-800, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/>. Acesso em: 07 jan. 2024.

PATEL, Hema J. *et al.* Inhibition of guinea-pig and human sensory nerve activity and the cough reflex in guinea-pigs by cannabinoid (CB2) receptor activation. **British journal of pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 261-268, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038%2Fsj.bjp.0705435>. Acesso em: 27 fev. 2024.

PATEL, Mehaben *et al.* Limonene-induced activation of A 2A adenosine receptors reduces airway inflammation and reactivity in a mouse model of asthma. **Purinergic Signalling**, v. 16, p. 415-426, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09697-z>. Acesso em: 27 fev. 2024.

PATIL, Rajeshwari H. *et al.* Dexamethasone inhibits inflammatory response via down regulation of AP-1 transcription factor in human lung epithelial cells. **Gene**, v. 645, p. 85-94, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.024>. Acesso em: 27 fev. 2024.

PATRA, Jayanta Kumar *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-33, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>. Acesso em: 27 fev. 2024.

PAULA-FREIRE, Lyvia Izaura Gomes de *et al.* Evaluation of the antinociceptive activity of Ocimum gratissimum L.(Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice.

Phytotherapy Research, v. 27, n. 8, p. 1220-1224, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.4845>. Acesso em: 27 fev. 2024.

PAUMGARTTEN, F. J. *et al.* Single dose toxicity study of beta-myrcene, a natural analgesic substance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas**, v. 23, n. 9, p. 873-877, 1990.

PAVÓN-ROMERO, Gandhi F. *et al.* Neuroimmune pathophysiology in asthma. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 1174, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.663535>. Acesso em: 27 fev. 2024.

PECOVA, Tatiana *et al.* Itch and cough—similar role of sensory nerves in their pathogenesis. **Physiological Research**, v. 69, n. Suppl 1, p. S43, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.33549/physiolres.934403>. Acesso em: 27 fev. 2024.

PELAIA, Corrado *et al.* Interleukin-5 in the pathophysiology of severe asthma. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 1514, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01514>. Acesso em: 27 fev. 2024.

PINA, L. T. *et al.* Alcoholic monoterpenes found in essential oil of aromatic spices reduce allergic inflammation by the modulation of inflammatory cytokines. **Natural product research**, v. 33, n. 12, p. 1773-1777, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1434634>. Acesso em: 02 aug. 2024.

PITCHON, Raquel Reis *et al.* Asthma mortality in children and adolescents of Brazil over a 20-year period. **Jornal de pediatria**, v. 96, p. 432-438, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jped.2019.02.006>. Acesso em: 02 aug. 2024.

POLIACEK, Ivan *et al.* Role of the dorsomedial medulla in suppression of cough by codeine in cats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 246, p. 59-66, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.07.011>. Acesso em: 02 aug. 2024.

POTACZEK, Daniel P. *et al.* Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes. **Cellular Signalling**, v. 69, p. 109523, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109523>. Acesso em: 02 aug. 2024.

PRAKASH, Y. S. Emerging concepts in smooth muscle contributions to airway structure and function: implications for health and disease. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 311, n. 6, p. L1113-L1140, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00370.2016>. Acesso em: 02 aug. 2024.

PROSKOCIL, Becky J.; CALCO, Gina N.; NIE, Zhenying. Insulin acutely increases agonist-induced airway smooth muscle contraction in humans and rats. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 320, n. 4, p. L545-L556, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00232.2020>. Acesso em: 02 aug. 2024.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X). Acesso em: 07 fev. 2024.

QUINT, Jennifer K. *et al.* Short-acting beta-2-agonist exposure and severe asthma exacerbations: SABINA findings from Europe and North America. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 10, n. 9, p. 2297-2309. e10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.02.047>. Acesso em: 28 mar. 2024.

RAMNARINE, Sean I.; LIU, Yu-Chih; ROGERS, Duncan F. Neuroregulation of mucus secretion by opioid receptors and KATP and BKCa channels in ferret trachea in vitro. **British journal of pharmacology**, v. 123, n. 8, p. 1631-1638, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701786>. Acesso em: 28 mar. 2024.

