



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

DAVID SOUZA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE NANOEMULSÃO CONTENDO
GERANIOL COM A AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE *IN VIVO* E *IN
VITRO* PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS
GASTROINTESTINAIS E RESPIRATÓRIAS**

Feira de Santana, BA

2025

DAVID SOUZA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE NANOEMULSÃO CONTENDO
GERANIOL COM A AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE *IN VIVO* E *IN
VITRO* PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS
GASTROINTESTINAIS E RESPIRATÓRIAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Silva

Feira de Santana, BA

2025

DAVID SOUZA SILVA

"DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE NANOEMULSÃO CONTENDO GERANIOL COM A AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS GASTROINTESTINAIS E RESPIRATÓRIAS"

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, 14 de maio de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **FABRÍCIO SOUZA SILVA**
Data: 14/05/2025 11:54:38-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

UNIVASF

Documento assinado digitalmente
 **MARIGILSON PONTES DE SIQUEIRA MOURA**
Data: 14/05/2025 14:09:31-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Marigilson Pontes de Siqueira Moura**

UNIVASF

Documento assinado digitalmente
 **MAX DENISSON MAURICIO VIANA**
Data: 14/05/2025 13:02:52-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Max Denisson Maurício Viana**

UFBA

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL GUIMARAES BENEVIDES**
Data: 19/05/2025 08:19:48-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro: Prof^ª. Dr^ª. **Raquel Guimarães Benevides**

UEFS

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIA OLIVEIRA DE LIMA GOMES**
Data: 16/05/2025 14:56:01-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro: Prof^ª. Dr^ª. **Flávia Oliveira de Lima**

UEFS

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

S579d Silva, David Souza

Desenvolvimento de sistema de nanoemulsão contendo geraniol com a avaliação da sua atividade in vivo e in vitro para o tratamento de desordens gastrointestinais e respiratórias. / David Souza Silva. – 2025.

117 f.: il.

Orientador: Fabrício Souza Silva

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2025.

1.Tosse. 2.Traqueia. 3.Nanoemulsão. 4.Íleo. 5.Espasmolítico. 6.Antidiarreico.
I.Silva, Fabrício Souza, orient. II.Universidade Estadual de Feira de Santana. III.
Título.

CDU: 661.71

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida mãe, Cleidimar de Souza, que sempre faz das minhas realizações suas realizações pessoais, um exemplo de amor inesgotável a todos os momentos e ao meu pai Irenildo Antonio da Silva que me tornou o profissional e ser humano que sou hoje.

Agradeço a minha companheira Jamilly Araújo, que a todos os momentos de alegria e felicidade esteve comigo sobre tudo nos momentos mais difíceis, fonte de carinho e amor inestimáveis.

Agradeço ao Prof. Drº Fabrício Souza Silva meu orientador por me apoiarem nesse projeto e ter me acolhido com os braços abertos, nunca me deixando faltar com meus compromissos, falhar na execução desse trabalho, agindo sempre com dedicação e profissionalismo em todos os âmbitos de sua carreira acadêmica, sendo um espelho e uma referência sempre. Obrigado por proporcionar tantas oportunidades de crescimento e ser tão dedicado e comprometido.

Ao Prof. Dr. Luciano Riberio, por ter ajudado na execução do processamento estatístico.

Ao Dr. Pedro Modesto sempre mais do que presente, me acompanhando todos os momentos, me ensinando, me instigando a pesquisar e nunca baixar a cabeça quando os resultados forem falhos e continuar sempre tentando de novo. Um exemplo de mestre e amigo.

Aos estudantes da iniciação científica Nívea Meyriane Barros, Maria Eduarda Lopes da Cruz Chaves, Murilo Soares Da Silva, João Lázaro de Oliveira Rocha, Paulo Ivis de Brito Moreira, João Lucas Saraiva Dantas, que colaboraram na execução dos experimentos e me ajudaram muito tornando esse trabalho possível. A todos os professores do colegiado do programa de pós-graduação em Biotecnologia e aos professores do colegiado de farmácia da UNIVASF, exemplo de excelência e os melhores no que fazem, todo o meu respeito e admiração.

A meu pai celestial, que nos momentos mais difíceis e em meio a minha distância e pequenez se mostrou presente e nos últimos meses mostrou toda a sua misericórdia e desejo em finalizar esse projeto. Teus planos querido Deus, são maiores que minha ínfima compreensão.

A UEFS e a UNIVASF, por ter me proporcionado minha formação acadêmica. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O geraniol (GE) é um monoterpeneo majoritário de algumas espécies vegetais utilizadas na medicina popular, possuindo propriedades farmacológicas relevantes, incluindo antitumoral, anti-inflamatória, antioxidativa, antimicrobiana, efeitos hepatoprotetores, cardioprotetores e neuroprotetores. Apesar da ampla descrição sobre seus efeitos, a atividade do GE para o tratamento de desordens respiratórias e gastrointestinais não foi explorada, tampouco em sistemas de nanoemulsões, que por sua vez melhoram a capacidade de entrega de fármacos nos sistemas biológicos. Dessa maneira, o GE e sua nanoformulação foram avaliados em modelos *in vitro* e *in vivo* frente a sua atividade farmacológica nesses dois sistemas fisiológicos. Para avaliação *in vitro*, foram testadas concentrações cumulativas do GE e sua nanoemulsão ($1,0 \times 10^{-7}$ - $3,0 \times 10^{-3}$ M) em amostras de íleo e traqueia isoladas de cobaias. No modelo *in vivo*, foram utilizadas doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg em modelo de diarreia induzida por óleo de ricino, velocidade de trânsito gastrointestinal com carvão aditivado e tosse induzida por ácido acético nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e com avaliação de toxicidade sub-aguda na dose de 2000 mg/kg. Os resultados demonstraram que o GE apresentou atividade espasmolítica em íleo nas contrações induzidas por carbacol, com possível mecanismo de ação envolvendo os canais de BKCa e TRPV1, com sua potência farmacológica aumentada com a formulação (F1) do monoterpeneo em seu sistema de nanoemulsão. O GE apresentou efeito anti-diarreico em camundongos nas doses de 200 e 400 mg/kg, havendo aumento de sua potência farmacológica em sua nanoemulsão em todas as doses, que por sua vez apresentou uma redução na velocidade de trânsito intestinal nas doses 200 e 400 mg/kg. O GE não apresentou toxicidade e nem atividade espasmolítica em traqueia isolada de cobaia, mas apresentou atividade antitussígena nas doses 100 e 200 mg/kg comparada à codeína. [...] Dessa maneira, o GE é um monoterpeneo com potencial biotecnológico tal como seu sistema de nanoemulsão, para distúrbios gastro-intestinais..

Palavras-chave: Tosse. Traqueia. Nanoemulsão. Íleo. Espasmolítico. Antidiarreico.

ABSTRACT

Geraniol (GE) is a major monoterpene in some plant species used in folk medicine and has relevant pharmacological properties, including antitumor, anti-inflammatory, antioxidative, antimicrobial, hepatoprotective, cardioprotective and neuroprotective effects. Despite the extensive description of its effects, the activity of EG in the treatment of respiratory and gastrointestinal disorders has not been explored, nor in nanoemulsion systems, which in turn improve the ability to deliver drugs in biological systems. In this way, EG and its nanoformulation were evaluated in *in vitro* and *in vivo* models for their pharmacological activity in these two physiological systems. For the *in vitro* evaluation, cumulative concentrations of EG and its nanoemulsion (1.0×10^{-7} - 3.0×10^{-3} M) were tested in samples of ileum and trachea isolated from guinea pigs. In the *in vivo* model, doses of 10, 50, 100, 200 and 400 mg/kg were used in a model of diarrhea induced by ricin oil, gastrointestinal transit speed with added charcoal and cough induced by acetic acid at doses of 100, 200 and 400 mg/kg and with evaluation of sub-acute toxicity at a dose of 2000 mg/kg. The results showed that GE had spasmolytic activity in the ileum in carbachol-induced contractions, with a possible mechanism of action involving the BKCa and TRPV1 channels, with its pharmacological potency increased with the formulation (F1) of the monoterpene in its nanoemulsion system. EG showed an anti-diarrheal effect in mice at doses of 200 and 400 mg/kg, with an increase in its pharmacological potency in its nanoemulsion at all doses, which in turn showed a reduction in intestinal transit speed at doses of 200 and 400 mg/kg. GE showed no toxicity or spasmolytic activity in isolated guinea pig trachea, but did show antitussive activity at doses of 100 and 200 mg/kg compared to codeine. [Thus, GE is a monoterpene with biotechnological potential, as is its nanoemulsion system, for gastrointestinal disorders.

Keywords: Cough. Trachea. Nanoemulsion. ileum. Spasmolytic. Antidiarrheal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estruturas moleculares do 1,8 – cineol, limoneno, linalol, com foco para o neral e geraniol que se apresentam como monoterpênicos isômeros com rotação no 2C, fazendo parte do citral. Imagem retirada do estudo realizado por VICENTE et al. (2013). 27
- Figura 2 – Efeito relaxante do GER nas contrações tônicas ileais induzidas por carbachol 1 μM , registro original do experimento e cumulativa de $1,0 \times 10^{-7}$ até $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores dos n=5 sobrepostos, expressos com $\pm\text{SEM}$ do experimento real obtido a partir do Windaq. Gráfico desenhado no Prisma, a partir dos dados brutos do Windaq convertidos para Excel. Essa estratégia foi útil para obtenção da AUC (área sobre a curva). O eixo (y) do gráfico demonstra a força em (g) do íleo isolado, o eixo (x) é o tempo em segundos de experimento, cada segundo gera um dado de (g) força que foram agrupados. Valores com pontos com barra média e erro com IC de 95%..56
- Figura 3 - Efeito do GER sem agente indutor de contração, registro original do experimento e cumulativa de $1,0 \times 10^{-7}$ até $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores dos n=5 sobrepostos, expressos com $\pm\text{SEM}$ do experimento real obtido a partir do Windaq. Gráfico desenhado no Prisma, a partir dos dados brutos do Windaq convertidos para Excel. Essa estratégia foi útil para obtenção da AUC. O eixo (y) do gráfico demonstra a força em (g) do íleo isolado, o eixo (x) é o tempo em segundos de experimento, cada segundo gera um dado de (g) força que foram agrupados. 57
- Figura 4 - Gráficos de regressão não-linear da área sobre a curva, da contração do íleo de cobaia pré-incubado 15 minutos antes da contração com CCh 1 μM , com (A) – propranolol 1 μM (PRO), antagonista β -adrenérgico não seletivo. (B) – fentolamina 1 μM (FET), antagonista α -adrenérgico não seletivo. (C) – aminofilina 100 μM (AMI), inibidor não seletivo da fosfodiesterase. Com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ M a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores da regressão não linear expressos em Y em (%). Análise estatística realizada através de test t de Student e ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com $p < 0,05$ 58
- Figura 5 - Gráficos de regressão não-linear da área sobre a curva, da contração do íleo de cobaia pré-incubado 15 minutos antes da contração com CCh 1 μM , com (A) – glibenclamida 10 μM (GLI) (bloqueador dos canais KATP). (B) – Cloreto de Césio 5mM (CsCl) (bloqueador dos canais para K não seletivo). (C) – tetraetilamônio 1 mM (TEA) (bloqueador dos canais Kv e KCa). (D) 4-aminopiridina 3 mM (bloqueador dos canais KV). Com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores da regressão não linear expressos em Y em (%). Análise estatística realizada através de test t de Student e ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com

p<0,05..... 59

Figura 6 - Gráficos de regressão não-linear da área sobre a curva, da contração do íleo de cobaia pré-incubado 15 minutos antes da contração com CCh 1 μ M, com (A) – glibenclamida 10 μ M (GLI) (bloqueador dos canais KATP). (B) – Cloreto de Césio 5mM (CsCl) (bloqueador dos canais para K não seletivo). (C) – tetraetilamônio 1 mM (TEA) (bloqueador dos canais Kv e KCa). (D) 4-aminopiridina 3 mM (bloqueador dos canais KV). Com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Análise estatística realizada através de test t de Student e ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com p<0,05..... 61

Figura 7 - Gráficos de regressão não-linear da área sobre a curva, da contração do íleo de cobaia pré-incubado 15 minutos antes da contração com CCh 1 μ M, com (A) – capsazepina 10 μ M (CPZ) (inibidor não seletivo de TRPV1). (B) – Vermelho de Rutênio 10 μ M (V-RUT) (inibidor não seletivo para TRP). (C) – Ácido flufenamico 1 μ M (FLU) (inibidor seletivo de canais para cálcio regulados por cloreto). Com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores da regressão não linear expressos em Y em (%). Análise estatística realizada através de test t de Student e ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com p<0,05..... 63

Figura 8 - Representação gráfica do experimento do modelo in vitro, utilizando íleo isolado de cobaia com 1 cm de órgão, com contrações induzidas por CCh 1 μ M, e concentrações cumulativas de $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M de GER, e teste do mecanismo de ação com os bloqueadores farmacológicos

Figura 9 - Formação de nanoemulsões pelo método de emulsificação espontânea. Quando a fase orgânica contendo o GER + os surfactantes e co-surfactantes, óleo orgânica (óleo + surfactante hidrofílico) e a fase aquosa (água) entram em contato, uma microemulsão bicontínua (μ E) é formada no limite entre as fases, que se romper e forma pequenas gotículas de óleo a temperatura ambiente e agitação magnética de 200 rpm, a nanoemulsão de GER é formada. Em círculo as fotografias das nanoemulsões em tubo de ensaio, contendo geraniol após o seu preparo. F1, F2 e F3. Podemos notar que a formulação F2 ficou levemente mais transparente em comparação a F1, e por sua vez F3 pois a que teve maior transparência e uma coloração levemente azulada, a iluminação ambiente. As formulações foram testadas em modelos in vitro em íleo isolado de cobaia, com 1 cm de órgão, com contrações induzidas por CCh 1 μ M, e concentrações cumulativas de $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M de GER e de NanoGER das três formulações, em in vivo nos modelos de diarreia induzida por óleo de ricino e de velocidade de trânsito gastrointestinal..... 85

Figura 10 - Figura 10 - Comparação do efeito relaxante em íleo isolado de cobaia, do geraniol e da sua nanoemulsão, na contração com CCh 1 μ M, com a adição cumulativa do (GER) ou (GNEs) 1,0 x 10⁻⁷ M to 3,0 x 10⁻³ M. (A) na formulação 1 NanoGER - F1, com SML-20: monolaurato de sorbitano de polioxietileno-20 (6,2%), SMO: monooleato de sorbitano (3,8%), MCT: triglicéridos de cadeia média (5,0%), GER (5,0%) em PBS: Solução tampão de fosfato 10 mM pH 7,4 (80%). (B) na formulação 2 NanoGER – F2, com SMO-20: monooleato sorbitano de polioxietileno-20 (7,2%), SMO: monooleato de sorbitano (2,8%), MCT: triglicéridos de cadeia média (5,0%) + GER (5,0%) em PBS: Solução tampão de fosfato 10 mM pH 7,4 (80%). (C) na formulação 3 NanoGER – F3, com SMO-20: monooleato sorbitano de polioxietileno-20 (10%), MCT: triglicéridos de cadeia média (5,0%) + GER (5,0%) em PBS: Solução tampão de fosfato 10 mM pH 7,4 (80%). Valores da regressão não linear expressos em (AUC%). Análise estatística realizada através de teste t de Student e ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com p<0,05..... 88

Figura 11- Gráficos em coluna da comparação da atividade antidiarreica do geraniol e da nanoemulsão de geraniol, no teste de diarreia induzida por óleo de rícino. (A) Comparação da quantidade de massa fecal evacuada em grama (g), no teste usando o geraniol. (B) Comparação da quantidade de massa fecal evacuada em grama (g), no teste utilizando a nanoemulsão contendo geraniol. (C) grupo geraniol não nanoemulsionado, na avaliação de variação da massa corpórea dos animais, com peso perdido em gramas (g) após 4h de experimento, da administração de óleo de rícino. (D) grupo nanoemulsão contendo geraniol, na avaliação de variação da massa corpórea dos animais, com peso perdido em gramas (g). Gráficos em \pm SEM, em um período de 4h, na diarreia induzida por óleo de rícino, nas doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg do GER ou NanoGER F1. Com (n=6) por grupo, onde (#) corresponde a diferença estatisticamente significativa superior, quando comparados com o grupo veículo. (*) diferença estatisticamente significativa inferior, quando comparado com o grupo salina p<0,05 por ANOVA one-way, com pós teste de Dunnett. 91

Figura 12 - Gráficos em coluna da comparação da atividade antidiarreica do geraniol e da nanoemulsão de geraniol. (A) Notas (score), 0 - ausência de diarreia, 1 - eliminação de fezes de aspecto úmido, 2 - eliminação de fezes de aspecto pastoso em pequena/moderada quantidade, 3 - eliminação de fezes de aspecto líquido ou pastoso em grande quantidade, para o aspecto das fezes durante as 4h de experimento, na diarreia induzida por óleo de rícino, comparando o efeito do geraniol. (B) Notas (score) para o aspecto das fezes durante as 4h de experimento, na diarreia induzida por óleo de rícino, quando utilizado a nanoemulsão contendo geraniol. A e B em um período de 4h, na diarreia induzida por óleo de rícino. (C) Grupo geraniol, com a distância

percorrida pelo carvão aditivado em % no intestino dos camundongos. (D) Grupo nanoemulsão, com a distância percorrida pelo carvão aditivado em % no intestino dos camundongos. Gráficos em \pm SEM, nas doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg do GER ou NanoGER F1. Com (n=6) por grupo, onde (#) corresponde a diferença estatisticamente significativa superior, quando comparados com o grupo veículo. (*) diferença estatisticamente significativa inferior, quando comparado com o grupo salina $p < 0,05$ por ANOVA one-way, com pós teste de Dunnett. 93

Figura 13 - Experimento original do GER nas contrações induzidas por carbachol 1 μ M, em traqueia isolada de cobaia, registro original do experimento e cumulativa de $1,0 \times 10^{-7}$ até $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores dos n=5 sobrepostos, expressos com \pm SEM do experimento real obtido a partir do Windaq. Gráfico desenhado no Prisma, a partir dos dados brutos do Windaq convertidos para Excel. Essa estratégia foi útil para obtenção da AUC. O eixo (y) do gráfico demonstra a força em (g) da traqueia isolada, o eixo (x) é o tempo em segundos de experimento, cada segundo gera um dado de (g) força que foram agrupados..... 108

Figura 14 - Gráfico da regressão linear da força da contração da traqueia de cobaia com contração com CCh 1 μ M, com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ M a $3,0 \times 10^{-3}$ M..... 109

Figura 15 - Protocolo de tosse, os animais foram avaliados em 24 h, a nebulização com ácido cítrico 0,4 M, na triagem e após de 23h e 30 minutos no teste, por 3 minutos. (A) Avaliação durante a triagem do tempo de latência em segundos para o início da primeira tosse. (B) Número de tosses durante os 3 minutos de avaliação durante a triagem. (C) Avaliação do tempo de latência em segundos para o início da primeira tosse durante o teste. (D) Número de tosses durante os 3 minutos de avaliação durante o teste. (*) $p < 0,05$ com diferença estatisticamente significativa comparada com o veículo, com ANOVA com pós-teste de Dunnett. 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição em (p/v %) das formulações contendo o geraniol (GNEs).....	82
Tabela 2: Tamanho da partícula (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersidade (PDI) das formulações de GNEs (média ± SEM, n = 3).	86
Tabela 3: Áreas sobre a curva da contração induzida por carbacol com o GER em contrações cumulativas.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

- 4-AP** – 4-aminopiridina
- 5-HT** – 5-hidroxitriptamina (serotonina)
- ACh** – Acetilcolina
- AMI** – Aminofilina hidratada
- AMPc** – Adenosina monofosfato cíclico 3',5'
- BaCl₂** – Cloreto de bário
- BALF** – Fluido de lavagem broncoalveolar
- BKCa** – Canal de potássio de grande condutância ativado por cálcio
- CCh** – Carbacol
- CEUA** – Comitê de Ética no Uso de Animais
- GMPc** – Guanidina monofosfato cíclico 3',5'
- c-JNK** – Proteína quinase N-terminal c-Jun
- COX-2** – Enzima ciclooxigenase 2
- CD44** – Glicoproteína de adesão celular CD44
- CFTR** – Regulador da condutância transmembrana da fibrose cística
- CsCl** – Cloreto de cério
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DAG** – Diacilglicerol
- E2F8** – Fator de transcrição E2F tipo 8
- EP3** – Receptor de prostaglandina tipo 3
- ERK1** – Proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1)
- GAP** – Junções comunicantes (gap junctions)
- GER** – Geraniol
- GLI** – Glibenclamida
- GIT** – Trato gastrointestinal
- GNEs** – Nanoemulsão de geraniol
- GPCR** – Receptores acoplados à proteína G
- GSH** – Glutathiona reduzida
- HSSG** – Sistema nanoestruturado multibioresponsivo autoestimulado (Highly Self-Stimuli-sensitive Gel)
- IL-6** – Interleucina 6
- IP₃** – Inositol 1,4,5-trifosfato
- K_{ATP}** – Canal de potássio sensível ao ATP

KCa – Canais de potássio ativados por cálcio
KCl – Cloreto de potássio
Kir – Canal de potássio retificador de entrada
KV – Canais de potássio dependentes de voltagem
L-NAME – N ω -nitro-L-arginina metil éster
MAPKs – Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MMC – Complexo motor migratório
MLCK – Quinase da cadeia leve de miosina
MLCP – Fosfatase da cadeia leve de miosina
NAL – Naloxona
NK1 e NK3 – Receptores de neurocinina 1 e 3
NanoGER F1 – Formulação de número tipo 1 de geraniol
NanoGER F2 – Formulação de número tipo 2 de geraniol
NanoGER F3 – Formulação de número tipo 3 de geraniol
Nrf2 – Fator de transcrição nuclear relacionado ao fator eritroide 2
P2X3 – Receptor purinérgico do tipo P2X subtipo 3
p38 – Proteína quinase p38 (MAPK p38)
p53 – Proteína supressora de tumor p53
PGE2 – Prostaglandina E2
PHE – Fentolamina
PRO – Propranolol cloridrato
Prdx-1 – Peroxiredoxina-1
R-RUT – Rutênio vermelho
SNA – Sistema nervoso autônomo
SNE – Sistema nervoso entérico
SNC – Sistema nervoso central
STAT3 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TEA – Tetraetilamônio
TGI – Trato gastrointestinal
TH1 – Linfócito T helper tipo 1
TH2 – Linfócito T helper tipo 2
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TRP – Canais do potencial receptor transitório
TRPV – Canais do potencial receptor transitório vaniloide

TRPA1 – Canal do potencial receptor transitório anquirina 1

TRPM8 – Canal do potencial receptor transitório melastatina 8

UNIVASF – Universidade Federal do Vale do São Francisco

VOCCs – Canais de cálcio dependentes de voltagem (Voltage-Operated Calcium Channels)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
REFERÊNCIAS:.....	42
CAPÍTULO 1. Avaliação da atividade do geraniol <i>in vitro</i> em óleo isolado de cobaia e investigação de seu mecanismo de ação	49
RESUMO	49
ABSTRACT.....	50
1.1. INTRODUÇÃO	51
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
1.3 RESULTADOS.....	55
1.4 DISCUSSÃO.....	64
1.5 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS:.....	71
CAPÍTULO 2. Avaliação do sistema de nanoemulsão com inclusão do monoterpeno geraniol e a comparação de seu efeito farmacológico <i>in vitro</i> em óleo isolado de cobaia e <i>in vivo</i> em diarreia induzida e velocidade de trânsito gastrointestinal em camundongos	78
RESUMO	78
ABSTRACT.....	79
2.1 INTRODUÇÃO	80
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	81
2.3 RESULTADOS.....	86
2.4 DISCUSSÃO.....	94
2.5 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS.....	99
CAPÍTULO 3. Avaliação farmacológica <i>in vivo</i> do geraniol em traqueia isolada de cobaia e <i>in vivo</i> em modelo de tosse em camundongos e toxicologia do geraniol	103
RESUMO	103

ABSTRACT	104
3.1 INTRODUÇÃO	105
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	106
3.3 RESULTADOS.....	108
3.4 DISCUSSÃO.....	111
3.5 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS.....	114
CONCLUSÃO GERAL	116
ANEXOS.....	117

1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento no número de pesquisas relacionadas à atividade biológica de óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais tem sido observado em todo o mundo nos últimos anos. Este interesse tem sido mais expressivo devido à grande importância e variedade de espécies e às mais diversas propriedades que muitas delas apresentam, tais como atividades espasmolíticas, antidiarreicas e para distúrbios respiratórios. O alívio da dor e controle de desordens relacionadas aos espasmos musculares quer seja devido a problemas como hipertensão, asma, cólicas uterinas e intestinais, dentre outros, estão associados a uma disfunção da contratilidade do músculo liso, e tem sido uma preocupação constante tanto de profissionais da área da saúde como da população em geral. Dessa forma a contribuição das plantas medicinais e seus metabolitos secundários, como os monoterpenos, tem se apresentado como potenciais estratégias terapêuticas (KHAN, *et al.* 2016 e RAUF, *et al.* 2021).

O geraniol (GER) é um monoterpeno isoprenoide acíclico isolado a partir de óleos essenciais de plantas aromáticas, incluindo *Melissa officinalis* (Lamiaceae), *Cinnamomum tenuipilum* Kosterm (Lauraceae), *Valeriana officinalis* L. (Caprifoliaceae), *Phyla scaberrima* (Juss. ex Pers.) Moldenke (Verbenaceae), *Perilla frutescens* var. *hirtella* (Nakai) Makino (Lamiaceae), (LEI, *et al.*, 2019), dentre outras. Na literatura diversas propriedades farmacológicas do GE são relatadas, incluindo antitumoral, antiinflamatória, antioxidativa e antimicrobiana e efeitos hepatoprotetores, cardioprotetores e neuroprotetores. Entretanto pouco se conhece sobre a atividade do GER isolado para o tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias (LEI, *et al.*, 2019). Foi descrito que espécies que possuem o monoterpeno como constituinte fitoquímico majoritário como *Valeriana officinalis* possui atividades anti-diarreica e broncodilatadora (KHAN, A. e GILANI, A., 2012); *Melissa officinalis* com uso popular digestivo, distúrbios gastrointestinais, carminativo, antiespasmódico, sedativo, analgésico e diurético (MIRAJ, *et al.*, 2017); *Phyla scaberrima* (CHAVES, *et al.*, 2014), *Perilla frutescens* (VERSPOHL, *et al.*, 2013), com seu uso popular com propriedade espasmolítica em ileo de rato (LEI, *et al.*, 2019). Esses achados evidenciam que o GER possui potencial farmacológico e pode ser utilizado como espasmolítico, anti-diarreico e anti-tussígeno se investigado, sendo esse um dos objetivos desse trabalho.

Compostos bioativos como o GER têm suas atividades farmacológicas potencializadas por meio de diferentes sistemas de entrega, como as nanoemulsões. Tais formulações aumentam sua

solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade, refletindo em maior eficácia terapêutica. Destacam-se, por exemplo, sua atividade anti-inflamatória, evidenciada pelo aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) (GIONGO *et al.*, 2017), além de suas propriedades antimicrobianas (ABU *et al.*, 2021; DEEPIKA *et al.*, 2021) e larvicidas (DEHGHANKAR *et al.*, 2021). Diante disso, torna-se relevante o aprofundamento dos estudos sobre nanoemulsões contendo geraniol, especialmente quanto aos efeitos sobre o músculo liso dos sistemas gastrointestinal e respiratório, considerando seu potencial antihipertensivo já descrito na literatura (EL-BASSOSSY *et al.*, 2018; MENEZES *et al.*, 2014).

Com base no exposto, o estudo tem como objetivo investigar a atividade farmacológica *in vitro* e *in vivo*, do geraniol e seu sistema nanoemulsionado sobre o sistema gastrointestinal, enquanto espasmolíticos e anti-diarreicos e respiratório, como anti-tussígeno. Tal os mecanismos de ação foram propostos e a avaliação de curva dose-resposta foi empregada para determinar o aumento da potência farmacológica do monoterpeno quando apresentado em sua nanoemulsão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Uso de monoterpenos na farmacologia

Na última década há um crescente interesse medicinal no uso de monoterpenos, considerando os diversos estudos na farmacologia devido às suas propriedades terapêuticas e potencialidades no tratamento de várias condições, esses estudos destacam uma ampla gama de aplicações dos monoterpenos na farmacologia, fornecendo evidências científicas para sua utilização potencial, como em terapias alternativas e complementares em diversas condições médicas (SILVA e DOMINGUES., 2017).

As pesquisas têm sido conduzidas para explorar os efeitos desses compostos para o tratamento de distúrbios relacionados ao sistema nervoso central e para o câncer. Estudos revelaram a capacidade dos monoterpenos de ultrapassar barreiras biológicas, principalmente a barreira hemato-encefálica, mas também a membrana citoplasmática e a pele, que parecem ser características que contribuem de forma crítica no desenvolvimento e administração de fármacos que revelam as propriedades farmacológicas dos monoterpenos e seu potencial terapêutico no tratamento de diversas condições como o câncer (CHEN, *et al.*, 2021).

Monoterpenos com relatos na literatura são limoneno e o linalool que exercem efeitos neuroprotetores, e que ainda apresentam várias propriedades biológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antinociceptivas e gastroprotetoras. Devido ao seu efeito atenuante no estresse oxidativo, na inflamação e na regulação da morte celular apoptótica (EDDIN, *et al.*, 2021; SABOGAL-GUÁQUETA, *et al.*, 2019). O papel neuroprotetor de monoterpenos, como o limoneno, tem sido explorado em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer, esclerose múltipla, epilepsia, ansiedade e acidente vascular cerebral (EDDIN *et al.*, 2021). Além disso, suas propriedades sedativas e relaxantes sugerem potencial uso no tratamento de distúrbios do sono, como demonstrado em testes com camundongos, nos quais o limoneno apresentou efeitos semelhantes ao diazepam em comparação à solução salina (GASTÓN *et al.*, 2016).

O *trans*-anetol, um monoterpeno encontrado em diversas espécies vegetais, especialmente na *Pimpinella anisum*, demonstrou efeito antidepressivo sem comprometer a locomoção em modelos animais (HASSANZADEH *et al.*, 2022). Além disso, há ampla literatura destacando o potencial terapêutico dos monoterpenos oxigenados, como linalol, terpinen-4-ol e pulegona, bem como dos hidrocarbonetos monoterpênicos, os quais contribuem significativamente para as atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica e anticancerígena de óleos essenciais de

diferentes espécies vegetais (ELANSARY *et al.*, 2018).

Monoterpenos como o mentol, mentona, neomentol, iso-mentona, timol, também já foram investigados demonstrando suas atividades anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais, escolícidas, imunomoduladoras, antitumorais, neuroprotectoras, antifadiga e antioxidantes, tal como serem protetoras dos sistemas gastrointestinal, hepático, renal, cutâneo, respiratório, cerebral e nervoso, e exercer efeitos hipoglicêmicos e hipolipidêmicos como é o caso do geraniol. Clinicamente, o esses monoterpenos podem ser utilizados em doenças gastrointestinais e dermatológicas, na terapia adjuvante pós-operatória (LIU, *et al.*, 2022; ZHAO, *et al.*, 2022).

A busca por novas terapias baseadas em produtos naturais representa uma alternativa promissora à terapêutica convencional e tem sido amplamente incentivada. Nesse contexto, os monoterpenos vêm ganhando destaque devido à sua ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo propriedades cicatrizantes e anti-ulcerogênicas, comprovadas por estudos recentes *in vitro* e *in vivo* (PÉRICO *et al.*, 2020). Diante da crescente demanda por novos fármacos e da relativa escassez de estudos específicos sobre o monoterpeno geraniol, torna-se evidente a necessidade de aprofundar as investigações sobre seu potencial biotecnológico e aplicações terapêuticas.

2.2 Considerações gerais sobre o uso do geraniol

O geraniol é um monoterpeno isoprenoide acíclico isolado dos óleos essenciais de plantas aromáticas, incluindo *Cinnamomum tenuipilum*, *Valeriana officinalis* e várias outras espécies (LEI, *et al.*, 2019 e BEN AMMAR, 2023). Dado o agradável aroma de rosas, é um componente fitoquímico importante em muitos óleos essenciais é utilizado comercialmente como um composto de fragrância em produtos cosméticos e domésticos (MAÇZKA, *et al.*, 2020).

Uma revisão da literatura, nas principais bases de dados (Pubmed, Scielo, Lilacs) utilizando os descritores indexados no DeCS/MeSH “geraniol” encontraram no total de 1.998 resultados entre 1960 a 2021, estando 1.016 trabalhos entre os anos de 2015 a 2025. Refinando a pesquisa utilizando os descritores “geraniol; smooth muscle” ofereceram 4 resultados e “geraniol; ileum” 2 resultados apenas, não se tratando da substância isolada e sim de óleos essenciais complexos que apresentam o geraniol em sua composição fitoquímica. Uma varredura com os descritores “geraniol; nanoemulsion”, encontraram 4 resultados, todos do ano de 2021, sendo que em sua totalidade relacionados à atividade antimicrobiana. Outra pesquisa com “geraniol; trachea” não resultou em nenhum resultado e por fim utilizando “geraniol; smooth muscle; nanoemulsion”

nenhum resultado foi encontrado.

Uma consulta no INPI, apontou 4 depósitos de patente tendo em seu tema o geraniol, essas descritas no quadro abaixo.

Quadro – Patentes no INPI relacionadas ao geraniol.

Pedido	Depósito	Título
<u>BR 11</u> <u>2017</u> <u>014223 6</u>	29/12/2015	Planta lenhosa geneticamente modificada, estrutura de ácido nucleico, sistema de estruturas de ácido nucleico, célula isolada, célula vegetal isolada, composição pesticida, método para reforço da resistência de uma planta lenhosa à infecção causada por pragas, método para reforço de, pelo menos, um teor de óleo de geraniol, geraniol, neral, citronelol, citronelal e citral de uma planta lenhosa, método para produção de óleo, óleo, óleo de eucalipto, método para produzir, pelo menos, um monoterpeno, e planta geneticamente modificada
<u>PI</u> <u>1106543-</u> <u>5</u>	16/08/2011	Complexos de inclusão de geraniol e b-ciclodextrina, método de obtenção e atividade antihipertensiva do geraniol e seus complexos
<u>BR 11</u> <u>2012</u> <u>024260 1</u>	28/03/2011	Composições inibidoras virais para uso terapêutico in vivo compreendendo uma combinação de(-)-carvona, (+)-carvona, geraniol e um adicional componente óleo essencial
<u>PI</u> <u>0619383-</u> <u>8</u>	03/08/2006	Composições e métodos compreendendo terpenos ou misturas de terpeno selecionadas de timol, eugenol, geraniol, citral, e l-carvona
<u>PI</u> <u>0307136-</u> <u>7</u>	16/05/2003	Processo para aumentar a porcentagem de geraniol e nerol no óleo essencial de

Nota: As patentes depositadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) até 30 de março de 2025 evidenciam o interesse crescente na aplicação do geraniol em diversas áreas. Os registros abrangem desde o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para aumento da produção de geraniol e outros monoterpenos, até a formulação de complexos com β -ciclodextrina com atividade antihipertensiva. Também são descritas composições com potencial antiviral, pesticida e terapêutico, refletindo o amplo espectro de aplicações farmacológicas, agrícolas e biotecnológicas desse composto. Fonte: Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Base de dados de patentes. Acesso em: 30 mar. 2025.

Uma pesquisa em outras bases de dados internacionais como o *Espacenet* com o termo geraniol, revelou 37.253 resultados, usando os descritores: *geraniol; diarrhea; respiratory; spasmolytic* foram encontrados 32 resultados. Desses, nenhum se relaciona diretamente ao objetivo desse trabalho. Os resultados encontrados na *Espacenet* estão mais relacionados às atividades antiviral, antifúngica, antibacteriana, hipoglicêmica ou para a o tratamento da acne e cicatrização.

É possível observar, com base no quadro apresentado, que até o momento não há registros de patentes relacionados à possível atividade espasmolítica do geraniol (GER). Embora a literatura descreva efeitos sobre o músculo liso em diversas espécies vegetais, esses estudos não investigam especificamente o monoterpeno isolado. Ressalta-se, contudo, que o GER, isoladamente ou em combinação, já possui atividades farmacológicas bem documentadas, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, hepatoprotetora, cardioprotetora e neuroprotetora (LEI *et al.*, 2019).

O GER apresenta importante atividade anti-ulcerogênica no estômago e na mucosa duodenal envolvendo a mediação de prostaglandinas endógenas e óxido nítrico mostrando uma melhora de sintomas clínicos (por exemplo, perda de peso, edema de cólon, ulceração e índices de massa do cólon / baço), prevenindo o aumento dos níveis de óxido nítrico e peróxido de lipídio e restaurando a atividade antioxidante no modelo de rato com colite. Além disso, o GER mostrou efeitos gastroprotetores e de cura de úlceras gástricas agudas induzidas por etanol e úlceras crônicas induzidas por ácido acético (ROCCA, *et al.*, 2017; VENZON, *et al.*, 2018).

O GER reduziu significativamente a expressão de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) fosforiladas, tais como p38 MAPK, quinase-1 regulada por sinal

extracelular (ERK1), quinase c-Jun N-terminal (c-JNK), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em células epiteliais gástricas humanas infectadas com *H. pylori*. Além disso, aumentou a proteína antioxidante peroxiredoxina-1 (Prdx-1) nas células infectadas com *H. pylori*. O GER protege assim a infecção concomitante por *H. pylori* e a sua resistência pode ser um método possível para prevenir o câncer gástrico causado pela espécie (ZHUANG, *et al.*, 2023).

Em estudos *in vivo*, a administração de geraniol (GER) nas doses de 100 e 200 mg/kg demonstrou efeitos benéficos no controle da asma alérgica em modelo murino sensibilizado com ovalbumina. O tratamento com GER reduziu significativamente os níveis de eotaxina no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) e diminuiu a infiltração de eosinófilos nos pulmões (XUE *et al.*, 2016). Além disso, a intervenção com GER resultou na supressão de citocinas do perfil Th2, ao mesmo tempo em que estimulou a produção de interferon- γ (IFN- γ), marcador do perfil Th1, também no BALF. O GER também promoveu a expressão da proteína Nrf2, um regulador-chave da resposta antioxidante, elevando os níveis de enzimas como glutamato-cisteína ligase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase, bem como aumentando a produção do hormônio glutathione reduzida (GSH), evidenciando seu potencial antioxidante (XUE *et al.*, 2016).