RAMSAHAI, J. Michael; HANSBRO, Philip M.; WARK, Peter AB. Mechanisms and management of asthma exacerbations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 199, n. 4, p. 423-432, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201810-1931ci>. Acesso em: 28 mar. 2024.

RAO, V. S. N.; MENEZES, A. M. S.; VIANA, G. S. B. Effect of myrcene on nociception in mice. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 42, n. 12, p. 877-878, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb07046.x>. Acesso em: 27 fev. 2024.

REEVES, Kaitlin C. *et al.* Opioid receptor-mediated regulation of neurotransmission in the brain. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 919773, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.919773>. Acesso em: 27 fev. 2024.

REN, Binhui *et al.* SNAP23 is selectively expressed in airway secretory cells and mediates baseline and stimulated mucin secretion. **Bioscience reports**, v. 35, n. 3, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20150004>. Acesso em: 27 fev. 2024.

RIBEIRO-FILHO, Jaime *et al.* Carvone enantiomers differentially modulate IgE-mediated airway inflammation in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9209, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21239209>. Acesso em: 27 fev. 2021.

RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. **British journal of pharmacology**, v. 129, n. 1, p. 110-114, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/2Fsj.bjp.0703038>. Acesso em: 02 fev. 2020.

ROGERIO, Alexandre P.; ANDRADE, Edinéia L.; CALIXTO, João B. C-fibers, but not the transient potential receptor vanilloid 1 (TRPV1), play a role in experimental allergic airway inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 662, n. 1-3, p. 55-62, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.027>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ROGERS, Duncan F. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. **Respiratory care**, v. 52, n. 9, p. 1134-1149, 2007. Disponível em: <https://rc.rcjournal.com/content/52/9/1134.short>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ROGERS, Duncan F.; BARNES, Peter J. Treatment of airway mucus hypersecretion. **Annals of medicine**, v. 38, n. 2, p. 116-125, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07853890600585795>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ROTHER, Thomas *et al.* Diagnosis and management of asthma—the Swiss Guidelines. **Respiration**, v. 95, n. 5, p. 364-380, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000486797>. Acesso em: 27 fev. 2024.

RUBIN, Bruce K. Aerosol medications for treatment of mucus clearance disorders. **Respiratory Care**, v. 60, n. 6, p. 825-832, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4187/respcare.04087>. Acesso em: 27 fev. 2024.

RUBIN, Bruce K. Mucolytics, expectorants, and mucokinetic medications. **Respiratory Care**, v. 52, n. 7, p. 859-865, 2007.

RUFINO, Ana Teresa *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. **European journal of pharmacology**, v. 750, p. 141-150, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.018>. Acesso em: 27 fev. 2024.

SABERI, Amir Hossein; FANG, Yuan; MCCLEMENTS, David Julian. Stabilization of vitamin E-enriched mini-emulsions: Influence of organic and aqueous phase compositions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 449, p. 65-73, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.042>. Acesso em: 27 mar. 2024.

SAGLANI, Sejal; MENZIE-GOW, Andrew N. Approaches to asthma diagnosis in children and adults. **Frontiers in pediatrics**, v. 7, p. 148, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00148>. Acesso em: 03 nov. 2024.

SAKAE, Harumi *et al.* Ceramide Nanoliposomes as Potential Therapeutic Reagents for Asthma. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 591, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cells12040591>. Acesso em: 03 nov. 2024.

SANDERS, Niek N. *et al.* Mucolytic activity of bacterial and human chitinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 5, p. 839-846, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.01.011>. Acesso em: 03 nov. 2024.

SANTOS, Edgleyson C. dos *et al.* The monoterpene 1, 8-cineole prevents cerebral edema in a murine model of severe malaria. **Plos one**, v. 17, n. 5, p. e0268347, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268347>. Acesso em: 05 dez. 2024.

SANTUS, Pierachille; RADOVANOVIC, Dejan; CHIUMELLO, Davide Alberto. Mucins and asthma: are we headed to the revolutionary road?. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1955, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm8111955>. Acesso em: 05 dez. 2024.

SAUNDERS, Ruth *et al.* Prostaglandin D2 type 2 receptor antagonism reduces airway smooth muscle mass in asthma: mechanistic insights from in vitro and computational models. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 479, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao6451>. Acesso em: 05 dez. 2024.

SCHEPETKIN, Igor A. *et al.* Neutrophil Immunomodulatory Activity of Nerolidol, a Major Component of Essential Oils from *Populus balsamifera* Buds and Propolis. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3399, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11233399>. Acesso em: 05 dez. 2024.

SCHERER, Paul C. *et al.* TRPV1 is a physiological regulator of μ -opioid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 51, p. 13561-13566, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.1717005114>. Acesso em: 02 jun. 2024.

SCOVILLE, David K. *et al.* Quantum dots and mouse strain influence house dust mite-induced allergic airway disease. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 368, p. 55-62, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.018>. Acesso em: 02 jun. 2024.

SELNØ, Anette T. Hansen; SUMBAYEV, Vadim V.; GIBBS, Bernhard F. IgE-dependent human basophil responses are inversely associated with the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1052290>. Acesso em: 04 jun. 2024.

SHEN, Zhong-Jian; MALTER, James S. Eosinophils, Pin1 and the Response to Respiratory Viral Infection and Allergic Stimuli. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 39, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2019031697>. Acesso em: 04 jun. 2024.

SHI, Rui *et al.* Naringin and naringenin relax rat tracheal smooth by regulating BKCa activation. **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 9, p. 963-970, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.4364>. Acesso em: 04 jun. 2024.

SHI, Rui *et al.* Naringin and naringenin relax rat tracheal smooth by regulating BKCa activation. **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 9, p. 963-970, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.4364>. Acesso em: 07 jul. 2020.

SIGEL, Erwin; STEINMANN, Michael E. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40224-40231, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664>. Acesso em: 07 jul. 2020

SIMERA, M.; VETERNIK, M.; POLIACEK, I. Naloxone blocks suppression of cough by codeine in anesthetized rabbits. In: *Respiratory Regulation-The Molecular Approach*. Springer, Dordrecht, v. 756, p. 65-71, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-007-4549-0_9. Acesso em: 02 jul. 2020.

SIMERA, Michal *et al.* Differential inhibition of cough by GABAA and GABAB receptor antagonists in the nucleus of the solitary tract in cats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 315, p. 104115, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resp.2023.104115>. Acesso em: 21 ago. 2024.

SINYOR, Benjamin; PEREZ, Livasky Concepcion. Pathophysiology of asthma. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551579/>. Acesso em: 03 ago. 2024.

SOETHOUDT, Marjolein *et al.* Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 13958, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms13958> Acesso em: 05 ago. 2022.

SOUSA, Cátia; MENDES, Alexandrina Ferreira. Monoterpenes as sirtuin-1 activators: therapeutic potential in aging and related diseases. **Biomolecules**, v. 12, n. 7, p. 921, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom12070921>. Acesso em: 02 abr. 2024.

SOUSA, Damião P. *et al.* Spasmolytic Activity of Carvone and Limonene Enantiomers. **Natural product communications**, v. 10, n. 11, p. 1893-1896, 2015. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1501001120>. Acesso em: 08 nov. 2022.

SURENDRAN, Shelini *et al.* Myrcene—what are the potential health benefits of this flavouring and aroma agent?. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 699666, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.699666>. Acesso em: 18 mar. 2023.