2.2.1 Efeitos farmacológicos do geraniol no tratamento do câncer

Nos últimos anos, o monoterpene geraniol tem sido amplamente explorado como um potencial agente anticancerígeno. Foram investigados análogos naturais como o álcool nerol, os aldeídos geranial e neral, o sinergismo destes terpenos com compostos utilizados clinicamente e não clinicamente como potenciais candidatos ao tratamento de diferentes tipos de câncer. A atividade promissora destes compostos inspirou também a síntese de novos análogos, com diversos estudos que apoiam os efeitos terapêuticos ou preventivos do geraniol em diferentes tipos de câncer, como o câncer da mama, de endométrio, do pulmão, do cólon, da próstata, do pâncreas e do fígado, e revelaram a base mecanicista das suas ações farmacológicas (CHO, *et al.*, 2016; ELGANAINY, *et al.*, 2023; SILVA, *et al.*, 2022; SHANMUGAPRIYA, *et al.*, 2017).

Além disso, o geraniol sensibiliza as células tumorais aos agentes de quimioterapia habitualmente utilizados, o geraniol controla uma variedade de moléculas e vias de sinalização, como a indução da apoptose e a paragem do ciclo celular, modula múltiplos alvos moleculares, incluindo p53 e STAT3, ativação das caspases e modulação da inflamação através da regulação transcricional. O geraniol também alterou de forma potente o perfil de expressão dos genes e, em primeiro lugar, reduziu a regulação das assinaturas dos genes relacionados com o ciclo celular, em

comparação com o linalol, outro monoterpene estruturalmente semelhante que não induz alterações fenotípicas aparentes (BEN AMMAR, 2023; CHO, *et al.*, 2016; LEE, *et al.*, 2016).

A análise do regulador principal utilizando o interactoma regulador específico do câncer da próstata identificou o fator de transcrição E2F8 como uma molécula alvo específica que regula as assinaturas do ciclo celular específicas do geraniol. Experiências subsequentes confirmaram que o geraniol regulava negativamente a expressão de E2F8 e que a supressão de E2F8 era suficiente para suprimir o crescimento celular induzindo a paragem G2 /M. Dentre outras vias moleculares que representam características distintivas dos tumores; estas ações do geraniol limitam a capacidade das células tumorais de adquirirem resistência adaptativa aos medicamentos anticancerígenos, sendo uma substância molécula promissora para o desenvolvimento de um agente anticancerígeno seguro e eficaz (BEN AMMAR, 2023; CHO, *et al.*, 2016; LEE, *et al.*, 2016), além de apresentar uma característica muito importante para esse tratamento que é de redução da expressão do fator de crescimento vascular (VEGF) (WITTIG, *et al.*, 2015).

Sistemas de entrega de drogas de nanotecnologia auto-responsivo multi-bioresponsivo (HSSG) foi construído por Duan, *et al.*, 2023, conjugando o monoterpene anticâncer geraniol ao ácido hialurônico por meio de uma ligação dissulfeto. As nanopartículas exibiram uma forma esférica uniforme com um diâmetro médio de ~110 nm, mantiveram alta estabilidade e realizaram liberação controlada de drogas no microambiente tumoral (pH / glutatona / hialuronidase). Os resultados da microscopia de fluorescência do estudo e da citometria de fluxo verificaram que as nanopartículas foram seletivamente absorvidas pelas linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano através da internalização mediada pelo receptor CD44. Estudos em ratos portadores de tumor H22 demonstram que as nanopartículas podem efetivamente acumular-se no local do tumor durante um longo período. Assim promoveram significativamente a morte de células do câncer, enfatizando o potencial biotecnológico da molécula em questão. Tal como outros estudos apontam sua atividade para o câncer de colo retal, que pode ser atribuída à capacidade de desencadear a apoptose, os danos no DNA e a paragem do ciclo celular (DUAN, *et al.*, 2023; QI, *et al.*, 2018, SAWADA, *et al.*, 2016). Além disso, o geraniol diminuiu potentemente a expressão da caspase-9, Bax, Bcl-2 e caspase-3 nas células, inibiu a forma de fosforilação da via de sinalização da proteína quinase activada por mitogénio (p38, MAPK, JNK e ERK1/2), contra o câncer de estômago humano (YANG, *et al.*, 2021).

2.2.2 Efeitos farmacológicos do geraniol em músculo liso isolado

Existe escassa literatura sobre a atividade do GER em músculo liso. Alguns estudos apenas são encontrados de espécies vegetais que o apresentam como um de seus constituintes fitoquímicos, majoritário ou não, cujo extrato ou óleo exibem atividades espasmolítica e relaxante de músculos lisos endoteliais, gastrointestinais e respiratórios.

O GER administrado de forma isolada protege a mucosa gástrica e duodenal, aumentando a atividade dos fatores de proteção, como já relatado, incluindo a liberação de prostaglandinas endógenas e a regulando a via do óxido nítrico (NO). Também tendo atividade antioxidante no modelo de colite em ratos (LEI, *et al.*, 2019, XUE, *et al.*, 2016). Entretanto a atividade na motilidade e possíveis eventos espasmolíticos em traqueia e íleo, ainda não haviam sido avaliados, mesmo que o GER nas doses de 100 ou 200 mg/kg tenha sido eficaz no alívio dos sintomas da asma alérgica, em modelo de rato sensibilizado pela ovalbumina e efeito gastro protetor em úlceras induzidas por etanol e ácido acético, e ainda alivia as arritmias induzidas pela ouabaína através da regulação negativa da força contrátil do coração (LEI, *et al.*, 2019).

Espécies como a *Dracocephalum kotschyi*, que contém o GER em seu óleo essencial usado na medicina tradicional iraniana, sendo utilizada como antiespasmódico e analgésico. O óleo essencial obtido a partir de partes aéreas da planta possui como componentes majoritários α -pineno (10%), neral (11%), geraniol (10%), α -citral (12%), limoneno (9%) e α -terpineol (1,1%), apresentando atividade espasmolítica em íleo isolado e contraído com KCl (80 mM), acetilcolina (ACh, 500 nM) e estimulação de campo elétrico. No entanto, com atividade atribuída ao limoneno e ao α -terpineol no óleo essencial, não havendo relato ao GER no qual não foi investigado de forma isolada (KUCHARSKA, *et al.*, 2018).

O óleo essencial extraído das flores de *Anthemis mauritiana* Maire & Sennen também apresenta efeitos antiespasmódicos no músculo liso intestinal. A composição fitoquímica foi revelada por cromatografia gasosa de alta eficiência acoplado a espectrofotometria de massa. Foram identificados 18 compostos que representam 90,56% do óleo. Os principais constituintes fitoquímicos foram descritos como alfa-pineno (27,02%), sabineno (15,25%), cedrenol (14,53%), germacreno (9,61%), geraniol (6,82%) e cariofileno (5,38%) (KARIM, *et al.*, 2010).

O óleo essencial exibiu um efeito inibitório nas curvas dose-resposta induzidas pelo carbacol e CaCl₂ em preparações de jejuno de rato. Estes resultados demonstraram claramente o efeito antiespasmódico do óleo essencial com a presença também do geraniol. Com o mecanismo do óleo essencial sugerido como sendo principalmente devido a um efeito inibitório no influxo de

Ca^{2+} através da membrana das células musculares lisas do jejuno, com $\text{EC}_{50} = 32,26 \pm 1,48 \mu\text{g/mL}$ de óleo essencial de *Anthemis mauritiana* (KARIM, *et al.*, 2010).

Outra espécie que na literatura que apresentou atividade espasmolítica em músculo liso de traqueia de ratos foi a *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), em contrações induzidas por KCl (60 mM), apresentando uma CE_{50} de $148 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial de *Lippia alba*, $136 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ para o citral e $581 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ para o limoneno. Nas contrações induzidas pela acetilcolina $10 \mu\text{M}$, o EC_{50} para o óleo essencial e o citral foi de $731 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ e $795 \pm 9 \mu\text{g/mL}$. Alinhado a esses resultados a caracterização fitoquímica do óleo essencial de *Lippia alba*, apresenta os seguintes componentes em suas proporções, citral 75,92% [geraniol (41,81%) e neral (34,11%)], limoneno (9,85%), carvona (8,92%), gama-terpineno (2,05%), cimeno (1,02%). Os resultados evidenciam que o geraniol é uma molécula isômera do citral, entre o neral e o geraniol (CARVALHO, *et al.*, 2017).

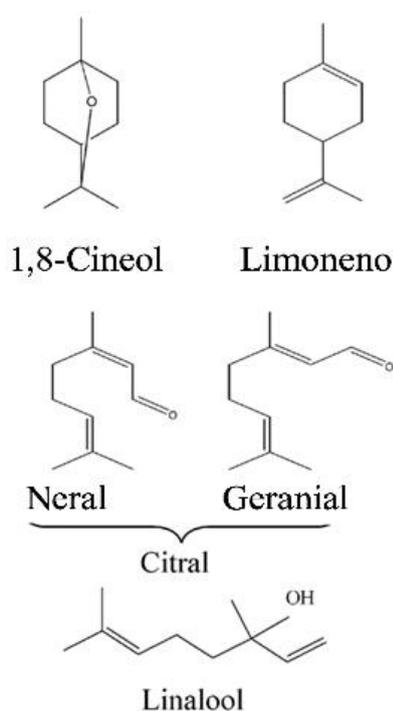


Figura 1 – Estruturas moleculares do 1,8 – cineol, limoneno, linalol, com foco para o neral e geraniol que se apresentam como monoterpenos isômeros com rotação no 2C, fazendo parte do citral. Fonte: VICENTE, *et al.*, 2013.

Carvalho *et al.*, 2017, verificou que $1000 \mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de *Lippia alba* e citral, ambos os agentes teriam a capacidade de bloquearem o influxo de BaCl_2 pelos VOCCs, apresentando efeito antiespasmódico sobre o músculo liso traqueal de ratos, tendo como principal constituinte fitoquímico o citral. Além de haver outros estudos que evidencie a atividade espasmolítica e vaso relaxante do óleo essencial de *Lippia alba* em aorta isolada de rato (SILVA,

et al., 2018) e vasorelaxante em arterial umbilical humana (MENEZES DANTAS, *et al.*, 2022), atividade tocolítica, com o citral e o limoneno relaxando de forma dose-dependente as preparações miométriais pré-contraídas com KCl 60 mM, oxitocina 10^{-2} UI/mL, serotonina (10 μ M) ou ACh (10 μ M) (PEREIRA-DE-MORAIS, *et al.*, 2019).

2.3 Atividade farmacológica do geraniol em modelos de tosse

2.3.1 Fisiopatologia da tosse

A tosse é um reflexo fisiológico essencial, desencadeado principalmente pela estimulação das terminações nervosas presentes nas vias aéreas, com o objetivo de eliminar secreções ou substâncias irritantes. Embora seja uma resposta natural e protetora do organismo, a tosse crônica pode indicar condições patológicas subjacentes, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, geralmente associadas à contração da musculatura lisa das vias aéreas, processos inflamatórios ou alterações teciduais. Na infância, compreender a fisiopatologia da tosse é fundamental para identificar seus mecanismos causais. A causa mais comum em crianças é a infecção viral, responsável por episódios de tosse. No entanto, a persistência da tosse por mais de 4 a 8 semanas caracteriza a chamada "tosse crônica", exigindo investigação clínica aprofundada (LAMAS *et al.*, 2014).

Os estudos sobre a neurofisiologia da tosse têm-se baseado fortemente em modelos animais, especialmente cobaias e gatos. A tosse nestas espécies pode ser induzida com estímulos que evocam a tosse nos seres humanos e, como tal, os estudos nesses modelos identificaram mecanismos que levam à ativação dos nervos sensoriais, à indução normal da tosse e às vias neurais que medeiam a tosse reflexa (CHUNG, *et al.*, 2022).

Em cobaias, dois subtipos de fibras sensoriais periféricas podem iniciar a tosse quando estimulados: o subtipo de fibras A δ finamente mielinizadas e o subtipo de fibras C não mielinizadas nociceptivas. Os corpos celulares das fibras A δ e das fibras C da tosse surgem de gânglios vagais distintos (gânglio nodoso para as fibras A δ e gânglio jugular para as fibras C), e acredita-se que as suas terminações periféricas residam predominantemente nas vias aéreas principais (laringe, traqueia e brônquios grandes), embora as terminações no parênquima pulmonar não possam ser descartadas, uma vez que várias doenças pulmonares parenquimatosas se apresentam com tosse crônica (MAZZONE e MCGARVEY, 2021; CHUNG, *et al.*, 2022).

As doenças habitualmente associadas, como a rinite, a bronquite eosinofílica, a asma ou o

refluxo gastroesofágico ácido, podem não ser fundamentais para a tosse e, por conseguinte, podem ser fatores desencadeantes e não causas, sendo necessário enfatizar a importância da inflamação e da remodelação das vias aéreas, bem como a interação entre componentes neurais e imunes envolvidos (POE e KALLAY, 2003; SONG, *et al.*, 2014).

2.3.2 Atividade do geraniol em modelos de tosse

Na literatura a quantidade de trabalhos que correlacionam o uso do geraniol diretamente em modelos de tosse são escassos. No estudo de Stinson, *et al.*, 2023, o óleo essencial do eucalipto ativa o TRPM₈ (Canal Transiente do Tipo Melastatina 8) e inibe o TRPA₁ (Canal Transiente do Tipo Anquirina 1), ao mesmo tempo que desregula o P2X₃ (Receptor Purinérgico do Tipo P2X Subtipo 3), ajudando a reduzir a tosse, a dor e a irritação das vias respiratórias, não há menção direta ao GER somente a cânfora e ao mentol, todavia em vários estudos demonstram a presença em mais de uma espécie de eucalipto a presença do geraniol, 9,5% (CAPUTO, *et al.*, 2020), tal como o óleo essencial de *Michelia alba* é utilizado para tratar doenças inflamatórias e também suprime a tosse e trata expectorantes e bronquite, tendo 1,23% de geraniol no óleo essencial das flores (CHENG, *et al.*, 2022), uma quantidade muito pequena, mas é importante relatar tendo em vista o seu potencial uso e que o tratamento com geraniol reduziu os níveis de eotaxina no líquido de lavagem broncoalveolar e atenuou a infiltração de eosinófilos induzida pela ovalbumina e a deformação broquiolar (XUE, *et al.*, 2016), no entanto até o momento não existem estudos que façam o uso de geraniol de forma isolada em traqueia.

Outras espécies de plantas com relato etnofarmacológico de atividade anti-tussígena ou para o tratamento da asma apresentam o GER em diferentes concentrações como, *Cymbopogon jwarancusa* subsp. *olivieri* (Boiss.), *Cananga odorata* Hook. F. and Thoms), *Citrus bergamia* Risso, *Citrus limon* (L.) Osbeck, *Citrus paradisi* Macfad, *Coriandrum sativum* L., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Cymbopogon martini* (Roxb.) W. Watson, *Jasminum officinale* L., *Ocimum basilicum* L., *Pelargonium graveolens* L'Hér, *Rosa damascena* Mill. (CHENG, *et al.*, 2017; EFTEKHAR, *et al.*, 2019; NAPAGODA, *et al.*, 2018; TAN, *et al.*, 2015; TIBENDA, *et al.*, 2022; SHARMEEN, *et al.*, 2021).

2.4 Atividade farmacológica do geraniol na diarreia e desordens gastrointestinais

2.4.1 Fisiopatologia da diarreia

O epitélio intestinal é um ambiente complexo que atua como uma barreira restritiva contra

antígenos luminais, microbiota residente, patógenos invasores e como superfície que permite a absorção e secreção, ambos fatores críticos para a aquisição de nutrientes e manutenção da homeostase. A ruptura desta barreira causada por estresse, psicológico ou físico, pode causar um aumento de um potencial aparecimento de distúrbios gastrointestinais (GI), como síndrome do intestino irritável e doença inflamatória do intestino (EDWINSON, e GROVER, 2019).

A motilidade gastrointestinal resulta da complexa interação entre o músculo liso e o sistema nervoso entérico (SNE), localizado nas paredes do TGI, o qual mantém conexões funcionais com o sistema nervoso central (SNC). As fibras musculares lisas do TGI são interligadas por um grande número de junções comunicantes (GAP), que facilitam a condução de estímulos e a coordenação das contrações (SAFFAR *et al.*, 2019). Essa integração neuromuscular é modulada por diversos mediadores fisiológicos, como acetilcolina, histamina, serotonina, bradicininas, prostaglandinas e substância P, culminando na mobilização intracelular de cálcio (Ca^{2+}), elemento-chave na contração do músculo liso.

Nesse contexto, produtos naturais que bloqueiam o influxo de Ca^{2+} têm se mostrado particularmente eficazes na regulação da motilidade intestinal. Em contraste, antagonistas dos receptores muscarínicos produzem apenas uma inibição parcial, uma vez que a inervação colinérgica é apenas um dos múltiplos mecanismos que controlam essa motilidade. Além disso, estudos sugerem que a desregulação do eixo intestino-cérebro, que envolve o SNE, o sistema nervoso autônomo (SNA), o SNC e as células enteroendócrinas, está fortemente associada à fisiopatologia de diversos distúrbios gastrointestinais através da modulação da motilidade (GILANI *et al.*, 2008).

A motilidade do TGI é resultante das contrações das células do músculo liso que são reguladas por excitabilidade intrínseca e mecanismos de sensibilidade ao Ca^{2+} e contribuições de uma variedade de sistemas de controle de ordem superior, por exemplo, células intersticiais de Cajal, neurônios motores entéricos, hormônios e substâncias parácrinas (KAKINO *et al.*, 2010). As fibras musculares lisas maduras apresentam um único núcleo ovoide, estando localizado centralmente na célula. Os filamentos do seu citoesqueleto são delgados e constituídos por actina, com sua tropomiosina associada, porém sem troponina, e estão ancorados em corpos densos contendo actinina associados à membrana plasmática, enquanto os filamentos espessos são compostos por miosina. Logo abaixo da membrana celular encontram-se estruturas denominadas cavéolas, que representam o retículo sarcoplasmático. Essas vesículas podem ser importantes na liberação e sequestro de íons cálcio. O Ca^{2+} , liga-se com a calmodulina e o complexo Ca^{2+} +

Calmodulina ativa a MLCK (cinase Ca^{2+} + Calmodulina ativadora da miosina) que fosforila a cabeça da miosina promovendo a ligação ao filamento da actina e promovendo a contração (GUO *et al.* 2017).

Esses mecanismos podem apresentar efeitos heterogêneos em sistemas diferentes, como por exemplo, um determinado produto natural induz uma seletividade de relaxamento das vias respiratórias superiores, enquanto no sistema gastrointestinal uma atividade indutora de contrações da musculatura lisa. Existe a possibilidade de que haja uma diferença de moduladores fisiológicos entre vários tecidos e/ou a extensão de suas influências regulatórias, fazendo com que um produto natural tenha melhor efetividade em traqueia, bexiga e/ou aorta do que em íleo (DESIRE, *et al.*, 2010; GILANI, *et al.* 2008).

A interação bidirecional entre intestino e SNC foi responsável por alguns distúrbios gastrointestinais, incluindo a dispepsia funcional, em pacientes com maiores níveis de ansiedade e depressão, no intestinal é dominante as doenças inflamatórias intestinais. De acordo com a forte conexão entre SNC e TGI, dados pré-clínicos e clínicos de alguns estudos apoiam o uso de agentes psicotrópicos no tratamento de pacientes com distúrbios na mobilidade do TGI (SAFFAR, *et al.* 2019).

O padrão de motilidade do TGI é divergente em períodos de jejum chamados de interdigestivo e digestivo. No período interdigestivo é caracterizado por períodos latência (fase I) com posterior contrações irregulares de baixa amplitude (fase II), seguindo de um curto período de explosões de contrações regulares (fase III) que se estendem do duodeno ou estômago, até o íleo, essa atividade na fase III pode está relacionada com o esvaziamento do intestino antes da próxima refeição sendo ativada pelo hormônio motilina em *suncus*, caninos e humanos, enquanto que a grelina está relacionada a terceira fase em ratos e humanos (SCHATTAUER, *et al.*, 2012).

Agonistas dos receptores de motilina como a eritromicina ou mitemcinal exercem efeitos na fase III da contração em humanos, melhorando a gastropaseia em pacientes diabéticos. Essas contrações em jejum são reguladas pelo complexo motor migratório (MMC) sigla do inglês, ocorrendo em ciclos de aproximadamente a cada 90 a 100 minutos em *Suncus murinus*, caninos e humanos. Enquanto que em ratos, esse período é mais curto, entre 12 a 15 minutos, com renovação dos ciclos com três fases. A ausência da atividade do MMC está relacionada com infecções bacterianas e pseudo-obstrução intestinal (SCHATTAUER, *et al.*, 2012).

A compreensão sobre a atividade do MMC com seus períodos alternados de contrações

cíclicas com período sem contração, podem fornecer um modelo clínico e pré-clínico útil para o estudo das anormalidades fisiológicas e patológicas da motilidade e dos efeitos farmacológicos dos inibidores e estimulantes da atividade motora gastrointestinal (SAFFAR, *et al.*, 2019).

No período digestivo, após a alimentação o padrão motilidade muda imediatamente para um ciclo de contração pós-prandial, que consiste em contrações fásicas irregulares semelhantes às da fase II interdigestiva com duração de aproximadamente 160 minutos. É sugerindo que o conteúdo gástrico seja completamente misturado com o conteúdo intestinal nesse momento, seguindo de um período apresentando contrações com alto tônus “fortes”, denominadas contrações gigantes pós-prandiais durante períodos aproximados de 10 minutos que ocorrem no final do PPC. Propelindo o conteúdo para a porção do intestino grosso, esvaziando o estomago, duodeno, jejuno e boa parte do íleo. Dessa maneira preparando o TGI para a próxima refeição (KAKINO, *et al.*, 2010; SAFFAR, *et al.* 2019).

As respostas no músculo liso do íleo de cobaia são profundamente suprimidas em primeiros 30 minutos após a preparação de preparações *in vitro*. Durante esse período, há falta de tônus muscular em resposta a um agente contracturante. As contrações espontâneas estão presentes, as respostas à estimulação elétrica e aos agonistas exógenos são pouco controladas e a preparação é aparentemente inativa. No entanto, nos 30 a 90 minutos subsequentes, as respostas fisiológicas se recuperam. Embora esse fenômeno seja um inconveniente menor para fisiologistas e farmacologistas, se deveria for levando em conta o modelo *in vivo*, e se isso for comparado, uma supressão profunda da motilidade dos intestinos se seguiria. Apesar de sua potência, pouco se sabe sobre o que causa a perda inicial de capacidade de resposta. Um dos motivos indicados, está relacionada a uma perda temporária do acoplamento das GAP em células musculares lisas nos primeiros 30 minutos de experimento (CARBONE, *et al.*, 2014).

As contrações espontâneas rítmicas de diferentes porções do TGI são reguladas por sistema marca-passo nervoso semelhante as células intersticiais de Cajal especializadas, localizadas no sistema nervoso entérico. Foi demonstrado que pacientes com perda substancial das células intersticiais de Cajal é observada em pacientes com distúrbios de mobilidade como as doenças de gastroenteropatia diabética, constipação de trânsito lento, colite ulcerosa e doença de Crohn (SAFFAR, *et al.*, 2019).

O mecanismo de contração da musculatura lisa do sistema gastrointestinal é mediado por resposta a agonistas como a histamina (receptor H₁) e a acetilcolina que é um importante

neurotransmissor envolvida na ativação do sistema nervo parassimpático, regulando a mobilidade gastrointestinal através do receptor M_3 (RAHMAN, BASHIR, GILANI, 2013), no ato de preparação do órgão isolado, a secção do tecido separando-o do organismo da cobaia, imersão na solução de Krebs, estiramento e compressão, tal como a mudança da temperatura, podem afetar a liberação desses mediadores pelas junções sinápticas entéricas do órgão isolado (CARBONE, *et al.*, 2014).

Vários estudos demonstraram o importante papel da serotonina na regulação das funções GI, bem como seu papel fisiopatológico em distúrbios de motilidade do TGI. A serotonina aumenta a amplitude das contrações do TGI em cobaias principalmente pela via colinérgica. São conhecidos catorze receptores de serotonina, pertencentes a sete famílias, mas, o 5-HT₃ e 5-HT₄ são estudados principalmente por seu papel na motilidade GI. Os receptores 5-HT₄ estão distribuídos pelo MMC e são importantes para melhorar a mobilidade gastrointestinal. Estudos demonstraram que a atividade da motilina na fase III dependia da ativação dos receptores 5-HT₃ localizados nos aferentes vagais. Em humanos o efeito pro-cinético a administração de serotonina é inibida através de um antagonista dos receptores 5-HT₃ como o alosetrona, ondansetrona e cilansetron, promovendo efeitos como redução da mobilidade e aumento da quantidade de líquido intestinal mimetizando sintomas como da dispepsia (SAFFAR, *et al.*, 2019).

Tanto o receptor H_1 como o M_3 , são receptores acoplados a proteína Gq_{11} . Essa proteína por sua vez ativa a fosfolipase C, que degrada fosfatidil-inositol de membrana em DAG e IP_3 , que por sua vez estimula o receptor de IP_3 no retículo sarcoplasmático a liberar Ca^{2+} que por consequência age nos receptores de rianodina a liberar ainda mais Ca^{2+} . O Ca^{2+} liberado pode agir no potencial de membrana abrindo canais de Ca_v ou mesmo regulando canais KCa com a finalidade de repolarização da membrana plasmática, dentro outros vários alvos, qualquer interferência nesse delicado equilíbrio pode resultar na alteração do padrão de resposta da célula da musculatura lisa gastrointestinal (DESIRE, *et al.*, 2010).

Muitos autores relatam que o efeito espasmogênico de vários produtos naturais predominantemente envolve a ativação de receptores muscarínicos, enquanto que o efeito espasmolítico é devido ao bloqueio dos canais de cálcio (DESIRE, *et al.*, 2010). O aumento da concentração de Ca^{2+} ocorre por várias vias, uma delas é o influxo pelos canais para cálcio abertos por voltagem (Ca_v), ou via de liberação dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático, por receptores de IP_3 ou canais de rianodina (RAHMAN, BASHIR, GILANI, 2013). A concentração do Ca^{2+} e pH pode modular a condutância das GAP (CARBONE, *et al.*, 2014). A

despolarização periódica e repolarização, regula os movimentos espontâneos do intestino, como exemplo na indução espontânea de uma contração da fibra muscular lisa de um intestino em algum sentido, existe uma despolarização celular, um potencial de ação e rápido influxo de Ca^{2+} via (CaV). O bloqueio desses canais pode proporcionar, uma diminuição da frequência de contrações espontâneas ou mesmo a redução da frequência mediante da contração causada por um agente despolarizador como por exemplo o KCl, onde o K^+ em grande concentração extracelular ($>30\text{mM}$) induzira a despolarização da membrana e a abertura dos (Cav) (RAHMAN, BASHIR, GILANI, 2013).

A secreção de íons cloreto no intestino delgado e no cólon ocorre através dos canais apicais de cloreto ativados por cálcio ou na fibrose cística através de canais regulados por condutância transmembranar por meio de um processo mediado por AMPc ou GMPc. Os CaCCs (canais de cloro Ativados por cálcio) dependem da liberação e presença de Ca^{2+} intracelular, enquanto a presença de AMPc ativa a atividade basolateral do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ que é o principal canal pelo qual Cl^- é secretado no lúmen. A ativação do CFTR (regulador da condutância transmembrana da fibrose cística) resultou na secreção de Cl^- e um aumento na estimulação secretória de líquido. A administração oral de um agonista CFTR foi capaz de normalizar o trânsito intestinal total em um modelo de constipação em camundongo induzido por loperamida. Em outro estudo, nove em cada dez pacientes que receberam um inibidor de CFTR teve resolução dos sintomas diarreicos. Além disso, a bumetanida, um inibidor da NKCC1, diminui a estimulação secretória, impedindo a liberação de Cl^- indicando que a inibição de NKCC1 poderia potencialmente reduzir o transito e a diarreia, prevenindo secreção iônica e fluida no lúmen do cólon (EDWINSON e GROVER, 2019).

A proporção dos alimentos através do sistema gastrointestinal, está associada a uma série de contrações e relaxamentos organizados em fibras sobrepostas de maneira longitudinal e anelar ao longo do sistema, essas contrações dependem de vários mecanismos como a despolarização da membrana das células musculares lisas, e do potencial de ação, estimulação através de GAP e excitação através de neurotransmissores resultam na ação muscular das fibras específicas alvo, pois enquanto as fibras musculares longitudinais contraem as fibras anelares relaxam para não lesar o tecido tal como com a finalidade de promover o movimento peristáltico com perfeição (CARBONE, *et al.*, 2014).

Normalmente, durante os experimentos em banho de órgão isolados, os tecidos são estabilizados durante 30 a 90 minutos antes de começar gravações. Recentemente, foi mostrado

que em várias porções do intestino grosso de cobaias pequenas, que esse período inicial sem resposta esteja intimamente associado à redução da GAP entre células musculares. Como o acoplamento da junção GAP se recupera durante o “período de equilíbrio”, a respostas a estimulação das fibras nervosas e aos agonistas farmacológicos, provável que o acoplamento da GAP esteja realmente envolvido, é na modulação da responsividade. Ademais, quando um órgão é isolado, ele está sujeito a vários fatores que podem alterar sua potência e padrão de resposta, como o estiramento, danos celulares, mudanças de temperatura e pH (CARBONE, *et al.*, 2014).

2.4.2 Diarreia e Constipação

Infecção intestinal é a causa mais comum de diarreia no mundo, manifestando-se principalmente através de quadros de diarreia aguda, sendo essa responsável pela morte de cerca de 4 milhões de indivíduos a cada ano, a maior parte corresponde a crianças em idade pré-escolar, em países em desenvolvimento (RYU, *et al.*, 2004).

A diarreia pode ser induzida, por exemplo, por óleo de rícino em camundongos. Essa diarreia induzida pelo óleo de rícino é resultado da ação do ácido ricinoleico formado durante a hidrólise do óleo, o que afeta o transporte de eletrólitos e água, proporcionando um aumento da quantidade das fezes com aspecto pastoso ou aquoso, gerando também contrações gigantes do cólon transversal e distal (GILANI, *et al.*, 2008).

A diarreia crônica é um grande problema em muitas situações clínicas, especialmente em pacientes com AIDS, se manifestando em 30 a 50% dos casos (RYU, *et al.*, 2004). Problemas relacionados com os distúrbios gastrointestinais estão ligados principalmente com distensões abdominais, obstruções intestinais, gases e excreção de fezes em quantidade variável, ou em contraponto a diarreia temos a constipação. A constipação corresponde a uma manifestação sintomática com espasmos musculares no sistema gastrointestinal, resultante em desconforto por constipações, distensões abdominais, obstruções intestinais, gases ou no caso da diarreia a eliminação de grande quantidade de fezes. Esses sintomas trazem uma severa redução da qualidade de vida. Levando assim a uma parte da população a fazer uso de agentes laxativos ou espasmolíticos (KAKINO, *et al.*, 2010).

Prejuízo do transporte de íons através do epitélio intestinal pode ter consequências drásticas na fisiologia e função gastrointestinal e pode explicar muitos dos sintomas associados à doenças do trato GI. O equilíbrio iônico inadequado pode resultar em fenótipos diarreia e constipação por efeitos sobre a secreção tissular, além disso, também pode causar hipersensibilidade visceral

atividade e hiperalgesia. Por esses motivos, identificar mediadores de absorção e secreção de íons no trato GI tornaram-se atraentes metas para o tratamento de doenças gastrointestinais (EDWINSON, e GROVER, 2019).

Essas desordens geram sintomas que podem ser classificadas como distúrbios gastrointestinais, relacionados com distúrbio de mobilidade, hipersensibilidade visceral, alteração da mucosa, alterações imunológicas, microbiota e/ou processamento do sistema nervoso periférico. Existe uma dificuldade ainda, para a elaboração de modelos animais para distúrbios do TGI (trato gastrointestinal), por pouco se conhecer sobre a fisiologia desses distúrbios. Portanto, os modelos mais utilizados hoje estudam os principais sintomas como o, esvaziamento gástrico tardio, constipação e diarreia (SAFFAR, *et al.*, 2019).

Recentemente, foi demonstrado que microbiota e mediadores luminais como a bílis e triptamina demonstram a capacidade de afetar a secreção intestinal. As proteases correspondem à importantes moléculas luminais que foram estudadas extensivamente em fisiopatologia da síndrome da hipersensibilidade intestinal e como mediadores da hipersensibilidade visceral em modelos animais. As proteases podem quebrar as junções célula-célula e clivar os receptores ativados por protease na superfície celular que reduzem a integridade da barreira do tecido intestinal e aumenta a secreção no intestino. As proteases intestinais são um alvo atraente para o tratamento da síndrome da hipersensibilidade intestinal, com a inibição da atividade das proteases, em testes com modelos animais. Os resultados ofereceram evidências para a busca da resolução de problemas hipersensibilidade viscerais. No entanto, os efeitos das proteases nos mecanismos secretórios das doenças intestinais não são bem compreendidos (EDWINSON e GROVER, 2019).

A utilização de marcadores biológicos tem sido feita de forma concomitante ao desenvolvimento de tratamentos para a diarreia, condição frequentemente associada a distúrbios gastrointestinais, em estudos realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, a escolha da espécie animal utilizada é um fator determinante para a interpretação adequada dos dados e para a extrapolação dos resultados para seres humanos, uma vez que, apesar da semelhança considerável na estrutura básica do TGI entre animais e humanos, há particularidades relevantes. Assim, a seleção de uma espécie animal apropriada é essencial para garantir que os dados obtidos possam servir como base confiável para futuros testes clínicos em humanos (GILANI, *et al.*, 2008).

Respostas em estudos pré-clínicos devem levar em consideração as diferenças de espécies nas vias funcionais e moleculares que controlam a função do TGI que pode comprometer o valor

translacional dos dados de animais para humanos, por exemplo, em humanos, cães e *suncus*, o hormônio motilina está envolvido no início da atividade da fase III da MMC. No entanto, modelos verificando a atividade da motilina usando camundongos, ratos e cobaias não devem ser considerados, tendo em vista que a função/gene promotor do receptor da motilina não estão presentes nessas espécies. A literatura ainda aponta que os animais mais indicados e comumente usados para a avaliação de distúrbios diarreicos são: de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos e velocidade de trânsito gastrointestinal *in vivo* e em cobaias para modelos *in vitro* com órgãos isolados (DESIRE, *et al.*, 2010; EDWINSON e GROVER, 2019; SAFFAR, *et al.* 2019).

As alterações de velocidade de trânsito do TGI são realizadas em tecidos ou animais saudáveis, usando ferramentas farmacológicas para interferir ou aumentar uma resposta fisiológica. Portanto, modelos pré-clínicos podem imitar certas características da alteração sintomática da motilidade gastrointestinal observada nos pacientes (SAFFAR, *et al.* 2019).

Entretanto, existem diferenças significantes entre receptores kappa-opiídeos em humanos e de roedores, e a sinalização que possa afetar os efeitos mediados pela ativação desses receptores. Além disso, as neurocininas (NK) induzem potentes efeitos contráteis via receptores NK₂ no intestino humano, enquanto NK₁ e os receptores NK₃ são os principais contribuintes para a contração do músculo liso em cobaias e coelhos. No que diz respeito à motilina e neurocininas, os dados do estudo de Schattauer, *et al.*, 2012 sugerem que fatores fisiológicos e farmacológicos as respostas da motilina em cães parecem mais comparáveis às humanas do que nos roedores, que demonstraram significantes diferenças entre receptores kappa-opiídeos de humanos e de roedores. A sinalização pode afetar os efeitos mediados pela ativação dos receptores kappa-opiídeos, alterando a motilidade do TGI. Além disso, as NK induzem potentes efeitos contráteis via receptores NK₂ no intestino humano, enquanto que nos receptores NK₁ e NK₃ são os principais contribuintes para a contração do músculo liso em cobaias e coelhos, destacando que no caso da motilina não demonstra atividade no TGI aparente em cobaias segundo Saffar, *et al.*, 2019.

Muitos estudos foram realizados em modelos *in vitro* sobre o segmento de tecido isolado de animais e órgão humano, ou parte inteira do TGI de animais, para estudar as respostas fisiológicas e farmacológicas do músculo liso e do sistema nervoso entérico. Esses estudos fisiológicos e farmacológicos foram conduzidos com segmento do intestino tipicamente suspenso no banho de órgãos em uma direção vertical para estudar a contração do músculo liso do músculo longitudinal. Apesar de o peristaltismo ser produzido pela camada muscular circular, isso é um

problema, pois é necessário esclarecer quais as contribuições fisiopatológicas na diarreia por exemplo de cada uma dessas camadas (KAKINO, *et al.*, 2010).

A eletromiografia e as medidas de pressão têm sido o método de escolha para registrar a atividade muscular circular e investigar a propagação do músculo contração ao longo do trato GI. Além da intervenção cirúrgica, as gravações da motilidade requerem restrição animal para capturar todos os dados. O desenvolvimento e a implementação de avanços clínicos recentes, como a cintilografia e o uso de cápsulas de mobilidade sem fio em estudos pré-clínicos, têm se mostrado alternativas menos invasivas e mais atrativas em comparação aos métodos tradicionais invasivos. Essas técnicas oferecem a vantagem de gerar dados com maior potencial de translação para a prática clínica, favorecendo a aplicabilidade dos resultados obtidos em humanos (SAFFAR, *et al.*, 2019).

2.4.3 Tratamentos para Distúrbios do Sistema Gastrointestinal

Algo importante a ser levado em consideração no estudo da avaliação na atividade frente ao músculo liso gastrointestinal na diarreia, é avaliar em conta a capacidade de o produto natural possuir a dinâmica necessária na inibição da secreção de líquido intestinal, redução dos espasmos e não levar a efeitos de constipação, com a distinguindo sua ação no efeito da contração de origem neurogênica e miogênica (LIS-BALCHIN e HART, 1998).