SURESH, Parvathy *et al.* Development of a Novel Methotrexate-Loaded Nanoemulsion for Rheumatoid Arthritis Treatment with Site-Specific Targeting Subcutaneous Delivery. **Nanomaterials**, v. 12, n. 8, p. 1299, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano12081299>. Acesso em: 18 mar. 2023

SUTOVSKA, M.; NOSALOVA, G.; FRANOVA, S. The role of potassium ion channels in cough and other reflexes of the airways. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 673-683, 2007. Disponível em: https://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/11_07_s5/pdf/673_11_07_s5_article.pdf. Acesso em: 17 set. 2024.

SVAJDOVA, Simona; BUDAY, Tomas; BROZMANOVA, Mariana. Lidocaine, a Non-selective Inhibitor of Voltage-Gated Sodium Channels, Blocks Chemically-Induced Cough in Awake Naïve Guinea Pigs. **Advances in Pulmonary Medicine: Research and Innovations**, p. 1-9, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/5584_2018_326. Acesso em: 22 set. 2024.

TANAKA, M.; MARUYAMA, K. Mechanisms of Capsaicin- and Citric-Acid-Induced Cough Reflexes in Guinea Pigs. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 77-82, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1254/jphs.fpj05014x>. Acesso em: 21 set. 2024.

TARANTINO, Lisa M. *et al.* Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strains. **Mammalian Genome**, v. 11, n. 7, p. 555-564, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s003350010107>. Acesso em: 08 out. 2020.

TILDY, Bernadett E.; ROGERS, Duncan F. Therapeutic options for hydrating airway mucus in cystic fibrosis. **Pharmacology**, v. 95, n. 3-4, p. 117-132, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000377638>. Acesso em: 08 out. 2020.

TIWARY, Meenakshi; SAMARASINGHE, Amali E. Initiation and pathogenesis of severe asthma with fungal sensitization. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 913, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10040913>. Acesso em: 08 out. 2022.

ULLMANN, Nicola *et al.* Asthma: differential diagnosis and comorbidities. **Frontiers in pediatrics**, v. 6, p. 276, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00276>. Acesso em: 08 out. 2022.

USHARANI, Nagarajan; KANTH, Swarna Vinodh; SARAVANAN, Natarajan. Current nanotechnological strategies using lipids, carbohydrates, proteins and metal conjugates-based carrier systems for diagnosis and treatment of tuberculosis—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.087>. Acesso em: 10 out. 2022.

VARECHOVA, S. *et al.* Stimulus response latency of cough and expiration reflex depends on breathing in the rabbit. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 25, n. 3, p. 242-247, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.03.006>. Acesso em: 27 fev. 2024.

VASCONCELOS, Juliana Fraga *et al.* The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1216-1221, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.04.011>. Acesso em: 27 mai. 2020.

VASILEIOU, Eleftheria *et al.* Effectiveness of influenza vaccines in asthma: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 8, p. 1388-1395, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/cix524>. Acesso em: 27 mai. 2020.

VIJ, Neeraj. Synthesis and evaluation of airway-targeted PLGA-PEG nanoparticles for drug delivery in obstructive lung diseases. In: **Nanoparticles in Biology and Medicine: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 147-154. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0319-2_11. Acesso em: 27 mai. 2020.

VIRMANI, Tarun *et al.* Nanocarrier-based approaches to combat chronic obstructive pulmonary disease. **Nanomedicine**, n. 00, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0403>. Acesso em: 27 mai. 2020.

VOELKER, Dennis R.; NUMATA, Mari. Phospholipid regulation of innate immunity and respiratory viral infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 12, p. 4282-4289, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.AW118.003229>. Acesso em: 27 mai. 2020.

WAGNER, Jasmin K. *et al.* Sex Differences in the Anxiolytic Properties of Common Cannabis Terpenes, Linalool and β -Myrcene, in Mice. **NeuroSci**, v. 5, n. 4, p. 635-649, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/neurosci5040045>. Acesso em: 28 fev. 2025.

WALLACE, Emma *et al.* A systematic review of methods of citric acid cough reflex testing. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 58, p. 101827, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2019.101827>. Acesso em: 27 fev. 2024.

WANG, Kimberley CW *et al.* Asthma: Pharmacological degradation of the airway smooth muscle layer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 126, p. 105818, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105818>. Acesso em: 05 mar. 2024.

WANG, Kimberley CW *et al.* Transition from phasic to tonic contractility in airway smooth muscle after birth: an experimental and computational modeling study. **Journal of engineering and science in medical diagnostics and therapy**, v. 2, n. 1, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1115/1.4042312>. Acesso em: 15 jun. 2021.

WANG, S. *et al.* Effects of furosemide on allergic asthmatic responses in mice. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, n. 10, p. 1456-1467, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03811.x>. Acesso em: 19 fev. 2024.

WANG, Z. *et al.* Butylphthalide ameliorates airway inflammation and mucus hypersecretion via NF- κ B in a murine asthma model. **International immunopharmacology**, v. 76, p. 105873, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105873>. Acesso em: 27 fev. 2024.

WATKINS, Rebekah *et al.* Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 6055, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S92162>. Acesso em: 11 fev. 2024.

WEI-HONG, Tang *et al.* Pharmacological and pharmacokinetic studies with vitamin D-loaded nanoemulsions in asthma model. **Inflammation**, v. 37, p. 723-728, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9790-0>. Acesso em: 27 fev. 2024.

WENZEL, Sally E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature medicine**, v. 18, n. 5, p. 716-725, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.2678>. Acesso em: 06 jan. 2021.

WICHER, Sarah A. *et al.* Aging increases senescence, calcium signaling, and extracellular matrix deposition in human airway smooth muscle. **PloS one**, v. 16, n. 7, p. e0254710, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254710>. Acesso em: 06 jan. 2021.

WIDDICOMBE, Jonathan H.; WINE, Jeffrey J. Airway gland structure and function. **Physiological reviews**, v. 95, n. 4, p. 1241-1319, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2014>. Acesso em: 02 jul. 2021.

WILKINSON, Mark *et al.* Mucolytics for bronchiectasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001289.pub2>. Acesso em: 02 jul. 2021.

XAVIER, Edilaine S. *et al.* Therapeutic efficacy of carvacrol-loaded nanoemulsion in a mouse model of schistosomiasis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 917363, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.917363>. Acesso em: 15 jul. 2023.

XIE, Luyu *et al.* Adverse Drug Events Related to Common Asthma Medications in US Hospitalized Children, 2000–2016. **Drugs-Real World Outcomes**, p. 1-13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40801-022-00304-8>. Acesso em: 12 set. 2023.

XU, Fang-zhou *et al.* Synthesis and antitussive evaluation of verticinone-cholic acid salt, a novel and potential cough therapeutic agent. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 10, p. 1591-1596, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00179.x>. Acesso em: 08 mai. 2024.