Uma variedade de medicamentos antiespasmolíticos são autorizados pelas principais agências reguladoras para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. Os mais utilizados são os anticolinérgicos como butilescopolamina, relaxantes diretos do músculo liso como a papaverina, antagonistas de cálcio com o pinaverium ou moduladores dos receptores opióides como a trimebutina (HEGHES, *et al.*, 2019).

Comparação entre resultados de tecidos gastrointestinais humanos isolados e dados obtidos a partir das preparações isoladas de tecidos de roedores revelaram diferenças acentuadas nas espécies, dependentes as respostas aos canabinóides, 5-HT_{3/4} receptores de histamina, receptores ativados por protease e o efeito da morfina na contração estimulada eletricamente. Estudos pré-clínicos e clínicos com prucaloprida, um agonista dos receptores 5-HT₄, mostraram um efeito consistente entre espécies de roedores e caninos, na estimulação da motilidade do TGI. Melhorando também a evacuação em pacientes com doença crônica de constipação idiopática. (SAFFAR, *et al.* 2019).

Alguns medicamentos como a loperadima, tinturas a base de ópio e o difenoxilato apresentam efeitos limitantes, como constipação e depressão do sistema nervoso central (RYU, *et al.*, 2004). Por sua vez, alguns medicamentos utilizados como antidiarreicos acabam por apresentar a tendência a diminuir o movimento peristáltico no sistema gastrointestinal, causando constipações sendo pouco interessante sobre o ponto de vista de reversibilidade, um exemplo disso é a loperamida. Dessa forma, espécies que apresentem efeitos laxativos e espamolíticos dose-dependentes são extremamente interessantes clinicamente (REHMAN, *et al.*, 2015). A atividade antidiarreica de uma gama de espécies já é relatada na literatura. Enquanto que algumas espécies possuem atividade antidiarreica e espamolítica, outras possuem atividade laxativa. (HEGHES, *et al.*, 2019)

Os flavonoides são os principais agentes antidiarreicos de vários produtos naturais. Suas propriedades antidiarreicas envolvem ações antissecretoras e antimotilidade envolvendo o relaxamento da musculatura lisa intestinal normalmente relacionada a inibição da mobilização ou antagonismo de Ca^{2+} . Alguns canais de Ca^{2+} como os Cav , agem como propagadores rápidos da entrada de Ca^{2+} que se refletem a contrações com voltagens de ondas lentas, estando relacionados com as frequências e a amplitude das contrações musculares intestinais, com a posterior liberação de Ca^{2+} através dos canais de rianodina que regula a excitabilidade e tônus do músculo liso gastrointestinal (BALEMBA, *et al.*, 2014).

No cólon do rato e da cobaia, a motilidade intestinal depende da atividade elétrica miogênica rítmica que subjaz contração do músculo liso chamado potenciais de ação. Alguns estudos demonstram que a atividade inibitória de alguns fármacos isolados e/ou produtos naturais são dependentes não da concentração, mas sim do tempo, com a diminuição da amplitude e frequência das contrações (BALEMBA, *et al.*, 2014).

2.4.4 Ação farmacológica do geraniol em íleo isolado

Algumas informações na literatura são encontradas sobre a possível atividade espasmolítica do geraniol, não de forma isolada em íleo de cobaia ou rato, mas sim na presença de algumas plantas medicinais, como é o exemplo da *Dracocephalum kotschy* usada na medicina tradicional iraniana, a tem sido utilizada como antiespasmódico e analgésico, os principais componentes encontrados no óleo essencial foram α -pineno (10%), neral (11%), geraniol (10%), α -citral (12%), limoneno (9%) e α -terpineol (1,1%), o óleo essencial, inibiu a resposta a contração no íleo induzida por KCl ($IC_{50}=51 \pm 8,7$ nl/ml), ACh ($IC_{50}=19 \pm 2,7$ nl/ml) e EFS ($IC_{50}=15 \pm 0,5$

nl/ml) de forma dependente da concentração do óleo essencial (KUCHARSKA, *et al.*, 2018; SADRAEI, *et al.*, 2015) tal como a de *Anthemis mauritiana* com EC_{50} de $32,26 \pm 1,48$ $\mu\text{g/mL}$ com 6,28% de Geraniol com claro efeito espasmolítico em íleo isolado de cobaia (KARIM, *et al.*, 2010).

2.4.5 Atividade do geraniol em modelos de diarreia

O geraniol apresenta atividade antidiarreica inibindo o crescimento da estirpe enterotoxigénica patogénicas de *E. coli*, que é responsável por cerca de 200 milhões de casos de diarreia por ano e causa cerca de 380 mil mortes. É de salientar que, nos países em desenvolvimento, a *E. coli* é o principal problema de saúde em crianças com menos de 5 anos de idade, segundo o estudo de Maćzka, *et al.*, 2020, além que uma dieta com a presença do geraniol tem a capacidade de melhoria da disbiose intestinal e alivia os sintomas em pacientes com síndrome do intestino irritável (RICI, *et al.*, 2022; RIZZELLO, *et al.*, 2018), porém ainda não existem dados na literatura suficientes em modelos de diarreia induzidas avaliando o efeito do geraniol.

2.5 Desenvolvimento de sistemas biotecnológicos de nanoemulsão envolvendo o geraniol

Podemos destacar que o desenvolvimento de sistemas de nanoemulsão envolvendo diferentes fármacos, com finalidade de potencializar seu efeito farmacológico, trará melhorias nas suas características farmacocinéticas, através da capacidade de melhoria da liberação do fármaco no local de ação e a redução da sua toxicidade, como elemento chave para o envolvimento da biotecnologia voltada a nanotecnologia de compostos de origem natural.

Alguns estudos já apontam o aumento de potência do geraniol em sistema de β - ciclodextrina onde resultados mostraram que as propriedades físico-químicas das nanopartículas foram afetadas pelo teor de geraniol em formulações que produziram partículas de tamanho nanométrico variando de 111 a 258 nm, sendo considerado como um material bioativo promissor para a concepção de alimentos funcionais, tal como seu uso como uma ferramenta muito promissora na administração de geraniol no sistema nervoso central através da via nariz-cérebro, impedindo a libertação de geraniol na corrente sanguínea e assegurando a integridade da mucosa nasal (HADIAN, *et al.*, 2018; SANTOS, *et al.*, 2015; TRUZZI, *et al.*, 2021).

O uso das nanoemulsões contendo geraniol são relatadas, para atividade antibacteriana efeito anti-inflamatório em macrófagos em inflamação induzida com proteína solúvel de *Candida*

albicans (GIONGO, *et al.*, 2017, SOMALA, *et al.*, 2022).

A escolha do sistema de nanoemulsão para formulações envolvendo o geraniol se justifica pela necessidade de superar limitações típicas de compostos naturais voláteis, como baixa solubilidade em água, instabilidade e biodisponibilidade reduzida. A nanoemulsão atua como um sistema de entrega eficiente, favorecendo a liberação controlada do composto no local de ação, aumentando sua penetração tecidual e reduzindo efeitos tóxicos sistêmicos. Além disso, a incorporação do geraniol em nanoestruturas potencializa suas propriedades bioativas, ampliando sua aplicabilidade farmacológica e tecnológica (DEEPIKA, *et al.*, 2021; FENG, *et al.*, 2022; KAMOU, *et al.*, 2022).

Assim, a seleção dos modelos e testes farmacológicos utilizados nas investigações depende diretamente do tipo de efeito a ser estudado. Em estudos com foco antimicrobiano, são utilizados modelos *in vitro* que avaliam a inibição do crescimento bacteriano frente a cepas patogênicas relevantes, o que permite rápida triagem da eficácia. Já para efeitos anti-inflamatórios, empregam-se culturas de macrófagos ativados por estímulos inflamatórios específicos, como proteínas de origem fúngica, a fim de mensurar a modulação da resposta imunológica. Para aplicações neurológicas, por sua vez, são adotados modelos *in vivo* e estratégias de administração inovadoras, como a via intranasal, que possibilitam avaliar a biodistribuição do composto até o sistema nervoso central, explorando o potencial do GER em terapias neuroprotetoras (HADIAN, *et al.*, 2018; SANTOS, *et al.*, 2015; TRUZZI, *et al.*, 2021).

REFERÊNCIAS:

ABU Ali, Ola A et al. “Facile Synthesis of Natural Anise-Based Nanoemulsions and Their Antimicrobial Activity.” *Polymers* vol. 13,12 2009. 19, <https://doi.org/doi:10.3390/polym13122009>, 2021.

BADRUDDOZA, A. Z. Md et al. Low energy nanoemulsions as templates for the formulation of hydrophobic drugs. *Advanced Therapeutics*, v. 1, n. 1, 2018.

BARBARA, G. Geraniol Treatment for Irritable Bowel Syndrome: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Nutrients*, 14(19), 4208. <https://doi.org/10.3390/nu14194208>, 2022.

BEN AMMAR R.. Potential Effects of Geraniol on Cancer and Inflammation-Related Diseases: A Review of the Recent Research Findings. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(9), 3669. <https://doi.org/10.3390/molecules28093669>, 2023.

CAPUTO, L., SMERIGLIO, A., TROMBETTA, D., CORNARA, L., TREVENA, G., VALUSSI, M., FRATIANNI, F., DE FEO, V., & NAZZARO, F. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils of *Leptospermum petersonii* and *Eucalyptus gunnii*. *Frontiers in microbiology*, 11, 409. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00409>, 2020.

CARVALHO, P. M. M., MACÊDO, C. A. F., RIBEIRO, T. F., SILVA, A. A., DA SILVA, R. E. R., DE MORAIS, L. P., KERNTOPF, M. R., MENEZES, I. R. A., & BARBOSA, R. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. *Biotechnology reports* (Amsterdam, Netherlands), 17, 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.12.002>, 2017.

CHAVES, C L et al. “Isolation and characterization of simple sequence repeat markers for the herbaceous species *Phyla scaberrima* (Verbenaceae).” *Genetics and molecular research : GMR* vol. 13,3 7864-8. 26, <https://doi.org/doi:10.4238/2014.September.26.24>, 2014.

CHENG, K. K., NADRI, M. H., OTHMAN, N. Z., RASHID, S. N. A. A., LIM, Y. C., & LEONG, H. Y. Phytochemistry, Bioactivities and Traditional Uses of *Michelia × alba*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(11), 3450. <https://doi.org/10.3390/molecules27113450>, 2022.

CHENG, L., REN, Y., LIN, D., PENG, S., ZHONG, B., & MA, Z. The Anti-Inflammatory Properties of *Citrus wilsonii* Tanaka Extract in LPS-Induced RAW 264.7 and Primary Mouse Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(7), 1213. <https://doi.org/10.3390/molecules22071213>, 2017.

CHEN, T. C., DA FONSECA, C. O., LEVIN, D., & SCHÖNTHAL, A. H. The Monoterpenoid Perillyl Alcohol: **Anticancer Agent and Medium to Overcome Biological Barriers**. *Pharmaceutics*, 13(12), 2167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122167>, 2021.

CHO, M., SO, I., CHUN, J. N., & JEON, J. H. The antitumor effects of geraniol: Modulation of cancer hallmark pathways (Review). *International journal of oncology*, 48(5), 1772–1782. <https://doi.org/10.3892/ijco.2016.3427>, 2016.

CHUNG, K. F., MCGARVEY, L., SONG, W. J., CHANG, A. B., LAI, K., CANNING, B. J., BIRRING, S. S., SMITH, J. A., & MAZZONE, S. B. Cough hypersensitivity and chronic cough.

Nature reviews. Disease primers, 8(1), 45. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00370-w>, 2022.

DEEPIKA et al. Zingiber zerumbet L. essential oil-based chitosan nanoemulsion as an efficient green preservative against fungi and aflatoxin B₁ contamination. *Journal of food science* vol. 86,1: 149-160. <https://doi.org/doi:10.1111/1750-3841.15545>, 2021.

DEHGHANKAR, Maryam et al. Bioactivities of rose-scented geranium nanoemulsions against the larvae of *Anopheles stephensi* and their gut bacteria. *PloS one* vol. 16,2 e0246470, <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0246470>, 2021.

DUAN, S., XIA, Y., TIAN, X., CUI, J., ZHANG, X., YANG, Q., ZHAO, T., LIN, Y., ZHANG, F., ZHANG, X., & CEN, J. A multi-bioresponsive self-assembled nano drug delivery system based on hyaluronic acid and geraniol against liver cancer. *Carbohydrate polymers*, 310, 120695. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120695>, 2023.

EDDIN, L. B., JHA, N. K., MEERAN, M. F. N., KESARI, K. K., BEIRAM, R., & OJHA, S. Neuroprotective Potential of Limonene and Limonene Containing Natural Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(15), 4535. <https://doi.org/10.3390/molecules26154535>, 2021.

EFTEKHAR, N., MOGHIMI, A., MOHAMMADIAN ROSHAN, N., SAADAT, S., & BOSKABADY, M. H. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of hydro-ethanolic extract of *Ocimum basilicum* leaves and its effect on lung pathological changes in an ovalbumin-induced rat model of asthma. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 349. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2765-4>, 2019.

ELANSARY, H. O., ABDELGALEIL, S. A. M., MAHMOUD, E. A., YESSOUFOU, K., ELHINDI, K., & EL-HENDAWY, S. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2262-1>, 2018.

EL-BASSOSSY, Hany M et al. Geraniol improves the impaired vascular reactivity in diabetes and metabolic syndrome through calcium channel blocking effect. *Journal of diabetes and its complications* vol. 30,6: 1008-16. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.04.006>, 2016.

EL-GANAINY, S. O., SHEHATA, A. M., EL-MALLAH, A., ABDALLAH, D., & MOHY EL-DIN, M. M. Geraniol suppresses tumour growth and enhances chemosensitivity of 5-fluorouracil on breast carcinoma in mice: involvement of miR-21/PTEN signalling. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 75(8), 1130–1139. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgad060>, 2023.

FENG, Xiaolin et al. Preparation and characterization of geraniol nanoemulsions and its antibacterial activity. *Frontiers in microbiology* vol. 13 1080300, <https://doi.org/doi:10.3389/fmicb.2022.1080300>, 2022.

GASTÓN, M. S., CID, M. P., VÁZQUEZ, A. M., DECARLINI, M. F., DEMMEL, G. I., ROSSI, L. I., AIMAR, M. L., & SALVATIERRA, N. A. Sedative effect of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil and its major component linalool in neonatal chicks. *Pharmaceutical biology*, 54(10), 1954–1961. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1137602>, 2016.

GIONGO, Janice Luehring et al. “Anti-inflammatory effect of geranium nanoemulsion macrophages induced with soluble protein of *Candida albicans*.” *Microbial pathogenesis* vol. 110:

694-702. <https://doi.org/doi:10.1016/j.micpath.2017.01.056>, 2017.

GILIANI, Anwar-ul Hassan et al. Presence of antispasmodic, antidiarrheal, antisecretory, calcium antagonist and acetylcholinesterase inhibitory steroidal alkaloids in *Sarcococca saligna*. *Planta medica* vol. 71,2 2005. doi:10.1055/s-2005-837777

IZZO, A. A. et al. Antidiarrhoeal activity of *Terminalia sericea* Burch ex. DC extracts. In: **Natural drugs and the digestive tract**. EMSI, p. 223-30, 1992.

HADIAN, Z., MALEKI, M., ABDI, K., ATYABI, F., MOHAMMADI, A., & KHAKSAR, R. Preparation and Characterization of Nanoparticle β -Cyclodextrin:Geraniol Inclusion Complexes. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 17(1), 39–51. 2018.

HASSANZADEH, S. A., ABBASI-MALEKI, S., & MOUSAVI, Z. Anti-depressive-like effect of monoterpene trans-anethole via monoaminergic pathways. **Saudi journal of biological sciences**, 29(5), 3255–3261. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.060>, 2022.

KAMOU, Nathalie N et al. “Impact of Geraniol and Geraniol Nanoemulsions on *Botrytis cinerea* and Effect of Geraniol on Cucumber Plants' Metabolic Profile Analyzed by LC-QTOF-MS.” *Plants (Basel, Switzerland)* vol. 11,19 2513, <https://doi.org/doi:10.3390/plants11192513>, 2022.

KARIM, A., BERRABAH, M., MEKHFI, H., ZIYYAT, A., LEGSSYER, A., BOUALI, A., HALOUI, B., Amrani, S., & Aziz, M. Effect of essential oil of *Anthemis mauritiana* Maire & Sennen flowers on intestinal smooth muscle contractility. **Journal of smooth muscle research**, 46(1), 65–75. <https://doi.org/10.1540/jsmr.46.65>, 2010.

KHAN, Arif-ullah, and Anwarul Hassan GILANI. “Antidiarrhoeal and bronchodilatory potential of *Valeriana wallichii*.” *Natural product research* vol. 26,11: 1045-9. <https://doi.org/doi:10.1080/14786419.2010.551754>, 2012.

KHAN, Taous et al. Intestinal and vascular smooth muscle relaxant effect of *Viscum album* explains its medicinal use in hyperactive gut disorders and hypertension. *BMC complementary and alternative medicine* vol. 16 251. 27 Jul. 2016, doi:10.1186/s12906-016-1229-3

KUCHARSKA, M., SZYMAŃSKA, J. A., WESOŁOWSKI, W., BRUCHAJZER, E., & FRYDRYCH, B. Porównanie składu chemicznego wybranych olejków eterycznych stosowanych w chorobach układu oddechowego [Comparison of chemical composition of selected essential oils used in respiratory diseases]. *Medycyna pracy*, 69(2), 167–178. <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00673>, 2018.

LAMAS, A., RUIZ DE VALBUENA, M., & MÁIZ, L. Cough in children. *Archivos de bronconeumologia*, 50(7), 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.09.011>, 2014.

LEE, S., PARK, Y. R., KIM, S. H., PARK, E. J., KANG, M. J., SO, I., CHUN, J. N., & JEON, J. H. Geraniol suppresses prostate cancer growth through down-regulation of E2F8. *Cancer medicine*, 5(10), 2899–2908. <https://doi.org/10.1002/cam4.864>, 2016.

LEI, Yu et al. Pharmacological Properties of Geraniol - A Review. *Planta medica* vol. 85,1: 48-55. <https://doi.org/doi:10.1055/a-0750-6907>, 2019.

LIU, Y., YAN, H., YU, B., HE, J., MAO, X., YU, J., ZHENG, P., HUANG, Z., LUO, Y., LUO, J., WU, A., & CHEN, D. Protective Effects of Natural Antioxidants on Inflammatory Bowel Disease: Thymol and Its Pharmacological Properties. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(10), 1947. <https://doi.org/10.3390/antiox11101947>, 2022.

MAÇZKA, W., WIŃSKA, K., & GRABARCZYK, M. One Hundred Faces of Geraniol. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(14), 3303. <https://doi.org/10.3390/molecules25143303>, 2020.

MAZZONE, S. B., & MCGARVEY, L. Mechanisms and Rationale for Targeted Therapies in Refractory and Unexplained Chronic Cough. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 109(3), 619–636. <https://doi.org/10.1002/cpt.2003>, 2021.

MENEZES DANTAS, D., PEREIRA-DE MORAIS, L., DE ALENCAR SILVA, A., DA SILVA, R. E. R., DIAS, F. J., DE SOUSA AMORIM, T., CRUZ-MARTINS, N., MELO COUTINHO, H. D. D., & BARBOSA, R. Pharmacological screening of species from the Lippia genus, content in terpenes and phenylpropanoids, and their vasorelaxing effects on human umbilical artery. *Current pharmaceutical design*, 10.2174/1381612829666221124101321. Advance online publication. <https://doi.org/10.2174/1381612829666221124101321>, 2022.

MENEZES, José Evaldo Rodrigues Filho et al. “Geraniol blocks calcium and potassium channels in the mammalian myocardium: useful effects to treat arrhythmias.” *Basic & clinical pharmacology & toxicology* vol. 115,6: 534-44. <https://doi.org/doi:10.1111/bcpt.12274>, 2014.

MIRAJ, Sepide et al. “Melissa officinalis L: A Review Study With an Antioxidant Prospective.” *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine* vol. 22,3: 385-394. <https://doi.org/doi:10.1177/2156587216663433>, 2017.

NAPAGODA, M. T., SUNDARAPPERUMA, T., FONSEKA, D., AMARASIRI, S., & GUNARATNA, P. An Ethnobotanical Study of the Medicinal Plants Used as Anti-Inflammatory Remedies in Gampaha District, Western Province, Sri Lanka. *Scientifica*, 2018, 9395052. <https://doi.org/10.1155/2018/9395052>, 2018.

PEREIRA-DE-MORAIS, L., SILVA, A. A., DA SILVA, R. E. R., COSTA, R. H. S. D., MONTEIRO, Á. B., BARBOSA, C. R. D. S., AMORIM, T. S., DE MENEZES, I. R. A., KERNTOPF, M. R., & BARBOSA, R. Tocolytic activity of the Lippia alba essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats. *Chemico-biological interactions*, 297, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.006>, 2019.

POE, R. H., & KALLAY, M. C. Chronic cough and gastroesophageal reflux disease: experience with specific therapy for diagnosis and treatment. *Chest*, 123(3), 679–684. <https://doi.org/10.1378/chest.123.3.679>, 2003.

QI, F., YAN, Q., ZHENG, Z., LIU, J., CHEN, Y., & ZHANG, G.. Geraniol and geranyl acetate induce potent anticancer effects in colon cancer Colo-205 cells by inducing apoptosis, DNA damage and cell cycle arrest. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 23(2), 346–352, 2018.

RAUF, Abdur et al. Antispasmodic Potential of Medicinal Plants: A Comprehensive Review. *Oxidative medicine and cellular longevity* vol. 2021 4889719. 11 Nov. 2021, doi:10.1155/2021/4889719

RAO, V. S. et al. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 63, p.146-149, 1997.

RICCI, C., RIZZELLO, F., VALERII, M. C., SPISNI, E., GIONCHETTI, P., TURRONI, S., CANDELA, M., D'AMICO, F., SPIGARELLI, R., BELLOCCHIO, I., MARASCO, G., &

RIZZELLO, F., RICCI, C., SCANDELLA, M., CAVAZZA, E., GIOVANARDI, E., VALERII, M. C., CAMPIERI, M., COMPARONE, A., DE FAZIO, L., CANDELA, M., TURRONI, S., & SPISNI, E. Dietary geraniol ameliorates intestinal dysbiosis and relieves symptoms in irritable bowel syndrome patients: a pilot study. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 338. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2403-6>, 2018.

ROCCA V, DA FONSÊCA DV, SILVA-ALVES KS, FERREIRA-DA-SILVA FW, DE SOUSA DP, SANTOS PL, QUINTANS-JÚNIOR LJ, LEAL-CARDOSO JH, DE ALMEIDA RN. Geraniol induces antinociceptive effect in mice evaluated in behavioural and electrophysiological models. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**; 120: 22–29, 2017

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M., HOBBIE, F., KEERTHI, A., OUN, A., KORTHOLT, A., BODDEKE, E., & DOLGA, A. Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 118, 109295. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109295>, 2019.

SADRAEI, H., ASGHARI, G., & KASIRI, F. Comparison of antispasmodic effects of *Dracocephalum kotschyi* essential oil, limonene and α -terpineol. *Research in pharmaceutical sciences*, 10(2), 109–116. 2015.

SANTOS, P. L., ARAÚJO, A. A., QUINTANS, J. S., OLIVEIRA, M. G., BRITO, R. G., SERAFINI, M. R., MENEZES, P. P., SANTOS, M. R., ALVES, P. B., DE LUCCA JÚNIOR, W., BLANK, A. F., LA ROCCA, V., ALMEIDA, R. N., & QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Preparation, Characterization, and Pharmacological Activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) Leaf Essential Oil of β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2015, 502454. <https://doi.org/10.1155/2015/502454>, 2015.

SAWADA, S., OKANO, J., IMAMOTO, R., YASUNAKA, Y., ABE, R., KODA, M., MURAWAKI, Y., & ISOMOTO, H. Preventive Effect of Geraniol on Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats. *Yonago acta medica*, 59(1), 37–43, 2016.

SHARMEEN, J. B., MAHOMOODALLY, F. M., ZENGIN, G., & MAGGI, F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(3), 666. <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>, 2021.

SHANMUGAPRIYA, S., SUBRAMANIAN, P., & KANIMOZHI, S. Geraniol Inhibits Endometrial Carcinoma via Downregulating Oncogenes and Upregulating Tumour Suppressor Genes. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 32(2), 214–219. <https://doi.org/10.1007/s12291-016-0601-x>, 2017.

SILVA, F., & DOMINGUES, F. C. **Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative.** *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(1), 35–47. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.847818>, 2017.

SILVA, G. D. S. E., MARQUES, J. N. J., LINHARES, E. P. M., BONORA, C. M., COSTA, É. T., & SARAIVA, M. F. Review of anticancer activity of monoterpenoids: Geraniol, nerol, geranial and neral. *Chemico-biological interactions*, 362, 109994. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109994>, 2022.

SILVA, R. E. R., DE MORAIS, L. P., SILVA, A. A., BASTOS, C. M. S., PEREIRA-GONÇALVES, Á., KERNTOPF, M. R., MENEZES, I. R. A., LEAL-CARDOSO, J. H., & BARBOSA, R. Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 108, 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.073>, 2018.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 17, p. 246–254, 2012.

SOMALA, Naphat et al. “Formulation process, physical stability and herbicidal activities of *Cymbopogon nardus* essential oil-based nanoemulsion.” *Scientific reports* vol. 12,1 10280. <https://doi.org/doi:10.1038/s41598-022-14591-2>, 2022.

SONG, W. J., CHANG, Y. S., & MORICE, A. H.. Changing the paradigm for cough: does 'cough hypersensitivity' aid our understanding?. *Asia Pacific allergy*, 4(1), 3–13. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2014.4.1.3>, 2014.

STINSON, R. J., MORICE, A. H., & SADOFSKY, L. R. Modulation of transient receptor potential (TRP) channels by plant derived substances used in over-the-counter cough and cold remedies. *Respiratory research*, 24(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02347-z>, 2023.

SU, Y. W., CHAO, S. H., LEE, M. H., OU, T. Y., TSAI, Y. C. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E₂ production in macrophages. *Planta medica*, 76, 1666–1671. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249947>, 2010.

TAN, L. T., LEE, L. H., YIN, W. F., CHAN, C. K., ABDUL KADIR, H., CHAN, K. G., & GOH, B. H. Traditional Uses, Phytochemistry, and Bioactivities of *Cananga odorata* (Ylang-Ylang). *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2015, 896314. <https://doi.org/10.1155/2015/896314>, 2015.

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.

TIBENDA, J. J., YI, Q., WANG, X., & ZHAO, Q. Review of phytomedicine, phytochemistry, ethnopharmacology, toxicology, and pharmacological activities of *Cymbopogon* genus. *Frontiers in pharmacology*, 13, 997918. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.997918>, 2022.

TRUZZI, E., RUSTICHELLI, C., DE OLIVEIRA JUNIOR, E. R., FERRARO, L., MARETTI, E., GRAZIANI, D., BOTTI, G., BEGGIATO, S., IANNUCELLI, V., LIMA, E. M., DALPIAZ, A., & LEO, E. Nasal biocompatible powder of Geraniol oil complexed with cyclodextrins for neurodegenerative diseases: physicochemical characterization and in vivo evidences of nose to brain delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 335, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.020>, 2021.

VENZON L, MARIANO LNB, SOMENSI LB, BOEING T, DE SOUZA P, WAGNER TM, ANDRADE SF, NESELLO LAN, DA SILVA LM. Essential oil of *Cymbopogon citratus*

(lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. **Biomed Pharmacother**; 98: 118–124, 2018.

VERSPOHL, Eugen J et al. “Testing of *Perilla frutescens* extract and Vicenin 2 for their antispasmodic effect.” *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* vol. 20,5: 427-31. <https://doi.org/doi:10.1016/j.phymed.2012.12.018>, 2013.

VICENTE, S. CABAÑAS, Y., RENUNCIO, A. C., PANDO, J., CONCEPCIÓN. Supercritical CO₂ as a green solvent for eucalyptus and citrus essential oils processing: Role of thermal effects upon mixing. **RSC Adv.** 3. 6065-6075. doi: 10.1039/C3RA23174G, 2013.

XUE Z, ZHANG XG, WU J, XU WC, LI LQ, LIU F, YU JE. Effect of treatment with geraniol on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. **Ann Allergy Asthma Immunol**; 116: 506–513, 2016.

YANG, H., LIU, G., ZHAO, H., DONG, X., & YANG, Z. Inhibiting the JNK/ERK signaling pathway with geraniol for attenuating the proliferation of human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 35(8), e22818. <https://doi.org/10.1002/jbt.22818>, 2021.

YE, C. J., LI, S. A., ZHANG, Y., LEE, W. H. Geraniol targets K_v1.3 ion channel and exhibits anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. **Fitoterapia**, 139, 104394. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104394>, 2019.

WITTIG, C., SCHEUER, C., PARAKENINGS, J., MENGER, M. D., & LASCHKE, M. W. Geraniol Suppresses Angiogenesis by Downregulating Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/VEGFR-2 Signaling. *PloS one*, 10(7), e0131946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131946>, 2015.

ZHAO, H., REN, S., YANG, H., TANG, S., GUO, C., LIU, M., TAO, Q., MING, T., & XU, H. Peppermint essential oil: its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, 154, 113559. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113559>, 2022.

ZHUANG, K., TANG, H., GUO, H., & YUAN, S. Geraniol prevents *Helicobacterium pylori*-induced human gastric cancer signalling by enhancing peroxiredoxin-1 expression in GES-1 cells. **Microbial pathogenesis**, 174, 105937. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105937>, 2023.

CAPÍTULO 1

Avaliação da atividade do geraniol *in vitro* em íleo isolado de cobaia e investigação de seu mecanismo de ação.

RESUMO

Dentre os constituintes fitoquímicos de algumas espécies vegetais utilizadas na medicina popular, destaca-se o geraniol (GER), um monoterpene que possui propriedades farmacológicas relevantes, como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidativa, antimicrobiana, efeitos hepatoprotetores, cardioprotetores, anti-hipertensivo e neuroprotetores. Contudo, pouco se conhece sobre sua atividade no trato gastrointestinal. Assim esse estudo visa investigar o potencial antiespasmódico *in vitro* do geraniol e possíveis mecanismos de ação associados.

Concentrações cumulativas de GER ($1,0 \times 10^{-7}$ M a $3,0 \times 10^{-3}$ M) foram testadas em íleo isolado de cobaia, nas contrações induzidas por carbacol $1 \mu\text{M}$. Para estudo complementar, as vias dos canais de potássio, canais TRPV (canais do potencial receptor transitório vaniloide), dos receptores adrenérgicos, opióides e via do óxido nítrico foram propostas. O GE apresentou atividade espasmolítica, com $p\text{EC}_{50} = 4,75$ e $\text{E}_{\text{max}} = 40,23\%$, sendo que os bloqueadores tetraetilamônio (TEA) $p\text{EC}_{50} = 2,92$ e $\text{E}_{\text{max}} = -33,00\%$, e capsazepina (CPZ) $p\text{EC}_{50} = 4,98$ e $\text{E}_{\text{max}} = -17,30\%$. Os resultados indicam que os mecanismos de ação estão relacionados possivelmente, à modulação de canais de potássio do tipo BKCa e à atuação sobre receptores TRPV1, conforme evidenciado pela resposta à presença dos bloqueadores TEA e capsazepina. Esses dados contribuem para o entendimento farmacológico do geraniol no trato gastrointestinal e reforçam seu potencial como agente terapêutico espasmolítico em músculo liso de íleo.

Palavras-chave: TRPV1. Mecanismo de ação. Íleo. Geraniol. BKca.

ABSTRACT

Among the phytochemical constituents of some plant species used in folk medicine, geraniol (GER) stands out, a monoterpene that has relevant pharmacological properties, such as antitumor, anti-inflammatory, antioxidative, antimicrobial, hepatoprotective, cardioprotective, antihypertensive and neuroprotective effects. However, little is known about its activity in the gastrointestinal tract. Therefore, this study aims to investigate the *in vitro* antispasmodic potential of geraniol and possible associated mechanisms of action. Cumulative concentrations of GER (1.0×10^{-7} M to 3.0×10^{-3} M) were tested in isolated guinea pig ileum, during contractions induced by $1 \mu\text{M}$ carbachol. For complementary studies, the potassium channel pathways, TRPV channels (transient receptor potential vanilloid channels), adrenergic receptors, opioids and the nitric oxide pathway were proposed. The EG showed spasmolytic activity, with $\text{pEC}_{50} = 4.75$ and $\text{E}_{\text{max}} = 40.23\%$, whereas the blockers tetraethylammonium (TEA) $\text{pEC}_{50} = 2.92$ and $\text{E}_{\text{max}} = -33.00\%$, and capsazepine (CPZ) $\text{pEC}_{50} = 4.98$ and $\text{E}_{\text{max}} = -17.30\%$. The results indicate that the mechanisms of action are possibly related to modulation of BKCa-type potassium channels and action on TRPV1 receptors, as evidenced by the response to the presence of TEA blockers and capsazepine. These data contribute to the pharmacological understanding of geraniol in the gastrointestinal tract and reinforce its potential as a spasmolytic therapeutic agent in ileal smooth muscle.

Keywords: TRPV1. Mechanism of action. Ileum. Geraniol. BKca.

1. Introdução

O interesse sobre a pesquisa de atividades biológicas de óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais é mundial. Este interesse tem sido mais expressivo devido à grande variedade de espécies e às mais diversas propriedades que muitas delas apresentam, tais como: espasmolíticas, antidiarreicas dentre outras (EL ALLAOUI, *et al.*, 2024; YADAV e JOSHI, 2024). O geraniol (GER) é um monoterpene isoprenoide acíclico, isolado dos óleos essenciais de plantas aromáticas, incluindo *Cinnamomum tenuipilum*, *Valeriana officinalis* e muitas outras plantas, e sendo um dos principais constituintes fitoquímicos dos óleos essenciais de diversas espécies vegetais. (MIRAJ, S. *et al.*, 2017, LIU, *et al.*, 2022, SÁ, *et al.*, 2021).

Entre as principais atividades do GER é relatado em estudos que elucidam sua atividade farmacológica, entretanto, apesar de haver muitas espécies contendo esse monoterpene como constituinte fitoquímico, com esses óleos essenciais atividade em músculo liso isolados em modelos *in vivo*, pouco se conhece sobre a atividade do monoterpene apresentado de maneira isolado no trato gastrointestinal em modelos *in vitro* em íleo isolado de cobaia com avaliação de sua função espasmolítica, tal como a escassez de estudos que avalie o monoterpene e sua atividade em modelos de diarreia (LEI, *et al.*, 2019; YE, *et al.*, 2019). Destacam-se as propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes, antimicrobianas, além de efeitos hepatoprotetores, cardioprotetores e neuroprotetores (AMMAR, *et al.*, 2023; CHO, *et al.*, 2016; GUO, *et al.*, 2023; LEI, *et al.*, 2019; LIU, *et al.*, 2022; MAÇZKA, *et al.*, 2020; MAMATTAH, *et al.*, 2023). Além disso, o composto tem mostrado efeitos protetores sobre o fígado, o coração e o sistema nervoso, além de possuir atividade espasmolítica, o que envolve a modulação da motilidade gastrointestinal, consolidando-se como uma promissora opção farmacológica para uso terapêutico (MAÇZKA, *et al.*, 2020).

Nesse contexto, é importante destacar que a motilidade gastrointestinal depende diretamente da contração do músculo liso, a qual é regulada principalmente pelo influxo de cálcio (Ca^{2+}) através de canais do tipo L e pela liberação de estoques intracelulares. Esse processo é modulado por íons potássio (K^+), canais catiônicos não seletivos e por neurotransmissores como a acetilcolina, o óxido nítrico (NO) e a noradrenalina. Enquanto a acetilcolina promove a contração via aumento do Ca^{2+} intracelular, o NO e os receptores β -adrenérgicos favorecem o relaxamento muscular por mecanismos mediados, respectivamente, pelo cGMP e pelo AMPc (DUANGJAI, *et al.*, 2021).

Apesar das evidências de que diversas espécies vegetais contendo geraniol apresentam

efeitos sobre o músculo liso, ainda são escassos os estudos que investigam a atividade desse monoterpene de forma isolada no trato gastrointestinal, especialmente em modelos experimentais *in vitro* (KARIM, *et al.*, 2010; LEI, *et al.*, 2019; YE, *et al.*, 2019). Diante dessa lacuna, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade espasmolítica do geraniol em óleo isolado de cobaia, bem como investigar os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos em sua ação.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Geraniol foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA, Número de lote: 163333-25G), com propriedades físico-químicas de 154,25 g/mol, 229-230 °C ponto de ebulição (lit.) a 1.008 hPa, densidade de 0,879 g/mL a 20 °C sendo sua solubilidade 0,1 g/L em água 25 °C. Considerando essas informações disponíveis na National Center for Biotechnology Information, e do fabricante, GER foi dissolvido com cremofor 3% sobre agitação por 5 minutos em água destilada em sistema fechado para evitar a evaporação do monoterpene.

2.2 Animais

Foram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) machos pesando entre 300 e 500 g, procedentes do Biotério Central da UNIVASF. Os animais foram mantidos pelo Biotério Central da UNIVASF, em caixas adequadas, com ciclo claro escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*, entrando em períodos de jejum de 18 horas ou 24 horas apenas antes dos experimentos. Todos os protocolos experimentais respeitam os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF), nº 0005/270320.

2.3 Reagentes químicos

Os agentes químicos carbacol (CCh), cloreto de potássio (KCl), histamina (HIS), aminofilina hidratada (AMI), glibenclamida (GLI), propranolol cloridrato (PRO), fentolamina (PHE), *N* ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), naloxona (NAL), rutênio vermelho (V-RUT), cloreto de céσιο (CsCl), tetraetilamônio (TEA), 4-aminopiridina (4-AP), capsazepina (CPZ), nitroprussiato de sódio (NPS), azul de metileno (AZM), ácido flufenâmico (FLU) e Cremophor EL[®] foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

2.4 Avaliação da atividade relaxante da musculatura lisa de óleo isolado de cobaia

As cobaias foram mantidas em jejum de sólidos por 18 horas e em seguida eutanasiadas com tiopental 150 mg/kg, via intraperitoneal. Um segmento de 1 cm do íleo foi coletado e imerso em recipiente contendo solução nutritiva de Krebs modificada (NaCl 117,0 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂.2H₂O 2,5 mM, MgSO₄.7H₂O 1,3 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, Glicose 11,0 mM, NaHCO₃ 25,0 mM), a 37°C sob aeração com carbogênio 95% O₂ e 5% CO₂. Após dissecação, o segmento foi seccionado e suspenso longitudinalmente, individualmente em cubas de vidro (10 mL) e deixados em período de estabilização do órgão por 30 minutos, com força induzida no tecido de 1 gF, sendo a solução nutritiva trocada a cada 10 minutos.

Com o objetivo de definir o agente contraturante a ser utilizado na avaliação do mecanismo de ação do estudo, foram testadas separadamente as substâncias carbacol (1 μM), histamina (1 μM) e KCl (60 mM). Após a estabilização e formação dos grupos basais, as contrações induzidas por cada agente foram registradas por meio de transdutores isométricos.

Após o período de estabilização, duas contrações foram induzidas com carbacol 1 μM, histamina 1 μM ou KCl 60 mM. A primeira contração teve por finalidade verificar a viabilidade do órgão. Após essa primeira contração a cuba foi lavada mais três vezes, com uma diferença de 10 minutos entre elas. Após a última (6ª e última lavagem) o íleo foi novamente contraído (segunda contração) na presença de carbacol 1 μM, histamina 1 μM ou KCl 60 mM ou mantido na ausência de agente contraturante com a finalidade obter o tônus basal, e a cada 5 minutos após a 2ª contração o GER foi adicionado, em concentrações cumulativas de 1,0 x 10⁻⁷; 3,0 x 10⁻⁷; 1,0 x 10⁻⁶; 3,0 x 10⁻⁶; 1,0 x 10⁻⁵; 3,0 x 10⁻⁵; 1,0 x 10⁻⁴; 3,0 x 10⁻⁴; 1,0 x 10⁻³ e 3,0 x 10⁻³ M, a fim de determinar uma curva concentração-resposta com intervalo de 5 minutos entre cada concentração.

2.5 Mecanismos de ação associados ao geraniol isolado

Para a investigação do mecanismo de ação do GER, o órgão foi posicionado de forma vertical conforme descrito anteriormente. Após o período de estabilização, os seguintes protocolos experimentais foram utilizados: a) 15 minutos antes de uma segunda contração induzida por carbacol 1 μM captada por um transdutor isométrico, as preparações foram expostas separadamente a bloqueadores das vias adrenérgicas, opioides, óxido nítrico, TRP e canais de potássio, afim de investigar em qual(is) via(s) seria(m) observada(s) reversão do efeito.

2.5.1 Avaliação da influência via adrenérgica e AMPc no mecanismo de ação do geraniol

Foram utilizados os seguintes fármacos no íleo isolado de cobaia e suas concentrações de propranolol 1 μM (antagonista β-adrenérgico não seletivo) (HORINOUCI e KOIKE, 2000),

fentolamina 1 μM (antagonista α -adrenérgico) (ZHANG, et al., 2021), aminofilina 100 μM (inibidor não seletivo da fosfodiesterase e inibidor de influxo intra-celular de cálcio) (MELNYK, et al., 2023, OKWASABA, et al., 1997).

2.5.2 Avaliação da influência via do NO e opioides no mecanismo de ação, do geraniol.

Os seguintes fármacos foram utilizados no estudo com íleo isolado de cobaia, juntamente com suas respectivas concentrações, naloxona 1 μM (antagonista de receptores opióides) (KANG, et al., 2012), N ω -nitro-L-arginina metil éster 100 μM (L-NAME, inibidor competitivo da óxido nítrico sintase) (GASTREICH-SEELIG, et al., 2020), Nitroprussiato de Sódio 1 μM (doador de NO), Azul de Metileno 10 μM (Inibição da guanilil ciclase) (DUANGJAI, et al., 2021).

2.5.3 Avaliação da influência dos canais de potássio no mecanismo de ação, do geraniol.

No experimento com íleo isolado de cobaia, foram empregados os seguintes fármacos, com suas respectivas concentrações, CsCl 5 mM (bloqueador dos canais para K não seletivo) (VASCONCELOS, et al., 2015), Tetraetilamônio 1 mM (bloqueador dos canais Kv, KCa, BKca) (KOSLOV e ANDERSSON, 2013, VASCONCELOS, et al., 2015), 4-aminopiridina 3 mM (bloqueador dos canais KV) (GOLDFEDER, et al., 2022, VASCONCELOS, et al., 2015), glibenclamina 10 μM (bloqueador dos canais KATP) (VASCONCELOS, et al., 2015).

2.5.4 Avaliação da influência dos receptores TRPV1 e canais de cálcio no mecanismo de ação, do geraniol.

Foram administrados diferentes fármacos no íleo isolado de cobaia, cada um em sua respectiva concentração, vermelho de Rutênio 10 μM (inibidor não seletivo para TRPV1) (JARA-OSGUERA, 2024), capsazepina 10 μM (antagonista TRPV1) (KISTNER, et al., 2016, LIU, et al., 2021), ácido flufenamico 1 μM (inibidor seletivo de canais para cálcio regulados por cloreto) (HOTTA, et al., 2005).

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos do Windaq exportados para o Excel e foram desenhados em gráficos no Graph-Pad Prism® versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) Windaq XL® (Dataq Instruments Inc. Springside, Akron, Ohio, USA), and Excel® 2014 (Microsoft, San Francisco, California, USA)., permitiram a análise da área sobre a curva (AUC). resultados de área sobre a curva (AUC) obtidos foram expressos como S.E.M e analisados estatisticamente por teste

t de Student das médias das AUC obtidas, com teste paramétrico pareado para cada concentração entre o GER na presença e ausência de cada bloqueador, inibidor ou antagonista farmacológico e ANOVA one-way com pós-teste de Dunnett para comparar dentro de cada experimento as diferenças entre as concentrações cumulativas e o início da curva de concentração após a estabilização do órgão. Onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados os significantes. Os valores de pEC_{50} (p valor da concentração do monoterpeno que produz uma resposta igual a 50% do seu efeito máximo) e E_{max} (efeito máximo), foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados.

3. Resultados

3.1 Triagem da atividade espasmolítica do geraniol em íleo isolado de cobaia.

Os resultados demonstram que a administração de GER promoveu um efeito relaxante nas contrações induzidas por carbacol, reduzindo progressivamente a força de contração conforme a concentração do GER aumentava. A comparação da AUC (área sobre a curva) indica que o GER apresentou maior potência frente ao carbacol ($pEC_{50} = 4,75$; $E_{max} = 40,23\%$) em relação ao KCl ($pEC_{50} = 2,16$; $E_{max} = 43,06\%$) e à histamina ($pEC_{50} = 0,20$; $E_{max} = 18,11\%$), sugerindo que o geraniol possui maior afinidade e eficácia relaxante em modelos de contratilidade colinérgica.

Os resultados expressos na Figura 2 representam as AUC das contrações induzidas por carbacol sobre o íleo isolado de cobaia, evidenciando que o efeito relaxante do GER é possivelmente mais eficaz na presença de estímulo colinérgico, com ação seletiva e dependente da contração prévia, tal como o uso do carbacol como agente indutor de contração, permite a avaliação de vias no mecanismo de ação como os canais para potássio, o que não seria viável caso fosse utilizado o KCl.

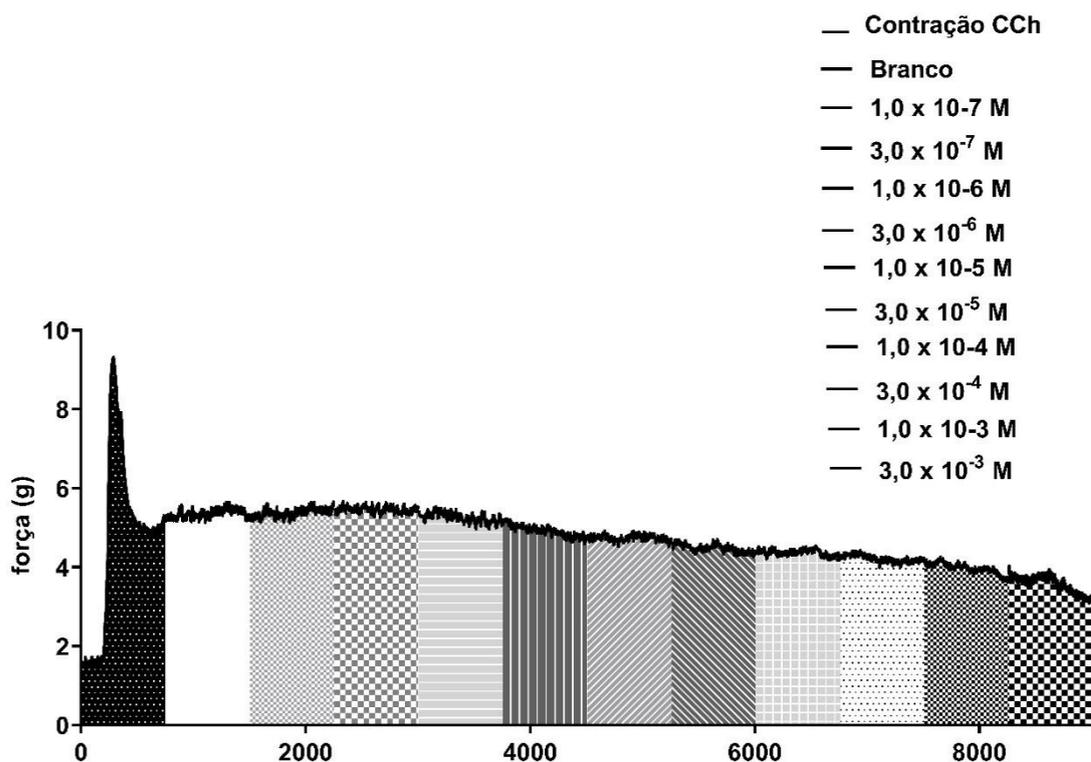


Figura 2. Efeito relaxante do GER nas contrações ileais induzidas por carbachol 1 μ M, registro original do experimento e cumulativa de $1,0 \times 10^{-7}$ até $3,0 \times 10^{-3}$ M, indicadas nas diferentes áreas, cada uma correspondendo a uma concentração dentro de um período de 5 minutos até a adição de uma nova concentração de forma cumulativa. Valores dos $n=5$ sobrepostos, expressos com \pm SEM do experimento real obtido a partir do Windaq. Gráfico desenhado no Prisma, a partir dos dados brutos do Windaq convertidos para Excel. Essa estratégia foi útil para obtenção da AUC (área sobre a curva). O eixo (y) do gráfico demonstra a força em (g) do íleo isolado, o eixo (x) é o tempo em (segundos) em segundos de experimento, cada segundo gera um dado de (g) força que foram agrupados. Valores com pontos com barra média SEM.

Afim de avaliar a influência do GER sem contração induzida por carbachol, não é observado efeito indutor da contração pelo geraniol, quando na ausência do carbachol, a cumulativa foi realizada no órgão isolado fig. 3.

Além disso, a ausência de efeito significativo nas preparações basais conforme demonstrado na figura 3 indica que o GER não induz relaxamento espontâneo do tecido sem a presença de um estímulo prévio, o que fortalece seu perfil farmacodinâmico seletivo e potencialmente seguro para uso terapêutico.

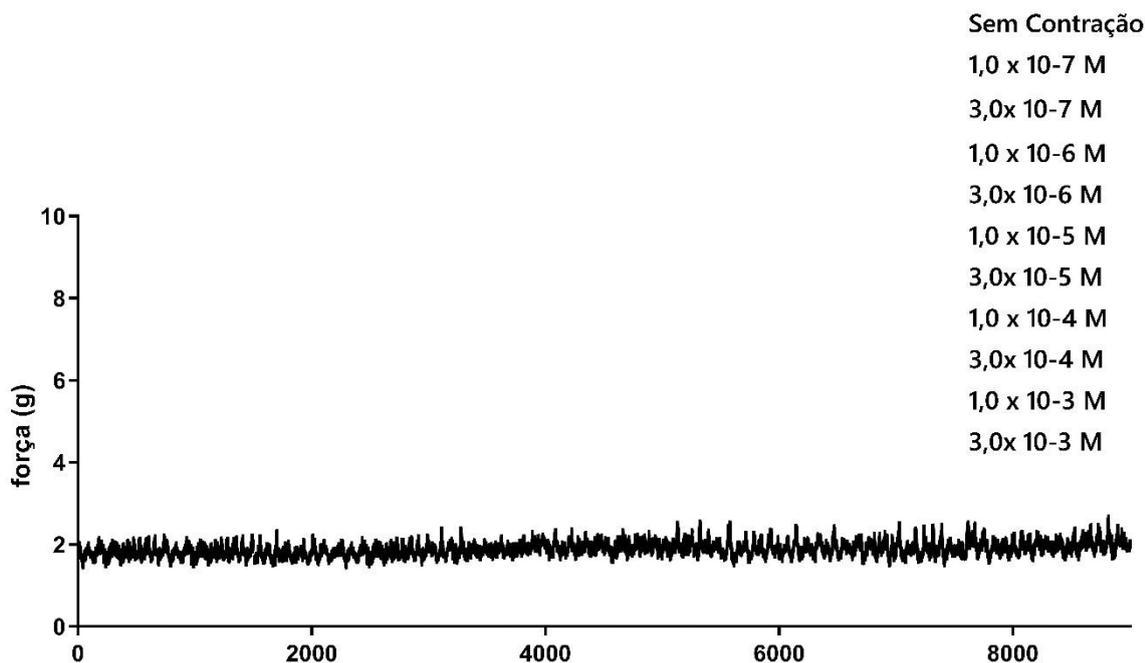


Figura 3. Registro original do efeito do geraniol (GER) sobre o íleo isolado de cobaia na ausência de qualquer agente indutor de contração. O gráfico representa a aplicação cumulativa de GER nas concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$ M até $3,0 \times 10^{-3}$ M, com intervalos de 5 minutos entre cada dose. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM), com $n = 5$. O eixo y representa a força de contração (g), enquanto o eixo x representa o tempo de experimento (s), sendo que a cada segundo foi registrado um ponto de força. Os dados foram obtidos por meio do software WinDaq, convertidos para Excel e analisados no GraphPad Prism. Os resultados demonstram que, na ausência de estímulo contrátil, o GER não induziu alterações significativas na contratilidade basal do íleo isolado, sugerindo que sua ação relaxante depende da presença prévia de contração induzida.

3.2 Avaliação do mecanismo de ação do geraniol em íleo isolado de cobaia

3.2.1 Avaliação da influência via adrenérgica e do AMPc no mecanismo de ação do GER em íleo isolado de cobaia.

Diferentes bloqueadores foram utilizados com a finalidade de verificar o possível mecanismo de ação do GER em músculo liso, do íleo isolado de cobaia. Na presença do antagonista β -adrenérgico não seletivo propranolol, houve um aumento de potência do GER de $pEC_{50} = 4,75$, $E_{max} = 40,23\%$ para $pEC_{50} = 6,78$ e $E_{max} = 54,81\%$. Houve diferença da AUC, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com test t quando comparado o GER na presença e ausência do propranolol. As concentrações de $3,0 \times 10^{-7}$ até $3,0 \times 10^{-3}$ M, como demonstrado na Figura 4.

De forma semelhante, na presença da fentolamina, antagonista α -adrenérgico não seletivo, também houve uma diminuição da AUC do geraniol, com um aumento de sua potência com pEC_{50}

= 6,19, e $E_{max} = 76,59\%$. Houve diferença da AUC, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com o teste t, como demonstrado na fig. 4 B.

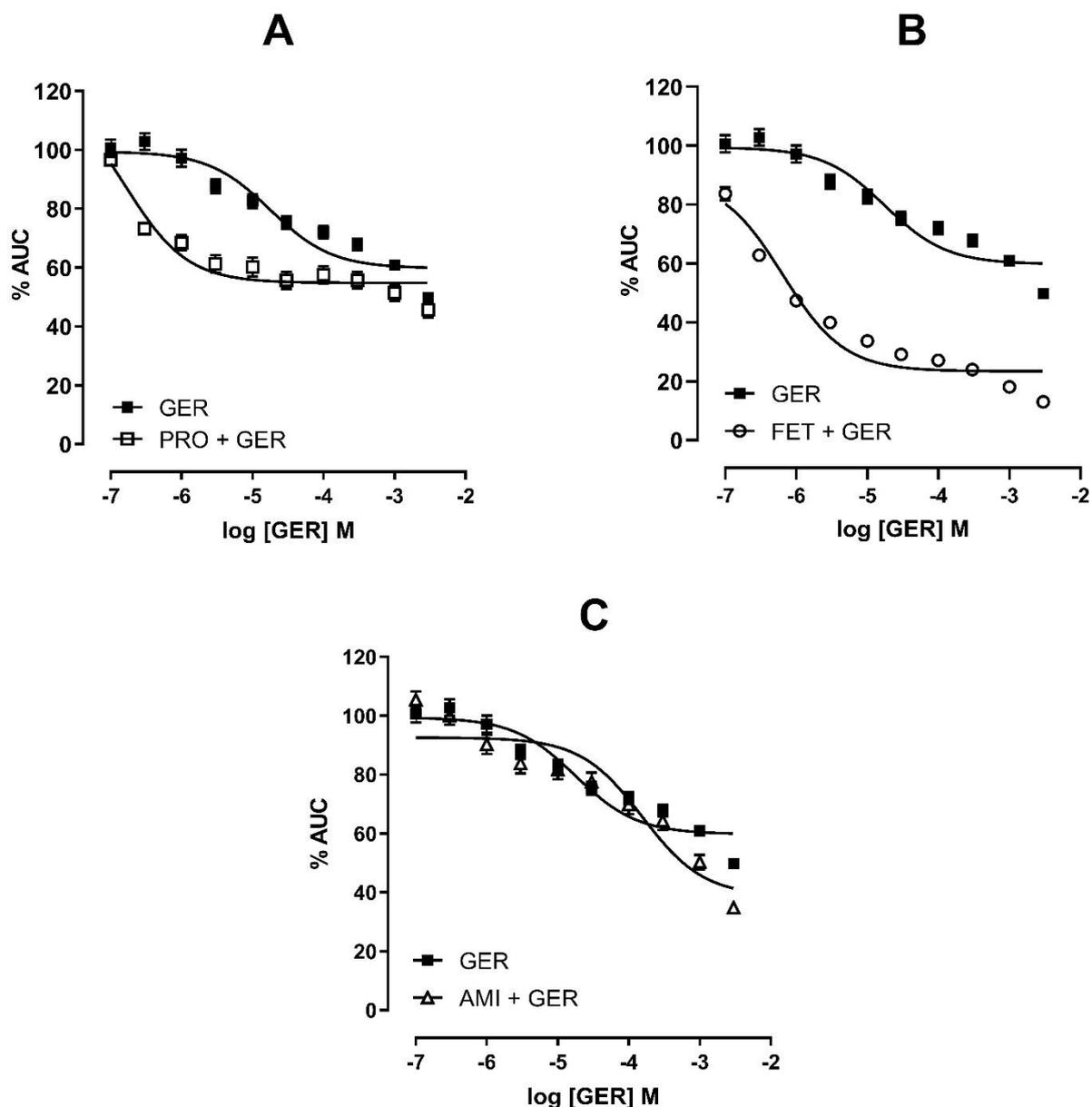


Figura 4 - Gráficos de regressão não-linear da área sobre a curva, da contração do íleo de cobaia pré-incubado 15 minutos antes da contração com CCh 1 μ M, cada grupo com (n=5), com (A) – propranolol 1 μ M (PRO), antagonista β -adrenérgico não seletivo. (B) – fentolamina 1 μ M (FET), antagonista α -adrenérgico não seletivo. (C) – aminofilina 100 μ M (AMI), inibidor não seletivo da fosfodiesterase. Com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ M a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores da regressão não linear expressos em Y em (%). Análise estatística realizada através de teste t de Student, com $p < 0,05$.

A contração do íleo isolado de cobaia com carbacol, na presença de aminofilina, inibidor não seletivo da fosfodiesterase e inibidor de influxo intracelular de cálcio, resultou em uma redução da potência GER de $pEC_{50} = 4,75$, $E_{max} = 40,23\%$ para $pEC_{50} = 3,81$ com e no entanto

aumentou seu $E_{max} = 53,89\%$.. Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa da AUC como demonstrado na figura 4 C.

3.2.2 Avaliação a influência via do óxido nítrico, GMPc e opioide no mecanismo de ação do GER em íleo isolado de cobaia.

Durante a contração do íleo isolado, na presença do L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, na figura 5 A, observou-se $pEC_{50} = 4,19$ e $E_{max} = 63,75\%$. Não houve diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$ com o teste t.

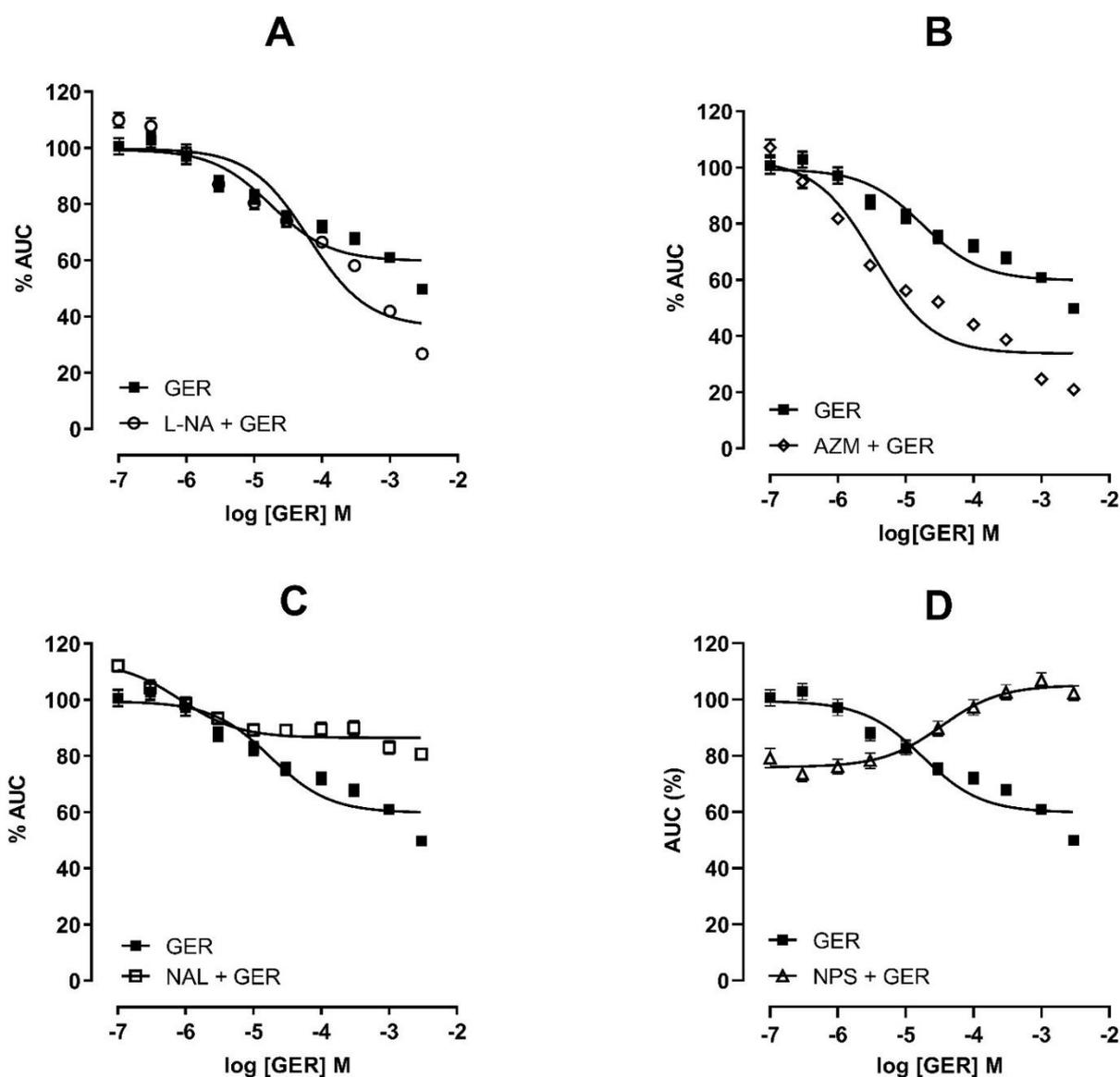


Figura 5 - Gráficos de regressão não-linear da área sobre a curva, da contração do íleo de cobaia pré-incubado 15 minutos antes da contração com CCh 1 μM, com (n=5) em cada grupo. (A) – L-name 1 μM (L-NA), inibidor da óxido nítrico sintase. (B) – Azul de Metileno 10 μM (AZM), inibição da guanilil ciclase e da NO sintase. (C) – naloxona 1 μM (NAL), antagonista de receptores opióides. (D) – nitroprussiato de Sódio 1 μM (NPS) doador de NO. Com a

adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores da regressão não linear expressos em Y em (%). Valores da regressão não linear expressos em Y em (%). Análise estatística realizada através de teste t de Student, com $p < 0,05$.

Na figura 5, observa-se que a inibição da guanilil ciclase pelo azul de metileno (figura 5 B) potencializa o efeito do monoterpeno. Na presença do azul de metileno, o GER teve um aumento de potência para $pEC_{50} = 5,46$ e $E_{max} = 66,27\%$, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com o teste t.

Tal como observado para naloxona figura 5 C um antagonista de receptores opioides, houve um bloqueio do efeito do monoterpeno GER, com $pEC_{50} = 6,07$ e uma diminuição do $E_{max} = 13,55\%$ com um bloqueio do efeito do GER nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ M até $3,0 \times 10^{-3}$ M com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com teste t quando GER é comparado na presença e ausência de naloxona e ANOVA one-way com pós teste de Dunnett quando observadas as concentrações.

Quando usado o nitroprussiato de sódio, figura 5 D, um doador de óxido nítrico, houve um aumento do relaxamento produzido pelo GER nas primeiras concentrações $1,0 \times 10^{-7}$ M, $3,0 \times 10^{-7}$ M, $1,0 \times 10^{-6}$ M e depois um bloqueio do relaxamento produzido pelo GER e um leve aumento do tônus muscular e contração do íleo isolado, com uma diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ com ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, nas concentrações de $3,0 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-5}$ M, $3,0 \times 10^{-5}$ M. Com de $pEC_{50} = 4,47$ e $E_{max} = -4,9\%$, ou seja a AUC chegou a 104,9% como demonstrado na fig. 5 D na presença do doador de NO. Apesar dos resultados encontrados, na comparação com teste t, na presença e ausência do NPS, não houve diferença estatisticamente significativa.

3.2.3 Avaliação da influência da via dos canais de potássio no mecanismo de ação do GER em íleo isolado de cobaia.

Os resultados demonstraram que o GER teve uma diminuição de sua potência na presença da glibenclamida figura 6 A. Onde houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de $1,0 \times 10^{-6}$ M até $3,0 \times 10^{-3}$ M, ($p < 0,05$) com ANOVA one-way com pós teste de Dunnett. Com o $pEC_{50} = 3,36$ no entanto aumentando o $E_{max} = 69,16\%$ na presença da glibenclamida, houve no teste t diferença estatisticamente significativa comparando as médias das AUC na presença e ausência da glibenclamida.

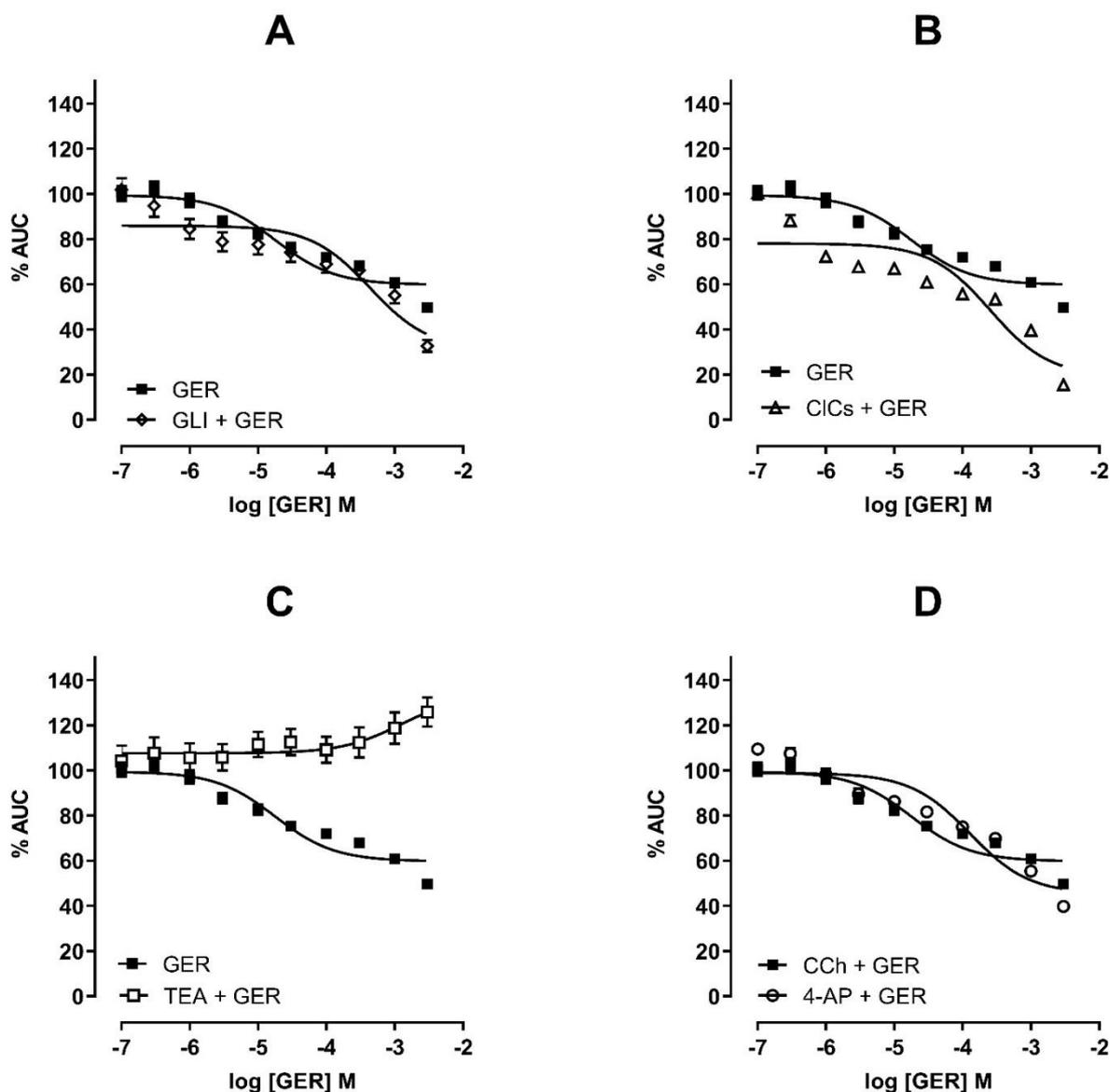


Figura 6. Gráficos de regressão não-linear da área sobre a curva, da contração do íleo de cobaia pré-incubado 15 minutos antes da contração com CCh 1 μ M, com (A) – glibenclamida 10 μ M (GLI) (bloqueador dos canais KATP). (B) – Cloreto de Césio 5mM (CsCl) (bloqueador dos canais para K não seletivo). (C) – tetraetilamônio 1 mM (TEA) (bloqueador dos canais Kv e KCa). (D) 4-aminopiridina 3 mM (bloqueador dos canais KV). Com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores da regressão não linear expressos em Y em (%). Análise estatística realizada através de test t de Student, com $p < 0,05$.

Como observado houve na presença do CsCl, figura 6 B, um deslocamento da curva para a esquerda, com diferença estatisticamente significativa nas concentrações de $3,0 \times 10^{-7}$ M até $3,0 \times 10^{-3}$ M, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com ANOVA one-way com pós teste de Dunnett. Com o $pEC_{50} = 3,59$ e aumento do $E_{max} = 78,05\%$ na presença do CsCl, resultados com diferença estatisticamente significativa no test t de Student $p < 0,05$.

Um resultado muito importante para o estudo, no íleo isolado de cobaia, o GER quando na presença do TEA (tetraetilamônio), figura 6 C, teve seu efeito bloqueado, com diferença estatisticamente significativa nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ M, $3,0 \times 10^{-5}$ M, $3,0 \times 10^{-4}$ M, $1,0 \times 10^{-3}$ M, $3,0 \times 10^{-3}$ M, $p < 0,05$ com ANOVA one-way com pós teste de Dunnett. Sendo o bloqueador que mais reduziu a potência do GER, expressiva diminuição de $pEC_{50} = 2,98$ e $E_{max} = -33,0\%$ ou seja a AUC chegando a 133,0% na presença do TEA, com diferença estatisticamente significativa, no test t de Student, quando comparadas as médias das AUC na presença e ausência de TEA.

Esse resultado evidencia uma possível interação entre os canais Kv ou Kca no mecanismo de ação do GER. O GER quando na presença da 4-AP fig. 6 D, com $pEC_{50} = 3,89$ e $E_{max} = 54,71\%$ na presença da 4-AP. No entanto não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as médias das AUC no teste t de Student.

3.2.4 Avaliação da influência da via dos receptores TRPV e canais de cálcio no mecanismo de ação do GER em íleo isolado de cobaia.

Tendo em vista os resultados obtidos, foi realizada uma investigação quanto a influência dos canais TRPV no mecanismo de ação do monoterpeno. O GER teve seu efeito bloqueado pela capsazepina figura 7 A, com diferença estatisticamente significativa em todas as concentrações de $1,0 \times 10^{-7}$ M até $3,0 \times 10^{-3}$ M, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com ANOVA one-way com pós teste de Dunnett. Com o $pEC_{50} = 4,98$ e redução seu $E_{max} = -17,30\%$ ou seja, na presença da capsazepina a AUC chegou a 117,30%, com uma inversão da curva, figura 7 A. Os resultados apresentação no test t de Student, diferenças estatisticamente significativas, $p < 0,05$ quando comparadas as médias das AUC, na presença e ausência da CPZ.

Observando os resultados da figura 7 B, fica demonstrado que o vermelho de rutênio potencializou o efeito do GER em todas as concentrações de forma estatisticamente significativa $p < 0,05$ com ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com aumento da potência do GER com $pEC_{50} = 5,55$ e aumento do $E_{max} = 56,06\%$ do GER, com diferença estatisticamente significativa, no test t de Student, quando comparadas as médias das AUC na presença e ausência de V-RUT.

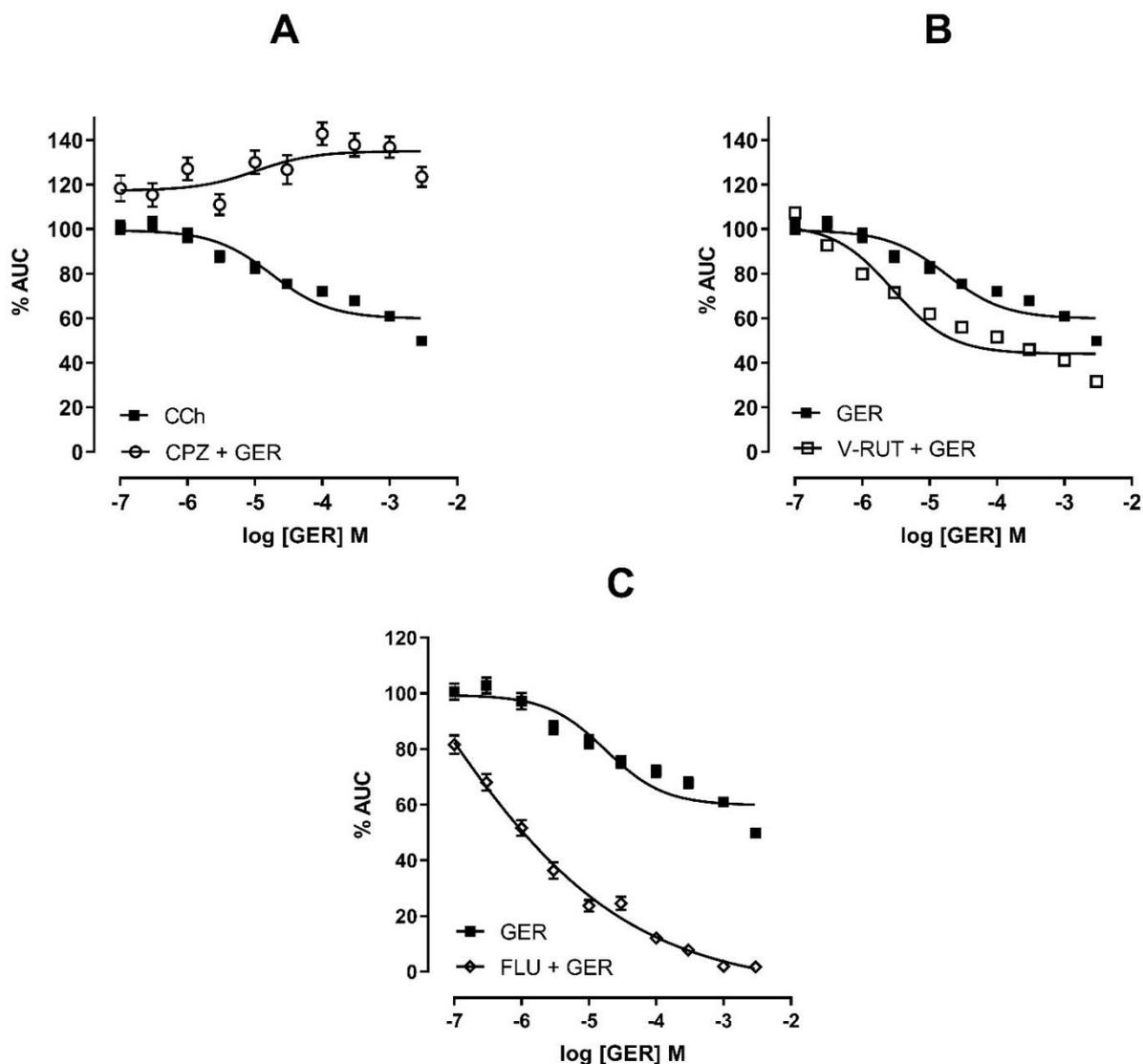


Figura 7. Gráficos de regressão não-linear da área sobre a curva, da contração do íleo de cobaia pré-incubado 15 minutos antes da contração com CCh 1 μ M, com (A) – capsazepina 10 μ M (CPZ) (inibidor não seletivo de TRPV1). (B) – Vermelho de Rutênio 10 μ M (V-RUT) (inibidor não seletivo para TRP). (C) – Ácido flufenâmico 1 μ M (FLU) (inibidor seletivo de canais para cálcio regulados por cloreto). Com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores da regressão não linear expressos em Y em (%). Análise estatística realizada através de teste t de Student, com ($p < 0,05$).

Já os resultados da figura 6 C, fica evidente que o ácido flufenâmico, potencializou o efeito do GER em todas as concentrações, de forma estatisticamente significativa $p < 0,05$ com ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com $pEC_{50} = 5,71$ e aumento de seu $E_{max} = 91,54$ %, deslocando a curva para a esquerda. Os resultados serão discutidos logo mais no estudo, mas fica evidente uma possível integração entre os canais Kca e TRPV, que foram bloqueados/antagonizados respectivamente pelo TEA e capsazepina, segundo a fig. 6 A e fig. 7 C, e representação resumida do experimento na fig. 8.

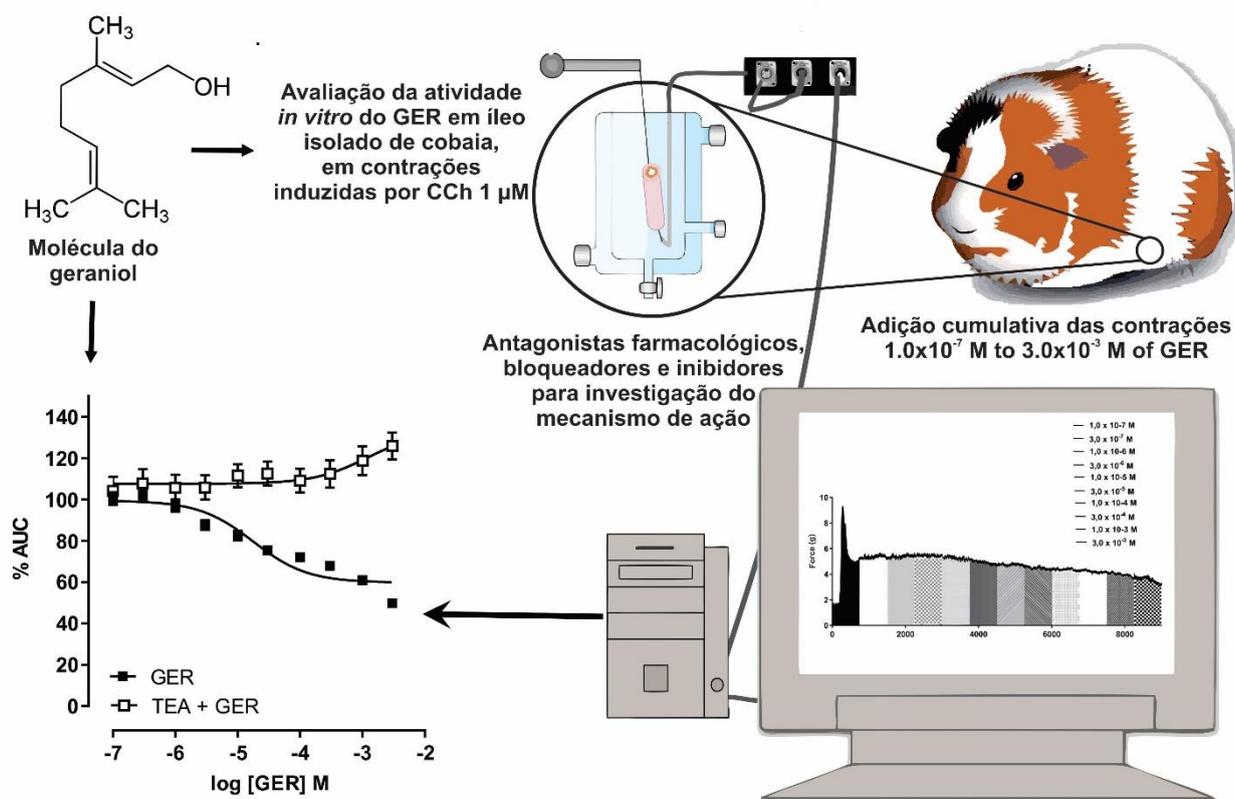


Figura 8 – Representação gráfica do experimento do modelo *in vitro*, utilizando íleo isolado de cobaia, com contrações induzidas por carbacol (1 μ M), e concentrações cumulativas de $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M de geraniol, seguida da investigação do mecanismo de ação com bloqueadores farmacológicos.

4. DISCUSSÃO

O geraniol apresentou atividade espasmolítica sobre o íleo isolado de cobaia, possivelmente mediada pela abertura de canais BKCa (Canais de potássio de grande condutância ativados por voltagem e por Ca^{2+} intracelular), ou aos receptores TRPV, conforme sugerem os resultados obtidos. O modelo experimental utilizando o íleo isolado de cobaia é amplamente utilizado para avaliar o efeito de substâncias farmacológicas sobre a reatividade do tecido à estimulação elétrica ou a agentes exógenos, como a acetilcolina, ou um mimético sintético como no caso o carbacol. Esse modelo permite investigar tanto a atuação das drogas sobre componentes neuronais quanto sobre elementos musculares, como demonstrado pelas respostas observadas na presença de carbacol, KCl ou histamina.

Dessa maneira, o uso do carbacol permite estudar ações em componentes neuronais e musculares, assim o carbacol, um agonista colinérgico, atua no músculo liso do íleo ao se ligar aos receptores muscarínicos do tipo M3 presentes na membrana das células musculares lisas. Esses

receptores estão acoplados a proteínas Gq, que, ao serem ativadas, estimulam a enzima fosfolipase C- β (PLC- β) (ENNIS, *et al.*, 2011, DONNERER, LIEBMANN, 2016, GAO, *et al.*, 2016).

A ativação dessa enzima resulta na hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), gerando dois segundos mensageiros: o inositol trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O IP₃ se difunde no citoplasma e se liga a receptores específicos no retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação de íons cálcio (Ca²⁺) para o interior da célula. O aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ permite que esses íons se liguem à proteína calmodulina, formando um complexo Ca²⁺-calmodulina. Esse complexo ativa a enzima quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), responsável por fosforilar a cadeia leve da miosina. A fosforilação da miosina permite sua interação com os filamentos de actina, desencadeando o mecanismo de deslizamento dos filamentos, o que resulta na contração do músculo liso (ENNIS, *et al.*, 2011, DONNERER, LIEBMANN, 2016, GAO, *et al.*, 2016).

Na influência da contração por KCl e dos canais Cav para a contração tônica e suas diferenças com carbacol para a contração do íleo, podemos observar experimentalmente suas distinções sendo justificado pois, o KCl é um espasmogênio tipicamente usado para analisar a atividade dos extratos vegetais ou monoterpenos com atividade espasmolítica e/ou seu mecanismo de ação. Tendo a alta concentração de K⁺ pela dissociação através do KCl, atua impedido a saída de K⁺ para que ocorra o processo de repolarização, já que o K⁺ se encontra em maior quantidade no meio intracelular não havendo sua saída, contra seu gradiente de concentração, mantendo a célula despolarizada, e o tônus da contração muscular, assim impedindo a investigação de canais para K⁺ que estejam relacionados ao mecanismo de ação (GUO, *et al.* 2017).

Avaliando os diferentes resultados obtidos na investigação do mecanismo de ação, conforme as figuras 3 A e B, um aumento da potência pEC₅₀ e E_{max} do GER na presença do propranolol e fentolamina, enquanto que a aminofilina (figura 4 C) não alterou significativamente de forma estatística o efeito do GER. A presença de propranolol, figura 4 A, um antagonista β -adrenérgico, pode potencializar o efeito relaxante de monoterpenos como o timol e óleos essenciais de plantas como a *Xylopiya frutescens* no íleo da cobaia. O propranolol evita a despolarização tônica de receptores beta acoplados à Gs, relacionado ao fechamento dos canais BKCa, ou que poderia interferir no efeito de canais iônicos sensíveis ao timol que por sua vez induz um relaxamento devido a hiperpolarização celular (BOYER, *et al.*, 2017, ENNIS, *et al.*, 2011, SOUZA, *et al.*, 2015).

Os canais BKca são fosforilados por PKA e fechados, assim resultando em despolarização. Dessa forma, na medida em que os receptores acoplados a Gs são antagonizados pelo propranolol, ocorre a diminuição de AMPc, diminuição de PKA e assim mantendo os canais BKca abertos, resultando em hiperpolarização e no relaxamento observado, caso o geraniol tenha efeito possível nos canais BKca levando a esse aumento da potência e Emax observado do geraniol na presença do propranolol pode ser justificada, tal como o aumento do Emax na presença da aminofilina, na medida que a redução do AMPc celular, PKA e menor fosforilização da BKca mantendo o canal aberto (BOYER, *et al.*, 2017, ENNIS, *et al.*, 2011, SOUZA, *et al.*, 2015, ZHANG, *et al.*, 2021, ZHOU, *et al.* 2010).

Conforme observado na figura 4 B, nos resultados houve um aumento da potência do geraniol na presença da fentolamina, que é um antagonista não-seletivo dos receptores alfa adrenérgicos α_1 e α_2 . A estimulação dos receptores α_1 levam à ativação da fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 causa a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) (COSTA, *et al.*, 2017, DONNERER e LIEBMANN, 2018). Dessa maneira, a presença da fentolamina levou ao relaxamento via o antagonismo dos receptores α_1 , enquanto que o GER possivelmente pode está influenciando de forma sinérgica outra via o que levou a potencialização de seu efeito. De toda forma, assim descartando assim a via adrenérgica no envolvimento direto com o mecanismo de ação do geraniol.

Tanto a aminofilina, L-NAME, nitroprussiato de sódio e 4-AP, não apresentaram diferenças significativas nas suas médias da AUC, com o test t de Student, quando comparado o GER na presença desses bloqueadores farmacológicos e o monoterpeno na sua ausência. Dessa maneira não existe influência dessas vias no mecanismo de ação do GER.

O aumento do Emax do geraniol na presença de L-NAME pode ser atribuído possivelmente ao bloqueio da via do óxido nítrico, o que resulta em um aumento do tônus basal do músculo liso do íleo. Essa elevação do tônus favorece a observação de um efeito relaxante mais pronunciado do geraniol, uma vez que há maior margem para a ação do monoterpeno pois, na ausência do NO, pode-se induzir a ativação de vias compensatórias de relaxamento, contribuindo para a intensificação da resposta farmacológica e, conseqüentemente, para o aumento do efeito máximo observado (ABDELWAHAB, *et al.*, 2019).

Apesar de o L-NAME, ter aumentado o Emax do geraniol, não houve diferença estatisticamente significativa no test *t* de Student, assim não havendo como sugerir que a via

NO/GMPc exerce papel inibitório sobre seu efeito relaxante do GER, por sua vez o nitroprussiato de sódio, doador de NO, reduziu o Emax. Como é observado na fig. 5 D que também outros doadores de NO como o sal de Angeli, induziu um aumento significativo na concentração de Ca^{2+} citosólico o que resulta no aumento da contração do íleo (ABDELWAHAB, et al., 2019, GALLEGO, et al., 2014, GASTREICH-SEELIG, et al., 2020, GRONEBERG, et al., 2016; NAKANISHI, et al., 2006, POUOKAM, 2022, QU, et al., 2016, RYOO, et al., 2015, SANDERS e WARD, 2019, SCHUCHT, et al., 2023)

Na presença do azul de metileno houve um aumento da potência do geraniol, fig. 5, assim o bloqueio da produção do GMPc favorece o efeito do geraniol, possivelmente pelo aumento do tônus de contração muscular pela ausência de GMPc, ou sugerindo que geraniol atua por uma via independente ou competitiva com GMPc ou PKG, ressaltando um possível efeito do geraniol via BKca uma vez que esse canal é ativado por PKG (ZHOU, et al. 2010).

O azul de metileno exibe um mecanismo de ação multifacetado no íleo isolado da cobaia, influenciando principalmente na atividade neuronal. Isso se deve principalmente à supressão da condutância de potássio dependente do cálcio via BKca, resultando na liberação de neurotransmissores, aumentando a saída de noradrenalina, impactando a sinalização adrenérgica no intestino (CHINO et al., 2018, DUANGJAI, et al., 2021, PATON e VIZI, 1969, SOARES e CARAMONA, 1989), o que resulta na ativação dos receptores β -adrenérgicos, ativação da proteína Gs e consequentemente um aumento de AMPc que resulta no relaxamento do músculo liso. Caso o geraniol promova provável abertura de BKca, a supressão provocada pelo azul de metileno não ocorreu, pela ação do monoterpene diretamente nos canais mantendo-os abertos, observando assim somente um efeito de sinergismo pela ativação dos receptores β -adrenérgicos e aumento de AMPc, resultando em relaxamento, somado a diminuição de PKG que seria possivelmente competitivo pelo BKca com o geraniol (NANTAIS; et al., 2014; MENDES; et al., 2015; YANG, et al., 2023).

A naloxona, antagonista opioide, bloqueou o efeito do geraniol com significância estatística, com uma diminuição do Emax para apenas 13,55%, diminuindo a potência do geraniol, implicando diretamente a participação da via opioide endógena, possivelmente resultando na liberação de peptídeos opioides endógenos, como encefalinas (GALLIGAN e STERNINI, 2016). Os antagonistas opioides podem induzir a contração da musculatura lisa do íleo através da inativação de receptores opioides. Essa inibição pode ser mediada, em parte, pela diminuição de NO. A diminuição do NO também pode influenciar a liberação desses neurotransmissores, como a acetilcolina no íleo isolado de cobaia. A naloxona, ao antagonizar os receptores opioides, afeta

a liberação neurotransmissores, como a acetilcolina, tanto direta quanto indiretamente, através dessa modulação da produção de NO (KILBINGER, et al., 2002) ZHANG, et al., 2022).

A naloxona mantém a contração muscular. O mecanismo de ação da naloxona envolve principalmente seu papel como antagonista competitivo no receptor μ -opioide. O receptor μ -opioide, se acopla predominantemente às proteínas G_i , inibindo a adenilato ciclase e reduzindo os níveis de cAMP, o que leva à diminuição da liberação de neurotransmissores, além disso o receptor μ -opioide também influencia os canais iônicos, inibindo especificamente os canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem e ativando os canais de K^+ , dessa forma o antagonismo promovido pela naloxona leva ao aumento do Ca^{+2} e inativação dos canais de K^+ , salientando novamente a importância dos canais de K^+ para a ação do GER pelo efeito indireto da naloxona (MONDAL. et al., 2020, GALLIGAN e STERNINI, 2016, KANG, et al., 2012, (O'BRIEN, et al., 2024, SADEE, et al., 2022, ZHANG, et al., 2022).

A possível atuação do geraniol sobre canais de potássio foi investigada utilizando diferentes bloqueadores seletivos, permitindo inferências relevantes sobre os mecanismos espasmolíticos envolvidos. A 4-aminopiridina, bloqueador de canais de K^+ voltagem-dependentes (K_v), exerce seus efeitos ao prolongar o potencial de ação e aumentar a liberação de neurotransmissores excitatórios, como a acetilcolina. Apesar de sua aplicação ter provocado alterações discretas no perfil de resposta ao geraniol, a ausência de significância estatística indica que os canais K_v não são essenciais para a ação do composto, embora possam exercer um papel acessório (CURRÒ, 2016; GOLDFEDER *et al.*, 2022; DIETRICH *et al.*, 2021; RODRÍGUEZ-RANGEL *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Já a glibenclamida, um bloqueador de canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), provocou alteração mais perceptível nos parâmetros farmacodinâmicos, o que sugere que essa subclasse de canais participa da fase inicial do relaxamento promovido pelo geraniol. Contudo, a resposta incompleta ao bloqueio com glibenclamida indica que vias compensatórias, como os canais de potássio ativados por cálcio (BKCa), podem ser recrutadas em paralelo (GUO, *et al.*, 2017; PENFOLD, *et al.*, 2021; VASCONCELOS, *et al.*, 2015).

O bloqueio dos canais K_{ir} com cloreto de céσιο também resultou em aumento da resposta máxima, ainda que com redução de potência. Isso sugere que a inibição desses canais, ao remover um mecanismo basal de repolarização, favorece a amplificação do relaxamento mediado por outras vias ativas, como os BKCa. A relação entre canais K_{ir} , despolarização leve e subsequente ativação de canais de cálcio tipo L é compatível com o modelo de ativação indireta dos BKCa, que

respondem ao aumento transitório de Ca^{2+} intracelular. Nesse cenário, o geraniol possivelmente atua como modulador positivo dos BKCa, ampliando a corrente de saída de K^+ , promovendo hiperpolarização e intensificando o relaxamento (PLANTE, *et al.*, 2021).

O bloqueio promovido pelo tetraetilamônio (TEA) apresentou o perfil de inevidências mais robusto entre os bloqueadores testados, sendo o único capaz de reverter o efeito relaxante do geraniol. O TEA inibe diretamente canais de K^+ regulados por cálcio, como os BKCa, impedindo a saída de K^+ e, conseqüentemente, a hiperpolarização celular. Isso interrompe um dos mecanismos fundamentais para o relaxamento do músculo liso, sustentando a hipótese de que o geraniol exerce sua ação majoritariamente via ativação de BKCa (TAN, *et al.*, 2012). Esse tipo de atuação está de acordo com descrições anteriores que apontam a localização estratégica desses canais nas regiões de liberação de "faíscas" de cálcio no retículo sarcoplasmático (KOSLOV e ANDERSSON, 2013; SHIH, *et al.*, 2016).

Essa dinâmica entre cálcio e canais BKCa é essencial: um influxo localizado de Ca^{2+} pode ativar esses canais, gerando correntes hiperpolarizantes que limitam a ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes, diminuindo a contratilidade. O geraniol, ao facilitar esse processo, pode estar agindo como agonista funcional dos BKCa, justificando os efeitos observados em presença e ausência do TEA (TAN, *et al.*, 2012; SHIH, *et al.*, 2016; KOSLOV e ANDERSSON, 2013).

Além dos canais de potássio, os dados sugerem um papel relevante dos receptores TRPV1 na ação do geraniol. A capsazepina, antagonista seletivo desses receptores, promoveu uma redução da resposta espasmolítica, indicando possível participação do TRPV1 como alvo adicional do monoterpeno. Embora tradicionalmente associado à sinalização sensorial e nociceptiva, o TRPV1 também está presente em terminais nervosos entéricos e células musculares lisas, podendo influenciar a motilidade intestinal. A ativação desses receptores leva ao influxo de Ca^{2+} , o qual pode, por sua vez, ativar canais BKCa, gerando hiperpolarização e relaxamento muscular (CAO, *et al.*, 2013; CHEN, *et al.*, 2004; ISAEV, *et al.*, 2022; WAN, *et al.*, 2022; YANG, *et al.*, 2014).

Essa possível interação entre TRPV1 e BKCa sustenta um modelo de ação integrada, no qual o geraniol promoveria um influxo inicial de Ca^{2+} via TRPV1, seguido pela ativação dos BKCa, resultando em relaxamento do íleo. Essa hipótese ganha força quando se considera que outros monoterpenos estruturalmente relacionados ao geraniol, como o linalol e o próprio propofol, também interagem com canais da família TRP, incluindo TRPV3 (BEHRENDT, *et al.*, 2004; VOGT-EISELE, *et al.*, 2007; YE, *et al.*, 2019; ZHANG, *et al.*, 2019; LAVIGNE, *et al.*, 2021).

O uso de vermelho de rutênio, bloqueador inespecífico de canais TRP, corroborou esses achados ao potencializar o efeito do geraniol. Ao reduzir o influxo de Ca^{2+} , o vermelho de rutênio contribuiu para a hiperpolarização ao impedir a ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes, favorecendo a ação do geraniol via BKCa. Esse sinergismo sugere uma sobreposição de mecanismos que convergem para a redução da excitabilidade celular e do tônus muscular liso (HOLZER, 2004; JARA-OSEGUERA, 2024).

Portanto, os dados apresentados indicam que o geraniol atua possivelmente de forma predominantemente por meio da ativação dos canais BKCa, provavelmente em cooperação com os receptores TRPV1, compondo um eixo funcional de modulação da excitabilidade no íleo isolado. A multiplicidade de vias acessadas por esse monoterpene reforça seu potencial farmacológico e aponta para mecanismos análogos observados com outros compostos naturais de estrutura semelhante.

5. CONCLUSÃO

Os resultados da verificação do comportamento do íleo isolado de cobaia revelaram que o geraniol possui efeito espasmolítico nas contrações induzidas por carbacol e seu mecanismo de ação está relacionado possivelmente a abertura de canais de BKCa. Uma possível ampliação do estudo consiste em explorar comparativamente o geraniol frente a outros monoterpenos, destacando seu potencial diferenciado como modulador espasmolítico, dada sua aparente capacidade singular de atuar sobre múltiplas vias, especialmente BKCa e TRPV1, o que o posiciona como um candidato promissor para o desenvolvimento de fitofármacos direcionados ao trato gastrointestinal. No entanto, outros estudos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese, assim como a execução de protocolos como *patch clamp* ou modelos de *docking molecular*.

REFERÊNCIAS

1. ABDELWAHAB, Muhanad S., et al. Basic Pharmacology of NG -Nitro – L – Arginine Methyl Ester. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, vol. 19, no. 3, Jan. 2019, pp. 1–5, <https://doi.org/10.9734/JAMPS/2018/46307>.
2. AHERN, Gerard P., et al. Extracellular Cations Sensitize and Gate Capsaicin Receptor TRPV1 Modulating Pain Signaling. *The Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 21, May 2005, pp. 5109–16, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0237-05.2005>.
3. AMMAR, Rebai Ben. Potential Effects of Geraniol on Cancer and Inflammation-Related Diseases: A Review of the Recent Research Findings. *Molecules*, vol. 28, no. 9, Apr. 2023, p. 3669, <https://doi.org/10.3390/molecules28093669>.
4. ASANO, Teita, et al. “Aminophylline Suppresses Stress-Induced Visceral Hypersensitivity and Defecation in Irritable Bowel Syndrome.” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Jan. 2017, p. 40214, <https://doi.org/10.1038/SREP40214>.
5. BEHRENDT, H-J et al. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *British journal of pharmacology* vol. 141,4, 2004: 737-45. <https://doi:10.1038/sj.bjp.0705652>
6. BENCSIK, T.; SANDOR, Z.; BARTHO, L. High-Concentration Piperine: Capsaicin-Sensitive and -Insensitive Effects on Isolated Organs. *Pharmacology*, 96(1-2), 86–89, 2015. <https://doi.org/10.1159/000436976>
7. BOYER, Nelly, et al. Propranolol Treatment Prevents Chronic Central Sensitization Induced by Repeated Dural Stimulation. *Pain*, vol. 158, no. 10, Oct. 2017, pp. 2025–34, <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001007>.
8. CAO, E.; LIAO, M.; CHENG, Y.; JULIUS, D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, 504(7478), 113–118, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12823>
9. CHEN, Mao Xiang et al. Small and intermediate conductance Ca⁽²⁺⁾-activated K⁺ channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* vol. 369,6 (2004): 602-15. <https://doi:10.1007/s00210-004-0934-5>
10. CHINO, Daisuke, et al. Pharmacological Identification of β -Adrenoceptor Subtypes Mediating Isoprenaline-Induced Relaxation of Guinea Pig Colonic Longitudinal Smooth Muscle. *Journal of Smooth Muscle Research. Japanese Section*, vol. 54, Jan. 2018, pp. 13–27, <https://doi.org/10.1540/JSMR.54.13>.
11. CHO, Minsoo, et al. The Antitumor Effects of Geraniol: Modulation of Cancer Hallmark Pathways (Review). *International Journal of Oncology*, vol. 48, no. 5, May 2016, pp. 1772–82, <https://doi.org/10.3892/IJO.2016.3427>.
12. COSTA, Marcello, et al. New Insights into Neurogenic Cyclic Motor Activity in the Isolated Guinea-Pig Colon. *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 29, no. 10, Apr. 2017, pp. 1–13, <https://doi.org/10.1111/NMO.13092>.

13. CURRÒ, Diego. The Modulation of Potassium Channels in the Smooth Muscle as a Therapeutic Strategy for Disorders of the Gastrointestinal Tract. *Adv Protein Chem Struct Biol*, vol. 104, 2016, pp. 263–305, <https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2015.12.002>.
14. DONNERER, Josef, and Ingrid LIEBMANN. Effect of CB1 Ligands on Neurogenic and Myogenic Contractile Responses in the Guinea-Pig Ileum. *Pharmacology*, vol. 101, Jan. 2018, pp. 330–36, <https://doi.org/10.1159/000488682>.
15. DONNERER, Josef, and Ingrid LIEBMANN. Interaction of $\alpha\beta$ -Methylene ATP with the Cholinergic Twitch Response in the Guinea-Pig Ileum. *Pharmacology* vol. 97,5-6 (2016): 277-81. <https://doi.org/10.1159/000444504>
16. DIETRICH, Michael, et al. Neuroprotective Properties of 4-Aminopyridine. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, vol. 8, no. 3, Mar. 2021, <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000976>.
17. DU, Qian, et al. The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Common Diseases of the Digestive Tract and the Cardiovascular and Respiratory System. *Frontiers in Physiology*, vol. 10, Aug. 2019, p. 1064, <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.01064>.
18. DUANGJAI, Acharaporn et al. Antispasmodic Effect of Asperidine B, a Pyrrolidine Derivative, through Inhibition of L-Type Ca^{2+} Channel in Rat Ileal Smooth Muscle. *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 26,18 5492. 9 Sep. 2021, <https://doi.org/10.3390/molecules26185492>
19. ENNIS, Christine, et al. “Characterization of Receptors on Postganglionic Cholinergic Neurons in the Guinea-Pig Isolated Ileum.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 31, no. 4, Apr. 2011, pp. 217–21, <https://doi.org/10.1111/J.2042-7158.1979.TB13482.X>.
20. EL ALLAOU, H. et al. Trends and Insights in Medicinal Plant Extract Research: A Ten-Year Bibliometric and Visualization Study. *Horticulturae*, v. 10, p. 1163, 2024. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10111163>.
21. GAO, Ning, et al. Physiological Signalling to Myosin Phosphatase Targeting Subunit-1 Phosphorylation in Ileal Smooth Muscle. *The Journal of Physiology*, vol. 594, no. 12, June 2016, pp. 3209–25, <https://doi.org/10.1113/JP271703>.
22. GALLEGO, D. et al. Nitregic and purinergic mechanisms evoke inhibitory neuromuscular transmission in the human small intestine. *Neurogastroenterology and motility*, 26(3), 419–429, 2014. <https://doi.org/10.1111/nmo.12293>
23. GALLIGAN, James J., and Catia Sternini. *Insights into the Role of Opioid Receptors in the GI Tract: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance*. Springer, Cham, 2016, pp. 363–78, https://doi.org/10.1007/164_2016_116.
24. GASTREICH-SEELIG, Mirko, et al. Mechanisms Associated to Nitroxyl (HNO)-Induced Relaxation in the Intestinal Smooth Muscle. *Frontiers in Physiology*, vol. 11, June 2020, p. 438, <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00438>.
25. GILANNI, A. H. et al. Presence of antispasmodic, antidiarrheal, antisecretory, calcium antagonist and acetylcholinesterase inhibitory steroidal alkaloids in *Sarcococca saligna*. *Planta Medica*, v. 71, p. 120-125, 2005.

26. GOLDFEDER, Nicole et al. Functions of potassium channels blocked by low micromolar 4-aminopyridine in the crayfish nervous system. *Synapse (New York, N.Y.)* vol. 76,7-8, 2022: e22234. <https://doi.org/10.1002/syn.22234>
27. GRONEBERG, Dieter, et al. Integrative Control of Gastrointestinal Motility by Nitric Oxide. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 23, no. 24, June 2016, pp. 2715–35, <https://doi.org/10.2174/0929867323666160812150907>.
28. GUO, Shuai, et al. “Ginsenoside Rb1, a Novel Activator of the TMEM16A Chloride Channel, Augments the Contraction of Guinea Pig Ileum.” *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, vol. 469, no. 5, Jan. 2017, pp. 681–92, <https://doi.org/10.1007/S00424-017-1934-X>.
29. GUO, Wei, et al. Geraniol-a Potential Alternative to Antibiotics for Bovine Mastitis Treatment without Disturbing the Host Microbial Community or Causing Drug Residues and Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 13, Feb. 2023, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1126409>.
30. HOLZER, Peter. Vanilloid Receptor TRPV1: Hot on the Tongue and Inflaming the Colon. *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 16, no. 6, Dec. 2004, pp. 697–99, <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2004.00598.X>.
31. HORINOUCHI, T, and K Koike. “Functional identification of beta3-adrenoceptors in the guinea-pig ileum using the non-selective beta-adrenoceptor antagonist (+/-)-bupranolol.” *Journal of autonomic pharmacology* vol. 20,4 2000: 253-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2680.2000.00188.x>
32. HOTTA, Aya, et al. The Effects of Flufenamic Acid on Spontaneous Activity of Smooth Muscle Tissue Isolated from the Guinea-Pig Stomach Antrum. *Journal of Smooth Muscle Research*, vol. 41, no. 4, Aug. 2005, pp. 207–20, <https://doi.org/10.1540/JSMR.41.207>.
33. ISAEV, D. et al. Capsaicin Inhibits Multiple Voltage-Gated Ion Channels in Rabbit Ventricular Cardiomyocytes in TRPV1-Independent Manner. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1187, 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15101187>
34. IZZO, A. A. et al. Antidiarrhoeal activity of Terminalia sericea Burch ex. DC extracts. In: *Natural drugs and the digestive tract*. EMSI, p. 223-30, 1992.
35. JARA-OSEGUERA, Andres. Ruthenium Red: Blocker or Antagonist of TRPV Channels? *Cell Calcium*, vol. 119, Mar. 2024, p. 102874, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2024.102874>.
36. KANG, Minho et al. The role of β -arrestin2 in the mechanism of morphine tolerance in the mouse and guinea pig gastrointestinal tract. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* vol. 340,3 (2012): 567-76. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.186320>
37. KARIM, Ahmed et al. Effect of essential oil of Anthemis mauritiana Maire & Sennen flowers on intestinal smooth muscle contractility. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi* vol. 46,1 2010: 65-75. <https://doi.org/10.1540/jsmr.46.65>
38. KHIN, Phyu Phyu et al. Signal Transduction Underlying the Inhibitory Mechanism of Fluoxetine on Electrical Field Stimulation Response in Rat Ileal Smooth Muscle. *Pharmacology* vol. 99,5-6, 2017: 216-225. <https://doi.org/10.1159/000449528>

39. KILBINGER, Heinz, et al. Nitrergic Modulation of Acetylcholine Release in the Enteric Nervous System: Differences between Guinea-Pig and Man. *Inflammopharmacology*, vol. 10, no. 4, Dec. 2002, pp. 461–69, <https://doi.org/10.1163/156856002321544927>.
40. KISTNER, Katrin, et al. Systemic Desensitization through TRPA1 Channels by Capsazepine and Mustard Oil - a Novel Strategy against Inflammation and Pain. *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, June 2016, p. 28621, <https://doi.org/10.1038/SREP28621>.
41. KOSLOV, David S, and Karl-Erik ANDERSSON. Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens-an update. *Frontiers in pharmacology* vol. 4 101. 22 Aug. 2013, <https://doi:10.3389/fphar.2013.00101>
42. LAVIGNE, Justin E et al. Cannabis sativa terpenes are cannabimimetic and selectively enhance cannabinoid activity. *Scientific reports* vol. 11,1 8232. 15 Apr. 2021, <https://doi:10.1038/s41598-021-87740-8>
43. LÁZÁR, Zs et al. Actions of endothelin and corticotropin releasing factor in the guinea-pig ileum: no evidence for an interaction with capsaicin-sensitive neurons. *Neuropeptides* vol. 37,4, 2003: 220-32. [https://doi:10.1016/s0143-4179\(03\)00048-9](https://doi:10.1016/s0143-4179(03)00048-9)
44. LEI, Y. et al. Pharmacological Properties of Geraniol - A Review. *Planta medica*, 85(1), 48–55, 2019. <https://doi.org/10.1055/a-0750-6907>
45. LIANG, Qi, et al. Targeting TRPV1 and TRPA1: A Feasible Strategy for Natural Herbal Medicines to Combat Postoperative Ileus. *Pharmacological Research*, Oct. 2023, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106923>.
46. LIU, Julia Y H et al. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in the modulation of pacemaker potentials in the mouse ileum. *Cell calcium*, vol. 97 102417. 30 Apr. 2021, <https://doi:10.1016/j.ceca.2021.102417>
47. LIU, Yang, et al. Mechanistic Insight of the Potential of Geraniol against Alzheimer’s Disease. *European Journal of Medical Research*, vol. 27, no. 1, June 2022, <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00699-8>.
48. MAĆZKA, W.; WIŃSKA, K.; GRABARCZYK, M. One Hundred Faces of Geraniol. *Molecules*, 25(14), 3303, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25143303>
49. MAMATTAH, K. M. et al. Chemical Characterization, Antioxidant, Antimicrobial, and Antibiofilm Activities of Essential Oils of *Plumeria alba*. *Biochemistry research international*, 2023, 1040478. <https://doi.org/10.1155/2023/1040478>
50. MEDICHERLA, K. et al. Oral administration of geraniol ameliorates acute experimental murine colitis. *Food & function*, 6(9), 2984–2995, 2015. <https://doi.org/10.1039/c5fo00405e>
51. MENDES, C. E. et al. The Effect of Ischemia and Reperfusion on Enteric Glial Cells and Contractile Activity in the Ileum. *Digestive diseases and sciences*, 60(9), 2677–2689, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3663-3>
52. MELNYK, Mariia, et al. Inhibitory Action of the General Anesthetic Ketamine on Intracellular Calcium Transients and Smooth Muscle Contractions of the Mouse Small Intestine. *Fiziologicheskii Zhurnal*, vol. 69, no. 1, Feb. 2023, pp. 25–34, <https://doi.org/10.15407/fz69.01.025>.

53. MIRAJ, S. et al. Melissa officinalis L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(3), 385–394, 2017. <https://doi.org/10.1177/2156587216663433>
54. MONDAL, Dibyendu, et al. Exploring the Activation Pathway and Gi-Coupling Specificity of the μ -Opioid Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 117, no. 42, Oct. 2020, pp. 26218–25, <https://doi.org/10.1073/PNAS.2013364117>.
55. NAKANISHI, Hironori et al. Nitric oxide modulates biphasic contractile response of guinea pig vas deferens to electrical field stimulation. *Fukushima journal of medical science* vol. 52,2, 2006: 45-57. <https://doi:10.5387/fms.52.45>
56. NANTAIS, J. et al. Impact of methylene blue in addition to norepinephrine on the intestinal microcirculation. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 58(1), 97–105, 2014. <https://doi.org/10.3233/CH-141874>
57. O'BRIEN, Evan S., et al. Negative Allosteric Modulation of the M-Opioid Receptor. *Biophysical Journal*, vol. 123, no. 3, Feb. 2024, p. 353a, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.11.2140>.
58. OKWASABA, F.K., Hamilton, J.T., Cook, M.A. Antagonism by methylxanthines of purine nucleotide-and dipyridamole-induced inhibition of peristaltic activity of the guinea pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 43, 181–194, 1977. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(77\)90130-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(77)90130-3)
59. PATON, W D, e E S VIZI. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *British journal of pharmacology* vol. 35,1, 1969 10-28. <https://doi:10.1111/j.1476-5381.1969.tb07964.x>
60. PLANTE, Amber E., et al. BK Channel Activation by L-Type Ca²⁺ Channels CaV1.2 and CaV1.3 during the Subthreshold Phase of an Action Potential. *Journal of Neurophysiology*, vol. 126, no. 2, June 2021, pp. 427–39, <https://doi.org/10.1152/JN.00089.2021>.
61. PENFOLD, James A., et al. Relationships between Serum Electrolyte Concentrations and Ileus: A Joint Clinical and Mathematical Modeling Study. *Physiological Reports*, vol. 9, no. 3, Feb. 2021, <https://doi.org/10.14814/PHY2.14735>.
62. POUOKAM, Ervice. Effects of the Gaseous Signalling Molecule Nitroxyl (HNO) on Myenteric Neurons Governing Intestinal Motility. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, vol. 0, no. 0, Dec. 2022, <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2022-0233>.
63. QU, M. H. et al. Neurophysiological mechanisms of bradykinin-evoked mucosal chloride secretion. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 7(1), 150–159, 2016. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v7.i1.150>
64. RODRÍGUEZ-RANGEL, Sofia, et al. Structure-Activity Relationship Studies of Four Novel 4-Aminopyridine K⁺ Channel Blockers. *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, Jan. 2020, p. 52, <https://doi.org/10.1038/S41598-019-56245-W>.
65. RYOO, S. B. et al. Electrophysiological and Mechanical Characteristics in Human Ileal Motility. *Korean journal of physiology & pharmacology*, 19(6), 533–542, 2015. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2015.19.6.533>

66. SÁ, Rodrigo Elísio de, et al. Geraniol, Um Componente Dos Óleos Essenciais de Plantas – Um Mapeamento Científico de Suas Propriedades Farmacológicas. *Research, Society and Development*, vol. 10, no. 12, Sept. 2021, <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I12.20805>.
67. SADEE, Wolfgang, and John C. McKew. Ligand-Free Signaling of G-Protein-Coupled Receptors: Relevance to μ Opioid Receptors in Analgesia and Addiction. *Molecules*, vol. 27, no. 18, Sept. 2022, p. 5826, <https://doi.org/10.3390/molecules27185826>.
68. SANDERS, Kenton M., and Sean M. WARD. Nitric Oxide and Its Role as a Non-adrenergic, Non-cholinergic Inhibitory Neurotransmitter in the Gastrointestinal Tract. *British Journal of Pharmacology*, vol. 176, no. 2, Jan. 2019, pp. 212–27, <https://doi.org/10.1111/BPH.14459>.
69. SCHUCHT, J. E. et al. Plasma resuscitation improves and restores intestinal microcirculatory physiology. *Vox sanguinis*, 2023. <https://doi.org/10.1111/vox.13504>
70. SHIH, Chung-Hung et al. Stereoselectivity of butylidenephthalide on non-adrenergic prejunctional voltage-dependent Ca^{2+} channels in prostatic portion of rat vas deferens. *European journal of pharmacology* vol. 786, 2016: 47-52. <https://doi:10.1016/j.ejphar.2016.05.036>
71. SO, Choon Leng et al. Transient receptor potential cation channel subfamily V and breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* vol. 100,2, 2020: 199-206. <https://doi:10.1038/s41374-019-0348-0>
72. SOARES-da-Silva, Patrício, and Margarida CARAMONA. Effects of Methylene Blue on the Uptake, Release and Metabolism of Noradrenaline in Mesenteric Arterial Vessels. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 40, no. 8, Apr. 1989, pp. 534–38, <https://doi.org/10.1111/J.2042-7158.1988.TB05297.X>.
73. SOUBH, Ayman A et al. Geraniol ameliorates TNBS-induced colitis: Involvement of Wnt/ β -catenin, p38MAPK, NF κ B, and PPAR γ signaling pathways. *Life sciences* vol. 136, 2015: 142-50. <https://doi:10.1016/j.lfs.2015.07.004>
74. SOUZA, Iara Leão Luna de, et al. “Essential Oil from *Xylopiya Frutescens* Aubl. Reduces Cytosolic Calcium Levels on Guinea Pig Ileum: Mechanism Underlying Its Spasmolytic Potential.” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, no. 1, Sept. 2015, p. 327, <https://doi.org/10.1186/S12906-015-0849-3>.
75. SUN, Jian-Fang, et al. Fenamates Inhibit Human Sodium Channel Nav1.2 and Protect Glutamate-Induced Injury in SH-SY5Y Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 40, no. 8, Mar. 2020, pp. 1405–16, <https://doi.org/10.1007/S10571-020-00826-1>.
76. TAN, Qiulin, et al. Tuning the Tetraethylammonium Sensitivity of Potassium Channel Kcv by Subunit Combination. *The Journal of General Physiology*, vol. 139, no. 4, Apr. 2012, pp. 295–304, <https://doi.org/10.1085/JGP.201110725>.
77. VASCONCELOS, Luiz H C et al. Flavonoid galetin 3,6-dimethyl ether attenuates guinea pig ileum contraction through K^{+} channel activation and decrease in cytosolic calcium concentration. *European journal of pharmacology* vol. 767, 2015: 52-60. <https://doi:10.1016/j.ejphar.2015.10.007>
78. VOGT-EISELE, A K et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *British journal of pharmacology* vol. 151,4, 2007: 530-40. <https://doi:10.1038/sj.bjp.0707245>

79. WAN, Hanxing et al. Capsaicin inhibits intestinal Cl⁻ secretion and promotes Na⁺ absorption by blocking TRPV4 channels in healthy and colitic mice. *The Journal of biological chemistry* vol. 298,5 (2022): 101847. <https://doi:10.1016/j.jbc.2022.101847>
80. WANG, Juan, et al. “Comprehensive Insights into the Multifaceted Roles of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channel in the Digestive System.” *Life Science*, vol. 334, Oct. 2023, p. 122207, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122207>.
81. YADAV, Krishna, and Jyoti JOSHI. *Biological Activity of Phytochemicals Extracted from Medicinal Plants of Apocynaceae Family*. Apr. 2024, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2024.04.003>.
82. YANG, S. M. et al. Duodenal Mucosal Resurfacing with Photodynamic Therapy Using Methylene Blue in a Mouse Model. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 103733. Advance online publication, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103733>
83. YANG, R.; XIONG, Z.; LIU, C.; LIU, L. Inhibitory effects of capsaicin on voltage-gated potassium channels by TRPV1-independent pathway. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 34, n. 4, p. 565–576, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0041-1>.
84. YE, C. J.; LI, S. A.; ZHANG, Y.; LEE, W. H. Geraniol targets KV1.3 ion channel and exhibits anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *Fitoterapia*, v. 139, p. 104394, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104394>
85. ZHANG, Hongling, et al. Effect of Solvent Fractions of Crude Extract of Liushenqu on Gastrointestinal Motility in Guinea Pigs, and the Underlying Mechanism(s). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 18, no. 5, May 2021, pp. 1089–94, <https://doi.org/10.4314/TJPR.V18I5.25>.
86. ZHANG, Xin, et al. Dynamic Recognition of Naloxone, Morphine and Endomorphin1 in the Same Pocket of μ -Opioid Receptors. *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 9, Aug. 2022, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.925404>.
87. ZHANG, Yun-Fei et al. Systematic elucidation of the mechanism of geraniol via network pharmacology. *Drug design, development and therapy* vol. 13 1069-1075. 4 Apr. 2019, <https://doi:10.2147/DDDT.S189088>
88. ZHOU, Xiaobo, et al. Dual Role of Protein Kinase C on BK Channel Regulation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 17, Apr. 2010, pp. 8005–10, <https://doi.org/10.1073/PNAS.0912029107>.

CAPÍTULO 2

Avaliação do sistema de nanoemulsão com inclusão do monoterpeno geraniol e a comparação de seu efeito farmacológico *in vitro* em íleo isolado de cobaia e *in vivo* em diarreia induzida e velocidade de trânsito gastrointestinal em camundongos.

RESUMO

O geraniol é um monoterpeno com diversas atividades farmacológicas, mas sua potência pode ser aumentada quando incorporado em sistemas de nanoemulsão. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade espasmolítica do geraniol e compará-la com sua forma nanoemulsionada, em três formulações diferentes, utilizando um sistema de emulsificação espontânea de baixa energia. Esse estudo tem como objetivo comparar os efeitos do geraniol livre e nanoemulsionado. Foram preparadas três nanoemulsões contendo geraniol (NanoGER F1, NanoGER F2 e NanoGER F3), por meio da técnica isotérmica de emulsificação espontânea. As formulações foram analisadas quanto ao tamanho das gotículas, índice de polidispersidade (PdI) e potencial zeta (ζ , mV). Os testes *in vitro* foram realizados em íleo isolado de cobaia, com contrações induzidas por carbacol 1 μ M e concentrações cumulativas de geraniol e sua nanoemulsão de $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Modelos *in vivo* de diarreia induzida por óleo de rícino e velocidade de trânsito gastrointestinal com carvão ativado foram utilizados com doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg, comparando-se o efeito do geraniol livre e nanoemulsionado (GNEs). Nos resultados foi observado que o geraniol, na formulação NanoGER F1, apresentou tamanho de gotícula de $49,70 \pm 0,421$ nm, PdI de $0,435 \pm 0,01$ e potencial zeta de $-38,75 \pm 0,37$ mV. NanoGER F2 apresentou $109,93 \pm 0,338$ nm, PdI de $0,165 \pm 0,007$ e ζ de $-39,52 \pm 0,19$ mV; enquanto a NanoGER F3 apresentou $110,23 \pm 0,406$ nm, PdI de $0,115 \pm 0,004$ e ζ de $-19,65 \pm 0,33$ mV. Tanto o geraniol livre quanto as nanoemulsões demonstraram efeito espasmolítico dependente da concentração nas contrações induzidas por carbacol. No entanto, apenas a formulação NanoGER F1 potencializou significativamente o efeito do monoterpeno, aumentando de $pEC_{50} = 4,75$ e $E_{max} = 40,23\%$ para $pEC_{50} = 5,21$ e $E_{max} = 84,31\%$ em todas as concentrações testadas. No modelo *in vivo*, a NanoGER F1 aumentou a atividade antidiarreica do geraniol, melhorando o aspecto das fezes, prevenindo a perda de peso dos animais e promovendo uma redução da velocidade do trânsito gastrointestinal semelhante à loperamida, nas doses de 200 e 400 mg/kg. Concluiu-se que a formulação NanoGER F1 potencializou significativamente os efeitos espasmolítico e antidiarreico do geraniol, evidenciando que a nanoemulsificação é uma estratégia promissora para otimizar sua eficácia no tratamento de distúrbios gastrointestinais.

Palavras-chave: Nanoemulsão. Monoterpeno. Íleo. Geraniol. Espasmolítico. Antidiarreico.

ABSTRACT

Geraniol is a monoterpene with diverse pharmacological activities, but its potency can be increased when incorporated into nanoemulsion systems. Therefore, the aim of this study was to investigate the spasmolytic activity of geraniol and compare it with its nanoemulsified form, in three different formulations, using a low-energy spontaneous emulsification system. This study aims to compare the effects of free and nanoemulsified geraniol. Three nanoemulsions containing geraniol (NanoGER F1, NanoGER F2 and NanoGER F3) were prepared using the isothermal spontaneous emulsification technique. The formulations were analyzed for droplet size, polydispersity index (PdI) and zeta potential (ζ , mV). The *in vitro* tests were carried out on isolated guinea pig ileum, with contractions induced by carbachol 1 μ M and cumulative concentrations of geraniol and its nanoemulsion from 1.0×10^{-7} to 3.0×10^{-3} M. *In vivo* models of castor oil-induced diarrhea and gastrointestinal transit speed with activated charcoal were used with doses of 10, 50, 100, 200 and 400 mg/kg, comparing the effect of free and nanoemulsified geraniol (GNEs). The results showed that geraniol in the NanoGER F1 formulation had a droplet size of 49.70 ± 0.421 nm, a PdI of 0.435 ± 0.01 and a zeta potential of -38.75 ± 0.37 mV. NanoGER F2 showed 109.93 ± 0.338 nm, PdI of 0.165 ± 0.007 and ζ of -39.52 ± 0.19 mV; while NanoGER F3 showed 110.23 ± 0.406 nm. NanoGER F2 showed 109.93 ± 0.338 nm, PdI of 0.165 ± 0.007 and ζ of -39.52 ± 0.19 mV; while NanoGER F3 showed 110.23 ± 0.406 nm, PdI of 0.115 ± 0.004 and ζ of -19.65 ± 0.33 mV. Both free geraniol and the nanoemulsions showed a concentration-dependent spasmolytic effect on carbachol-induced contractions. However, only the NanoGER F1 formulation significantly potentiated the effect of the monoterpene, increasing from $pEC_{50} = 4.75$ and $E_{max} = 40.23\%$ to $pEC_{50} = 5.21$ and $E_{max} = 84.31\%$ at all concentrations tested. In the *in vivo* model, NanoGER F1 increased the anti-diarrheal activity of geraniol, improving the appearance of the feces, preventing weight loss in the animals and promoting a reduction in the speed of gastrointestinal transit similar to loperamide, at doses of 200 and 400 mg/kg. It is concluded that the NanoGER F1 formulation significantly potentiated the spasmolytic and antidiarrheal effects of geraniol, showing that nanoemulsification is a promising strategy for optimizing its efficacy in the treatment of gastrointestinal disorders.

Keywords: Nanoemulsion. Monoterpene. Ileum. Geraniol. Spasmolytic. Antidiarrheal.

1. Introdução

Sistemas nanoemulsionados são bastante efetivos e cada vez mais utilizados para a conservação de monoterpenos, evitando sua volatilização, degradação pela luz e melhorando sua estabilidade química. A escolha entre diferentes sistemas carreados inclui polímeros nanocapsulados, lipossomas, fitossomas, nanoemulsões, microemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e lipídios nanoestruturados (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016; LIMA, *et al.*, 2022). A maioria dos estudos sobre nanoemulsões se concentra na caracterização da distribuição de tamanho de gotículas e no potencial zeta, avaliando suas propriedades tanto em fases aquosas quanto não aquosas (KADUKKATTIL RAMANUNNY, *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2023).

A administração oral de medicamentos, já amplamente consolidada quanto à sua efetividade e adesão, destaca-se como uma via promissora para sistemas de liberação baseados em nanoemulsões e nanoemulgéis. Isso é particularmente relevante considerando os desafios associados à baixa biodisponibilidade e à solubilidade aquosa limitada de muitos fármacos, como os monoterpenos, que são compostos oleosos altamente voláteis à temperatura ambiente (PANDEY, *et al.*, 2021; SITHOLE, *et al.*, 2021).

O uso de sistemas nanoemulsionados contendo monoterpenos vem ganhando cada vez mais espaço, tendo em vista a busca constante no mercado emergente de medicamentos de origem natural e cada vez mais biotecnológicos. Na natureza, óleos bioativos à base de terpeno (isopreno) e terpenóides compostos são sintetizados por plantas aromáticas como metabólitos secundários, comumente conhecidos como óleos essenciais (OE) ou óleos voláteis. Os monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno (10 átomos de carbono) e constituem mais de 80% da composição do OE (LIMA, *et al.*, 2021).

Vários estudos centram-se na utilização do geraniol como fármaco, produto cosmético e detergente, exibindo baixa toxicidade. É sugerido que o geraniol representa uma nova classe de agentes quimio-preventivos para o câncer. Outras atividades biológicas, como efeitos como antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, hepatoprotetor, anti-ulcerogênica no estômago e mucosa duodenal (ROCCA, *et al.*, 2017; VENZON, *et al.*, 2018), tal como o efeito do geraniol como intensificador de penetração para administração transdérmica de medicamentos também atraiu a atenção de pesquisadores e cientistas relacionados a biotecnologia (CHEN, VILJOEN, 2010, KAMOU, *et al.*, 2022).

Dessa forma esse trabalho, avalia se o geraniol tem seu efeito farmacológico com atividade

espasmolítica e antidiarreica potencializado em um sistema nanoemulsionado em modelos animais *in vitro* e *in vivo*, em íleo isolado de cobaia e em modelos de diarreia e de velocidade de trânsito gastrointestinal, propondo um sistema nanoemulsionado viável e eficiente.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O geraniol (3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-ol) 99,8% com propriedades físico-químicas de 154,25 g/mol, 229-230 C (lit) bp, solubilidade de 0,879 g/mL a 20 °C sendo (0,1 g/L a sua solubilidade em água 25 C), monooleato de sorbitano monooleato (SMO), monolaurato sorbitano de polioxietileno-20 (SML-20) monooleato sorbitano de polioxietileno-20 (SMO-20), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram adquiridos à SigmaAldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Os triglicéridos de cadeia média (MCT, d =0,94 g mL⁻¹ a 20 °C) foi gentilmente fornecido pela Brasquim (Porto Alegre-RS, Brasil). com propriedades físico-químicas de 154,25 g/mol, 229-230 C (lit) bp, solubilidade de 0,879 g/mL a 20 °C sendo (0,1 g/L a sua solubilidade em água 25 C), levando em consideração essas informações disponíveis na *National Center for Biotechnology Information*, e informações do fabricante o monoterpene foi diluído em água destilada com cremofor[®] 3% para os testes *in vivo* e *in vitro*. As formulações emulsionadas de geraniol (GNEs) foram preparadas pelo método de emulsificação direta, sem a presença de cremofor[®] (LIMA *et al.*, 2021, KAMAIOKO e MCCLEMENTS, 2016, XUE, *et al.*, 2019).

2.2 Preparo das nanoemulsões

As nanoemulsões carregadas com geraniol (GNEs) foram preparadas através da técnica de preparo isotérmico com emulsificação espontânea para a aquisição da nanoemulsão baseada abordagem relatada anteriormente de Lima *et al.*, 2021, Kamaiooko e McClements, 2016, Xue, *et al.*, 2019, com modificações. Resumidamente, o geraniol foi preparado em três formulações diferentes cada uma usando (500 mg) de geraniol que foi dissolvido em água destilada com PBS 10 mM tamponado pH 7,0 (8 mL), seguido da adição dos surfactantes (SMO), SML-20, SMO-20) para cada tipo de formulação realizada em triplicata para as posteriores análises, obtendo o geraniol 5% (m/v) na formulação. A mistura foi mantida num frasco fechado e emulsionado por tratamento com agitação magnética durante 15 minutos à temperatura ambiente (<30 °C). As nanoemulsões preparadas de óleo em água (O/W) foram armazenadas em sistema fechado, com condições de temperatura (25 °C) para uma melhor caracterização (KAMOU, *et al.*, 2022). Para o

preparo da GNEs formulação 1 (F1), 2 (F2) e 3 (F3), os surfactantes foram pesados e adicionados segundo a tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Composição em (peso/volume %) das formulações contendo o geraniol (GNEs).

GNEs	SML-20	SMO-20	SMO	MCT	GER	PBS
F1	6,2	-	3,8	5,0	5,0	80,0
F2	-	7,2	2,8	5,0	5,0	80,0
F3	-	10,0	-	5,0	5,0	80,0

SML-20: monolaurato de sorbitano de polioxietileno-20; SMO-20: monooleato sorbitano de polioxietileno-20; SMO: monooleato de sorbitano; MCT: triglicéridos de cadeia média; GER: geraniol; PBS: Solução tampão de fosfato 10 mM pH 7,4. Todos valores descritos na tabela, são correspondentes a proporção de porcentagem para 100% da formulação final.

2.3 Avaliação do tamanho de partículas

O diâmetro hidrodinâmico das gotículas e o índice de polidispersão (PDI) das formulações NE foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) a 25 °C e um ângulo de dispersão de 173° (Zetasizer® Nano ZS, Malvern PCS Instruments, Reino Unido). Todas as amostras foram diluídas (1/ 100) com água ultra-purificada (Lima, *et al.*, 2021).

2.4 Avaliação do potencial Zeta

O potencial zeta (ζ) da NE foi medido pela mobilidade electroforética utilizando um aparelho Zetasizer® Nano ZS (Malvern PCS Instruments, Reino Unido). O modelo de Smoluchowski foi utilizado para estimar o potencial ζ a partir da mobilidade electroforética. As análises foram realizadas a 25 °C, e as amostras foram adequadamente diluídas (1/100) com água ultra-purificada (Lima, *et al.*, 2021).

2.5 Animais

Foram utilizadas cobaias (*Cavia porcelus*) machos pesando entre 300 e 500 g, e camundongos albinos machos Swiss (*Mus musculus*) de pesando entre 25 e 35 g, todos procedentes do Biotério Central da UNIVASF. Os animais foram mantidos pelo Biotério Central da UNIVASF, em caixas adequadas, com ciclo claro escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*, entrando em períodos de jejum de 18 horas ou 24 horas apenas antes dos experimentos. Todos os protocolos experimentais que já estão em execução respeitam os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF) e aprovado pelo número 0005/270320.

2.6 Experimentos avaliativo da atividade relaxante da musculatura lisa de íleo isolado de cobaia

As cobaias foram mantidas em jejum de sólidos por 18 horas e em seguida eutanasiadas por injeção de tiopental 150 mg/kg via intraperitoneal. O abdômen foi aberto e um segmento do íleo foi retirado e colocado em recipiente contendo solução de Krebs modificada (NaCl 117,0 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂.2H₂O 2,5 mM, MgSO₄.7H₂O 1,3 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, Glicose 11,0 mM, NaHCO₃ 25,0 mM), a 37°C sob aeração com carbogênio 95% O₂ e 5% CO₂. Após dissecação, o segmento do íleo foi seccionado em fragmentos de 1 cm longitudinalmente, suspensos individualmente em cubas de vidro (10 mL) e deixados em período de estabilização do órgão por 45 minutos, com força induzida no tecido de 1 gF, sendo a solução nutritiva trocada a cada 10 minutos. Após o período de estabilização, contrações foram induzidas com carbacol 1 µM. A primeira contração teve por finalidade verificar a viabilidade do órgão.

Após essa primeira contração a cuba foi lavada mais três vezes, com uma diferença de 10 minutos entre elas. Após a última (6ª e última lavagem) o íleo foi novamente contraído na presença de carbacol 1 µM, ou mantido na ausência de agente contraturante com a finalidade obter o tônus basal, e 5 minutos após a 2ª contração ou na ausência da segunda contração o GER e NanoGER em suas diferentes formulações, foram adicionados, em concentrações cumulativas que resultaram nas concentrações finais do monoterpene dentro da cuba com o órgão de $1,0 \times 10^{-7}$; $3,0 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $1,0 \times 10^{-5}$; $3,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $3,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-3}$ e $3,0 \times 10^{-3}$ M com intervalo de 5 minutos entre a adição de cada concentração.

2.7 Investigação do efeito do geraniol e sua nanoemulsão na diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos

O modelo experimental foi o estabelecido por Gilanni *et al.*, (2005). Camundongos machos, em jejum de sólidos de 15 horas, foram divididos em cinco grupos (n=6). A diarreia foi induzida pela administração de óleo de rícino. Os animais divididos nesses cinco grupos foram tratados com cremofor 3% em água destilada 10 mL/kg (m/v) (controle negativo), loperamida 20 mg/kg (controle positivo) ou GER nas doses de 10, 50, 100, 200 ou 400 mg/kg, e a nanoemulsão da formulação F1 de geraniol (NanoGER) nas doses de 10, 50, 100, 200 ou 400 mg/kg todos por via oral. Após uma hora, foi administrado 0,01 mL/g do agente indutor da diarreia, (o óleo de

ricino), em cada animal por via oral. Os animais foram colocados em caixas individuais forradas com papel branco, que foram trocadas a cada hora, e avaliados por 4 horas. A cada hora após a administração do óleo de ricino, foi atribuído a cada animal uma pontuação de 0-3, onde: 0 - ausência de diarreia, 1 - eliminação de fezes de aspecto úmido, 2 - eliminação de fezes de aspecto pastoso em pequena/moderada quantidade, 3 - eliminação de fezes de aspecto líquido ou pastoso em grande quantidade. Somado ao escore, a massa de fezes eliminada por cada animal foi pesada, assim como a perda de peso corpóreo apresentada pelos mesmos. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por injeção com tiopental 180 mg/kg via intraperitoneal, e seu intestino retirado e pesado.

2.8 Investigação do efeito do geraniol e sua nanoemulsão sobre o trânsito intestinal normal em camundongos

O modelo experimental foi o estabelecido por Gilanni *et al.* (2005). A diarreia induzida por óleo de ricino em camundongos. Camundongos machos, em jejum de sólidos de 15 horas, serão divididos em cinco grupos (n=6) e tratados com solução de cremofor 3% em água destilada 10 mL/kg (controle negativo), loperamida 20 mg/kg (controle positivo) ou GER e GNEs nas doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg, todos via oral. Após 30 minutos, foi administrado 0,1 mL/g de uma solução de carvão ativado (5%) em goma arábica (2%) a cada animal, que foram eutanasiados por administração de tiopental 180 mg/kg via intraperitoneal. A cavidade abdominal foi aberta e o intestino delgado removido. Com auxílio de uma régua, foi determinado o comprimento total do intestino delgado, em centímetros, de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal) e a distância percorrida pelo carvão ativado. Os resultados serão expressos em percentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado.

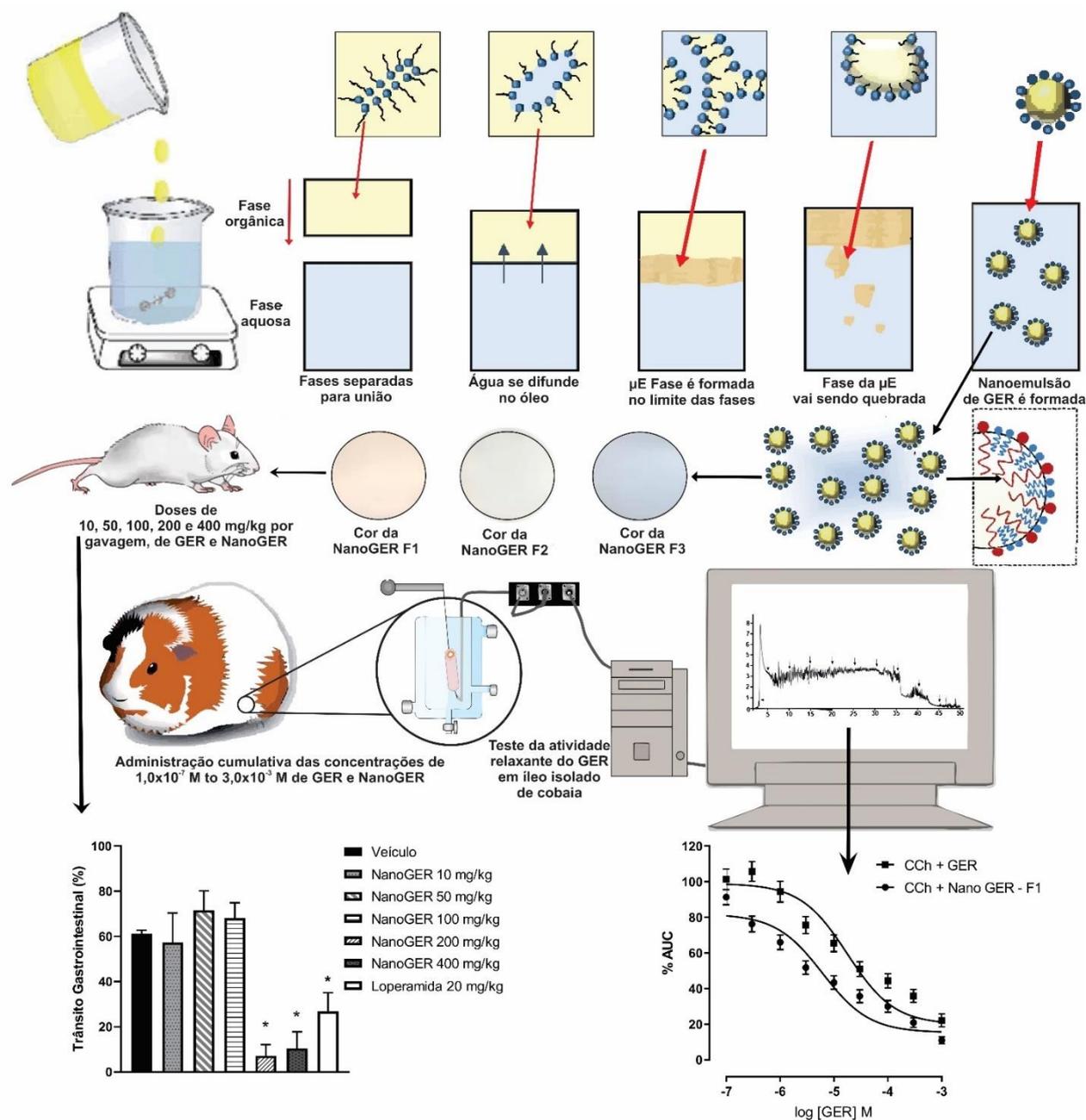


Figura 9 – Formação de nanoemulsões pelo método de emulsificação espontânea. Quando a fase orgânica contendo o GER + os surfactantes e co-surfactantes, óleo orgânica (óleo + surfactante hidrofílico) e a fase aquosa (água) entram em contato, uma microemulsão bicontínua (μ E) é formada no limite entre as fases, que se rompe e forma pequenas gotículas de óleo a temperatura ambiente e agitação magnética de 200 rpm, a nanoemulsão de GER é formada. Em círculo as fotografias das nanoemulsões em tubo de ensaio, contendo geraniol após o seu preparo. F1, F2 e F3. Podemos notar que a formulação F2 ficou levemente mais transparente em comparação a F1, e por sua vez F3 pois a que teve maior transparência e uma coloração levemente azulada, a iluminação ambiente. As formulações foram testadas em modelos *in vitro* em íleo isolado de cobaia, com 1 cm de órgão, com contrações induzidas por CCh 1 μ M, e concentrações cumulativas de $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M de GER e de NanoGER das três formulações, em *in vivo* nos modelos de diarreia induzida por óleo de rícino e de velocidade de trânsito gastrointestinal.

2.9 Análise estatística

Os valores indicados nos testes de índice de polidispersão e potencial zeta (ζ) foram analisados com média \pm SEM de três lotes diferentes de cada dispersão coloidal, e posterior ANOVA one-way, com pós teste de Dunnett. Os dados obtidos do Windaq exportados para o Excel e foram desenhados em gráficos no Graph-Pad Prism[®] versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA), permitiram a análise da área sobre a curva (AUC). resultados de área sobre a curva (AUC) obtidos foram expressos como S.E.M e analisados estatisticamente por teste t de Student, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados os significantes. Os valores de pEC₅₀ (concentração do monoterpene que produz uma resposta igual a 50% do seu efeito máximo) foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados. Nos testes *in vivo*, foi utilizado ANOVA one-way, com pós teste de Dunnett. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Graph-Pad Prism[®] versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

3. Resultados

As dispersões coloidais contendo geraniol, utilizando como fase aquosa PBS (pH 7,4), enquanto a fase orgânica consistia numa mistura de geraniol e triglicéridos de cadeia média (MTC) (1:1 w/w), e diferentes tipos de surfactantes. Para as emulsões aqui obtidas, registrou-se uma variação do visual entre as dispersões nanoemulsionadas fluidas, desde turva na F1 a ligeiramente turva na F2 e F3 com reflexo azulado a uma dispersão leitosa opaca que reflete diretamente a fase dispersa formada em cada formulação coloidal, figura 9.

As principais propriedades dos sistemas nanoemulsionados dependem tanto do tipo de surfactantes e co-surfactantes, como também da composição da fase aquosa e a técnica utilizada. Os tipos de surfactantes não iônicos utilizados nas formulações demonstraram uma influência considerável no diâmetro médio das gotículas e na distribuição do tamanho das dispersões coloidais e seu segundo a tabela 2.

Tabela 2: Tamanho da partícula (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersidade (Pdl) e (ζ) potencial zeta em (mV) das formulações de NanoGER.

GNEs	Tamanho (nm)	Pdl	ζ potencial (mV)
F1	49,70 \pm (0,421) ^a	0,435 \pm (0,01) ^b	-38,75 \pm (0,37)
F2	109,93 \pm (0,338)	0,165 \pm (0,007) ^b	-39,52 \pm (0,19)

F3	110,23 ± (0,406)	0,115 ± (0,004) ^b	-19,65 ± (0,33) ^c
----	------------------	------------------------------	------------------------------

Os resultados foram expressos como média ± SEM, (n = 3), com diferenças estatisticamente significativas comparadas com ANOVA one-way, com pós teste de Dunnett, quando $p < 0,05$.

^a $p < 0,05$ em comparação com as formulações F1 com F2, F3 em relação ao tamanho da partícula em (nm).

^b $p < 0,05$ em comparação com as formulações F1, F2 e F3 em relação ao Pdl.

^c $p < 0,05$ em comparação com as formulações F1, F2 e F3 em relação ao ζ potencial.

Assim, verificamos a obtenção nas formulações de NanoGER, gotículas com menores tamanhos (<115 nm) e com a distribuição de tamanho mais uniforme (Pdl <0,2 e monomodal). Esses resultados foram observados para a formulação F1 ($p < 0,05$), que foi preparada contendo SML-20 e SMO como par de surfactantes não iônicos, que apresentou partículas muito menores com média de 49,70 nm de tamanho, entretanto com uma distribuição maior de tamanho como observado no Pdl. As formulações de NanoGER, F1 e F2 apresentaram valores negativos significativos de potencial zeta (< - 20 mV, Tabela 2) que podem estar relacionados a grupos ionizados livres de componentes da fase orgânica, assim demonstrando uma possível boa estabilidade das formulações F1 e F2, no entanto o que não foi observado em F3 com valor (> - 20 mV, Tabela 1), com diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Em contraste, as maiores gotículas com a menor distribuição de tamanho foram observadas na dispersão preparada com os surfactantes SMO-20 e SMO (formulação F2). Do mesmo modo, para a formulação que contém apenas SML-20 como surfactante (formulação F3), o tamanho médio das gotículas apresentou diferença quando comparado entre F2 e F3 com F1. No que diz respeito ao índice de polidispersão, a variabilidade de populações com tamanhos de gotículas diferentes, todas as formulações apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si com $p < 0,05$, com valores de Pdl > 0,4 para F1 e < 0,2 para F2 e F3 (Tabela 2).

A formulação NanoGER F1 apresentou os melhores resultados, de tamanho de gotículas, $49,70 \pm (0,421)$ e ζ potencial $-38,75 \pm (0,37)$, entretanto no índice de polidispersão $0,435 \pm (0,01)$, houve a formação de duas populações de partículas diferentes em duas das três preparações, com intensidades de picos de 40 e 44%, mesmo que houvesse um tamanho de gotículas menores essa distribuição heterogênea não é interesse sobre o ponto de vista biotecnológico. Já na formulação F2, houve em apenas uma das preparações uma população diferente de partículas, no entanto com intensidade de apenas 1,8% o que pode ser desconsiderado. Na nanoemulsão F3 houve apenas uma população observada com pico de intensidade de 100% nas três amostras. Todos os resultados demonstraram a eficiência do método de preparo da nanoemulsão.

Os resultados obtidos nos testes *in vitro*, fig. 10, comparando as contrações no íleo isolado de cobaia induzidas por carbacol 1 μM , demonstraram que houve um aumento da potência farmacológica do geraniol quando esse foi incorporado em um sistema de nanoemulsão.

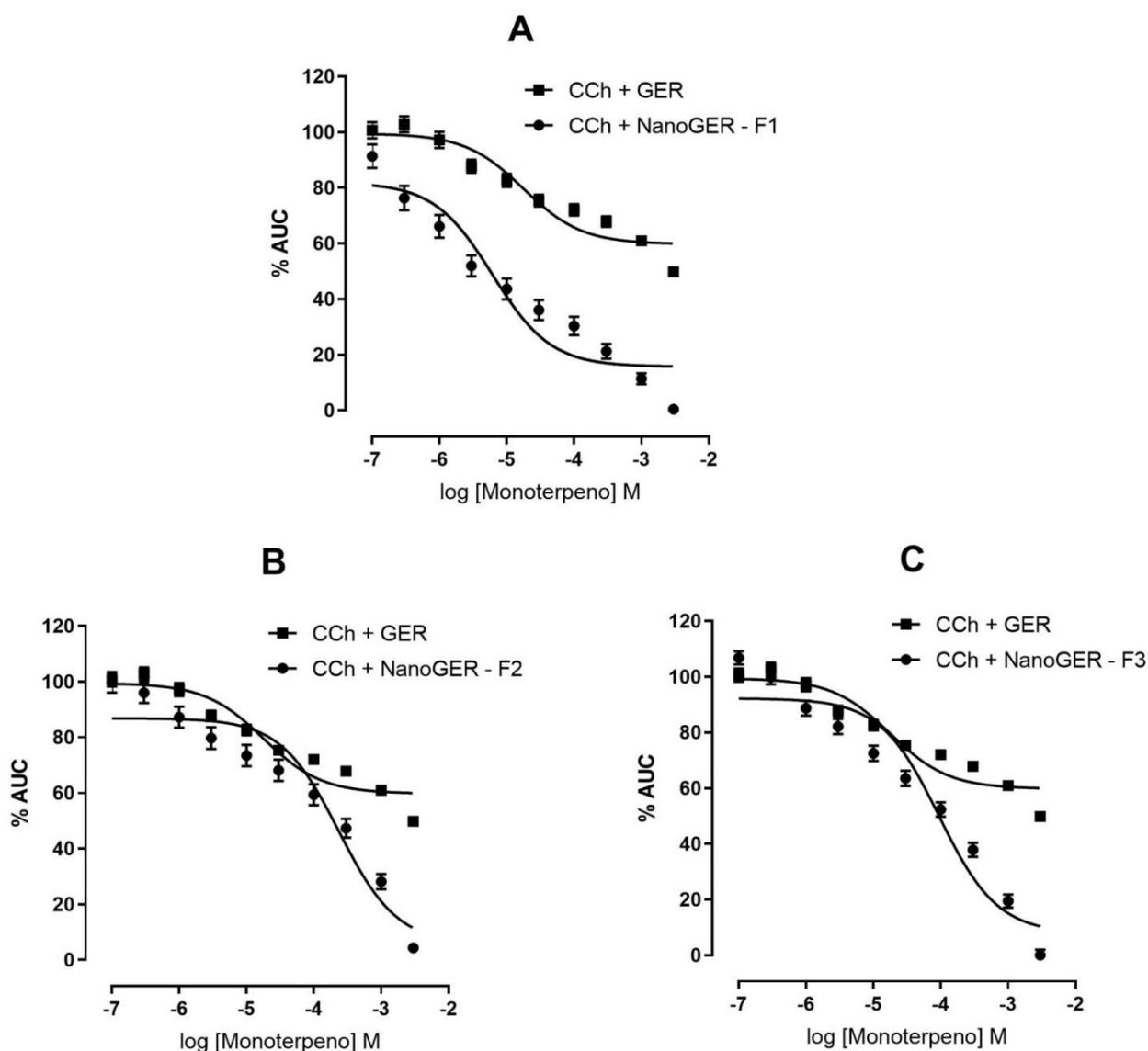


Figura 10 - Comparação do efeito relaxante em íleo isolado de cobaia, do geraniol e da sua nanoemulsão, na contração com CCh 1 μM , com a adição cumulativa do (GER) ou (GNEs) $1,0 \times 10^{-7}$ M to $3,0 \times 10^{-3}$ M. (A) na formulação 1 NanoGER - F1, com SML-20: monolaurato de sorbitano de polioxietileno-20 (6,2%), SMO: monooleato de sorbitano (3,8%), MCT: triglicéridos de cadeia média (5,0%), GER (5,0%) em PBS: Solução tampão de fosfato 10 mM pH 7,4 (80%). (B) na formulação 2 NanoGER - F2, com SMO-20: monooleato sorbitano de polioxietileno-20 (7,2%), SMO: monooleato de sorbitano (2,8%), MCT: triglicéridos de cadeia média (5,0%) + GER (5,0%) em PBS: Solução tampão de fosfato 10 mM pH 7,4 (80%). (C) na formulação 3 NanoGER - F3, com SMO-20: monooleato sorbitano de polioxietileno-20 (10%), MCT: triglicéridos de cadeia média (5,0%) + GER (5,0%) em PBS: Solução tampão de fosfato 10 mM pH 7,4 (80%). Valores da regressão não linear expressos em (AUC%). Análise estatística realizada

através de teste t de Student e ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com $p < 0,05$.

O geraniol solubilizado em água destilada e cremofor 3%, teve $pEC_{50} = 4,75$ e $E_{max} = 40,23\%$ nas contrações induzidas por carbacol, que foi potencializada na formulação F1, que apresentou por sua vez $pEC_{50} = 5,21$ e $E_{max} = 84,31\%$ deslocando a curva a esquerda apresentando diferença estatisticamente significativa em todas as concentrações quando comparado NanoGER F1 com GER. Já nas formulações F2 e F3, houve deslocamento da curva de concentração e de resposta como pode ser observado na figura 2 mas não potencializou o efeito do monoterpene geraniol, não apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparadas com o teste t de Student, com NanoGER F2 $pEC_{50} = 3,63$ e $E_{max} = 94,48\%$, enquanto NanoGER F3 com $pEC_{50} = 4,02$ e $E_{max} = 92,17\%$.

Em contraste, as maiores gotículas com a menor distribuição de tamanho foram observadas na dispersão preparada com os surfactantes SMO-20 e SMO (formulação F2). Do mesmo modo, para a formulação que contém apenas SML-20 como surfactante (formulação F3), o tamanho médio das gotículas apresentou diferença quando comparado entre F2 e F3 com F1. No que diz respeito ao índice de polidispersão, a variabilidade de populações com tamanhos de gotículas diferentes, todas as formulações apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si com $p < 0,05$, com valores de $PdI > 0,4$ para F1 e $< 0,2$ para F2 e F3 (tabela 2).

A formulação NanoGER F1 apresentou os melhores resultados, ou seja, quanto menor o tamanho de gotículas melhor, com $49,70 \pm (0,421)$ e ζ potencial $-38,75 \pm (0,37)$, entretanto no índice de polidispersão $0,435 \pm (0,01)$, houve a formação de duas populações de partículas diferentes em duas das três preparações, com intensidades de picos de 40 e 44%, mesmo que houve-se um tamanho de gotículas menores essa distribuição heterogênea não é interesse sobre o ponto de vista biotecnológico. Já na formulação F2, houve em apenas uma das preparações uma população diferente de partículas, no entanto com intensidade de apenas 1,8% o que pode ser desconsiderado. Na nanoemulsão F3 houve apenas uma população observada com pico de intensidade de 100% nas três amostras. Todos os resultados excelentes, demonstrando assim a eficiência do método de preparo da nanoemulsão.

Os resultados obtidos nos testes *in vitro*, comparando as contrações no íleo isolado de cobaia induzidas por carbacol $1 \mu M$, demonstraram que houve um aumento da potência farmacológica do geraniol quando esse foi incorporado em um sistema de nanoemulsão. O geraniol solubilizado em água destilada com cremofor 3%, teve $pEC_{50} = 4,75$ e $E_{max} = 40,23\%$ nas contrações induzidas por carbacol, que foi potencializada na formulação F1, que apresentou por

sua vez $pEC_{50} = 5,21$ e $E_{max} = 84,31\%$ deslocando a curva a esquerda apresentando diferença estatisticamente significativa em todas as concentrações quando comparado NanoGER F1 com GER. Já nas formulações F2 e F3, houve deslocamento da curva de concentração e de resposta como pode ser observado na figura 10 mas não potencializou o efeito do monoterpene geraniol, com NanoGER F2 $pEC_{50} = 3,63$ e $E_{max} = 94,48\%$, enquanto NanoGER F3 com $pEC_{50} = 4,02$ e $E_{max} = 92,17\%$.

Os resultados obtidos das formulações F2 e F3, apesar de terem um índice de polidispersão (PdI) menor e uma população de partículas bem definidas não potencializou o efeito do geraniol, de forma estatisticamente significativa, no modelo *in vitro* como observado na NanoGER F1. Os resultados apontaram para a melhor atividade *in vitro* da formulação NanoGER F1, dessa maneira, os testes *in vivo* prosseguiram utilizando a NanoGER F1. Já os resultados obtidos das formulações F2 e F3, apesar de terem um índice de polidispersão (PdI) menor e uma população de partículas bem definidas não potencializou o efeito do geraniol no modelo *in vitro* como observado na F1, quando avaliado o EC_{50} e E_{max} . Assim na comparação dos resultados da AUC entre GER, com F1, F2 e F3, somente F1 apresentou diferença estatisticamente significativa. A análise da diferença de cada concentração está descrita na tabela 3.

Tabela 3: Área sobre a curva da contração induzida em íleo isolado de cobaia por carbacol $1 \mu M$, na avaliação do efeito relaxante do GER e comparação a sua nanoemulsão em contrações cumulativas.

Formulação	GER (Geraniol)		GNEs F1		GNEs F2		GNEs F3	
	AUC	\pm SEM	AUC	\pm SEM	AUC	\pm SEM	AUC	\pm SEM
Contração CCh	3473	44,29	3967	35,87	4399	37,8	3372	45,54
0,0 M	4018	28,2	4733	44,12	4721	56,81	4111	37,19
$1,0 \times 10^{-7}$ M	4035	27,88	4439*	51,53	4712*	56,26	4298*	29,3
$3,0 \times 10^{-7}$ M	4093	26,92	3932*	53,38	4587*	55,53	4106*	31,11
$1,0 \times 10^{-6}$ M	3942	28,07	3588*	49,61	4293*	57,4	3800*	33,48
$3,0 \times 10^{-6}$ M	3692	23,21	3111*	45,77	4040*	58,81	3619*	34,19
$1,0 \times 10^{-5}$ M	3556	22,82	2829*	46,07	3829*	58,39	3355*	34,47
$3,0 \times 10^{-5}$ M	3362	20,03	2573*	43,68	3648*	58,07	3107*	34,07
$1,0 \times 10^{-4}$ M	3274	19,48	2381*	39,76	3354*	57,23	2799*	32,59
$3,0 \times 10^{-4}$ M	3162	17,69	2074*	32,59	2948*	51,34	2399	30,53
$1,0 \times 10^{-3}$ M	2979	17,43	1742*	24,04	2303*	41,53	1893	29,05
$3,0 \times 10^{-3}$ M	2682	16,57	1371	18,72	1504	25,74	1358	24,28

Valores (*) com diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo GER, a análise somente foi feita a partir da presença do geraniol, assim as concentrações 0,0 M e da contração foram retiradas da análise. Análise estatística realizada através de ANOVA one-way com pós teste de Dunnett, com $p < 0,05$.

Na avaliação do teste de diarreia induzida por óleo de rícino, fig. 11 A, verifica-se que as doses de 10, 50 e 400 mg/kg do GER sem está em sua nanoemulsão, apresentaram redução do efeito diarreico induzido pelo óleo de rícino.

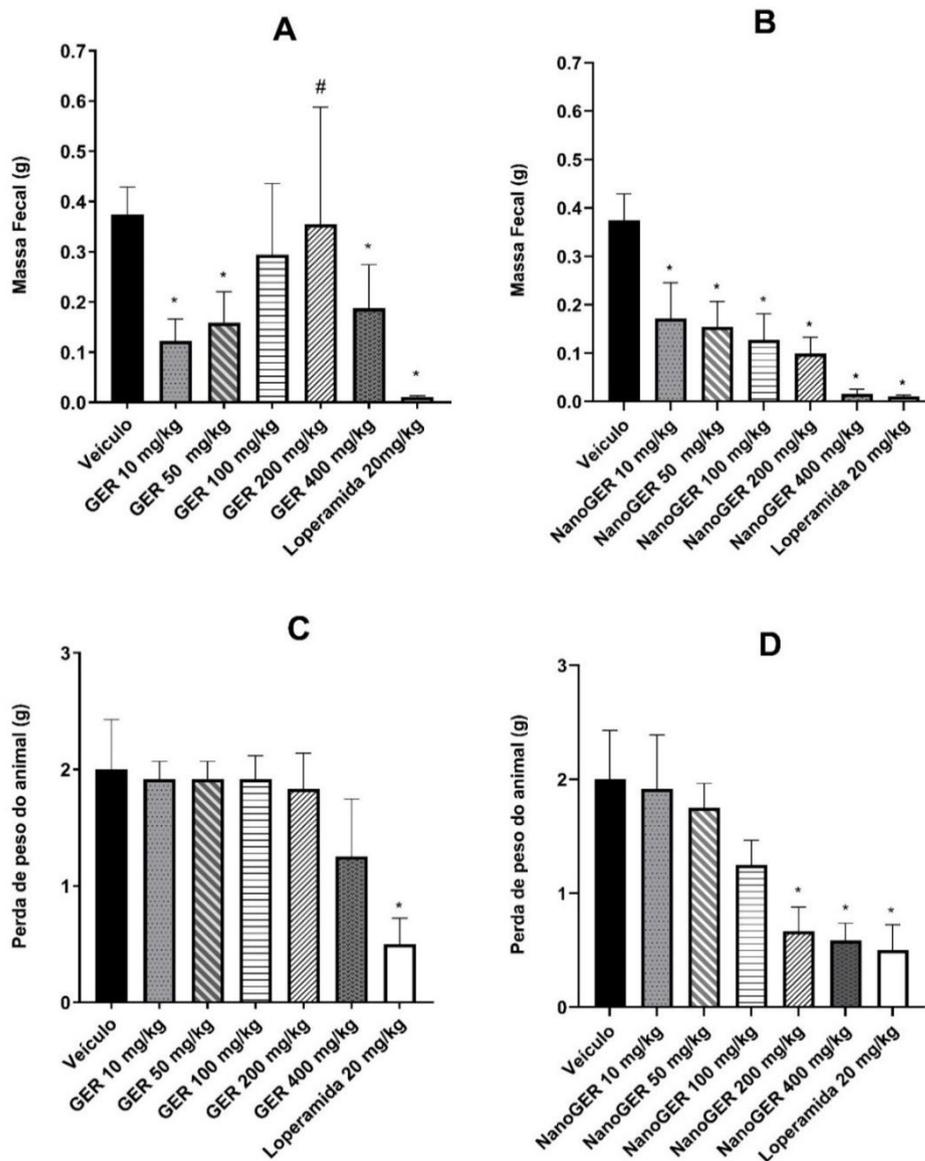


Figura 11 – Gráficos em coluna da comparação da atividade antidiarreica do geraniol e da nanoemulsão de geraniol, no teste de diarreia induzida por óleo de rícino. (A) Comparação da quantidade de massa fecal evacuada em grama (g), no teste usando o geraniol. (B) Comparação da quantidade de massa fecal evacuada em grama (g), no teste utilizando a nanoemulsão contendo geraniol. (C) grupo geraniol não nanoemulsionado, na avaliação de variação da massa corpórea dos animais, com peso perdido em gramas (g) após 4h de experimento, da administração de óleo de rícino. (D) grupo nanoemulsão contendo geraniol, na avaliação de variação da massa corpórea dos animais, com peso perdido em gramas (g). Gráficos em \pm SEM, em um período de 4h, na diarreia induzida por óleo de rícino, nas doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg do GER ou NanoGER F1. Com (n=6) por grupo, onde (#) corresponde a diferença estatisticamente significativa superior, quando comparados com o grupo veículo. (*) diferença estatisticamente

significativa inferior, quando comparado com o grupo salina $p < 0,05$ por ANOVA one-way, com pós teste de Dunnett.

Entretanto, com aumento da quantidade de fezes em (g) expelidas em 4h de experimento na dose de 200 mg/kg de GER como demonstrado na figura 11 A. Quando usada a nanoemulsão NanoGER F1 todas as doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg obtiveram efeito antidiarreico 11 B, comparado ao veículo, ficando evidente o aumento da atividade biológica do monoterpeno quando utilizado na sua forma de nanoemulsão. As formulações NanoGER F2 e NanoGER F3, não foram utilizadas pois não apresentaram como dito anteriormente aumento da potência do monoterpeno no óleo isolado de coabaia.

Quando usada a nanoemulsão NanoGER todas as doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg obtiveram efeito antidiarreico 11 B, comparado ao veículo, ficando evidente o aumento da atividade biológica do monoterpeno quando utilizado na sua forma de nanoemulsão. É ressaltada esse aumento da atividade uma vez que o GER não teve a capacidade de realizar a manutenção do peso animal figura 11 C, evitando assim a sua perda de peso em (g), durante a diarreia induzida por óleo de rícino em nenhuma das doses observadas, somente a loperamida 20 mg/kg. Quando utilizada a NanoGER F1, nas doses de 200 e 400 mg/kg, figura 11 C, se evitou a perda de peso animal comparado ao veículo, assim evidenciado que o GER possui efeito antidiarreico tal como a loperamida 20mg/kg.

Avaliando a influência do geraniol no aspecto das fezes expelidas durante a diarreia induzida com óleo de rícino, assim demonstrado na figura 12 A, somente a dose de 400 mg/kg de GER conseguiu reduzir o escore, tal como a loperamida quando comparado ao grupo veículo, sendo um dado importante pois quanto maior a eliminação de fezes e pior seu aspecto, maior será a perda de peso do indivíduo. Mesmo que a dose de 400 mg/kg de GER não tenha realizado de forma estatisticamente significativa a manutenção do peso dos camundongos como visto em 11 C.

Por outro lado, a NanoGER F1, melhorou a pontuação e o conseqüentemente o aspecto das fezes nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg tal como a loperamida, figura 12 B, o que corrobora os dados manutenção de peso animal das doses de 200 e 400 mg/kg da NanoGER F1, figura 11 D.

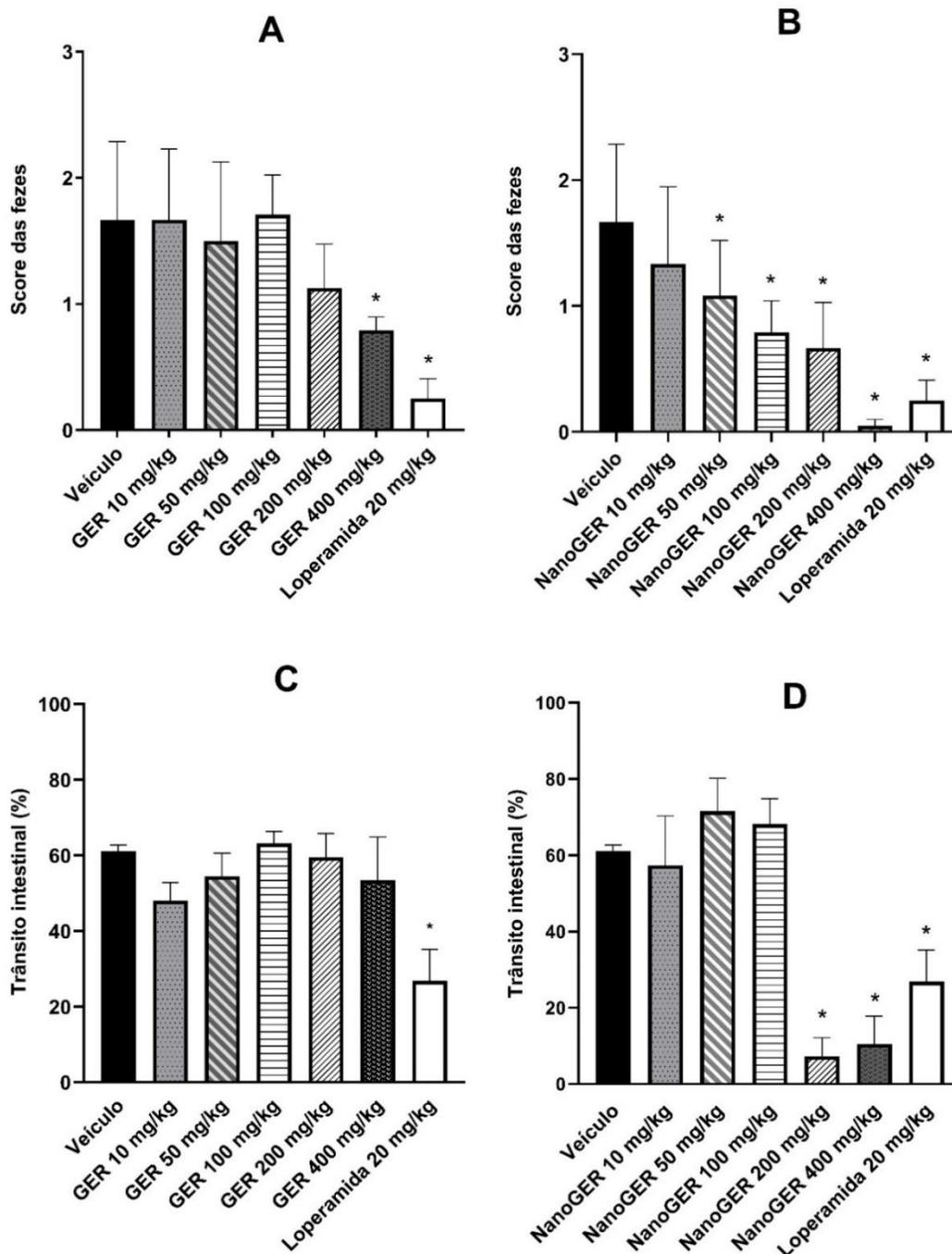


Figura 12 – Gráficos em coluna da comparação da atividade antidiarreica do geraniol e da nanoemulsão de geraniol. (A) Notas (score), 0 - ausência de diarreia, 1 - eliminação de fezes de aspecto úmido, 2 - eliminação de fezes de aspecto pastoso em pequena/moderada quantidade, 3 - eliminação de fezes de aspecto líquido ou pastoso em grande quantidade, para o aspecto das fezes durante as 4h de experimento, na diarreia induzida por óleo de rícino, comparando o efeito do geraniol. (B) Notas (score) para o aspecto das fezes durante as 4h de experimento, na diarreia induzida por óleo de rícino, quando utilizado a nanoemulsão contendo geraniol. A e B em um período de 4h, na diarreia induzida por óleo de rícino. (C) Grupo geraniol, com a distância percorrida pelo carvão aditivado em % no intestino dos camundongos. (D) Grupo nanoemulsão, com a distância percorrida pelo carvão aditivado em % no intestino dos camundongos. Gráficos em \pm SEM, nas doses de 10, 50, 100, 200 e 400 mg/kg do GER ou NanoGER F1. Com (n=6)

por grupo, onde (#) corresponde a diferença estatisticamente significativa superior, quando comparados com o grupo veículo. (*) diferença estatisticamente significativa inferior, quando comparado com o grupo salina $p < 0,05$ por ANOVA one-way, com pós teste de Dunnett.

Assim, um dos dados mais importantes é justamente conforme observado na figura 12 C, onde o GER não teve a capacidade em sua forma de monoterpene livre não nanoemulsionado, de reduzir a velocidade em que o carvão aditivado percorria o trato gastrointestinal em nenhuma dose, tal como não reduziu em nenhuma dose a perda de peso animal na 11 C. Todavia, a nanoemulsão NanoGER F1 nas doses de 200 e 400 mg/kg reduziram tal como a loperamida 20 mg/kg essa velocidade de trânsito gastrointestinal, figura 12 D, destacando a atividade antidiarreica da nanoemulsão nas doses de 200 e 400 mg/kg. Os resultados apontam que o geraniol na NanoGER F1, aumentou a atividade espasmolítica em todas as concentrações e também a antidiarreica do monoterpene principalmente nas doses de 200 e 400 mg/kg nos modelos de diarreia induzida por óleo de rícino, com a avaliação da variação de peso, escore para o aspecto das fezes e velocidade de trânsito gastrointestinal.

3. Discussão

Neste estudo fica evidente que o GER possui atividade espasmolítica e antidiarreica, e que foi potencializada com a NanoGER F1. As demais formulações não possuindo a mesma atividade, mesmo sendo preparadas nanoemulsões de geraniol utilizando o método de emulsificação espontânea como uma abordagem isotérmica, que são métodos de baixa energia que não utilizam qualquer equipamento especializado de homogeneização ou requerem aumento de temperatura para produzir gotículas finas, aplicada a compostos orgânicos voláteis e hidrofóbicos, com segurança sem perder compostos voláteis, ainda assim aumentar seu efeitos em diferentes sistemas, como observado nesse estudo, tendo em vista que a nanoemulsão NanoGER F1 aumentou a potência farmacológica do geraniol que era de $pEC_{50} = 4,75$ e $E_{max} = 40,23\%$ para a NanoGER F1 $pEC_{50} = 5,21$ e $E_{max} = 84,31\%$ do geraniol em óleo isolado de cobaia, tal como aumentou o efeito antidiarreico nas doses de 200 e 400 mg/kg (FENG, et al., 2022, KOMAIKO e MCCLEMENTS, 2016, LIMA, et al., 2021).

Outros estudos que realizaram a caracterização, revelaram que nanoemulsões contendo geraniol, pode ter tamanhos médios de gotículas variando de 68,22 nm a 232,3 nm, com baixos índices de polidispersidade indicando homogeneidade, além de boa estabilidade sob várias condições, incluindo armazenamento de longo prazo e estabilidade térmica (EKONOMOU, et al., 2022, PONTES, et al., 2023), nesse encontrado nesse estudo como já demonstrado nos resultados

gotículas com cerca de 49 nm. Foi observado que nas formulações F2 e F3, os resultados obtidos de índice de polidispersão foram melhores em comparação a formulação F1, o mecanismo atribuído à formação de gotículas de pequenas dimensões por emulsificação espontânea está diretamente ligado ao rápido deslocamento do(s) tensioativo(s) da fase orgânica para a fase aquosa. Posteriormente, ambas as fases entram em contato; esta mistura resulta na rápida difusão do(s) tensioativo(s) da fase orgânica para a fase aquosa, produzindo turbulência na interface óleo/água e a consequente formação de gotículas pequenas, assim o tipo do surfactante, como o monolaurato de sorbitano de polioxietileno-20 (SML-20), utilizado somente na formulação F1, pode ter influenciado diretamente nesses resultados observados. (CORDOVA-GONZALEZ e HEJAZI, 2024, LIMA et al., 2021, KAMAIOKO e MCCLEMENTS, 2016, KULLAPPAN, et al., 2023, XUE, et al., 2019).

O SML-20, um surfactante não iônico, presente apenas na NanoGER F1 que obteve os melhores resultados no íleo isolado de cobaia, desempenha um papel crucial na estabilização das nanoemulsões ao reduzir a tensão interfacial. Embora o foco esteja nas vantagens do SML-20 na formação de nanoemulsões estáveis, permanecem desafios em relação à estabilidade em longo prazo e à complexidade dos métodos de preparação, talvez métodos alternativos, como emulsificação por inversão de fase de baixa energia, também podem produzir nanoemulsões altamente homogêneas sem ampla entrada de energia (MAHFOUDHI, et al., 2016, KULLAPPAN, et al., 2023, PIRES, et al., 2023, SIMS, 2023, XUE, et al., 2019). A aplicação de nanoemulsões requer estudos de otimização para alcançar as melhores propriedades. Esta otimização é necessária não apenas em relação às variáveis de formulação, mas também em relação às variáveis de preparação (por exemplo, taxa de mistura ou taxa de adição) para obter as características desejadas. Esta dependência das características da nanoemulsão em variáveis de preparação é uma consequência direta de serem sistemas termodinamicamente instáveis (SOLANS e SOLÉ, 2012, WAKISAKA, et al., 2015).

As nanoemulsões normalmente exibem tamanhos de gotículas que variam de 50 a 200 nm, contribuindo para sua estabilidade cinética contra a separação gravitacional e floculação que ocorre justamente pela separação dos componentes O/W (KUMAR, et al., 2024, MUSTAFA, et al., 2024). Nesse estudo, os valores de tamanho de partícula < 50 nm para F1, e < 120 nm para F2 e F3, tal como valores de potencial zeta > 30 mV para F1 e F2, observados na tabela 2, demonstram a possível estabilidade dessas formulações e seu possível emprego biotecnológico, sobretudo para a F1 que apesar de ter dois tipos de população de gotículas, apresentou resultados promissores nos testes farmacológicos.

O NanoGER na formulação F1, no teste *in vitro* de contração por carbacol do íleo isolado de cobaia, teve diferença estatisticamente significativa quando comparado somente ao geraniol na sua forma não nanoemulsionada em todas as concentrações (figura 10), demonstrando assim o aumento da potência farmacológica necessitando de uma concentração menor do produto biotecnológico para alcançar o mesmo efeito, ou seja $pEC_{50} = 5,21$. Esses valores são muito promissores e corroboram os estudos já encontrados na literatura, demonstrando de forma preliminar em ensaios pré-clínicos que o GER pode ser desenvolvido em sistemas nanoemulsinados com potencial finalidade terapêutica (BALTA, *et al.*, 2017, CHEN, *et al.*, 2022, DEHGHANKAR, *et al.*, 2021, EKONOMOU, *et al.*, 2022, FENG, *et al.*, 2022, KAMOU, *et al.*, 2022, NEMODA, *et al.*, 2024, PONTES, *et al.*, 2023, SINGH, *et al.*, 2024). Estudos indicam que as formulações de geraniol exibem baixa citotoxicidade contra linhas celulares normais, tornando-as estratégias mais seguras para aplicações terapêuticas (LEI, *et al.*, 2019, PONTES, *et al.*, 2023).

O aumento da potência farmacológica do geraniol no modelo *in vitro* em íleo isolado de cobaia, ocorre possivelmente pela melhoria de sua biodisponibilidade e melhoria da entrega do fármaco a seu alvo farmacológico. Isso é particularmente relevante no contexto do íleo de cobaia, onde sistemas de entrega aprimorados podem facilitar uma melhor absorção e ação do geraniol. Segundo Feng, *et al.*, 2022, as nanoemulsões de geraniol exibem um tamanho médio de partícula de aproximadamente 90 nm, aumentando a solubilidade e a estabilidade em ambientes aquosos, o que é crucial para uma absorção gastrointestinal eficaz.

A espécie *Cymbopogon citratus*, que contém geraniol (37,1%) e *Cymbopogon palmarosa* (87,9%) (DANGOL, *et al.*, 2023) de composição fitoquímica em seu óleo essencial mostraram uma redução nas contrações do músculo liso de íleo isolado de cobaia, induzidas pela acetilcolina indicando potencial atividade espasmolítica, essa atividade espasmolítica da *C. palmarosa* possivelmente relacionada a modulação dos canais de cálcio (MANS, *et al.*, 2004). Outras espécies contendo geraniol é a *Lippia alba*, (20% de geraniol) também apresentando atividade espasmolítica relacionado a canais de cálcio e canais para potássio, assim justificando uma possível via do mecanismo de ação da atividade espasmolítica observada e potencializada pela NanoGER F1 (CABALLERO-GALLARDO, *et al.*, 2022, OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Apesar da grande maioria dos estudos encontrados na literatura envolvendo GER em sistemas de nanoemulsão, correspondam a testes antimicrobianos, com atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antineoplásica (CHAUDHURI, *et al.*, 2024, SOMALA, *et al.*, 2023), espécies contendo o GER em sua composição fitoquímica apresentam atividade antidiarreica como *C.*

winterianus, *C. nardus*, *C. citratus* e *C. martini*, (BANSAL, et al., 2022, ZHAO, et al., 2024) e *Pelargonium graveolens*, (GEVRENOVA, et al., 2024).

Os resultados demonstraram um aumento da atividade do GER quando incorporado nanoemulsão nos testes *in vivo*, com atividade antidiarreica e evitando a perda de peso do animal, nas doses de 200 e 400 mg/kg principalmente, resultados semelhantes foram encontrados por Medicherla et al., 2015 e Fazio et al., 2016, onde o pré-tratamento com geraniol melhorou a consistência das fezes (sem sangue oculto), aumentou o comprimento do cólon. Além disso os níveis de citocinas pró-inflamatórias, especificamente TNF- α , IL-1 β e IL-6 e a atividade da mieloperoxidase no tecido do cólon foram significativamente diminuídas em camundongos pré-tratados com GER.

Nas mesmas doses, de 200 e 400 mg/kg NanoGER F1, observamos efeito semelhante a loperamida 20 mg/kg uma redução da velocidade de trânsito gastrointestinal. A espécie vegetal *C. citratus*, a atividade espasmolítica tornou-se evidente devido aos seus efeitos inibitórios sobre as contrações do músculo liso induzidas por acetilcolina e histamina. Esse perfil farmacológico está alinhado com os resultados observados para o extrato de *C. citratus*, no estudo de Mans *et al.*, 2004, que demonstrou efeito antidiarreico em modelos animais. Isso inclui a redução da diarreia induzida por óleo de rícino em ratos também observada por Sadraei *et al.*, 2003 com a *Melissa officinalis* (GER 10%), a diminuição do trânsito intestinal de uma refeição marcada com carvão vegetal em camundongos e a redução dos escores de defecação em ratos.

Essa redução da diarreia pode está relacionada possivelmente com uma redução da motilidade instestinal, tendo em vista seu efeito espasmolítico, ou mesmo uma atividade anti-inflamatória ou mesmo de redução da secreção de líquido intestinal. Assim o geraniol pode ser um fármaco potencial, em sua forma de nanoemulsão para o tratamento de distúrbios de motilidade intestinal e diarreia.

4. Conclusão

A formulação F1, apesar de ter um índice de PDI maior conseguiu obter menores tamanhos de gotículas e melhor pontencial potencial zeta (ζ) apresentando os melhores resultados espasmolíticos em íleo isolado de cobaia melhorando a potência do GER e em *in vivo*, assim a NanoGER F1 aumentou a atividade antidiarreica, no aspecto das fezes, evitando a perda de peso do animal e uma maior redução da velocidade de trânsito gastrointestinal semelhante a loperamida, nas doses de NanoGER F1 200 e 400 mg/kg. Dessa maneira, nas formulações testadas fica evidente

a influência do tipo de formulação e surfactante escolhido para a obtenção de tamanhos de gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta apropriados sobre o ponto de vista, da aplicabilidade e efeito biológico. Assim, para verificar o uso do geraniol como possível medicamento para diarreica e cólica intestinal, outros testes precisam ser feitos, afim de avaliar a toxicidade da nanoemulsão.

REFERÊNCIAS

1. BALTA, Igori, et al. Geraniol and Linalool Loaded Nanoemulsions and Their Antimicrobial Activity. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, vol. 74, no. 2, Nov. 2017, p. 157, <https://doi.org/10.15835/BUASVMCN-ASB:0025>.
2. BANSAL, Hina et al. Bioactivity assessment of essential oils of *Cymbopogon* species using a network pharmacology approach. *Biologia futura* vol. 73,1 (2022): 107-118. <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00111-w>
3. CHAUDHURI, Angsuman Das, et al. Advances in Nanotechnology-Enhanced Delivery Systems of Geraniol: A Promising Future in Cancer Therapeutics. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, Oct. 2024, pp. 1877–89, <https://doi.org/10.38124/ijisrt/ijisrt24sep1121>.
4. CHEN, W. VILJOEN, A. M. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, Volume 76, Issue 4, 2010, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
5. CHEN, W. VILJOEN, A. M. Geraniol — A review update, *South African Journal of Botany*, Volume 150, 2022, Pages 1205-1219, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.012>.
6. CORDOVA-GONZALEZ, Mario, and S. Hossein HEJAZI. Integrating Phase Change Materials and Spontaneous Emulsification: In-Situ Particle Formation at Oil-Water Interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, June 2024, p. 134439, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.134439>.
7. DANGOL, Sabita, et al. “Essential Oil Composition Analysis of *Cymbopogon* Species from Eastern Nepal by GC-MS and Chiral GC-MS, and Antimicrobial Activity of Some Major Compounds.” *Molecules*, vol. 28, no. 2, Jan. 2023, p. 543, <https://doi.org/10.3390/molecules28020543>.
8. DE FAZIO, Luigia, et al. “Dietary Geraniol by Oral or Enema Administration Strongly Reduces Dysbiosis and Systemic Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice.” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 7, Mar. 2016, p. 38, <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2016.00038>.
9. DEHGHANKAR, Maryam et al. Bioactivities of rose-scented geranium nanoemulsions against the larvae of *Anopheles stephensi* and their gut bacteria. *PloS one* vol. 16,2 e0246470. 8 Feb. 2021, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246470>
10. EKONOMOU, Sotirios I., et al. Development of Geraniol-Loaded Liposomal Nanoformulations against *Salmonella* Colonization in the Pig Gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 70, no. 23, June 2022, pp. 7004–14, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00910>.
11. FENG, Xiaolin et al. Preparation and characterization of geraniol nanoemulsions and its antibacterial activity. *Frontiers in microbiology* vol. 13 1080300. 29 Nov. 2022, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1080300>

12. CABALLERO-GALLARDO, Karina et al. Chemical Composition, Repellent Action, and Toxicity of Essential Oils from *Lippia origanoide*, *Lippia. alba* Chemotypes, and *Pogostemon cablin* on Adults of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insects* vol. 14,1 41. 31 Dec. 2022, <http://doi:10.3390/insects14010041>
13. GEVRENOVA, Reneta et al. “*Pelargonium graveolens*: Towards In-Depth Metabolite Profiling, Antioxidant and Enzyme-Inhibitory Potential.” *Plants (Basel, Switzerland)* vol. 13,18 2612. 19 Sep. 2024, <https://doi:10.3390/plants13182612>
14. GILANNI, A. H. et al. Presence of antispasmodic, antidiarrheal, antisecretory, calcium antagonist and acetylcholinesterase inhibitory steroidal alkaloids in *Sarcococca saligna*. *Planta Medica*, v. 71, p. 120-125, 2005.
15. KAMOU, Nathalie N et al. Impact of Geraniol and Geraniol Nanoemulsions on *Botrytis cinerea* and Effect of Geraniol on Cucumber Plants' Metabolic Profile Analyzed by LC-QTOF-MS. *Plants (Basel, Switzerland)* vol. 11,19 2513. 26 Sep. 2022, <https://doi:10.3390/plants11192513>
16. LEI, Yu et al. “Pharmacological Properties of Geraniol - A Review.” *Planta medica* vol. 85,1, 2019: 48-55. doi:10.1055/a-0750-6907 <https://doi.org/10.1055/a-0750-6907>.
17. LIMA, Tayonara S et al. Cineole-containing nanoemulsion: Development, stability, and antibacterial activity. *Chemistry and physics of lipids* vol. 239, 2021: 105113. <https://doi:10.1016/j.chemphyslip.2021.105113>
18. KADUKKATTIL RAMANUNNY, Arya et al. Overcoming hydrolytic degradation challenges in topical delivery: non-aqueous nano-emulsions. *Expert opinion on drug delivery* vol. 19,1, 2022: 23-45. <https://doi:10.1080/17425247.2022.2019218>
19. KAMOU, Nathalie N., et al. Impact of Geraniol and Geraniol Nanoemulsions on *Botrytis Cinerea* and Effect of Geraniol on Cucumber Plants' Metabolic Profile Analyzed by LC-QTOF-MS. *Plants*, vol. 11, no. 19, Sept. 2022, p. 2513, <https://doi.org/10.3390/plants11192513>.
20. KARIM, Ahmed et al. Effect of essential oil of *Anthemis mauritiana* Maire & Sennen flowers on intestinal smooth muscle contractility. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi* vol. 46,1 2010: 65-75. <https://doi:10.1540/jsmr.46.65>
21. KOMAIKO, Jennifer S, e David Julian MCCLEMENTS. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Comprehensive reviews in food science and food safety* vol. 15,2, 2016: 331-352. <https://doi:10.1111/1541-4337.12189>
22. KULLAPPAN, Monicka et al. Spontaneous Emulsification: Elucidation of the Local Processes. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* vol. 39,47 (2023): 16892-16903. <https://doi:10.1021/acs.langmuir.3c02582>
23. KUMAR, Mohit, et al. Revolutionizing Nanomedicine: Expanding Horizons of Nanoemulsions in Drug Delivery and Beyond. *Journal of Dispersion Science and Technology*, June 2024, pp. 1–26, <https://doi.org/10.1080/01932691.2024.2369835>.
24. MAHFOUDHI, Nesrine, et al. *Nanoemulsions as Potential Delivery Systems for Bioactive*

- Compounds in Food Systems: Preparation, Characterization, and Applications in Food Industry*. Academic Press, 2016, pp. 365–403, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804306-6.00011-8>.
25. MANS, Dennis R. A., et al. Assessment of Eight Popularly Used Plant-Derived Preparations for Their Spasmolytic Potential Using the Isolated Guinea Pig Ileum. *Pharmaceutical Biology*, vol. 42, no. 6, Jan. 2004, pp. 422–29, <https://doi.org/10.1080/13880200490886012>.
 26. MEDICHERLA, Kanakaraju, et al. Oral Administration of Geraniol Ameliorates Acute Experimental Murine Colitis by Inhibiting Pro-Inflammatory Cytokines and NF- κ B Signaling. *Food & Function*, vol. 6, no. 9, Sept. 2015, pp. 2984–95, <https://doi.org/10.1039/C5FO00405E>.
 27. MUSTAFA, Muhammad Abid, et al. Formulation Techniques, Characterization of Nanoemulsion and Their Pharmaceutical Applications: A Comprehensive Technical Review. *Journal of Pharmaceutical Research International*, Feb. 2024, <https://doi.org/10.9734/jpri/2024/v36i27498>.
 28. NEMODA, Milica, et al. Geraniol in vitro and geraniol-based emulsion ex vivo potential against four-species *Streptococcus* spp. biofilm relevant for dentistry, *Industrial Crops and Products*. Volume 222, Part 3, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119827>.
 29. OLIVEIRA, Gislaíne Alves de, et al. A Atividade Espasmolítica Do Óleo Essencial Obtido de *Lippia Microphylla* Cham. (Verbenaceae) é Mediada Pela Modulação Da Sinalização Do Cálcio Em Modelos Animais e Celulares. *Research, Society and Development*, vol. 10, no. 7, June 2021, <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I7.16060>.
 30. PANDEY, Parijat et al. Nanoemulsion: A Novel Drug Delivery Approach for Enhancement of Bioavailability. *Recent patents on nanotechnology* vol. 14,4, 2020: 276-293. <https://doi:10.2174/1872210514666200604145755>
 31. PIRES, Patrícia C et al. Innovative Aqueous Nanoemulsion Prepared by Phase Inversion Emulsification with Exceptional Homogeneity. *Pharmaceutics* vol. 15,7 1878. 4 Jul. 2023, <https://doi:10.3390/pharmaceutics15071878>
 32. PONTES, Cristiano Silva, et al. Improving Drug Delivery on *Candida Albicans* Using Geraniol Nanoemulsion. *Pharmaceutics*, Oct. 2023, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102475>.
 33. ROCCA, Viviana et al. Geraniol Induces Antinociceptive Effect in Mice Evaluated in Behavioural and Electrophysiological Models. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* vol. 120,1, 2017: 22-29. <https://doi:10.1111/bcpt.12630>
 34. SADRAEI, H et al. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia* vol. 74,5 (2003): 445-52. [https://doi:10.1016/s0367-326x\(03\)00109-6](https://doi:10.1016/s0367-326x(03)00109-6)
 35. SIMS, Jennifer S. Innovative Aqueous Nanoemulsion Prepared by Phase Inversion Emulsification with Exceptional Homogeneity. *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 7, July 2023, p. 1878, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071878>.

36. SINGH, Shiva et al. Unlocking the therapeutic potential of Geraniol: an alternative perspective for metabolic disease management. *Inflammopharmacology* vol. 32,6, 2024: 3653-3668. <https://doi:10.1007/s10787-024-01582-0>
37. SITHOLE, Mduduzi N et al. Development and characterization of nano-emulsions and nano-emulgels for transdermal delivery of statins. *Expert opinion on drug delivery* vol. 18,6, 2021: 789-801. <https://doi:10.1080/17425247.2021.1867533>
38. SOLANS, C., SOLÉ, I., Nano-emulsions: Formation by low-energy methods, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.07.003>, 2012.
39. SOMALA, Naphat et al. Citronella essential oil-based nanoemulsion as a post-emergence natural herbicide. *Scientific reports* vol. 13,1 20851. 27 Nov. 2023, <https://doi:10.1038/s41598-023-48328-6>
40. VENZON, Larissa et al. Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* vol. 98, 2018: 118-124. <https://doi:10.1016/j.biopha.2017.12.020>
41. WANG, Xinyue et al. Updated insight into the characterization of nano-emulsions. *Expert opinion on drug delivery* vol. 20,1, 2023: 93-114. <https://doi:10.1080/17425247.2023.2154075>
42. WAKISAKA, Satoshi et al. O/W nano-emulsion formation using an isothermal low-energy emulsification method in a mixture of polyglycerol polyricinoleate and hexaglycerol monolaurate with glycerol system. *Journal of oleo science* vol. 64,4 (2015): 405-13. <https://doi:10.5650/jos.ess14229>
43. XUE, Yan et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan scaffolds combined with simvastatin-loaded nanoparticles for guided bone regeneration. *Journal of materials science. Materials in medicine* vol. 30,4 47. 12 Apr. 2019, <https://doi:10.1007/s10856-019-6249-3>
44. ZHAO, Jiaqi et al. Ethnobotanical uses, phytochemistry and bioactivities of *Cymbopogon* plants: A review. *Journal of ethnopharmacology* vol. 330 (2024): 118181. <https://doi:10.1016/j.jep.2024.118181>

CAPÍTULO 3

Avaliação farmacológica *in vivo* do geraniol em traqueia isolada de cobaia e *in vivo* em modelo de tosse em camundongos e toxicologia do geraniol.**RESUMO**

O geraniol (GER) é um monoterpeneo presente em óleos essenciais de diversas plantas aromáticas, com propriedades farmacológicas descritas, como anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana e antiasmáticas. Assim esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos espasmolíticos e antitussígenos do GER em modelos experimentais *in vitro* em traqueia isolada de cobaia e *in vivo* em modelo de tosse induzida por ácido cítrico, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg de GER, além de investigar sua toxicidade subaguda, nas doses de 100, 200, 400 e 2000 mg/kg. Para análise espasmolítica, utilizou-se traqueia isolada de cobaia submetida a contrações com carbacol (CCh) 1 μ M. O GER foi administrado de forma cumulativa ($1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M). Os resultados demonstraram ausência de efeito relaxante do GER sobre as contrações induzidas, não sendo observada atividade espasmolítica em nenhuma das concentrações testadas. Por outro lado, no modelo de tosse induzida por nebulização com ácido cítrico 0,4 M, o GER apresentou atividade antitussígena significativa. Nas doses de 100 e 200 mg/kg, reduziu o número de tosses de forma comparável à codeína, com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. Na avaliação de toxicidade subaguda, nenhum animal apresentou sinais clínicos de toxicidade ou morte ao longo de 14 dias. Entretanto, não foi possível realizar a análise histopatológica por limitações operacionais. Conclui-se que o GER não apresenta ação espasmolítica em traqueia isolada de cobaia, mas demonstra potencial antitussígeno promissor, com bom perfil de segurança preliminar. Estudos futuros são necessários para elucidar o mecanismo de ação envolvido na inibição da tosse, bem como avaliar aspectos farmacocinéticos e toxicológicos mais aprofundados.

Palavras-chave: Traqueia. Tosse. Geraniol. Espasmolítico. Cobaia.

ABSTRACT

Geraniol (GER) is a monoterpene found in the essential oils of various aromatic plants, with pharmacological properties such as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and antiasthmatic. The aim of this study was to evaluate the spasmolytic and antitussive effects of GER in experimental models *in vitro* in isolated guinea pig trachea and *in vivo* in a citric acid-induced cough model, at doses of 100, 200 and 400 mg/kg of GER, as well as investigating its subacute toxicity at doses of 100, 200, 400 and 2000 mg/kg. For spasmolytic analysis, trachea isolated from guinea pigs submitted to contractions with carbachol (CCh) 1 μ M was used. GER was administered cumulatively (1.0×10^{-7} to 3.0×10^{-3} M). The results showed no relaxing effect of GER on the induced contractions, and no spasmolytic activity was observed at any of the concentrations tested. On the other hand, in the model of cough induced by nebulization with 0.4 M citric acid, GER showed significant antitussive activity. At doses of 100 and 200 mg/kg, it reduced the number of coughs in a way comparable to codeine, with a statistically significant difference compared to the control group. In the subacute toxicity assessment, no animal showed clinical signs of toxicity or death over 14 days. However, it was not possible to carry out a histopathological analysis due to operational limitations. It is concluded that GER does not show spasmolytic action in isolated guinea pig trachea, but it does show promising antitussive potential, with a good preliminary safety profile. Future studies are needed to elucidate the mechanism of action involved in cough inhibition, as well as to evaluate pharmacokinetic and toxicological aspects in greater depth.

Keywords: Trachea. Spasmolytic. Guinea pig. Geraniol. Cough.

1. Introdução

Doenças respiratórias representam um importante problema de saúde pública mundial, sendo responsáveis por elevada morbidade e impacto socioeconômico. Dentre os principais sintomas relacionados a essas condições, destacam-se a tosse e o broncoespasmo, que comprometem significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Embora existam medicamentos sintéticos eficazes no controle desses sintomas, muitos apresentam efeitos colaterais indesejáveis, como sonolência, constipação e risco de dependência, especialmente no caso de antitussígenos opióides como a codeína. Esse cenário tem impulsionado a busca por novas estratégias terapêuticas provenientes de fontes naturais, com melhor perfil de segurança e eficácia (OSARODION, 2020, PATEL, 2022, WISNIVESKY e de-TORRES, 2019).

O geraniol (GER) é um monoterpene acíclico presente em óleos essenciais de diversas plantas aromáticas, como *Cymbopogon martinii*, *Rosa spp.* e *Pelargonium graveolens*. Diversos estudos têm demonstrado que o GER possui propriedades farmacológicas relevantes, incluindo atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena (DUDHAREJIYA, 2024, SÁ, *et al.*, 2021). Contudo, seus possíveis efeitos sobre o sistema respiratório ainda são pouco explorados, principalmente no que se refere à sua ação sobre a musculatura lisa das vias aéreas e ao reflexo da tosse.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade espasmolítica e antitussígena do geraniol, utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Para a avaliação do efeito espasmolítico, foram utilizadas preparações de traqueia isolada de cobaia, enquanto a atividade antitussígena foi investigada por meio do modelo de tosse induzida por nebulização com ácido cítrico em camundongos. Além disso, foi realizada uma avaliação preliminar de toxicidade subaguda com o objetivo de investigar a segurança do composto em doses terapêuticas. Com este estudo, pretende-se contribuir para o conhecimento farmacológico do geraniol e sua possível aplicação no tratamento de distúrbios respiratórios.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O monoterpeno geraniol adquirido comercialmente, com propriedades físico-químicas de 154,25 g/mol, 229-230 C (lit) bp, solubilidade de 0,879 g/mL a 20 °C sendo (0,1 g/L a sua solubilidade em água 25 C), levando em consideração essas informações disponíveis na *National Center for Biotechnology Information*, e informações do fabricante o monoterpeno foi solubilizado em água destilada com cremofor 3% para os testes *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Animais

Foram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) machos pesando entre 300 e 500 g, aproveitados dos testes em íleo isolado, e camundongos albinos machos Swiss (*Mus musculus*) de pesando entre 25 e 35 g, todos procedentes do Biotério Central da UNIVASF. Os animais foram mantidos pelo Biotério Central da UNIVASF com ciclo claro e escuro de 12 horas, e água e ração *ad libitum*, entrando em períodos de jejum de 18 horas ou 24 horas apenas antes dos experimentos. Todos os protocolos experimentais que já estão em execução respeitam os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF) e aprovado pelo número 0005/270320.

2.3 Avaliação da atividade espasmolítica em músculo liso de traqueia isolada de cobaia

As cobaias foram eutanasiadas por injeção letal por tiopental 150 mg/kg por via intraperitoneal, os animais que foram utilizados para os experimentos com íleo foram também aproveitados e 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 serão deixados em repouso por 60 minutos, sob uma tensão de 1 g a 37°C e aeração constante com mistura carbogênica, sendo a solução de Krebs substituída a cada 15 minutos. Após o período de estabilização uma primeira contração será induzida pela adição à cuba de 1 µM de carbacol (CCh), sendo a solução nutritiva do órgão substituída após atingir a contração máxima e após 15 minutos de repouso. Após o tecido estar estabilizado, uma segunda contração será induzida com 1 µM de carbacol e durante o componente tônico dessa será adicionada

individualmente o geraniol, de maneira cumulativa e em concentrações crescentes $1,0 \times 10^{-7}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ M. Os relaxamentos foram expressos como a percentagem reversa da tensão máxima obtida pela adição de carbacol à cuba, onde o relaxamento máximo será obtido quando a tensão registrada for reduzida aos níveis basais.

2.4 Avaliação da atividade antitussígena em camundongos

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 durante um período de 3 (três) minutos. Durante este tempo, dois parâmetros foram avaliados: latência da tosse – período do início da exposição ao ácido cítrico até o aparecimento da primeira tosse; frequência de tosse – número de tosses que o animal exhibe. Onde a tosse é caracterizada por um reflexo e por contração abdominal com a abertura da boca, os quais foram registrados. Os grupos (n=6) animais, cada grupo foi dividido como controle positivo (CP) com administração de Codeína (30 mg/kg – via oral); controle negativo (CN) com administração do veículo (NaCl 0,9% ou DMSO, etc); três grupos separados para administração das doses 100, 200 e 400 mg/kg do geraniol. Após 23 horas e 30 minutos da primeira exposição ao ácido cítrico 0,4 M, os animais foram tratados nos respectivos grupos e, passados mais 30 minutos, passaram por uma segunda exposição à solução tussígena já descrita, sendo observadas as variáveis latência e frequência de tosse.

2.5 Toxicidade sub-aguda

Os animais (n = 6) foram submetidos a administração por via gavagem de soro fisiológico 0,2 mL e geraniol na dose de 100, 200, 400 e 2000 mg/kg, nos primeiros 30 minutos, a cada 24h diariamente durante 14 dias, também sendo pesados para acompanhar o peso do animal. Os animais foram observados para a verificação da ocorrência de mortes e sinais de toxicidade, principalmente ações estimulantes ou depressoras do sistema nervoso central. Ao final dos 14 dias,

os animais foram eutanasiados por via intraperitoneal (i.p) com tiopental 180mg/kg via intraperitoneal, e o fígado foi retirado e pesado e colocado em formaldeído 10% tamponado e após 24h em álcool 70% durante 24h e emblocado em parafina.

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos do Windaq exportados para o Excel e foram desenhados em gráficos no Graph-Pad Prism[®] versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA), permitiram a análise da área sobre a curva (AUC). resultados de área sobre a curva (AUC) obtidos foram expressos como S.E.M e analisados estatisticamente por teste t de Student, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados os significantes. Os valores de pEC₅₀ (concentração do monoterpeno que produz uma resposta igual a 50% do seu efeito máximo) foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos. Nos testes *in vivo*, foi utilizado ANOVA one-way, com pós teste de Dunnett. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Graph-Pad Prism[®] versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

3. Resultados

Nos resultados observados, o GER não apresentou atividade espasmolítica em traqueia isolada de cobaia nas contrações induzidas por carbacol 1 μ M, em nenhuma concentração utilizada, segundo a figura 13.

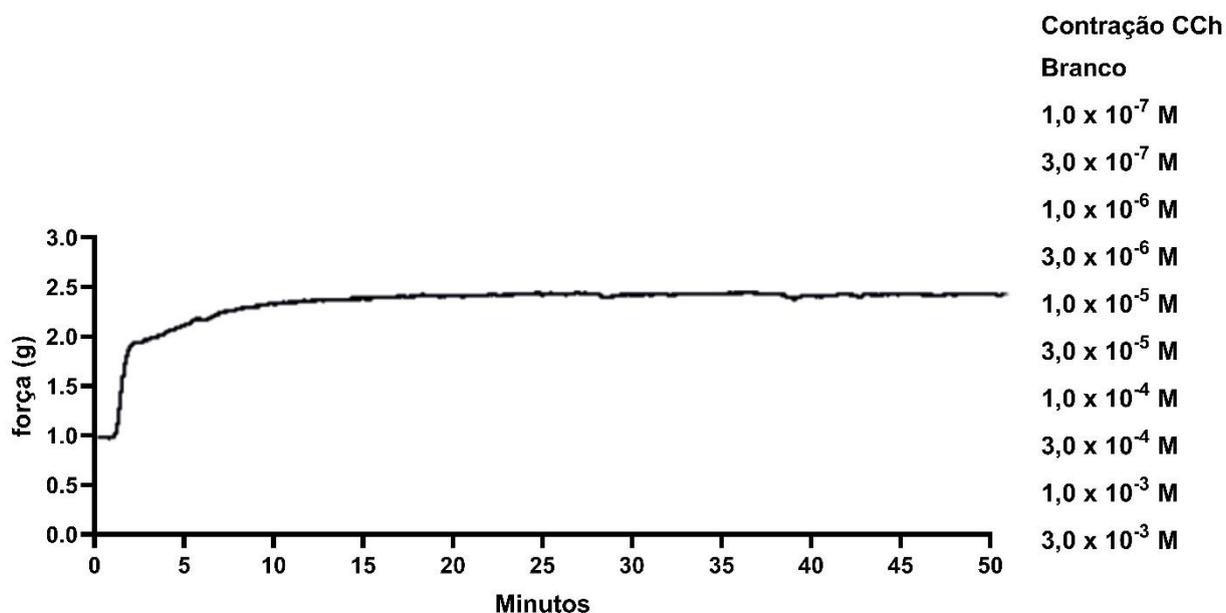


Figura 13. Experimento original do GER nas contrações induzidas por carbacol 1 μ M, em traqueia isolada de cobaia,

registro original do experimento e cumulativa de $1,0 \times 10^{-7}$ até $3,0 \times 10^{-3}$ M. Valores dos $n=5$ sobrepostos, expressos com \pm SEM do experimento real obtido a partir do Windaq. Gráfico desenhado no Prisma, a partir dos dados brutos do Windaq convertidos para Excel. Essa estratégia foi útil para obtenção da AUC. O eixo (y) do gráfico demonstra a força em (g) da traqueia isolada, o eixo (x) é o tempo em segundos de experimento, cada segundo gera um dado de (g) força que foram agrupados.

Como não foi apresentado resultados espasmolíticos, não foi avaliado vias de mecanismo de ação. Na figura 14, observamos a ausência de relaxamento da traqueia isolada de cobaia.

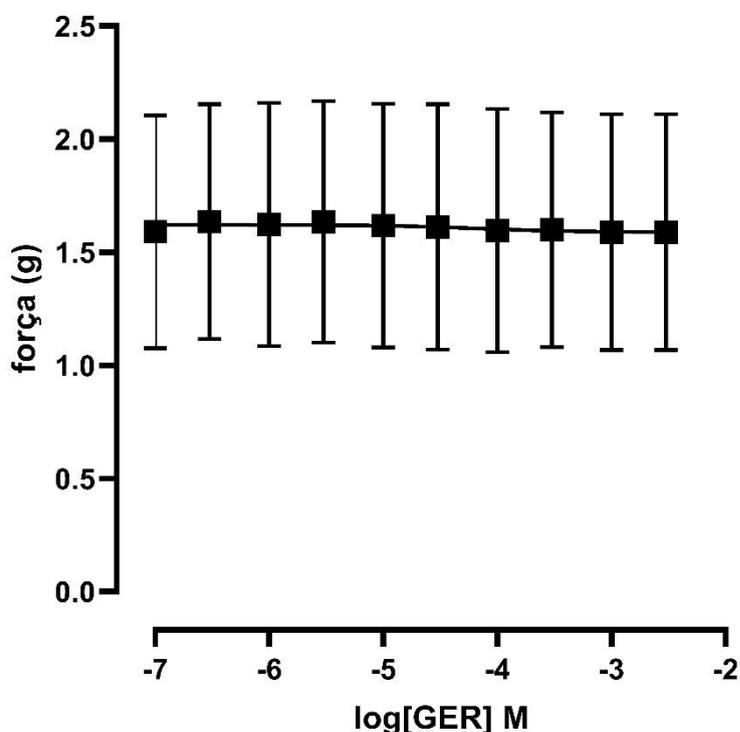


Figura 14 - Gráfico da regressão linear da força da contração da traqueia de cobaia com contração com CCh $1 \mu\text{M}$, com a adição cumulativa do geraniol (GER) $1,0 \times 10^{-7}$ M a $3,0 \times 10^{-3}$ M.

Os resultados expressos na figura 15, demonstram que apesar de o geraniol apesar de não apresentar atividade espasmolítica, apresentou somente no experimento de tosse na figura 15 D, redução do número de tosses semelhante a codeína. Nas doses de 100 e 200 mg/kg, com diferença estatisticamente significativa quando comparados com ANOVA com pós-teste de tukey, quando comparado com o veículo. Esses resultados evidenciam uma possível atividade antitussígena, mas que precisa ser melhor investigada em outros estudos posteriores.

Na avaliação sobre a toxicidade nenhum animal morreu durante a avaliação de 14 dias, ou nenhum sinal aparente de toxicidade foi verificado. Infelizmente não foi possível realizar em

tempo viável a análise histopatológica das lâminas por questões operacionais no processamento dos órgãos dos n=6 usados para o teste de toxicidade sub-aguda.

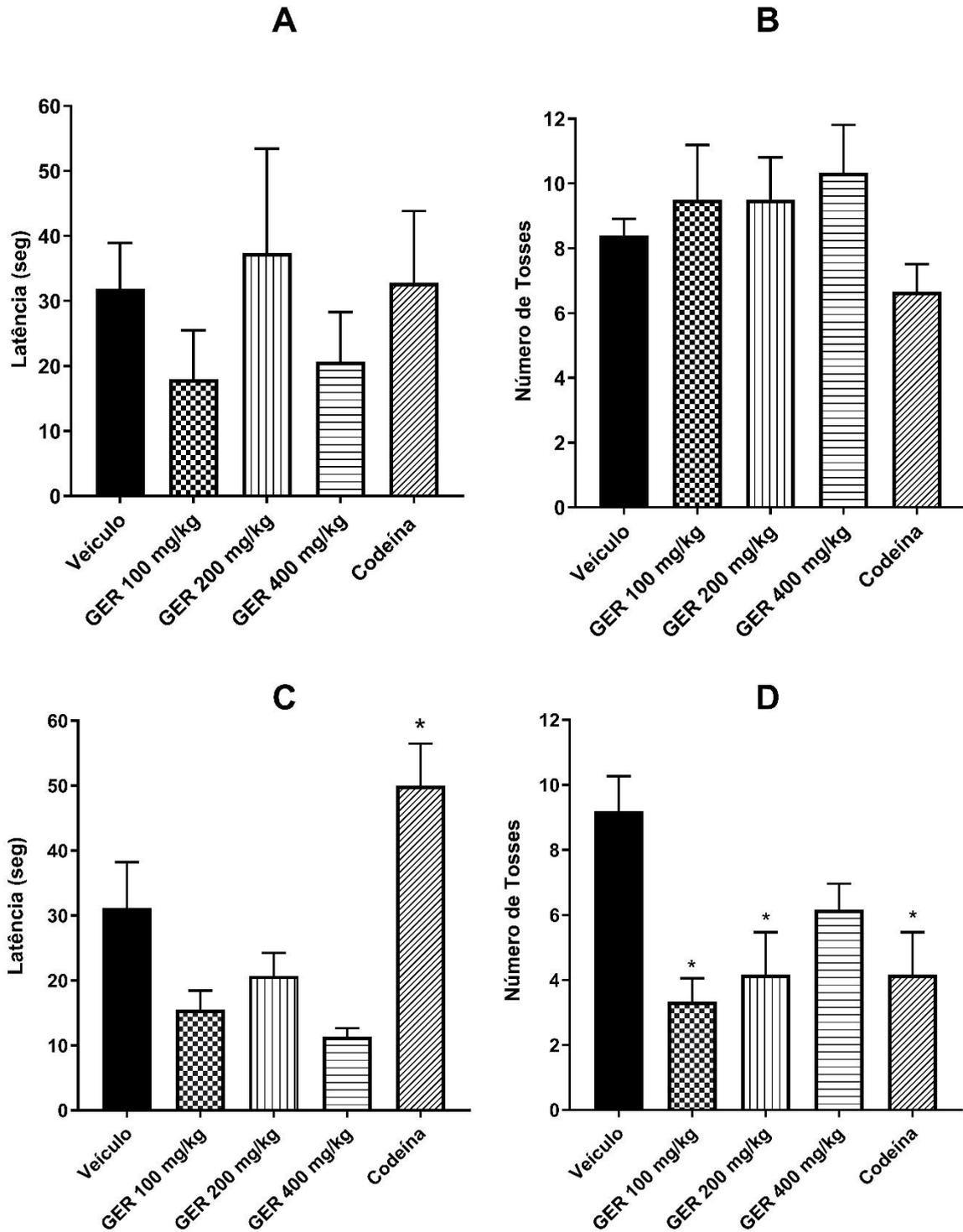


Figura 15 – Protocolo de tosse, os animais foram avaliados em 24 h, a nebulização com ácido cítrico 0,4 M, na triagem e após de 23h e 30 minutos no teste, por 3 minutos. (A) Avaliação durante a triagem do tempo de latência em segundos

para o início da primeira tosse. (B) Número de tosses durante os 3 minutos de avaliação durante a triagem. (C) Avaliação do tempo de latência em segundos para o início da primeira tosse durante o teste. (D) Número de tosses durante os 3 minutos de avaliação durante o teste. (*) $p < 0,05$ com diferença estatisticamente significativa comparada com o veículo, com ANOVA com pós-teste de Dunnett.

4. Discussão

O presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos espasmolíticos e antitussígenos do geraniol (GER), um monoterpene encontrado em óleos essenciais de diversas plantas aromáticas, com potencial farmacológico já demonstrado em outros modelos biológicos (LEI, et al., 2019, KUMAR, 2015, OSHIMA e ITO, 2021). No entanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que o GER não apresentou atividade espasmolítica sobre a musculatura lisa da traqueia isolada de cobaia, nas condições testadas. A ausência de efeito relaxante sobre as contrações induzidas por carbacol 1 μM foi evidenciada, mesmo após adição cumulativa de GER nas faixas testadas. Contudo, o GER apresentou efeito antitussígeno nas doses de 100 e 200 mg/kg e ausência de mortes dos animais durante os 14 dias de avaliação da toxicidade.

Não foi observada nenhuma redução significativa na força de contração da traqueia isolada, sugerindo que o GER não interfere nas vias contráteis dependentes de receptores muscarínicos ativados pelo CCh. A figura 14 reforça essa observação por meio da ausência de tendência à regressão da força de contração frente às concentrações testadas de GER, o que corrobora a falta de atividade espasmolítica, esse resultado ainda não foi relatado na literatura. Considerando esses resultados, optou-se por não prosseguir com a investigação de mecanismos de ação espasmolíticos, uma vez que o primeiro critério essencial, ou seja a observação de relaxamento das contrações induzidas não foi atendido. Isso difere de outros compostos naturais com estrutura química semelhante ao GER que, em estudos anteriores (LEI, et al., 2019, KUMAR, 2015, OSHIMA e ITO, 2021), demonstraram efeitos broncodilatadores ou moduladores de canais de cálcio em modelos semelhantes.

Essa divergência pode estar relacionada à especificidade estrutural do GER, sua interação com alvos moleculares, ou até mesmo à biodisponibilidade local em tecidos isolados. Outro fator importante a considerar é que, como trata-se de um modelo *in vitro*, a ausência de metabolismo hepático e sistêmico pode interferir nos resultados, visto que possíveis metabólitos ativos do GER não estariam presentes (DWIVEDI, et al., 2023, HUSSAIN, et al. 2021, KUME, et al., 2018).

Apesar da ausência de efeito espasmolítico, o GER demonstrou atividade antitussígena

significativa. No modelo de tosse induzida por ácido cítrico 0,4 M, observou-se uma redução estatisticamente significativa no número de tosses, especialmente nas doses de 100 e 200 mg/kg. Esses efeitos foram comparáveis aos observados com a codeína, fármaco de referência com potente ação antitussígena., não existem dados na literatura ainda a respeito dessa possível atividade, mas está possivelmente relacionada a atividade antinociceptiva do geraniol relacionado a outros estudos (LEI, et al., 2019, KUMAR, 2015, ROCCA, et al., 2017).

O tempo de latência para a primeira tosse, embora tenha sido avaliado, não apresentou alterações expressivas, indicando que o GER pode atuar principalmente reduzindo a frequência da tosse sem interferir significativamente no início do reflexo. Isso sugere que sua ação não ocorre em receptores sensoriais periféricos, mas possivelmente envolve modulação central do reflexo da tosse, como ocorre com a codeína. No entanto, mais estudos serão necessários para elucidar o mecanismo de ação, incluindo investigações neurofarmacológicas e a possível interação com receptores μ -opioides ou canais TRPV1, ambos envolvidos no reflexo da tosse (ANDERSON, 2004, GRACE, et al., 2012, LI, et al., 2019, SCHERER, et al., 2017).

No que tange à segurança do composto, os dados do estudo de toxicidade subaguda são promissores. Nenhuma morte ou sinal clínico de toxicidade foi observado durante o período de 14 dias de avaliação, indicando que o GER apresenta um perfil de segurança adequado nas doses testadas. Pesquisas indicam que GER pode induzir toxicidade no desenvolvimento em embriões de peixe-zebra, resultando em deformidades morfológicas e diminuição da utilização de nutrientes (LUO, et al., 2024). Além disso, demonstrou efeitos citotóxicos em linhagens celulares humanas, particularmente em células de hepatoma, onde reduziu significativamente a viabilidade celular (QUEIROZ, et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que o GER é letal para o ácaro vermelho das aves, com 100% de mortalidade observada em várias concentrações (GEORGE, et al., 2009).

Em camundongos o GER é rapidamente metabolizado em camundongos, com metabólitos como ácido gerânico e conjugados de glicuronídeo detectados em níveis mais altos do que o próprio GER (MORIKI, et al., 2024). Embora se mostre promissor no alívio da dor e em aplicações anti-inflamatórias, seu perfil de segurança em doses mais altas requer cautela (ROCCA, et al., 2016) (CHIRUMBOLO e BJØRKLUND, 2017). Contudo, a ausência de análise histopatológica dos órgãos devido a limitações operacionais representa uma limitação importante do estudo. A análise histopatológica poderia fornecer informações relevantes sobre alterações subclínicas ou inflamatórias nos órgãos-alvo, especialmente fígado, rins e pulmões. Assim, recomenda-se que

estudos futuros incluam essa etapa para fornecer um perfil toxicológico mais completo do composto.

Em conjunto, os resultados obtidos apontam para um potencial uso do geraniol como agente antitussígeno, mas não como broncodilatador ou espasmolítico. A ausência de atividade sobre a musculatura lisa traqueal não invalida o seu uso terapêutico, especialmente em formulações voltadas para o controle da tosse seca ou irritativa, comum em doenças respiratórias não obstrutivas. É importante ressaltar que, embora a atividade antitussígena tenha sido evidente no modelo experimental utilizado, é necessário ampliar a investigação com novos ensaios, testando diferentes vias de administração, formulações e modelos de indução de tosse, incluindo causas inflamatórias ou infecciosas.

Dessa forma, apesar da ausência de efeitos broncodilatadores, o GER mostra-se promissor como potencial agente antitussígeno, sendo necessário o aprofundamento das investigações em estudos futuros, que incluam a elucidação de mecanismos de ação, avaliação farmacocinética, análise histopatológica completa e testes em modelos adicionais de tosse. A continuidade dessas pesquisas poderá contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas à base de compostos naturais no tratamento sintomático da tosse.

5. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o geraniol não possui atividade espasmolítica sobre a musculatura lisa da traqueia isolada de cobaia, nas condições experimentais utilizadas. Mesmo após adição cumulativa em diferentes concentrações, não foi observada qualquer redução significativa na força das contrações induzidas por carbacol, impossibilitando, assim, a investigação de possíveis mecanismos de ação relaxante. Por outro lado, o GER demonstrou uma atividade antitussígena significativa no modelo de tosse induzida por ácido cítrico, com redução do número de tosses comparável à codeína, especialmente nas doses de 100 e 200 mg/kg. Além disso, os dados do estudo de toxicidade subaguda indicam um perfil de segurança favorável, sem sinais clínicos de toxicidade ou mortes nos animais avaliados por 14 dias. No entanto, a ausência de análise histopatológica limita conclusões mais detalhadas sobre a toxicidade em órgãos específicos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, Gary P. TRPV1 and Cough. *Thorax*, vol. 59, no. 9, Sept. 2004, pp. 730–31, <https://doi.org/10.1136/THX.2003.016782>.
- CHIRUMBOLO, S., e BJØRKLUND, G. 2017. The Antinociceptive Activity of Geraniol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 120(2), 105–107. <https://doi.org/10.1111/BCPT.12683>
- DUDHAREJIYA, Harit. A Review on Pharmacological Actions of Geraniol and Limonene. *African Journal of Biomedical Research*, Dec. 2024, pp. 6179–88, <https://doi.org/10.53555/ajbr.v27i4s.4755>.
- DWIVEDI, R., Drumm, B. T., Alkawadri, T., Martin, S. L., Sergeant, G. P., Hollywood, M. A., & Thornbury, K. D. (2023). The TMEM16A blockers benzbramarone and MONNA cause intracellular Ca²⁺-release in mouse bronchial smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 947, 175677. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175677>
- GEORGE, D., Biron, J., Jolly, G., Duvallet, G., & Sparagano, O. 2009. Toxicity of geraniol solution in vitro to the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Parasite*, 16(4), 319–321. <https://doi.org/10.1051/PARASITE/2009164319>
- GRACE, Megan S., et al. Transient Receptor Potential Channels Mediate the Tussive Response to Prostaglandin E2 and Bradykinin. *Thorax*, vol. 67, no. 10, Oct. 2012, pp. 891–900, <https://doi.org/10.1136/THORAXJNL-2011-201443>.
- HUSSAIN, M., Bakhsh, H., Syed, S. K., Ullah, M. S., Alqahtani, A., Alqahtani, T., Aldahish, A. A., Emran, T. B., Rehman, K. U., & Janbaz, K. H. (2021). The Spasmolytic, Bronchodilator, and Vasodilator Activities of *Parmotrema perlatum* Are Explained by Anti-Muscarinic and Calcium Antagonistic Mechanisms. *Molecules*, 26(21), 6348. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26216348>
- LEI, Yu, et al. Pharmacological Properties of Geraniol – A Review. *Planta Medica*, vol. 85, no. 1, Jan. 2019, pp. 48–55, <https://doi.org/10.1055/A-0750-6907>.
- LUO, Yumin, et al. Flavor Compound Geraniol Induces Inhibited Nutrient Utilization and Developmental Toxicity on Embryonic–Larval Zebrafish. *Food Frontiers*, Oct. 2024, <https://doi.org/10.1002/fft2.495>.
- KUMAR, M., & T, D. (2015). Geraniol, a component of plant essential oil “A Review Of Its Pharmacological Activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(4), 67–70.
- KUME, Hiroaki, et al. Involvement of Allosteric Effect and K_{Ca} Channels in Crosstalk between B₂-Adrenergic and Muscarinic M₂ Receptors in Airway Smooth Muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 7, July 2018, p. 1999, <https://doi.org/10.3390/IJMS19071999>.
- MORIKI, Yoshiaki, et al. Pharmacokinetics of Geraniol and Its Metabolites in Mice After Oral Administration. *Food Science and Nutrition*, vol. 13, no. 1, Dec. 2024, <https://doi.org/10.1002/fsn3.4653>.

LI, Long, et al. Heterogeneity of Cough Hypersensitivity Mediated by TRPV1 and TRPA1 in Patients with Chronic Refractory Cough. *Respiratory Research*, vol. 20, no. 1, June 2019, p. 112, <https://doi.org/10.1186/S12931-019-1077-Z>.

OSARODION, Peter Osarumwense. *Asthma Symptoms, Diagnosis, Management & Treatment*. no. 5, Jan. 2020, pp. 1–2, <https://www.alliedacademies.org/articles/asthma-symptoms-diagnosis-management--treatment.pdf>.

OSHIMA, Tomoko, e Michiho ITO. Sedative Effects of L-Menthol, d-Camphor, Phenylethyl Alcohol, and Geraniol. *Journal of Natural Medicines*, vol. 75, no. 2, Jan. 2021, pp. 319–25, <https://doi.org/10.1007/S11418-020-01470-1>.

PATEL, Princl Shaileshkumar. A Mini-Review on Respiratory Diseases- Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Tuberculosis, and Pneumonia- a Global Health Issue. *International Journal of Medical Laboratory Research*, vol. 07, no. 03, Jan. 2022, pp. 18–28, <https://doi.org/10.35503/ijmlr.2022.7303>.

QUEIROZ, T. B., et al. Cytotoxic and Genotoxic Potential of Geraniol in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Human Hepatoma Cell Line (HepG2). *Genetics and Molecular Research*, vol. 16, no. 3, Sept. 2017, p. 12, <https://doi.org/10.4238/GMR16039777>.

ROCCA, Viviana, et al. Geraniol Induces Antinociceptive Effect in Mice Evaluated in Behavioural and Electrophysiological Models. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, vol. 120, no. 1, Jan. 2017, pp. 22–29, <https://doi.org/10.1111/BCPT.12630>.

SÁ, Rodrigo Elísio de, et al. Geraniol, Um Componente Dos Óleos Essenciais de Plantas – Um Mapeamento Científico de Suas Propriedades Farmacológicas. *Research, Society and Development*, vol. 10, no. 12, Sept. 2021, <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I12.20805>.

SCHERER, Paul C., et al. TRPV1 Is a Physiological Regulator of μ -Opioid Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 51, Dec. 2017, pp. 13561–66, <https://doi.org/10.1073/PNAS.1717005114>.

WISNIVESKY, Juan P., and Juan P. de-Torres. The Global Burden of Pulmonary Diseases: Most Prevalent Problems and Opportunities for Improvement. *Annals of Global Health*, vol. 85, no. 1, Jan. 2019, p. 1, <https://doi.org/10.5334/AOGH.2411>.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados dos estudos realizados demonstram que o geraniol (GER) apresenta atividade farmacológica promissora, com efeitos diferenciados a depender do modelo experimental e do sistema fisiológico avaliado. Em preparações de íleo isolado de cobaia, o GER exibiu efeito espasmolítico significativo, possivelmente relacionado à ativação de canais BKCa, embora sejam necessários estudos complementares, como análises com canais iônicos isolados e modelos de *docking* molecular, para confirmar esse mecanismo de ação. A formulação em nanoemulsão (NanoGER F1) potencializou esses efeitos, proporcionando melhor perfil de tecnologia farmacêutica e biotecnológico, menor tamanho de gotículas, maior estabilidade e desempenho superior, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, especialmente em modelos espasmolíticos de íleo isolado de cobaia e de atividade antidiarreica. A NanoGER F1 foi capaz de reduzir a frequência e o aspecto das fezes, minimizar a perda de peso e retardar o trânsito intestinal de forma semelhante à loperamida, destacando seu potencial como alternativa terapêutica para distúrbios gastrointestinais, como cólicas e diarreia.

Por outro lado, no modelo de traqueia isolada de cobaia, o GER não apresentou efeito espasmolítico, assim não sendo avaliado o mecanismo de ação. No entanto, demonstrou atividade antitussígena significativa no modelo de tosse induzida por ácido cítrico, com redução do número de tosses comparável à codeína, nas doses de 100 e 200 mg/kg. Em relação à toxicidade, os dados de toxicidade subaguda indicam um perfil favorável, sem mortes ou sinais clínicos aparentes, embora a ausência de análise histopatológica limite conclusões mais aprofundadas. Assim, o GER e suas formulações apresentam potencial terapêutico relevante, especialmente na gastrointestinal, sendo necessários novos estudos para esclarecer mecanismos de ação, confirmar a segurança e viabilizar seu uso clínico.

Anexo I



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: "**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DE MONOTERPENOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO***", registrado com o nº **0005/270320**, sob a responsabilidade de **Fabício 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 27/03/2020.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/02/2021 a 28/02/2026
Espécie/linhagem/raça	<i>Cavia porcellus</i> ; <i>Mus musculus</i> *; <i>Rattus norvegicus</i> **;
Nº de animais	240 F; 240 F e 720 M*; 576 F**= 1776
Peso/Idade	300 – 500 g / 8 a 12 semanas; 25-35 / 6 a 8 semanas*; 150-250 / 6 a 8 semanas**
Sexo	Ambos
Origem	Biotério Central da UNIVASF

Em: 25/01/2021

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