- XU, Xianghuai *et al.* Association of cough hypersensitivity with tracheal TRPV1 activation and neurogenic inflammation in a novel guinea pig model of citric acid-induced chronic cough. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 7, p. 2913-2924, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177%2F0300060518778951>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- YANG, Jing; ZHONG, Chao; YU, Jun. Natural Monoterpenes as Potential Therapeutic Agents against Atherosclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2429, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24032429>. Acesso em: 18 jan. 2024.
- YANG, Lihong; LIAO, Min. Influence of myrcene on inflammation, matrix accumulation in the kidney tissues of streptozotocin-induced diabetic rat. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 10, p. 5555-5560, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.090>. Acesso em: 18 fev. 2022.
- YANG, Qin; SHI, Wei. Rho/ROCK-MYOCN in regulating airway smooth muscle growth and remodeling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 321, n. 1, p. L1-L5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00034.2021>. Acesso em: 20 fev. 2022.
- YAO, Pengyu; LIU, Yajuan. Terpenoids: Natural Compounds for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Therapy. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 272, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28010272>. Acesso em: 05 ago. 2024.
- YAYAN, Josef; RASCHE, Kurt. Asthma and COPD: similarities and differences in the pathophysiology, diagnosis and therapy. **Respiratory Medicine and Science**, p. 31-38, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/5584_2015_206. Acesso em: 15 ago. 2020.
- YOSHIDA, Shota *et al.* Effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on chemically induced lung inflammatory and neoplastic lesions in rodents. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 4, p. 255-265, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1293/tox.2018-0012>. Acesso em: 18 ago. 2020.
- YOUNG, Andrew *et al.* Mouse model demonstrates strain differences in susceptibility to opioid side effects. **Neuroscience Letters**, v. 675, p. 110-115, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.022>. Acesso em: 18 ago. 2020.
- ZAHY, Mohamed Reda *et al.* Enhancing the antimicrobial activity of d-limonene nanoemulsion with the inclusion of ϵ -polylysine. **Food Chemistry**, v. 221, p. 18-23, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.037>. Acesso em: 21 ago. 2020.
- ZHANG, Guangping *et al.* Comparative study of the efficacy and pharmacokinetics of reduning injection and atomization inhalation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109226, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109226>. Acesso em: 21 ago. 2020.
- ZHANG, Shui-juan *et al.* Ambroxol inhalation ameliorates LPS-induced airway inflammation and mucus secretion through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 775, p. 138-148, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.030>. Acesso em: 21 ago. 2020.

ZHANG, Ting; ZHOU, Xiangdong. Clinical application of expectorant therapy in chronic inflammatory airway diseases. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 7, n. 4, p. 763-767, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3892%2Fetm.2014.1494>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ZHANG, Wenwu; GUNST, Susan J. Molecular mechanisms for the mechanical modulation of airway responsiveness. **Journal of engineering and science in medical diagnostics and therapy**, v. 2, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3892%2Fetm.2014.1494>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ZHANG, Wenwu; WU, Yidi; GUNST, Susan. Membrane Adhesion Junctions Regulate Airway Smooth Muscle Function and Phenotype. **Physiological Reviews**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2022>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ZHAO, Junjun *et al.* Th17 cells in inflammatory bowel disease: cytokines, plasticity, and therapies. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/8816041>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ZHONG, Wenhao *et al.* Recent applications and strategies in nanotechnology for lung diseases. **Nano Research**, v. 14, p. 2067-2089, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12274-020-3180-3>. Acesso em: 02 jan. 2023.

ZHOU, Yujiao *et al.* Effects of long-term application of metoprolol and propranolol in a rat model of smoking. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 41, n. 9, p. 708-715, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12261>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ZHU, Jinfang. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 14-24, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.010>. Acesso em: 27 jun. 2024.

ZHU, Yunxiang *et al.* Baseline goblet cell mucin secretion in the airways exceeds stimulated secretion over extended time periods, and is sensitive to shear stress and intracellular mucin stores. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0127267, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127267>. Acesso em: 04 jun. 2024.

ZHUANG, Jianguo *et al.* An advanced recording and analysis system for the differentiation of guinea pig cough responses to citric acid and prostaglandin E2 in real time. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0217366, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217366>. Acesso em: 06 jun. 2023.

ZUO, Xu *et al.* Recent Advances in Nanomaterials for Asthma Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14427, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390%2Fijms232214427>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Certificado de autorização

Certificamos que o projeto intitulado: "DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NANOEMULSÃO CONTENDO β -MIRCENO PARA O TRATAMENTO DA ASMA", registrado com o nº 0002/270121, sob a responsabilidade de **Fabrizio Souza Silva** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em 27/01/2021.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 05/05/2021 a 31/12/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> ; <i>Rattus norvegicus</i> *
Nº de animais	360 M e 360 F; 40 M* = 760
Peso/Idade	30-40 g/ 6-8 semanas; 250-300 g/ 6-8 semanas*
Sexo	Ambos
Origem	Biotério Central da UNIVASF

Em: 20/04/2021

Diego César Nunes da Silva
DIEGO CÉSAR NUNES DA SILVA
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNIVASF