

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
Fundação Instituída nos Termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão.  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA CAROLINE SANTOS ATAÍDE**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO CARVACROL EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATAS**

São Luís – MA  
2022

**ANA CAROLINE SANTOS ATAÍDE**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO CARVACROL EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

São Luís – MA  
2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ataide, Ana Caroline Santos.

Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do carvacrol em modelo experimental de osteoartrite em ratas / Ana Caroline Santos Ataide. - 2022.

56 f.

Coorientador(a): Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Orientador(a): Rafael Cardoso Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2022.

1. Cartilagem articular. 2. Inflamação. 3. Monoterpeno. I. Carvalho, Rafael Cardoso. II. de Sousa Cartágenes, Maria do Socorro. III. Título.

**Ana Caroline Santos Ataíde**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO CARVACROL EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Aprovada em 18 de novembro de 2022.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Rachel Melo Ribeiro  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA (Memória Qualificação)

---

Prof. Dr. Lucas Martins França  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA (Interno ao Programa)

---

Profa. Dra. Renata Mondego de Oliveira  
Faculdade Mauricio De Nassau – UNINASSAU (Externo ao Programa)

---

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA  
(Orientador - Presidente)

## AGRADECIMENTOS

A Deus e nossa Senhora, por todas as bênçãos alcançadas, quando mais tive medo nos momentos angustiantes da minha vida, minhas forças foram renovadas na fé. Aos meus pais e em especial a minha mãe que sempre me apoiou e me deu condições para buscar meus sonhos. Mãe, você é o meu maior exemplo. Aos meus irmãos Andrew e Felipe que nunca pouparam esforços para me ajudar ao longo dessa jornada. E de forma imensurável a minha gratidão ao meu maior incentivador, meu irmão Felipe, porque, sem ele, eu jamais teria alcançado essa vitória, que sorte a minha de ter vindo nessa vida como sua irmã, eu te amo muito e serei eternamente grata, irmão! Ao meu sobrinho João Marcelo que é alegria da nossa família. Em especial ao meu noivo Luís Fernando, pela compreensão, incentivo, amor e apoio nas horas de maior dificuldade. Também quero deixar minha gratidão a minha vó Alzira (*in memoriam*).

A minha eterna gratidão ao principal autor dessa obra, meu orientador Rafael Cardoso Carvalho, grande mestre em minha vida. Não tenho palavras para descrever o excelente profissional e pessoa que você é, à sua infinita paciência, ao seu carisma, à sua brilhante sabedoria. Obrigada por ter me dado a oportunidade de ser sua aluna.

Agradeço também a uma querida amiga, Tânia Brasil, foi uma grande intercessora para que eu tivesse a oportunidade do meu ingresso no mestrado. Obrigada por ter sido tão especial!

Meus agradecimentos a professora Socorro Cartagenes e ao professor Eduardo Martins que com experiências, carinho, entusiasmos e paciência eu tive a honra de ter recebido os seus valiosos conhecimentos. E a todos do LEED.

Quero agradecer duas pessoas que moram no meu coração e a qual sou muito grata, ao Renzo e Eduardo, tive a sorte e felicidade de conhece-los. Obrigada pela ajuda e apoio, foram muito importantes, e nunca vou esquecer tudo que vocês fizeram por mim. Muito obrigada! Com todo o carinho e de coração eu agradeço, e para sempre minha gratidão será de vocês. A ajuda foi essencial para que concretizasse meu objetivo.

## RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma doença osteoarticular crônico-degenerativa, caracterizada por degradação progressiva da cartilagem articular, associada a inadequada reparação tecidual e inflamação. O tratamento com os fármacos padrões é bastante oneroso, e associado aos efeitos adversos em virtude do uso prolongado destes medicamentos aumenta a necessidade pela busca por novas opções terapêuticas, e entre elas, compostos químicos extraídos de plantas apresentam-se como alternativa promissora. Dentre estes componentes, destaca-se o carvacrol, que possui inúmeras propriedades biológicas já descritas na literatura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do carvacrol em modelo experimental de osteoartrite em ratas. Para execução deste estudo foram utilizadas 35 ratas da espécie *Rattus norvegicus* (variedade albinus) da linhagem Wistar, adultas (60 dias de idade), as quais foram distribuídas em sete grupos, a saber: Grupo Saudável; Grupo Sham; Grupo Controle Negativo: com indução da OA e sem tratamento; Grupo carvacrol 20mg: com indução da OA e tratados com carvacrol 20 mg/kg, 1x ao dia; Grupo carvacrol 40mg: com indução da OA e tratados com carvacrol 40 mg/kg, 1x ao dia; Grupo Associação: com indução da OA e tratados com associação de carvacrol 10 mg/kg + indometacina 1,25 mg/kg; Grupo Indometacina (Controle Positivo): com indução da OA animais e tratados com Indometacina 2,5 mg/kg, 1x ao dia. Para avaliações clínicas e comportamentais foram utilizados os parâmetros de atividade motora/deambulação forçada, quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica e análise da incapacitância/ distribuição do peso nas patas traseiras e hiperalgesia mecânica, que foram realizados nos dias 4, 7, 14, 21 e 28 após a indução de OA e tratamento. Além disso, exames radiológicos foram realizados no 21º dia de tratamento. Os animais foram tratados por gavagem e, ao final do período experimental de 28 dias, após eutanásia, o sangue periférico foi coletado para análises hematológicas e bioquímicas. Os resultados demonstraram que o carvacrol na dose de 40 mg/kg e sua associação com a indometacina nos testes realizados, apresentaram efeito antinociceptivo. A atividade pró-inflamatória com TNF- $\alpha$  atenuou a produção do nível TNF- $\alpha$  nos grupos carvacrol 40 mg/kg e associação. Na análise IL-10 o grupo indometacina, quando comparado com os grupos carvacrol 40 mg/kg e ao grupo associação não demonstrou significância estatística, o que nesta análise, pode evidenciar eficiência semelhante ao tratamento padrão utilizado. Desta forma, conclui-se que os grupos carvacrol 40 mg/kg e associação evidenciaram uma atividade analgésica e anti-inflamatória em modelo experimental proposto.

**Palavras-chaves:** Inflamação, Cartilagem Articular, Monoterpeno.

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative osteoarticular disease characterized by progressive degradation of joint cartilage, associated with inadequate tissue repair and inflammation. Treatment with standard drugs is quite expensive and associated with adverse effects due to the prolonged use of these drugs, it increases the need to search for new therapeutic options, and among them, chemical compounds extracted from plants are a promising alternative. Among these components, carvacrol stands out, which has numerous biological properties already described in the literature. This work aimed to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activity of carvacrol in an experimental model of osteoarthritis in rats. To perform this study, 35 rats of the *Rattus norvegicus* species (Albinus variety), Wistar lineage, adult (60 days old) used up, divided into seven groups, namely: Healthy Group; Sham Group; Negative Control Group: OA induction and without treatment; Carvacrol 20mg group: with OA induction and treated with carvacrol 20 mg/kg, 1x a day; Carvacrol 40mg group: with OA induction and treated with carvacrol 40 mg/kg, 1x a day; Association Group: with OA induction and treated with a combination of carvacrol 10 mg/kg + indomethacin 1.25 mg/kg; Indomethacin Group (Positive Control): animals with OA induction and treated with Indomethacin 2.5 mg/kg, 1x a day. On days 4, 7, 14, 21 and 28 after OA induction and treatment, clinical and behavioral evaluations (motor activity/forced walking, quantification of spontaneous pain and evaluation of mechanical allodynia, and analysis of disability/weight distribution in the hind legs and mechanical hyperalgesia) were performed. In addition, radiological examinations on the 21st day of treatment held up. The animals were treated by gavage and, at the end of the 28-day experimental period, after euthanasia, peripheral blood was collected for hematological and biochemical analysis. The results showed that carvacrol at a dose of 40 mg/kg and its association with indomethacin in the tests carried out had an antinociceptive effect. The pro-inflammatory activity with TNF- $\alpha$  attenuated the production of the TNF- $\alpha$  level in the carvacrol 40 mg/kg and combination groups. In the IL-10 analysis, the indomethacin group, compared with the carvacrol 40 mg/kg groups and the association group, did not show statistical significance, which in this analysis may show similar efficiency to the standard treatment used. In conclusion, the carvacrol 40 mg/kg and association groups showed analgesic and anti-inflammatory activity in the proposed experimental model.

**Keywords:** Inflammation, Articular Cartilage, Monoterpene.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do delineamento dos grupos .....	22
Figura 2 – Linha dotempo experimental do projeto de pesquisa.....	23
Figura 3 - Efeito do carvacrol da atividade motora da marcha de ratos com osteoartrite induzida (OA) .....	28
Figura 4 - Efeito do carvacrol sobre alodínea táctil em ratos com osteoartrite induzida (OA), mensurada por avaliação indireta com o teste de Von Frey.....	29
Figura 5 - Efeito do carvacrol na avaliação da distribuição do peso nas patas traseiras por meio do teste weight bearing . .....	30
Figura 6 - Aspecto radiográfico da articulação do joelho direito.....	32
Figura 7 - Aspecto radiográfico da articulação do joelho direito.....	33
Figura 8 - Aspecto radiográfico da articulação do joelho direito .....	34
Figura 9 - Efeito do carvacrol sobre os níveis de TNF- $\alpha$ .....	35
Figura 10 - Efeito do carvacrol sobre os níveis da IL- 10 .....	36



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classificação do grau radiológico de osteoartrose de Kellgren.....	31
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>OA</b>	osteoartrite
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>AINES</b>	Anti-inflamatórias Não Esteroidais
<b>COX-2</b>	ciclooxigenase-2
<b>OE</b>	Óleo essencial
<b>E-BCP</b>	Beta- Cariofilina
<b>1<math>\beta</math></b>	interleucina 1 $\beta$
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>MMPS</b>	Metalaproteinases
<b>1L6</b>	interleucina 6
<b>1L10</b>	interleucina 10
<b>1L13</b>	interleucina 13
<b>PGE2</b>	prostaglandina E2
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>MMPS13</b>	Metalaproteinases
<b>SNP</b>	Sistema Nervo Periférico
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>DRG</b>	gânglios da raiz dorsal
<b>FTC<math>\beta</math></b>	fator transformador de crescimento $\beta$
<b>SUS</b>	Sistema único da saúde
<b>OIR</b>	retinopatia induzida por oxigênio
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA
<b>MIA</b>	Monoiodoacetato de Sódio
<b>GC</b>	Grupo Carvacrol
<b>GCN</b>	Grupo controle negativo
<b>GCS</b>	Grupo controle saudável
<b>GI</b>	Grupo Indometacina
<b>GS</b>	Grupo SHAM
<b>GACI</b>	Grupo associação Cavacrol +Indometacina

**LNRP** Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata

**ATP** Adenosina trifosfato

**LNRPA** Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata Afetada

**LNRPC** Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata Contralateral

**MGCS** *Mouse Grimace Scale*

**PPA** Peso da pata afetada

**PPC** Peso da Pata Contralateral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	13
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
3.1 Osteoartrite .....	14
3.2 Fisiopatologia .....	15
3.3 Citocinas .....	16
3.4 Dor .....	17
3.5 Tratamentos farmacológicos para Osteoartrite .....	18
3.6 Carvacrol .....	19
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	20
4.1 Geral .....	20
4.2 Específicos .....	20
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
5.1 Produtos químicos e reagentes .....	20
5.2 Experimentação animal .....	21
5.2.1 Aspectos Éticos da pesquisa .....	21
5.2.2 Indução da osteoartrite por Monoiodo acetato de sódio (MIA) .....	21
5.2.3 Protocolo experimental: .....	21
5.3 Análise da atividade Antinociceptiva .....	24
5.3.1 Testes comportamentais .....	24
5.3.2 Avaliação de atividade motora / deambulação forçada (Rotarod Test) .....	24
5.3.3 Quantificação da dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (Von Frey Test) .....	24
5.3.4 Teste de incapacitância/ Distribuição do peso nas patas traseiras (weight bearing) .....	25
5.4 Avaliação radiográfica .....	25
5.5 Análise hematológica .....	26
5.5.1 Coleta de sangue .....	26

5.5.2 Dosagem da Citocina TNF- alfa.....	26
5.5.3 Dosagem IL-10.....	26
5.6 Análise Estatística.....	26
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
6.1 Avaliação da atividade motora/deambulação forçada – Rotarod teste.....	27
6.2 Avaliação da alodínea táctil - <i>Von Frey</i> .....	28
6.3 Distribuição do peso nos membros pélvicos ( <i>weight bearing</i> ).....	29
6.4 Análise das imagens radiográficas.....	30
6.5 Hematologia .....	34
6.6 Análise citocina TNF- alfa.....	34
6.7Análise citocina IL10.....	35
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO I – CEUA.....	52
ANEXO II – Artigo Publicado.....	53
ANEXO III – Artigo Publicado.....	54

## 1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma condição inflamatória degenerativa da cartilagem articular que afeta atualmente cerca de 58 milhões de adultos, com um aumento estimado para 78,4 milhões até 2040. Representa o principal motivo de dor articular e comprometimento funcional no mundo (COLLETTI *et al.*, 2021). É a doença reumática mais prevalente na população geral, estando intimamente relacionada ao envelhecimento humano, sendo mais comum em indivíduos com idade superior a 65 anos no Brasil (COIMBRA *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2011; WIBELINGER, 2014).

Compreender a doença é fundamental para entender o tamanho do desafio da OA. Tem implicações importantes para os financiadores de pesquisa e acadêmicos ao priorizar seu foco e é essencial para os prestadores de serviços de saúde na contratação de serviços adequados às necessidades da população (QUICKE *et al.*, 2022).

A OA é a doença degenerativa mais comum de toda a articulação, afetando progressivamente a cartilagem articular, sinóvia, osso subcondral e tecidos periarticulares como ligamentos, cápsula e músculos periarticulares, as principais manifestações patológicas são degeneração da cartilagem articular, adelgaçamento do osso subcondral, formação de osteófitos ao redor da articulação, alterações meniscal, inflamação do líquido sinovial, lesão ligamentar e hipertrofia da cápsula articular (MAO *et al.*, 2021).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Reumatologia, no conjunto das doenças agrupadas sob a designação de “reumatismos”, a osteoartrite é a mais frequente, representando cerca de 30 a 40% das consultas em ambulatórios de Reumatologia. Além deste fato, sua importância pode ser demonstrada através dos dados da previdência social no Brasil, pois é responsável por 7,5% de todos os afastamentos do trabalho; é a segunda doença entre as que justificam o auxílio-inicial, com 7,5% do total; é a segunda também em relação ao auxílio-doença (em prorrogação) com 10,5%; é a quarta a determinar aposentadoria (6,2%) (SOC. BRAS. REUM, 2019).

A OA é uma doença osteoarticular crônico-degenerativa caracterizada por degradação progressiva da cartilagem articular associada a uma reparação

inadequada tecidual e inflamação. Manifesta-se por dor, rigidez e limitação da função articular (HWANG; KIM, 2015).

Os tratamentos atuais para a OA de joelho incluem tratamento farmacológico, fisioterapia, órtese, proloterapia e até cirurgia, dependendo da gravidade. A medicação de primeira linha para OA são os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (HSIAO *et al.*, 2021). Porém, apenas neutralizam os sintomas sem atuar na progressão e na fisiopatologia da OA. No entanto, esses medicamentos não podem prevenir a degradação progressiva da cartilagem ou reparar a cartilagem danificada de pacientes com OA, e o uso prolongado desses medicamentos pode levar a vários efeitos adversos, incluindo toxicidade renal, distúrbios gastrointestinais, diarreia, náusea, vômito ou aumento dos riscos cardiovasculares (PARK, *et al.* 2020). Conseqüentemente, nos últimos anos, soluções alternativas com menos efeitos colaterais têm sido buscadas pela comunidade científica, como o tratamento com compostos naturais (OPPEDISANO *et al.*, 2021).

O recente estudo em humanos de Khazdair e Boskabady (2019) relataram uma diminuição significativa nas citocinas inflamatórias durante 2 meses de tratamento com carvacrol (1,2 mg/kg/dia) em pacientes com distúrbios pulmonares. Este estudo valida vários estudos que relatam diminuição das citocinas após tratamento com carvacrol em patologia e outras condições (De CARVALHO *et al.*, 2020). Por estas razões, o carvacrol tem sido amplamente utilizado em vários estudos devido suas propriedades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (CARVALHO *et al.*, 2021).

Posto isto, medicamentos tradicionais estão se tornando populares entre a maior parte do mundo, principalmente porque são baratos, abundantes com efeito na saúde. Nos últimos anos, o foco na pesquisa através de fitoquímicos aumentou globalmente para descobrir os imensos potenciais das plantas medicinais usadas na vários sistemas tradicionais. Várias plantas medicinais têm sido estudadas que podem ser usados como potentes agentes fitoquímicos na terapia tratamento de várias doenças (RIAZ *et al.*, 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

Com o crescimento da população idosa no país, se torna mais comum o surgimento de doenças degenerativas, ocasionando um consequente impacto socioeconômico. Destas doenças, a osteoartrite é elencada. Devido a extrema relevância da doença, principalmente no que tange a questão de saúde pública, a busca por terapêuticas alternativas é extremamente indispensável, visto que os tratamentos utilizados se restringem ao alívio sintomático, um efeito limitado, além de inúmeros efeitos colaterais. Além disso, o elevado custo e os efeitos adversos do uso prolongado dos fármacos de eleição para o tratamento da osteoartrite abre precedentes para a busca por novos medicamentos, que possam ser utilizados como alternativa terapêutica.

Dessa forma, a vasta biodiversidade de flora presente no Brasil instiga investigações sobre o potencial terapêutico dessas plantas, utilizadas na medicina tradicional, visando o surgimento de novos fármacos, além de proporcionar a valorização da biodiversidade vegetal brasileira. Do mesmo modo, surge o carvacrol como uma alternativa viável para o tratamento da OA, visto que seu caráter anti-inflamatório, demonstra um novo caminho significativamente capaz de torna-se uma opção contundente na saúde pública e privada do Brasil.

Novos projetos de incentivo à pesquisa e desenvolvimento fitoterápicos dentro da universidade são um caminho de avanço e inovação. As plantas medicinais devido ao seu papel em tratamento, como também pela facilidade de acesso e custo surgem como uma alternativa de grande interesse no tratamento da OA.

Considerando a importância da temática, dos argumentos iniciais apresentados, assim como, o entendimento que a inovação pode ser caracterizada como sinônimo de melhoria de algo existente, este estudo visa promover o tratamento desta doença com a utilização do carvacrol, pois o mesmo já foi descrito em diversos estudos animais, e a mesma tem se mostrado eficaz no tratamento de várias doenças. Sendo assim, os resultados desta pesquisa poderão servir de base para um estabelecimento de uma alternativa terapêutica para o tratamento da OA, e até mesmo, modificar os tratamentos já estabelecidos.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Osteoartrite

A OA é o distúrbio articular mais comum em idosos em todo o mundo, que pode diminuir a qualidade de vida devido à dor, rigidez, perda de função e incapacidade (PARK *et al.*, 2020). Quanto ao sexo, a incidência é semelhante entre homens e mulheres, porém o número de articulações acometidas é, em geral, maior no sexo feminino (De ROSIS *et al.*, 2010). É reconhecida como uma das doenças crônicas mais prevalentes afetando articulações das mãos, joelhos, quadris e coluna de diferentes graus de deformidades e edema articulares (BERENBAUM, 2013).

É uma doença caracterizada pela deterioração progressiva da cartilagem articular evoluindo com formação de osteófitos, remodelamento ósseo nas superfícies e margens articulares, e fibrose periarticular. A OA é a forma mais comum de doença articular alterando a qualidade de vida (YU *et al.*, 2013; REZENDE *et al.*, 2013).

A compreensão da fisiopatologia da OA com seu clássico conceito de doença degenerativa articular está sendo gradativamente modificado, enfatizando fenômenos mecânicos e inflamatórios em sua gênese e manutenção (FELSON, 2013; BERENBAUM, 2013).

A OA por uma complexa interação de fatores genéticos, metabólicos, bioquímicos e biomecânicos seguidos pela ativação da resposta inflamatória envolvendo a interação da cartilagem, osso subcondral e sinóvia. Muitos fatores, alguns modificáveis contribuem para um risco aumentado de OA e incluem obesidade, genética, envelhecimento e trauma na articulação (HASEEB; HAQQI 2013). Pode ser idiopática, quando não há uma causa aparente. Secundária, quando aparece após traumatismos, neste caso afetando também indivíduos jovens ou associada a doenças reumáticas (FELSON, 2000).

A cartilagem articular tradicionalmente recebe a maior atenção nos estudos da OA, possui as funções de permitir o movimento da articulação com o mínimo de atrito, graças à lubricin, uma glicoproteína secretada pelos fibroblastos sinoviais e absorve impactos evitando danos ósseos, através do colágeno tipo II e aos proteoglicanos sintetizados pelos condrócitos (HUNTER; FELSON, 2006; GLEGHORN *et al.*, 2009; WALLER *et al.*, 2013).

A OA não possui cura, e este fato apresenta um impacto direto na economia em decorrência dos elevados gastos públicos com medicamentos e cuidados hospitalares; perda da produtividade por afastamento do trabalho e, elevado índice de cirurgias de artroplastia de joelho (OLALEKAN *et al.*, 2014).

O diagnóstico de cartilagem lesada geralmente começa com uma história detalhada, um exame físico e radiografias simples da articulação. Certos exames laboratoriais (por exemplo, exames de líquido sinovial, tomografia computadorizada, ressonância magnética) podem ser úteis para confirmar a presença de cartilagem lesada. As imagens de ressonância magnética fornecem uma visão tridimensional da cartilagem que pode elucidar as irregularidades da cartilagem (HUANG *et al.*, 2017).

Muitos fármacos paliativos como anti-inflamatórios não esteroidais, corticoides e mesmo opioides têm sido usados no tratamento da doença, porém nenhum deles conseguiu interromper o processo evolutivo da lesão, que é o principal objetivo do tratamento da OA (CIALDAI *et al.*, 2009).

O tratamento é multimodal, por sua vez, é composto pela associação entre terapia farmacológica (medicamentos) e não farmacológica (fisioterapia e educação ao paciente). Dentre as possíveis opções de tratamento para esta doença, destaca-se o uso de condroprotetores orais e injetáveis, e a artroplastia total de joelho, uma cirurgia que consiste na substituição da articulação lesionada por uma prótese, podendo ser realizada de forma parcial ou total (SILVA *et al.*, 2019).

### **3.2 Fisiopatologia**

A OA, também conhecida como osteoartrose ou doença articular degenerativa, é uma doença das articulações sinoviais. Caracteriza-se pela deterioração progressiva e perda da cartilagem articular com alterações estruturais e funcionais concomitantes em toda a articulação, incluindo a sinóvia, menisco (no joelho), ligamentos periarticulares e osso subcondral (MOBASHERI *et al.*, 2016).

A etiologia da OA não é clara, mas estudos recentes mostraram que as citocinas inflamatórias estão envolvidas no início e na progressão da OA. Entre essas citocinas, a IL-1 $\beta$  desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da OA. A

liberação de IL-1 $\beta$  promove a produção e liberação de diversos mediadores inflamatórios e fatores catabólicos, como iNOS, COX-2, PGE2, TNF- $\alpha$  e MMPs, que contribuem para a disfunção condrocítica e degradação da MEC (FEI *et al.*, 2018).

Durante a progressão da doença, os condrócitos da OA produzem enzimas que degradam a matriz, incluindo a matriz metaloproteinase 13 (MMP13), que degrada o colágeno e a desintegrina, e a metaloproteinase com motivos de trombospondina-5 (Adamts-5), que tem como alvo o agregano. A síntese de enzimas degradativas exacerba ainda mais a degradação da cartilagem articular. As alterações biomecânicas e bioquímicas, juntas, rompem a homeostase da cartilagem e contribuem para a patogênese da OA, que leva ao estreitamento do espaço articular, destruição dolorosa da cartilagem e perda de função (ZHANG *et al.*, 2016).

### 3.3 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas secretadas liberadas pelas células que têm um efeito específico nas interações e comunicações entre as células. As citocinas podem atuar nas células que as secretam que possuem ação autócrina, em células próximas com ação parácrina ou, em alguns casos, em células distantes quando a ação endócrina (ZHANG; AN, 2007).

A dor articular crônica é o principal sintoma da osteoartrite. Embora alterações estruturais da osteoartrite, degeneração da cartilagem e remodelação óssea subcondral sejam os principais contribuintes para a progressão da doença e dor articular em pacientes, as respostas inflamatórias mediadas por citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios após lesão articular também contribuem para esses eventos patológicos na AO (PARK *et al.*, 2020).

As citocinas pró-inflamatórias são produzidas predominantemente por macrófagos ativados e estão envolvidas na regulação positiva de reações inflamatórias. Há evidências abundantes de que certas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  estão envolvidas no processo de dor patológica. As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTC $\beta$  (fator transformador de crescimento  $\beta$ ) (ZHANG; AN., 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As primeiras citocinas formadas após lesão tecidual ou infecção são IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , as quais atuam diretamente sobre receptores específicos dos neurônios

sensitivos e levam à síntese “em cascata” de outros efetores, como outras citocinas, quimiocinas, prostanoídes, neurotrofinas, óxido nítrico, cininas, lipídeos, trifosfato de adenosina (ATP) e membros da via do complemento. Esses elementos, por sua vez, causam proliferação e hipertrofia de células gliais no sistema nervoso central, com a liberação de citocinas pró-inflamatórias relevantes, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, formando uma rede complexa de ativação interdependente (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A inflamação sinovial é comumente observada em indivíduos com OA e é caracterizada pela produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios. Pelo menos alguns desses fatores se difundem através do líquido sinovial para a camada superficial da cartilagem, onde ativam a produção de fatores catabólicos pelos condrócitos, levando à destruição da cartilagem. IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  são duas das principais citocinas envolvidas na inflamação sinovial associada à OA (THYSEN *et al.*, 2015).

### **3.4 Dor**

A dor é o principal sintoma da OA e a principal razão para os pacientes procurarem ajuda médica, e é definida pela International Association for the Study of Pain (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano tecidual real ou potencial”. Muitas vezes, é considerado um importante sinal de alerta que desempenha um papel protetor na resposta à lesão e inflamação tecidual aguda. Quando a dor aguda não é aliviada e transita para dor crônica, o controle da dor se torna muito mais desafiador (YU *et al.*, 2022).

Geralmente, existem três estágios principais na percepção da dor. O primeiro estágio é a sensibilidade à dor, seguido pelo segundo estágio em que os sinais são transmitidos da periferia para o corno dorsal (DH), que está localizado na medula espinhal através do sistema nervoso periférico (SNP). Por fim, a terceira etapa é realizar a transmissão dos sinais para o cérebro superior através do sistema nervoso central (SNC). A via que sobe transportando informações sensoriais do corpo através da medula espinhal para o cérebro é definida como via ascendente, enquanto os

nervos que descem do cérebro para os órgãos reflexos via medula espinhal são conhecidos como via descendente (YAM *et al.*, 2018).

A nocicepção é o processo pelo qual estímulos químicos, térmicos ou mecânicos intensos são detectados por nervos periféricos especializados, chamados nociceptores. Os corpos celulares dos nociceptores estão agrupados nos gânglios da raiz dorsal (DRG), e estendem um axônio em direção à periferia (por exemplo, à articulação) e o outro em direção ao corno dorsal da medula espinhal, onde ocorre uma sinapse e a informação é transmitida para as regiões superiores do SNC. Em condições patológicas, como na inflamação, as alterações na via da dor levam à hipersensibilidade, de modo que os estímulos dolorosos provocam dor exagerada referida como hiperalgesia e estímulos inócuos, como o toque leve, são percebidos como dolorosos alodinia (SYX *et al.*, 2018).

### **3.5 Tratamentos farmacológicos para Osteoartrite**

Os tratamentos farmacológicos disponíveis são os analgésicos, considerados agentes de primeira escolha. Anti-inflamatórios são indicados nos casos de processo inflamatório agudo. Analgésicos opióides, terapia intra-articular com glicocorticóides e derivados do ácido hialurônico também estão indicados (PEREIRA *et al.*, 2006).

A terapia farmacológica é a base do tratamento da OA e os agentes mais comumente utilizados incluem anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), acetaminofeno (paracetamol) e opióides (D'ARCY *et al.*, 2021).

Os AINEs estão entre as classes medicamentosas mais utilizadas no mundo, principalmente no tratamento de inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide (BATLOUNI, 2010). No tratamento da dor em OA, são utilizado analgésicos, inibidores da enzima ciclo-oxigenase - 2 (COX-2) e drogas AINES, no entanto estes tratamentos ainda não são suficientes, pois não conseguem reverter a evolução da doença, além de apresentarem efeitos colaterais importantes, e a dor ser refratária aos tratamentos atuais (NIELSEN, 2006) (HUNTER, 2015).

O uso prolongado de AINES, pode elevar o risco de disfunção renal, complicações gastrointestinais e doenças cardiovasculares, assim como também

interferir no controle da pressão arterial (BATLOUNI, 2010). Estudos, mostraram que na meta- análise de Pope *et al* (1993), indometacina e naproxeno elevaram a pressão arterial média em 3,59 mmHg e 3,74 mmHg, respectivamente.

### 3.6 Carvacrol

As plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional devido às suas propriedades benéficas e protetoras. Tem sido destacado o carvacrol (2-metil-5-isopropilfenol), um fenol mono-terpênico (ZHAO *et al.*, 2020). O carvacrol é um monoterpeneo presente no óleo essencial de várias plantas aromáticas. Entre as diversas espécies de plantas, ressalta-se o orégano (*Origanum vulgare L.*). Seu óleo essencial é constituído por uma variedade de componentes químicos, principalmente o carvacrol e timol (LAMBERT *et al.*, 2001; BAYDAR *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos mostram que o carvacrol apresenta variadas atividades biológicas e também de certa forma efeitos toxicológicos. Porém, de acordo com Suntres *et al.* (2015) as informações sobre a toxicologia do carvacrol são limitadas. Foi relatado que a letalidade mediana a dose de carvacrol em ratos é de 810 mg/kg de peso corporal quando administrada por gavagem oral. Outro estudo realizado por Carvalho *et al.*, (2019) avaliou a ação bactericida do carvacrol sozinho e combinado com antibióticos selecionados contra quatro cepas *S. pyogenes* in vitro. Pesquisa realizada por Zhao W *et al.* (2020) avaliou que Carvacrol pode aliviar a inflamação vascular em camundongos db/db diabéticos e demonstraram que o carvacrol possui propriedades anti-inflamatórias.

Kaymaz *et al.* (2021) Investigaram os efeitos da administração intraperitoneal de carvacrol em ratos usando o modelo de retinopatia induzida por oxigênio (OIR) e concluíram que o carvacrol poderia potencialmente inibir a formação de neovascularização patológica da retina (NV) retiniana na retina, bem como diminuir a expressão induzida por OIR de VEGF e TNF- $\alpha$ . O estudo de Xiao *et al.* (2018) teve como objetivo investigar os efeitos protetores do carvacrol contra a inflamação em condrócitos humanos estimulados por interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Os resultados indicaram que o carvacrol inibiu a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2) e diminuiu a expressão de NO sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase (COX-2).

Este composto tem sido estudado pelo nosso grupo de pesquisa e tem demonstrado uma excelente atividade anti-inflamatória. Desta forma, objetivamos com esta pesquisa avaliar a atividade anti-inflamatória do carvacrol no modelo experimental de osteoartrite.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Geral**

Avaliar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do carvacrol em modelo experimental de osteoartrite em ratos.

### **4.2 Específicos**

- Avaliação do efeito sinérgico do carvacrol com a indometacina em modelo experimental de OA;
- Verificar o efeito do carvacrol sobre as alterações radiológicas nos animais tratados;
- Avaliar os padrões hematológicos dos animais dos diferentes grupos experimentais após os tratamentos;
- Quantificar o perfil de citocinas pro – inflamatória e anti-inflamatória em modelo experimental de OA, após os respectivos tratamentos;

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Produtos químicos e reagentes**

Nesta pesquisa foram utilizados os seguintes produtos químicos/reagentes: Monoiodoacetato de sódio (MIA) (Sigma-Aldrich), Cloridato de Quetamina (CETAMIN® - Syntec), Cloridrato de Xilazina (Xilazin® - Syntec), Carvacrol (Sigma-Aldrich), Indometacina (INDOCID® Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda), Sorbitol (Pharmamed).

## 5.2 Experimentação animal

### 5.2.1 Aspectos Éticos da pesquisa

Para execução deste estudo foram utilizadas 35 ratas da espécie *Rattus norvegicus* (variedade albinus) da linhagem WISTAR, adultas com 60 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Estes animais foram alimentados com ração padrão *ad libitum* e mantidos sob condições controladas de luz e temperatura.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos e procedimentos sobre experimentação animal foram submetidos para apreciação e pelo Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA da Universidade Federal do Maranhão, sob o número de protocolo 23115.037943/2019-14.

### 5.2.2 Indução da osteoartrite por Monoiodo acetato de sódio (MIA)

Para a indução da OA, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 2,5% - (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg). Após a certificação do plano anestésico, foi realizada tricotomia no joelho direito e, posteriormente, solução tópica de iodopovidona a 10% foi aplicada para assepsia local. Uma lesão articular foi induzida por uma única injeção intra-articular de 2 mg/kg de MIA no joelho direito através do ligamento patelar, no espaço intra-articular (PITCHER *et al.*, 2016).

### 5.2.3 Protocolo experimental:

Este estudo foi caracterizado como ensaio pré-clínico experimental, com distribuição aleatória dos animais nos grupos. Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais:

1. GRUPO SAUDÁVEL (n= 5): animais sadios;



2. GRUPO SHAM (n= 5): falsa indução de OA – animais anestesiados com lesão de cápsula articular sem inoculação do MIA. Este grupo recebeu tratamento diário, por gavagem, solução sorbitol na dose de 0,1 ml/kg;
3. GRUPO CONTROLE NEGATIVO (n=5): submetidos a indução de OA e não receberam tratamento;
4. GRUPO CARVACROL 20mg/ kg (n=5): submetidos à indução da OA e com tratamento diário com carvacrol na dose 20mg/kg por gavagem;
5. Grupo CARVACROL 40 mg/ kg (n=5): submetidos à indução da OA e receberam tratamento diário com carvacrol na dose 40mg/kg por gavagem;
6. GRUPO ASSOCIAÇÃO CARVACROL + INDOMETACINA (n=5): submetidos à indução da OA e receberam tratamento diário com associação 10 mg/kg carvacrol +1,25 mg/kg indometacina por gavagem;
7. GRUPO INDOMETACINA (n= 5) – CONTROLE POSITIVO: submetidos à indução de OA e receberam tratamento diário com indometacina 2,5 mg/kg por gavagem;

Abaixo, fluxograma do delineamento dos grupos (Figura 3).

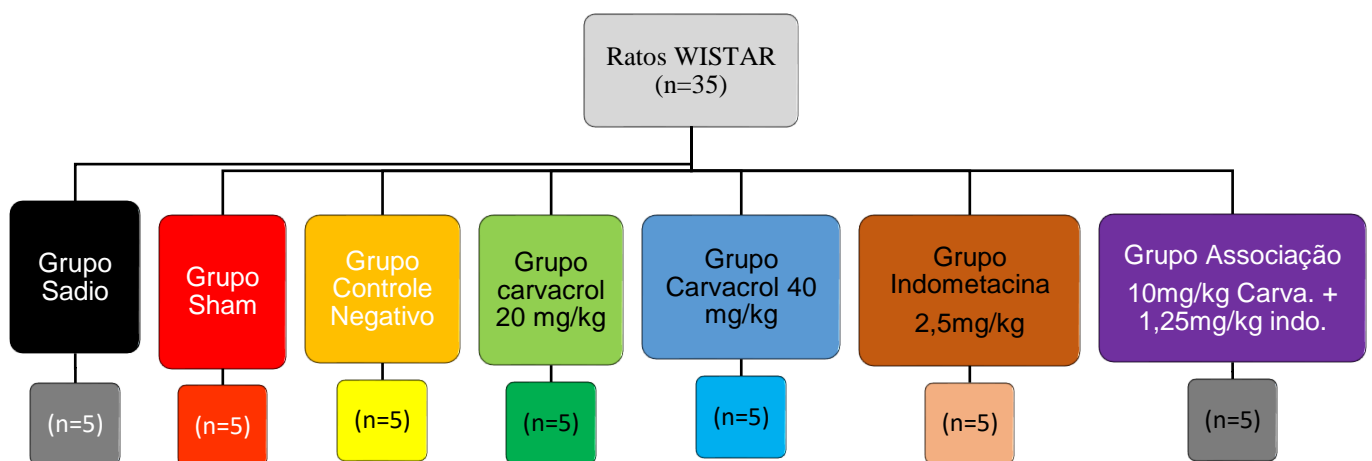


Figura 1 - Fluxograma do delineamento dos grupos

Após recebimento dos animais do Biotério Central, os animais foram aclimatados no Biotério Setorial da Pós-Graduação durante sete dias. No dia zero, os animais foram pesados em balança eletrônica, e este procedimento foi repetido a cada três dias. A avaliação dos testes comportamentais foi realizada no dia 0 (antes da indução da osteoartrite) e nos dias 4, 7, 14, 21 e 28 após a indução. Os tratamentos foram iniciados, via oral por gavagem após o terceiro dia da indução da AO, e os exames radiológicos foram realizados no 21º dia.

A eutanásia foi realizada um dia após o protocolo de terapêutico proposto, através da administração, por via intraperitoneal com overdose de cloridrato de cetamina 300mg/kg + cloridrato xilazina 30mg/kg, e após confirmação do óbito, realizou-se venopunção através da veia cava caudal para análise hematológica - hemograma completo. Além disso, o soro foi separado em alíquotas no volume de 500 µL e armazenado em freezer - 80°C, para a quantificação de citocinas no soro.

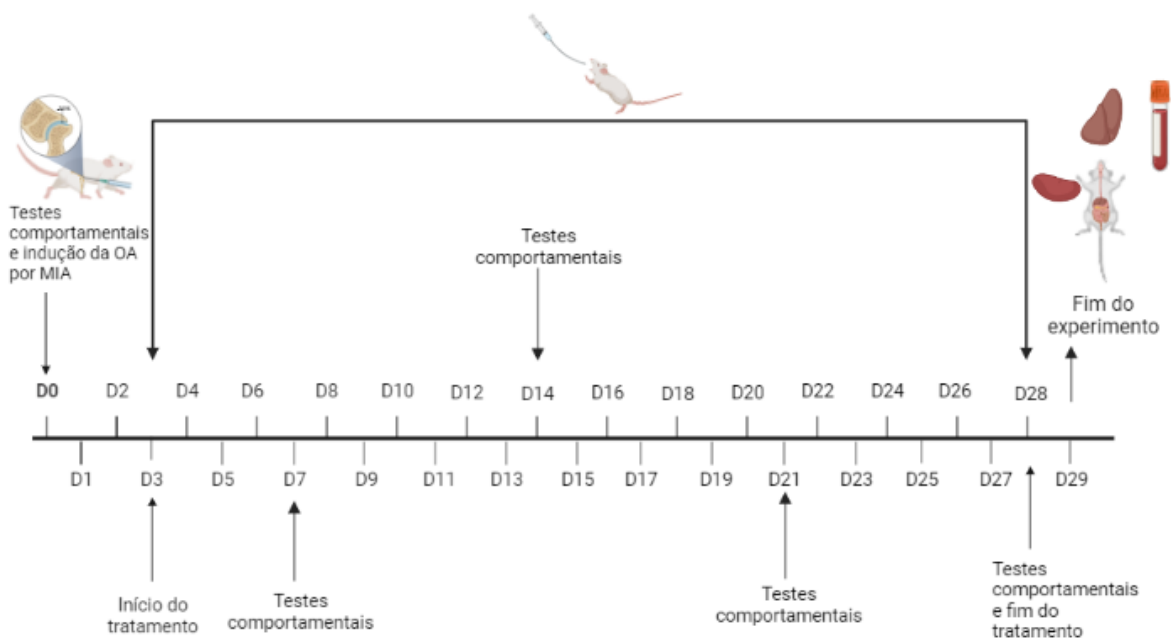


Figura 2 - Linha do tempo experimental do projeto de pesquisa. Desenvolvido no Biorender.com (2022).

### 5.3 Análise da atividade Antinociceptiva

#### 5.3.1 Testes comportamentais

A avaliação clínica para sinais comportamentais foi realizada antes e depois da indução da OA, e também em intervalos regulares a cada sete dias.

#### 5.3.2 Avaliação de atividade motora / deambulação forçada (Rotarod Test)

Os animais foram colocados em aparelho Rotarod (Il Life Science, California, Estados Unidos), para avaliação de atividade motora, na velocidade de 16 rpm por um período de tempo de 5 minutos. A utilização do membro afetado foi avaliada pela deambulação forçada. O uso da pata foi graduado em uma escala numérica que varia de 5 a 1, em que: 5= uso normal do membro; 4= claudicação leve; 3= claudicação grave; 2= intermitente desuso da pata afetada; 1= completo desuso da pata afetada (MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006).

#### 5.3.3 Quantificação da dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (Von Frey Test)

A alodínea táctil foi realizada com um analgesímetro digital (modelo Insight, São Paulo, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata dos animais foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao aparelho (KALFF *et al.*, 2010; VIVANCOS *et al.*, 2004;).

Para adaptação ao ambiente, os animais foram colocados em caixas de acrílico medindo 12 x 20 x 17cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha de 5mm<sup>2</sup>, constituída de arame não maleável de 1mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais.

O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da região plantar de pata do rato até o animal produzir

uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, nas patas ipsilateral e contralateral, até o animal apresentar três medidas similares de resposta “*flinch*” após a retirada da pata (VIVANCOS *et al.*, 2004; KALFF *et al.*, 2010). O limiar nociceptivo de retirada da pata (LNRP) foi definido como o percentual de força para provocar uma suspensão ativa na pata ipsilateral afetada e foi determinado da seguinte maneira:

$$\text{LNRP (\%)} = \frac{\text{LNRPA}}{\text{LNRPA} + \text{LNRPC}} \times 100$$

#### 5.3.4 Teste de incapacitância/ Distribuição do peso nas patas traseiras (weight bearing)

Os animais foram colocados em uma câmara de vidro angulada e posicionados, de modo que cada pata traseira repouse sobre plataformas diferentes. O peso exercido sobre cada pata traseira (mensurado em gramas) foi avaliado em um período de cinco segundos. A aferição final da distribuição do peso foi dada por uma medida de três aferições (SCHOTT *et al.*, 1994).

$$\text{Distribuição do peso (\%)} = \frac{\text{PPA}}{\text{PPA} + \text{PPC}} \times 100$$

#### 5.4 Avaliação radiográfica

As radiografias dos joelhos dos animais foram obtidas através de aparelho de raio X odontológico. Por meio de um sistema de imagem computadorizada com sensor eletrônico para radiografia digital (Digitalizador de imagens radiográficas Micro Imagem). O aparelho de raio-x Micro Imagem Diox-602, com tensão do tubo de 60 Kv (fixo) e corrente do tubo de 4 mA (fixo), foi utilizado para tomadas radiográficas.

## **5.5 Análise hematológica**

### **5.5.1 Coleta de sangue**

Ao fim do experimento no dia (D29), os animais foram anestesiados e, após a realização de laparotomia, a aorta abdominal foi puncionada com scalp nº 25, para coleta do sangue, o qual foi encaminhado ao laboratório SIMETRA para realização dos Hemogramas Completos. Para separação do soro, uma parte do sangue coletado, foi centrifugado a 3000 rotação por minuto (rpm) durante 10 minutos, alicotadas no volume de 500 µL e, armazenadas em freezer - 80°C.

### **5.5.2 Dosagem da Citocina TNF- alfa**

A determinação do nível da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  foi realizada a partir soro sanguíneo, utilizando o BD OptEIA™ Rat TNF ELISA Kit, de acordo com o protocolo do fabricante (BD Biosciences, 10977 Torreyana Rd., San Diego, CA-92121).

### **5.5.3 Dosagem IL-10**

A determinação do nível da citocina anti-inflamatória IL- 10 foi realizada a partir soro sanguíneo, utilizando o BD OptEIA™ Rat IL-10 ELISA Set, de acordo com o protocolo do fabricante (BD Biosciences Pharmingen, 10975 Torreyana Road San Diego, CA 92121).

## **5.6 Análise Estatística**

A comparação das médias dos diferentes grupos experimentais foi realizada pela análise de variância univariada (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Na avaliação de duas fontes de variabilidade, foi utilizada análise de variância bivariada (TWO-way ANOVA). O valor de  $P < 0,05$  foi considerado como indicativo de significância e os dados obtidos serão analisados através do software “Graph pad instat® 7.0 (GraphPad software, San Diego, CA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Avaliação da atividade motora/deambulação forçada – Rotarod teste

Na avaliação da atividade motora (Figura 5) foi evidenciado que no D7, foi possível observar que o tratamento nos grupos de 40 mg/kg e associação promoveram efeito analgesico onde na análise de deambulação o comportamento desses animais assemelhou-se aos animais saudáveis. O grupo Carvacrol 20 mg/kg neste dia de análise não demonstrou nenhum efeito analgesico. Nesta mesma análise o grupo associação demonstrou resultados semelhantes quando comparados ao grupo de 40 mg/kg e o grupo indometacina. Não foi observada significancia estatica entre os grupos controle negativo em relação ao cavacrol de 20 mg/kg .

No D14, o grupo Carvacrol de 20 mg/kg já apresenta indícios de atividade analgesica quando comparado ao grupo controle negativo ( $P < 0,0001$ ). Todos os grupos experimentais tratados apresentam resultado, quando comparados ao controle negativo e quando a comparação é realizada entre os grupos carvacrol 20,40 mg/kg e associação em relação ao controle positivo ( indometacina) não foi observado nenhuma significância estatística. Ao observar D21, o grupo carvacrol 20 mg/kg quando comparado ao controle negativo apresentou melhoria na deambulação ( $P < 0,0001$ ). Neste dia, pode-se afirmar que os grupos carvacrol de 40 mg/kg e associação não apresentaram nenhuma significância estatística, em relação a análise realizada. O mesmo resultado pode ser observado no dia D28.

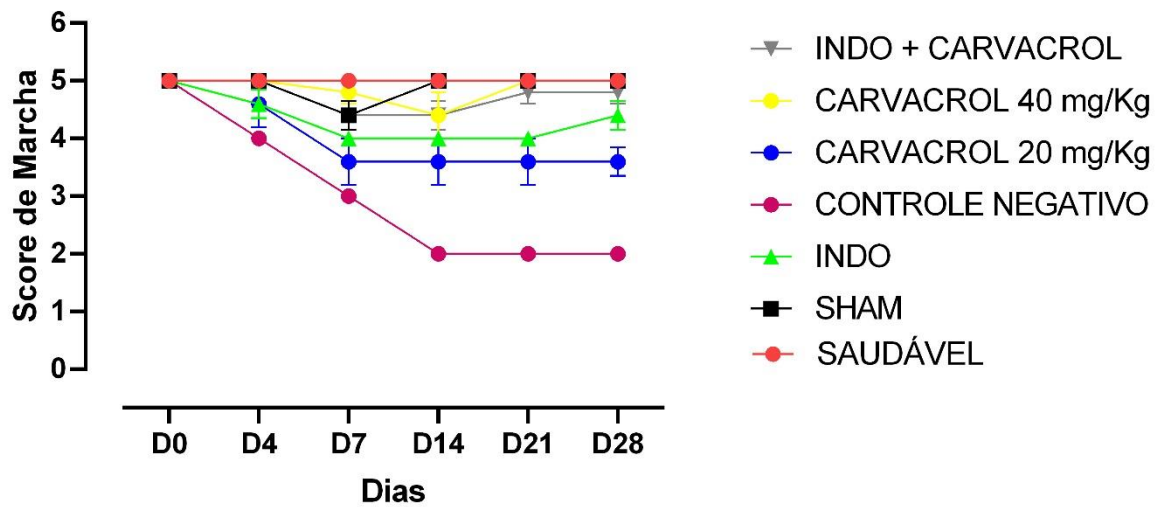


Figura 3 - Efeito do carvacrol da atividade motora da marcha de ratos com osteoartrite induzida (OA).

## 6.2 Avaliação da alodínea táctil - Von Frey

Na avaliação pelo Von Frey (Figura 6), no D7 o grupo Carvacrol 40 mg/kg e associação quando comparados com grupo indometacina não apresentaram valores estatisticamente significantes quanto a diminuição do limiar nociceptivo. Neste mesmo dia de análise, o grupo carvacrol 20 mg/kg quando comparado ao grupo associação apresentou significancia na diminuição do limiar nociceptivo ( $p < 0,05$ ).

Na analise do D14, o grupo Indometacina quando comparado com o grupo carvacrol 40 mg/kg e associação, apresentaram resultados semelhantes. Em relação ao grupo carvacrol 20 mg/kg, quando comparados com o grupo associação e carvacrol 40 mg/kg, não foi observada nenhuma siganificância estatística.

Nos dias D21 e D28, os grupos Carvacrol 40 mg/kg e associação apresentaram resultados semelhantes, quando comparados com grupo indometacina, o que nos leva a inferir que houve um aumento no limiar nociceptivo e diminuição da alodínea táctil, tendo efeitos semelhantes entre o grupo indometacina e se assemelhando proximo ao limiar nociceptivo do animais saudaveis.

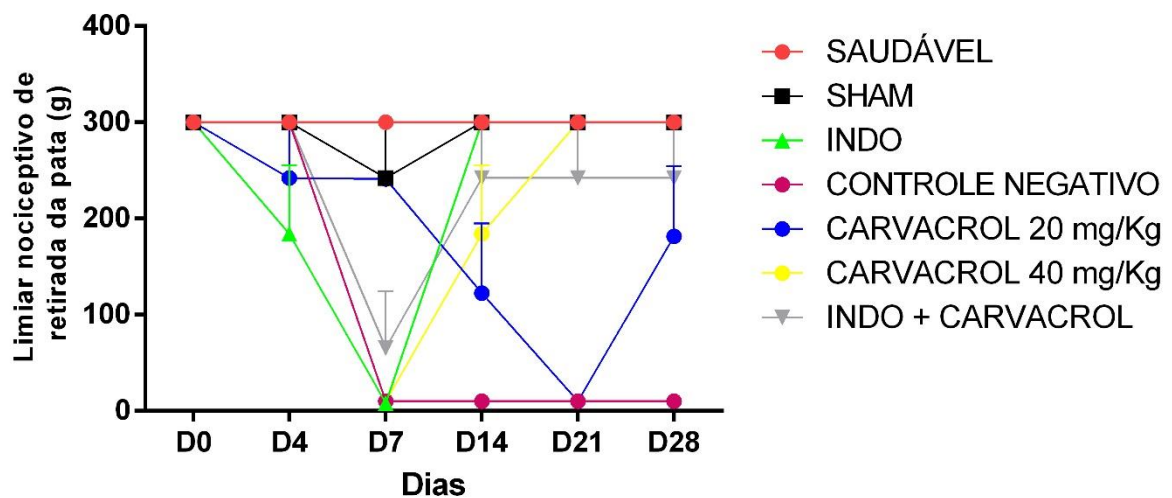


Figura 4 - Efeito do carvacrol sobre alodínea táctil em ratos com osteoartrite induzida (OA), mensurada por avaliação indireta com o teste de Von Frey.

### 6.3 Distribuição do peso nos membros pélvicos (*weight bearing*)

Quanto a análise dos dados relativos à incapacitação articular avaliados pela distribuição percentual do peso (Figura 7) das patas induzidas até o dia D7 não foi observada nenhuma significancia estatística entre os tratamentos propostos no diversos grupos experimentais. No D14 e D21, o grupo carvacrol na dosagem de 40 mg/kg e associação, quando comparados aos animais não tratados (grupo controle negativo) pode-se observar diferença estatisticamente significante, o que nos leva a inferir que houve melhora quanto o aspecto da avaliação da incapacitação nos diferentes tratamentos propostos.

Analisando o D28, os animais tratados com carvacrol 40 mg/kg e grupo associação comparados com grupo indometacina, pode-se observar resultados positivos na proposta terapêutica, com significância estatística ( $p < 0,0001$ ), o que nos leva a acreditar, nesta análise, uma maior eficiência dos tratamentos propostos nas doses de 40mg/kg e associação, em relação ao tratamento padrão utilizado.



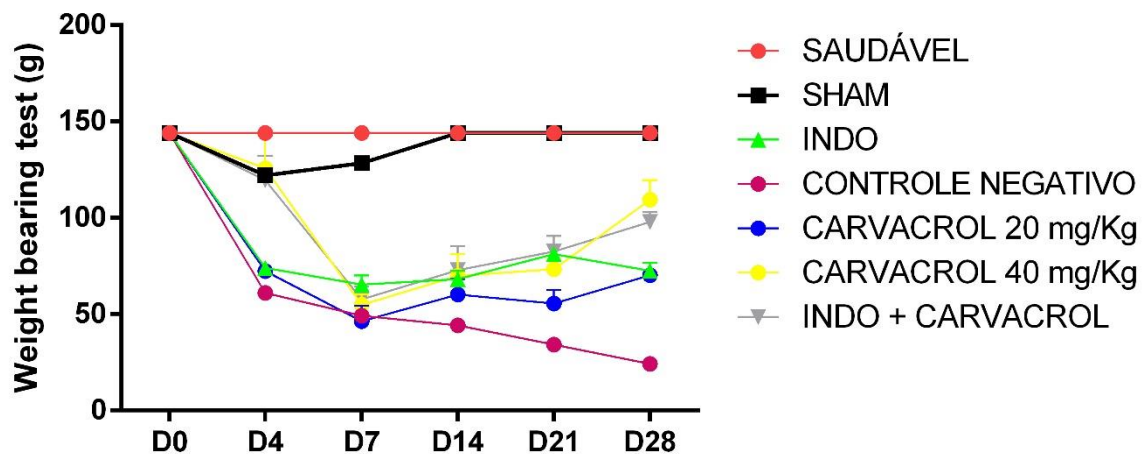


Figura 5 - Efeito do carvacrol na avaliação da distribuição do peso nas patas traseiras por meio do teste weight bearing.

#### 6.4 Análise das imagens radiográficas

A avaliação radiográfica foi realizada baseada nos Critérios de avaliação descrito através da classificação do grau radiológico de osteoartrose de Kellgren e Lawrence (KELLGREN JH, LAWRENCE JS, 1957), como descrito na tabela 1.

As análises radiográficas dos joelhos dos animais, evidenciaram diferenças nos graus, de acordo com os critérios de avaliação propostos no estudo, conforme demonstrado na figura 9. O grupo saudável e Sham apresentaram-se com espaço articular preservado e sem sinais de proliferações ósseas, o que caracterizou o score - grau 0. E grupo Indometacina, classificado com o score - grau I, apresentou espaço intrarticular preservado e osteófito marginal no côndilo lateral da tíbia, como demonstrado na figura 10. O grupo carvacrol 20 mg/kg, caracterizado com o score - grau III, apresentou espaço intrarticular reduzido, áreas de erosão articular, proliferação óssea, luxação do sesamoide do músculo poplíteo – provavelmente por edema sinovial ou instabilidade articular. O animal Carvacrol 40 mg/kg, score grau III, indicando, osteófitos marginais, esclerose de osso subcondral, redução de espaço intrarticular e erosão de osso subcondral. O grupo associação apresentou score - grau I – II, com redução de espaço intrarticular e osteófito marginal. A figura 11 demonstra o grupo controle negativo, score - grau IV, onde evidenciou-se osteófitos marginais exuberantes, estreitamento dos espaços interarticulares, esclerose de osso

subcondral, áreas de erosão na cartilagem, perda parcial do aspecto habitual das estruturas, aumento de volume sinovial e luxação medial de patela.

Tabela 1 - Classificação do grau radiológico de osteoartrose de Kellgren.

<b>Grau 0</b>	<b>Normal</b>
<b>Grau I</b>	Estreitamento do espaço articular duvidoso e possíveis osteófitos na borda
<b>Grau II</b>	Possível estreitamento do espaço articular e osteófitos definidos
<b>Grau III</b>	Definido estreitamento do espaço articular, múltiplos osteófitos, alguma esclerose subcondral e possível deformidade do contorno ósseo
<b>Grau IV</b>	Notável estreitamento do espaço articular, severa esclerose subcondral, definida deformidade do contorno ósseo e presença de grandes osteófitos

Fonte: Kellgren; Lawrence, 1957

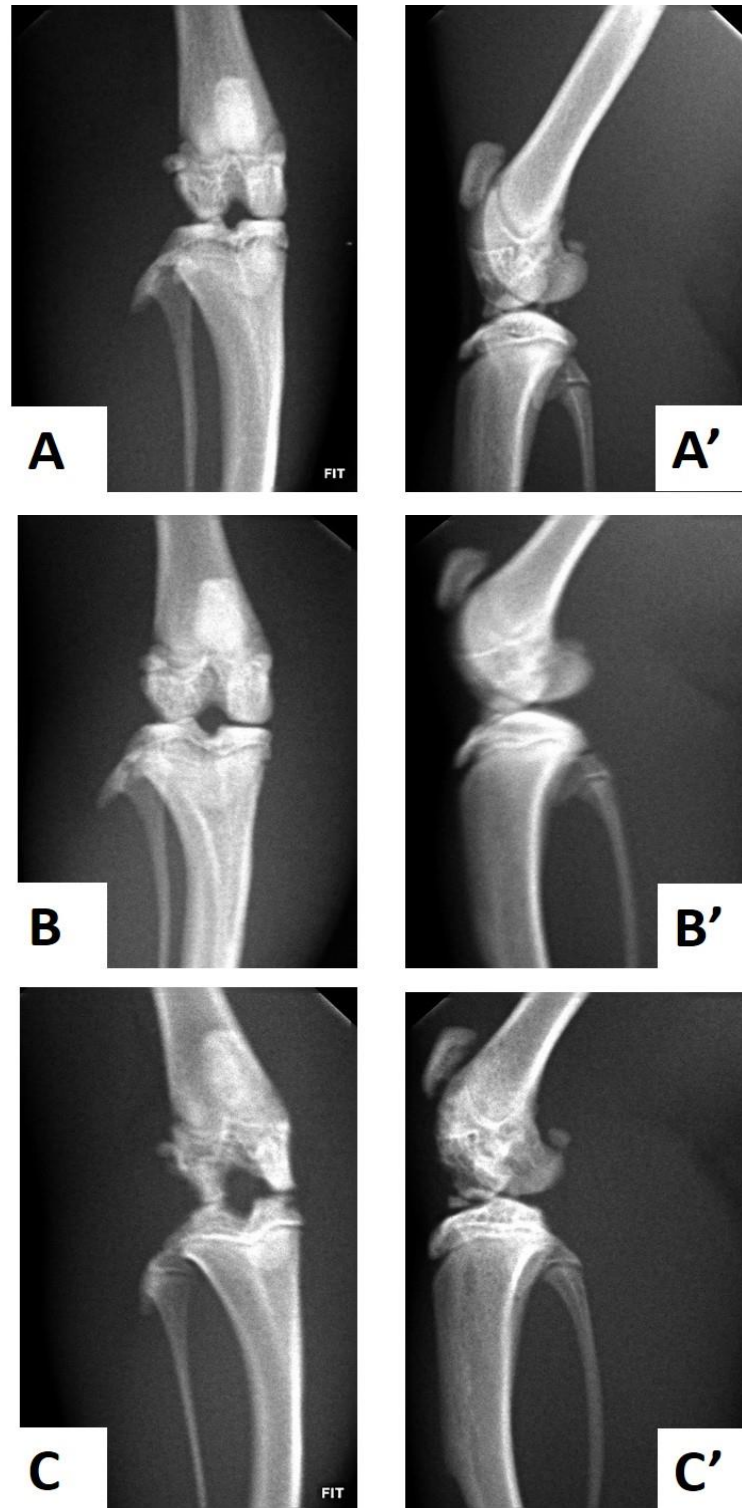


Figura 6 - Aspecto radiográfico da articulação do joelho direito após o 21º dia de protocolo experimental. Em A e A' - Grupo Saudável - projeção radiográfica caudocranial e latero-lateral respectivamente; Em B e B' – Grupo Sham - projeção radiográfica caudocranial e latero-lateral respectivamente; Em C e C' – Grupo Indometacina - projeção radiográfica caudocranial e latero-lateral respectivamente.



Figura 7 - Aspecto radiográfico da articulação do joelho direito após o 21º dia de protocolo experimental. Em D e D' - Grupo Carvacrol 20mg/Kg- projeção radiográfica caudocranial e latero-lateral respectivamente; Em E e E' - Grupo Carvacrol 40mg/Kg - projeção radiográfica caudocranial e latero-lateral respectivamente; Em F e F' - Grupo Associação - projeção radiográfica caudocranial e latero-lateral respectivamente.



Figura 8 - Aspecto radiográfico da articulação do joelho direito após o 21º dia de protocolo experimental. Em G e G'- Grupo Controle negativo - projeção radiográfica caudocranial e latero-lateral respectivamente.

## 6.5 Hematologia

Nos hemogramas completos, não foi evidenciada nenhuma alteração nos parâmetros hematológicos nos animais submetidos aos protocolos experimentais e aos animais saudáveis.

## 6.6 Análise citocina TNF- alfa

A figura 11 mostra o efeito do carvacrol sobre o nível de TNF- $\alpha$ . Com relação ao grupo controle negativo foi observado aumento significativo no nível TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo saudável ( $p < 0,0001$ ). Enquanto o grupo indometacina, apresentou diminuição significativa em relação ao grupo controle negativo, ( $p < 0,0001$ ).

Observa-se que nos grupos tratados com carvacrol de 40 mg/kg e associação houve significância estatística quando comparados ao grupo controle negativo, o que nos leva a inferir sobre a diminuição da liberação deste mediador pro-inflamatório. O grupo tratado com carvacrol 20 mg/kg manteve o nível de TNF- $\alpha$  aumentado, em relação ao grupo controle negativo, não apresentando significancia estatística entre estes grupos. Para os grupos saudável e associação, Indometacina e associação, não foi evidenciado significancia estatística entre os mesmos, o que, pontualmente nesta

análise, pode demonstrar eficiência, semelhante ao tratamento padrão utilizado, e até próximo ao grupo saudável.

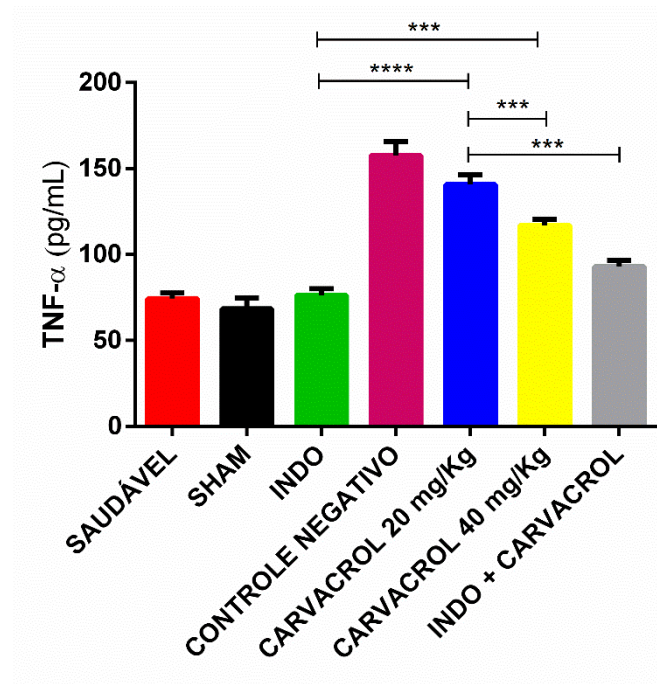


Figura 9 - Efeito do carvacrol sobre os níveis de TNF-  $\alpha$ . \*\*\*  $p < 0.0005$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$

### 6.7 Análise citocina IL- 10

A figura 12 demonstra o efeito do carvacrol sobre o nível de IL-10. Com relação ao grupo Indometacina, foi evidenciado aumento significativo no nível IL-10 em comparação ao grupo carvacrol 20 mg/kg ( $p < 0,005$ ). Observa-se que para a análise do grupo indometacina, quando comparado com os grupos carvacrol 40 mg/kg e ao grupo associação não demonstrou significância estatística, o que nesta análise, pode evidenciar eficiência semelhante ao tratamento padrão utilizado.

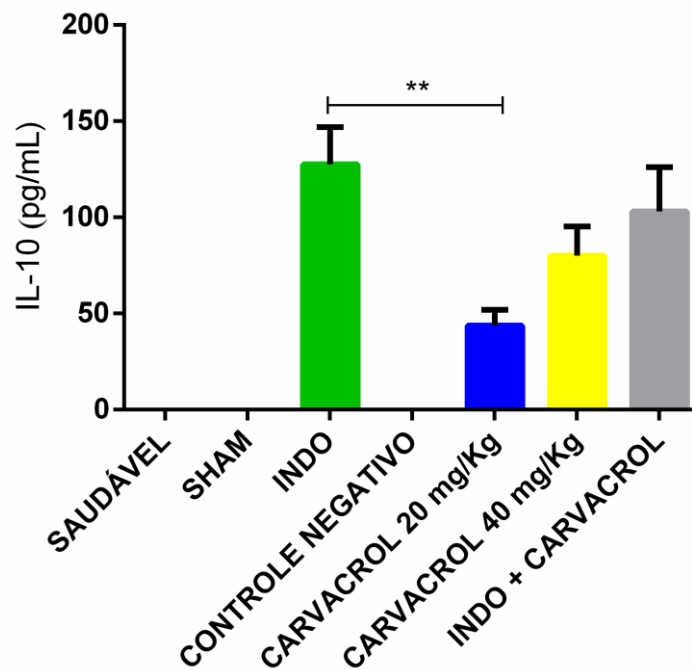


Figura 10 - Efeito do carvacrol sobre os níveis de IL- 10. \*\*  $p < 0.005$

## 7 DISCUSSÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa associada à interrupção da síntese dos constituintes articulares e degradação na cartilagem articular, que leva à dor crônica e perda funcional dos movimentos articulares. É induzida por diversos fatores, como síntese excessiva de citocinas inflamatórias e fatores mecânicos. Entre esses fatores, a ação de enzimas degradantes de todas as classes mecanicistas causa a perda de componentes da matriz extracelular (ECM), incluindo proteoglycans e colágeno, na cartilagem articular. As metaloproteínas matricial (MMPs) produzidas por condrócitos em resposta a fatores inflamatórios, incluindo interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), desempenham papéis cruciais na remodelação de tecidos e no desenvolvimento da destruição da cartilagem articular em OA (CHOI *et al.*, 2019).

Por não haver uma única maneira objetiva confiável de avaliar a dor em animais, muitas vezes seu diagnóstico acaba sendo baseado na associação de avaliações subjetivas, requerendo observação cuidadosa. Recomenda-se, entretanto,

que as avaliações sejam avaliadas continuamente sempre por um mesmo observador, visando reduzir o máximo de possibilidades diferentes entre os avaliadores (ALEIXO *et al.*, 2016).

Neste estudo foi avaliado o potencial terapêutico do carvacrol nas diferentes concentrações de 20, 40 mg/kg e associação de carvacrol 10 mg/kg + indometacina 1,25 mg/kg. Durante desenvolvimento desta pesquisa, observou-se uma melhora dos sinais de dor com o aumento do limiar nociceptivo periférico através dos testes de Von frey, rotarod e weight bearing. Ressalta-se que aqueles tratados com carvacrol de 40 mg/kg e os tratados com associação de carvacrol 10 mg/kg + indometacina 1,25 mg/kg apresentaram-se com significativa melhora, no qual também pode se confirmar com os achados radiológicos, pois carvacrol 40 mg/kg e associação apresentam graus de osteoartrite menores, quando comparados aos aspectos radiológicos dos grupos controle negativo e carvacrol 20 mg/kg. Diante disso, (OLIVEIRA *et al.*, 2019) relata em seu estudo que a associação da hibridização carvacrol-ibuprofeno reduz a dose ativa comumente utilizada na posologia farmacológica atual e pode diminuir efeitos adversos do carvacrol e do ibuprofeno. O CVIB parece ser um composto promissor para inflamação crônica ou crônica em dor inflamatória, promovendo melhorias nas propriedades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a inflamação, migração leucocitária, e a produção de mediadores inflamatórios. Assim este estudo reforça a ideia da possibilidade de associar AINES com carvacrol, pode ser útil para tratamentos de doenças inflamatórias.

Na atividade locomotora dos animais induzidos com osteoartrite foi avaliada pelo teste rota rod. Uma vez induzidos pelo MIA foi possível inferir que a indução a OA foi eficaz, pois ficou evidente que houve uma diminuição no escore das marchas no D4, dia de estabelecimento do modelo de OA. Após o início do tratamento apresentaram melhora significativa do escore de marcha quando comparado ao grupo controle negativo.

Outro teste realizado para a comprovação do efeito antinociceptivo foi avaliação na alteração da distribuição do peso da pata, realizado pelo teste weigth bearing. Em nosso estudo, foi observada a presença da diminuição da pressão da pata no D7 nos animais induzidos a OA, resultados análogos ao de Pitcher *et al.* (2016) no qual a



Injeção do MIA induziu a referida sensibilidade mecânica na pata traseira ipsilateral e déficits de suporte de peso do membro induzido. No D14 e D21, o grupo carvacrol na dosagem de 40 mg/kg e associação, quando comparados aos animais não tratados (grupo controle negativo) pode-se observar diferença estatisticamente significativa, o que nos leva a inferir que houve melhora quanto o aspecto da avaliação da incapacitação nos diferentes tratamentos propostos. Estes resultados, podem ser justificado, pela ação do carvacrol como inibidor da produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2) e diminuição da expressão de NO sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase (COX-2), o que corrobora com relato de Xiao et al (2018), que também relatou que o carvacrol t suprimiu os níveis de expressão proteica de matriz metaloproteinase (MMP)-3 e MMP-13 em condrócitos humanos. Assim, o carvacrol pode ter funções terapêuticas potenciais para o tratamento da AO.

O uso do MIA evidenciou uma diminuição do limiar doloroso nos testes de Von Frey no D7, havendo assim um início do processo inflamatório. A pesquisa de Beyreuther *et al.* (2007) que utiliza o teste de Von frey, pode justificar o possível resultado encontrado. Visto que na pesquisa estes autores concluíram que, durante a primeira semana, a dor é induzida principalmente pela inflamação no modelo iodoacetato, mas depois a inflamação desempenha apenas um papel menor na dor. A hiperalgesia pode estar relacionada ao processo inflamatório, pois a inflamação aumenta a sensibilidade das fibras A delta e C no local da inflamação. Isso aumenta a excitabilidade dos neurônios da medula espinhal, e é capaz de aumentar as respostas sensoriais, incluindo os estímulos táteis normalmente inócuos que são transportados pelas fibras A beta de limiar baixo. Estímulos nocivos provocam alterações no SNC, modificando os mecanismos desencadeados pelos estímulos aferentes. A estimulação persistente de nociceptores provoca dor espontânea, redução do limiar de sensibilidade e hiperalgesia (WUTZKE *et al.*, 2020). No D21 e D28 do teste Von frey, o grupo carvacrol 40 mg/kg de forma parecida com o efeito da indometacina, apresentou aumento no limiar nociceptivo, que incita a pensar em melhoras hiperalgésicas. No contexto relacionado à intensidade do aumento do limiar nociceptivo, a fim de estudar os efeitos sobre a resposta anti-inflamatório do carvacrol, Xu *et al.* (2006) explicam que o carvacrol é forte agonista do TRPV3, um canal iônico que expressa nos gânglios da raiz dorsal, cérebro e medula espinhal e que tem

sido implicado em hiperalgesia, inflamação nos tecidos e possivelmente sensibilização da pele. Além disso, o carvacrol ativa e dessensibiliza rapidamente o TRPA1, o que pode compreender sua modulação da dor.

O carvacrol é eficaz como composto analgésico em modelos nociceptivos, provavelmente pela inibição de mediadores periféricos que podem estar relacionados com seu forte efeito antioxidante observado *in vitro* (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Então, o carvacrol possui atividade antinociceptiva, e sua atividade pode contribuir significativamente para o controle da dor. Esses efeitos são certamente associados à inibição da prostaglandina síntese por carvacrol, tem importantes propriedades hipernociceptivas e anti-inflamatórias mediadas pela inibição de produção de citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  também como inibir a liberação de NO (GUIMARÃES *et al.*, 2013). Estudos anteriores relataram uma grande variedade de efeitos biológicos do carvacrol, como efeitos antiinflamatórios, analgésicos e antitrombóticos que são atribuídos, pelo menos em parte, aos seus efeitos inibitórios sobre uma ou ambas as ciclooxigenases (COXs), bem como a inibição das vias de sinalização do fator nuclear (NF)- $\kappa$ B e das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) ou a ativação do receptor g ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-g).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina de alto nível que induz o catabolismo permitindo a geração de enzimas proteoclásticas que destroem da cartilagem, produzida por monócitos e macrófagos ativados, estimulando os osteoclastos reunidos na região da reabsorção óssea tópica, levando a processos inflamatórios (VARAS *et al.*, 2015).

Com relação à avaliação dos níveis séricos de citocina, os resultados mostraram a redução de mediador pro-inflamatório (TNF- $\alpha$ ) nos grupos tratados com carvacrol de 40 mg/kg e associação quando comparados ao grupo controle negativo. Este achado corrobora com resultados de estudos anteriores. O estudo de (Riaz *et al.*, 2022) investigou os efeitos do carvacrol em ratos com hiperuricemia induzida por PO (mono-oxonato de potássio). Com grupos de tratamento, carvacrol 20 mg/kg ou 50 mg/kg e 10 mg/kg de alopurinol e obtiveram resultados que notavelmente se assemelha com o resultados do presente estudo, visto que o tratamento com carvacrol atenuou o aumento induzido por PO no nível de TNF- $\alpha$  em ratos hiperuricêmicos. Assim como, observou-se que o tratamento com 50 mg/kg de carvacrol produziu

resultados semelhantes ao tratamento com alopurinol. Concluíram que o carvacrol alivia potencialmente o estresse oxidativo e a inflamação induzidos pela hiperuricemia.

## **8 CONCLUSÃO**

Diante do exposto, pode-se afirmar o carvacrol na dose de 40 mg/kg, e sua associação com a indometacina, apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório no modelo experimental proposto.

## REFERÊNCIAS

- ALSALEM M, HADDAD M, ALTARIFI AHMAD, ALDOSSARY SA, KALBOUNEH H, ABOJARADEH AM, EL-SALEM KHALID. Impairment in locomotor activity as an objective measure of pain and analgesia in a rat model of osteoarthritis, 20: 165; 2020.
- ALBUQUERQUE JÚNIOR RLC, DE SOUZA ARAÚJO AA, NUNES PS. Anti-inflammatory and antioxidant activity of carvacrol in the respiratory system: A systematic review and meta-analysis. *Phytother Res. Sep*, 34: 2214-2229; 2020.
- ALEIXO GAS, TUDURY EA, COELHO, M. C. O. C.; ANDRADE, L. S. S.; BESSA, A. L. N. G. Tratamento da dor em pequenos animais: fisiopatologia e reconhecimento da dor. (revisão de literatura : parte I), 10: 1-4; 2016.
- BATLOUNI M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 94: 556-563; 2010.
- BAYDAR H, SAGDIÇ O, ÖZKAN G, KARADOĞAN T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15: 169-172; 2004.
- BEYREUTHER B, CALLIZOT N, STÖHR T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. *Arthritis research & therapy*, 9: R14; 2007.
- BRAGANÇA, LUIZ ANTONIO RANZEIRO DE. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Niterói: EDUFF; 1996.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). 2013. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533\\_28\\_03\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533_28_03_2012.html)> Acesso em: dezembro de 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
- CALADO GP, LOPES AJO, JÚNIOR-COSTA LM, LIMA F DAS CA, SILVA LA, PEREIRA WS, AMARAL FMM DO, GARCIA JBS, CARTÁGENES M DO S DE S, NASCIMENTO FRF. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis. *PLoS ONE*, 10: 5-6; 2015.

CARVALHO KBD, OLIVEIRA M DE AN, CAVALCANTI D DA SP. As propriedades do óleo essencial de *origanum vulgare* e seus benefícios terapêuticos. SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde, 7: 46-63; 2021.

CHEN JJ, LUE JH, LIN LH, HUANG C-T, CHIANG RP-Y, CHEN CL, TSAI YJ. Effects of pre-emptive drug treatment on astrocyte activation in the cuneate nucleus following rat median nerve injury. *Pain*, 148: 158-166; 2010.

CHOI JC, CHOI Soo-Im, CHOI Bo-Ram, LEE SL, LEE DY, KIM GS. Cartilage protective and anti-analgesic effects of ALM16 on monosodium iodoacetate induced osteoarthritis in rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 19: 325; 2019.

CIALDAI C, GIULIANI S, VALENTI C, TRAMONTANA M, MAGGI C. Effect of Intra-articular 4-(S)-Amino-5-(4-{4-[2,4-dichloro-3-(2,4-dimethyl-8-quinolyloxymethyl)phenylsulfonamido]-tetrahydro-2H-4-pyranilylcarbonyl} piperazino)-5-oxopentyl (trimethyl) ammoniumchloride hydrochloride (MEN16132), a Kinin B2 Receptor Antagonist, on Nociceptive Response in Monosodium Iodoacetate-Induced Experimental Osteoarthritis in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331: 1025-1032; 2009.

CICALĂU GIP, BABES PA, CALNICEANU H, POPA A, CIAVOI G, IOVA GM, GANEA M, SCROBOTĂ I. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Carvacrol and Magnolol, in Periodontal Disease and Diabetes Mellitus. *Molecules*, 26: 6899; 2021.

COIMBRA IBSEN BELLINI, PASTOR ELDA HIROSE, GREVE, JULIA MARIA D'ANDRESSA, PUCCINELLI MARIO LUIZ CARDOSO, FULLER RICARDO, CAVALCANTI FERNANDO DE SOUZA, MACIEL FLÁVIO MONTEIRO DE BARROS, HONDA EMERSON. Osteoartrite (Artrose): Tratamento. *Revista Brasileira Reumatologia*, 44: 450-453; 2004

COLLETTI A, CICERO AFG. Nutraceutical Approach to Chronic Osteoarthritis: From Molecular Research to Clinical Evidence. *International journal of molecular sciences*, 22:12920; 2021.

COSGE B, TURKER A, IPEK A, GURBUZ B, ARSLAN N. Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand-Mazz.) letsvaart, an endemic species to turkey. *Molecules*, 14: 1702-1712; 2009.

DUARTE V DE S, SANTOS ML DOS, RODRIGUES K DE A, RAMIRES J, ARÊAS GPT, BORGES GF. Exercícios físicos e osteoartrose: uma revisão sistemática. *Fisioterapia em Movimento*, 26:193-202; 2013.

D'ARCY Y, MANTYH P, YAKSH T, DONEVAN S, HALL J, SADRARHAMI M, VIKTRUP L. Treating osteoarthritis pain: mechanisms of action of acetaminophen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, opioids, and nerve growth factor antibodies. *Postgraduate medicine*, 133: 879-894; 2021.

DE CARVALHO FO, SILVA ÉR, GOMES IA, SANTANA HSR, DO NASCIMENTO SANTOS D, DE OLIVEIRA SOUZA GP, DE JESUS SILVA D, MONTEIRO JCM, DE DE ROSIS GARCIA ROBERTA, MASSABKI PAULO SÉRGIO, KAIRALLA MAISA. Osteoartrite: avaliação clínica e epidemiológica de pacientes idosos em instituição de longa permanência. *Rev Soc. Bras Clín. Méd.*8(2): 101-108; 2010.

ALBUQUERQUE JÚNIOR RLC, DE SOUZA ARAÚJO AA, NUNES PS. Anti-inflammatory and antioxidant activity of carvacrol in the respiratory system: A systematic review and meta-analysis. *Phytotherapy research: PTR*, 34: 2214-2229; 2020.

DE OLIVEIRA PRM, DE ALMEIDA AR, DA ROCHA PMG, DE MELO RMJB, QUINTANS-JÚNIOR LJ, DE SOUZA SQJ, HEIMFARTH L, SCOTTI L, SCOTTI MT, DA CRUZ RMD, DE ALMEIDA RN, DA SILVA TG, DE OLIVEIRA JA, DE CAMPOS ML, MARCHAND P, MENDONÇA-JUNIOR FJB. Design, synthesis and pharmacological evaluation of CVIB, a codrug of carvacrol and ibuprofen as a novel anti-inflammatory agent. *International immunopharmacology*, 76:105856; 2019

ELDIN SUE, DUNFORD ANDREW. *Fitoterapia na atenção primária a saúde*. São Paulo: Manole; 2001.

FALOPPA, FLÁVIO, BELLOTI, JOÃO CARLOS. Tratamento clínico da osteoartrose: evidências atuais. *Revista Brasileira de ortopedia*, 41: 47-53; 2006.

FELSON DT, LAWRENCE RC, DIEPPE PA, HELMICK CG, JORDAN JM, KINGTON, RS, LANE NE, NEVITT MC, ZHANG Y, SOWERS M, MCALINDON T, SPECTOR TD, POOLE AR, YANOVSKI SZ, ATESHIAN G, SHARMA L, BUCKWALTER JA, BRANDT KD, FRIES JF. Osteoarthritis new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Annals of Internal Medicine*, 133: 637-639; 2000.

FERNIHOUGH J, GENTRY C, MALCANGIO M, FOX A, REDISKE J, PELLAS T, KIDD B, BEVAN S, WINTER J. Pain-related behavior in two models of osteoarthritis in rat knee. *Pain*, 112: 83–93; 2004.

FEI J, LIANG B, JIANG C, NI H, WANG L. Luteolin inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model. *Biomed Pharmacother.*109:1586-1592; 2019.

FITZGERALD JONATHAN B, JIN MOONSOO, GRODZINSKY ALAN J. Shear and compression differentially regulate clusters of functionally related temporal transcription patterns in cartilage tissue. *The Journal of biological chemistry*, 281: 24095-24103; 2006.

GAUTAM RAJU, JACK SANJAY M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*, 29: 767-820; 2009.

GIULIETTI A M, HARLEY RM, QUEIROZ LP, WANDERLEY MGL, BERG Van Den. Biodiversidade e conservação das plantas do Brasil. *Mega diversidade*, 1: 52-61; 2005.

GLEGHORN JP, JONES ARC, FLANNERY CR, BONASSAR LJ. Boundary mode lubrication of articular cartilage by recombinant human lubricin. *Journal of Orthopaedic Research*, 27: 771-777; 2009.

GOMES RKS, PIRES FA, NOBRE MRC, MARCHI MF DE SÁ, RICKLI JCK. Impacto da artrite reumatoide no sistema público de saúde em Santa Catarina, Brasil: análise descritiva e de tendência temporal de 1996 a 2009. *Revista brasileira de reumatologia*, 57:204–209; 2017.

GUIMARÃES AG, XAVIER MA, Santana MT de, CAMARGO E. A, SANTOS CA, BRITO FA, BARRETO EO, CAVALCANTI SCH, ANTONIOLLI ÂR, OLIVEIRA RCM, QUINTANS-JUNIOR LJ. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 385:253-263; 2012.

Guimarães AG, Quintans JS, Quintans LJ Jr. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. *Phytotherapy research* : PTR,27: 1-15; 2013.

HASEEB ABDUL, HAQQI TARIQ M. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clinical Immunology*, 146:185-196; 2013.

HUANG Y, ZHOU J, HAKAMIVALA A, WU J, HONG Y, BORRELLI J, TANG L. An optical probe for detecting chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Scientific Reports*, 7: 10906; 2017.

HUNTER DJ, FELSON DT. Clinical review: osteoarthritis. *British Medical Journal*, London, 332: 639-642; 2006.

HSIAO AF, LIEN YC, TZENG IS, LIU CT, CHOU SH, HORNG YS. The efficacy of high- and low-dose curcumin in knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Complementary therapies in medicine*, 63: 1-12; 2021.

HUNTER DJ, LO GH. The Management of Osteoarthritis: An Overview and Call to Appropriate Conservative Treatment. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 34: 689–712; 2008.

HWANG HYUN SOOK, KIM HYUN AH. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 26035–26054; 2015.

KALFF KM, ELL MOUEDDEN M, VAN EGMOND J, VEENING J, Joosten L, SCHEFFER GJ, MEERT T, VISSERS K. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model



reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. *European journal of pharmacology*, 641: 108-113, 2010.

KAYMAZ A, ULAŞ F, ÇETINKAYA A, ERIMSAH S. Investigating the effects of carvacrol in rats using oxygen-induced retinopathy model. *Indian Journal of Ophthalmology*, 69: 1219–1223; 2021.

KELLGREN JH, LAWRENCE J. S. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann rheum dis*, 16:494-502; 1957.

KHAZDAIR MR, BOSKABADY MH. The effect of carvacrol on inflammatory mediators and respiratory symptoms in veterans exposed to sulfur mustard, a randomized, placebo-controlled trial. *Respiratory medicine*, 150: 21-29; 2019.

KRASNOKUTSKY S, ATTUR M, PALMER G, SAMUELS J, ABRAMSON SB. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. Suppl 3:S1-S3; 2008.

LAMBERT RJ, SKANDAMIS PN, COOTE PJ. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91: 453-462; 2001.

LEITE AA, COSTA AJG, LIMA B DE AM DE, PADILHA AVL, DE ALBUQUERQUE EC, MARQUES CLAUDIA DL. Comorbidades em pacientes com osteoartrite: frequência e impacto na dor e na função física. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 51: 118–123; 2011.

LIMA DS DE, LIMA JC, CALVACANTI R, MAIARA CB, SANTOS BHC DOS, LIMA IO. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 8:17-21; 2017.

LIMA MVV, FREIRE ADO, SOUSA ELF, VALE AAM, LOPES AJO, VASCONCELOS, CC, LIMA-ARAGÃO MVV, SERRA HO, LIBERIO RNMG, SANTOS APSDAD, SILVA GEB, ROCHA CQD, MOREIRA LIMA FCV, CARTÁGENES MDSDS, GARCIA JBS. Therapeutic Use of *Scoparia dulcis* Reduces the Progression of Experimental Osteoarthritis. *Molecules*, 24:3474; 2019.

MARCONI GD, ROCCA YD, FONTICOLI L, GUARNIERI S, CARRADORI S, RAJAN TS, PIZZICANNELLA J, DIOMEDE F. The Beneficial Effect of Carvacrol in HL-1 Cardiomyocytes Treated with LPS-G: Anti-Inflammatory Pathway Investigations. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11: 386; 2022.

MAO L, WU W, WANG M, GUO J, LI H, ZHANG S, XU J, ZOU J. Targeted treatment for osteoarthritis: drugs and delivery system. *Drug Deliv*, 28: 1861-1876; 2021.

MEDZHITOV RUSLAN. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454: 428–435; 2008.

MEGRAJ KVK, RAJU K, BALARAMAN R, MEENAKSHISUNDARAM K. Biological activities of some Indian medicinal plants. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 1: 12-44; 2011.

MOBASHERI A, BATT M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Annals of physical and rehabilitation medicine*, 59: 333-339; 2016.

MOHAN M, WAGHULDER H, KASTURE S. Effect of pomegranate juice on Angiotensin II-induced hypertension in diabetic Wistar rats. *Phytotherapy Research*, 24: 196-203; 2010.

MONVILLE CHRISTELLE, TORRES EDUARDO M, DUNNETT SEPHEN B. Comparison of Incremental and Accelerating Protocols of The Rotarod Test for The Assessment of Motor Deficits in the 6-OHDA Model. *Journal Neurosc Methods*, 158: 219-223; 2006.

NETO FIGUEIREDO EM DE, QUELUZ TT, FREIRE BFA. Physical activity and its association with quality of life in patients with osteoarthritis. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 51: 544- 549; 2011.

NIELSEN O H, AINSWORTH M, CSILLAG C, RASK-MADSEN J. Systematic Review: Coxibs, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs or No Cyclooxygenase Inhibitors in Gastroenterological High-Risk Patients?. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 23: 27–33; 2006.

NOURI A, IZAK-SHIRIAN F, FANAEI V, et al. Carvacrol exerts nephroprotective effect in rat model of diclofenac-induced renal injury through regulation of oxidative stress and suppression of inflammatory response. *Heliyon*. 7: 1-7; 2021.

OKAMOTO M, ATSUTA Y. Cartilage Degeneration is associated with Augmented chemically-induced joint pain in rats. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 468: 1423-1427; 2010.

OPPEDISANO F, BULOTTA RM, MAIUOLO J, GLIOZZI M, MUSOLINO V, CARRESI C, ILARI S, SERRA M, MUSCOLI C, GRATTERI S, PALMA E, MOLLACE V. The Role of Nutraceuticals in Osteoarthritis Prevention and Treatment: Focus on n-3 PUFAs. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021: 1-12; 2021.

OLALEKAN AU, WINDT D A VAN D, JORDAN JL, DZIEDZIC KS, HEALEY EL, PEAT GM, FOSTER NE. Exercise for lower limb osteoarthritis: systematic review incorporating trial sequential analysis and network meta-analysis. *British Medical Journal*, 48: 1579; 2014.

OLIVEIRA AMI, PECCIN MS, SILVA KNOG DA, TEIXEIRA LEPP DE, TREVISANI VFM. Impacto dos exercícios na capacidade funcional e dor em pacientes com

osteoartrite de joelhos: ensaio clínico randomizado. *Revista Brasileira Reumatologia*. 52: 870-882; 2012.

OLIVEIRA CMB DE, TSA, RKS, ISSY AM, GEROLA LR, SALOMÃO R. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61: 255-265; 2011.

OSHIRO MC, MIGUEL MDA, DIAS J DE FG, GOMES EC, MIGUEL OG. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. 2016. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência e Tecnologia*, 4: 116- 122; 2016.

PARK MH, JUNG JC, HILL S, CARTWRIGHT E, DOHNALEK MH, YU MI, JUN HJ, HAN SB, HONG JT, SON DJ. FlexPro MD®, a Combination of Krill Oil, Astaxanthin and Hyaluronic Acid, Reduces Pain Behavior and Inhibits Inflammatory Response in Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats. *Nutrients*,12: 956; 2020.

PELLETIER JP, MARTEL-PELLETIER J, ABRAMSON SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*, 44:1237-1247; 2001.

PEREIRA HLA, RIBEIRO SLE, CICONELLI RM. Tratamento com Antiinflamatórios Tópicos na Osteoartrite de Joelho. *Rev Bras Reumatol*, 46: 188-193; 2006.

PITCHER T, SOUSA-VALENTE J, MALCANGIO M. The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse. *Journal of visualized experiments: Jove*, 111: 1-5; 2016.

POPE JE, ANDERSON JJ, FELSON DT. A meta-analysis of the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on blood pressure. *Arch Intern Med*. 153: 477-84; 1953.

QUICKE JG, CONAGHAN PG, CORP N, PEAT G. Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy. *Osteoarthritis Cartilage*, 30: 196-206; 2022.

RANDALL LO, SELITTO JJ. A Method for Measurement of Analgesic Activity on Inflamed Tissue. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 111: 409-419; 1957.

REZENDE MU DE, CAMPOS GC, PAILO AF. Conceitos atuais em osteoartrite. *Acta Ortopedica Brasileira*. 21:120-122; 2013.

REZENDE MU DE, GURGEL HM DE C, JUNIOR-VILAÇA PR, KUROBA RK, LOPES ASS, PHILLIPI RZ, HERNANDEZ AJ. Diacerhein versus glucosamine in a rat model of osteoarthritis. *Rev Clinics*, 61: 461-466; 2006.

RIAZ M, AL KURY LT, ATZAZ N, et al. Carvacrol Alleviates Hyperuricemia-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating the NLRP3/NF-κB Pathway. *Drug design, development and therapy*, 16:1159-1170; 2022.

RIAZ G, CHOPRA R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. Biomed Pharmacother, 102: 575-586; 2018.

SANTOS-NOGUEIRA E, CASTRO ER, MANCUSO R, NAVARRO X. Randall-Selitto Test: A New Approach for The Detection of Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury. Journal of neurotrauma, 29: 898-904; 2012.

SCANDORIEIRO S, CAMARGO LC DE, LANCHEROS CAC, YAMANDA-OGATTA SF, NAKAMURA CV, OLIVEIRA AG DE, ANDRADE CGTJ, DURAN N, NAKASATO G, KOBAYASHI RKT. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. Frontiers in microbiology, 7: 760; 2016.

SCHOTT E, BERGE O. G, ANGEHY-MÖLLER K, HAMMARSTRÖM G, DALSGAARD CJ, BRODIN E. Weight bearing as an objective measure of arthritic pain in the rat. Journal of pharmacological and toxicological methods, 31:79-83; 1994.

SILVA A, ANDERSEN ML, TUFIK S. Sleep Pattern in An Experimental Model of Osteoarthritis. Pain, 140: 446–455; 2008.

SILVA GM, SIMÕES E SENNA KM, SOUSA EB, TURA BR. Análise do impacto orçamentário da viscosuplementação no tratamento não cirúrgico da osteoartrite de joelho. Cadernos Saúde Pública, 35: 1-7; 2019.

SILVA LE, VALIM V, PESSANHA APC, OLIVEIRA LM, MYAMOTO S, JONES A, NATOUR J. Hydrotherapy Versus Conventional Land-Based Exercise for The Management of Patients with Osteoarthritis of The Knee: A Randomized Clinical Trial. Physical Therapy, 88:12-21; 2008.

SILVA MD DA. Estudos Comportamentais e Farmacológicos Com a Diacereína No Modelo De Monoartrite Induzida Por Adjuvante Complete De Freund (Efa) Em Ratos. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal De Santa. SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Osteoartrite (artrose). Disponível em <<https://reumatologia.org.br/doenca-reumatica/osteoartrite-osteoartrose/>> Acesso em: Janeiro de 2022

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Osteoartrite artrose. SRINIVASAN, K. "Role of spices beyond food flavoring: nutraceuticals with multiple health effects." Food Reviews International, 21: 167-188; 2015.

SOHN DH, SOKOLOVE J, SHARPE O, ERHART JC, CHANDRA PE, LAHEY LJ, LINDSTROM TM, HWANG I, BOYER KA, ANDRIACCHI TP, ROBINSON WH. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. Arthritis research & therapy, 14:7; 2012.

SYX DELFIEN, TRAN PHUONG B, MILLER RACHEL E, MALFAIT ANNE-MARIE. Peripheral mechanisms contributing to oteoarthritis pain. *Current rheumatology reports*, 20: 9; 2018.

SOUZA CRF, FERRAZ-FREITAS PN, OLIVEIRA WP. Complexos de inclusão binários, ternários e quaternários contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. *Química Nova*, 39: 979-986; 2016.

SUNTRES ZE, COCCIMIGLIO J, ALIPOUR M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55: 304-18; 2015.

THYSEN S, LUYTEN FP, LORIES RJ. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Disease models & mechanisms*, 8: 17–30; 2015.

ULTEE A, SLUMP RA, STEGING G, SMID EJ. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of food protection*, 63: 620-4; 2020.

WALLER MA, ZHANG LX, ELSAID KA, FLEMING BC, WARMAN ML, JAY GD. Role of lubricin and boundary lubrication in the prevention of chondrocyte apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 10: 5852-5857; 2013.

VARAS A, VALENCIA J, LAVOCAT F, MARTÍNEZ VG, THIAM NN, HIDALGO L, FERNÁNDEZ-SEVILLA LM, SACEDÓN R, VICENTE A, MIOSSEC P. Blockade of bone morphogenetic protein signaling potentiates the pro-inflammatory phenotype induced by interleukin-17 and tumor necrosis factor- $\alpha$  combination in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis research & therapy*, 17:192-201; 2015.

WIBELINGER, LM. *Fisioterapia em Reumatologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2014.

WIJESUNDARA NM, LEE SF, CHENG Z, DAVIDSON R, RUPASINGHE HPV. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. *Scientific Reports*, 11:1487;2021.

WUTZKE MLS, PERETTI AL, RIBEIRO L DE FC, CARVALHO AR DE, BERTOLINI, GRF. Evaluation of nociception induced by whole-body vibration remobilization in Wistar rats. *Brazilian Journal of Pain*, 3:94-8; 2020.

XIAO Y, LI B, LIU J, MA X. Carvacrol ameliorates inflammatory response in interleukin 1 $\beta$ -stimulated human chondrocyte. *Molecular medicine reports*, 17: 3987-3992; 2018.

XU H, DELLING M, JUN JC, CLAPHAM DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature neuroscience*, 9: 628–635; 2006.

YAM MF, LOH YC, TAN CS, ADAM SK, MANAN NA, BASIR R. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *International journal of molecular sciences*, 19: 2164; 2018.

YU H, HUANG T, LU WW, TONG L, CHEN D. Osteoarthritis Pain. *International journal of molecular sciences*, 23: 4642; 2022.

YU DE-GANG, DING HUI-FENG, MAO YUAN-QING, LIU M, YU BO, ZHAO X, WANG, XIAO-QING, LI Y, LIU GUANG-WANG NIE, SHAO-BO, ZHU ZHEN-AN. Strontium ranelate reduces cartilage degeneration and subchondral bone remodeling in rat osteoarthritis model. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34:393-402; 2013.

ZHANG W, OUYANG H, DASS CR, XU J. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Research*, 4:15040; 2016.

ZHANG JUN-MING, JIANXIONG. Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45: 27-37; 2007.

ZHAO W, DENG C, HAN Q, XU H, CHEN Y. Carvacrol may alleviate vascular inflammation in diabetic db/db mice. *International journal of molecular medicine*, 46:977-988; 2020.

ZHONG YING, HUANG YI, SANTOSO MARCEL B, WU LI-DONG. Sclareol exerts anti-osteoarthritic activities in interleukin-1 $\beta$ -induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8: 2365-2374; 2015.

## ANEXO I – CEUA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



**CERTIFICADO (02/2022)**

Certificamos que a proposta intitulada: "ATIVIDADE ANTINOCICEPTVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO CARVACROL EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATOS", Processo n. 23115.004774/2021-69, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho, 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 considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 24 de fevereiro de 2021.

We certify that the proposal: "ANTINOCICEPTVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF CARVACROL IN EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOARTHRITIS IN RATS", Process n. 23115.004774/2021-69, under the responsibility of Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6,899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of February 24, 2021.

**PROPOSTA**

Finalidade: **Pesquisa** Área: **Ciências da Saúde**  
Vigência: **10/03/2021 a 31/03/2023**

**ANIMAIS**

Origem: **Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão.**

Espécie: **Ratos** Sexo: **Machos** Idade: **60 dias**  
Peso: **250 a 300g**  
Linhagem/Raça: **Wistar (Rattus norvegicus)**

**AMOSTRA**

**75**

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão – CCBS/UFMA.

São Luís, 25 de janeiro de 2022

*Bruno Araújo Serra Pinto*  
Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto  
Presidente da Comissão de Ética no uso  
de Animais – CEUA/UFMA



Documento assinado digitalmente  
Bruno Araújo Serra Pinto  
CPF: 21.011.2812-10-17-46-0000  
Verifique em: <https://verificador.cef.br>



Article

## Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* and Its Component Ellagic Acid Exert Antibacterial and Anti-Inflammatory Properties against *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*

Roberval Nascimento Moraes-Neto <sup>1</sup>, Gabrielle Guedes Coutinho <sup>1</sup>, Ana Caroline Santos Ataíde <sup>1</sup>, Aline de Oliveira Rezende <sup>1</sup>, Camila Evangelista Carnib Nascimento <sup>1</sup>, Rafaela Pontes de Albuquerque <sup>1</sup>, Cláudia Quintino da Rocha <sup>2</sup>, Adriana Sousa Rêgo <sup>3</sup>, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes <sup>1</sup>, Ana Lúcia Abreu-Silva <sup>1,4</sup>, Igor Victor Ferreira dos Santos <sup>5</sup>, Cleudson Breno Rodrigues dos Santos <sup>5</sup>, Rosane Nassar Meireles Guerra <sup>1</sup>, Rachel Melo Ribeiro <sup>1</sup>, Valério Monteiro-Neto <sup>1</sup>, Eduardo Martins de Sousa <sup>1,6</sup> and Rafael Cardoso Carvalho <sup>1,\*</sup>

**Citation:** Moraes-Neto, R.N.; Coutinho, G.G.; Ataíde, A.C.S.; de Oliveira Rezende, A.; Nascimento, C.E.C.; de Albuquerque, R.P.; da Rocha, C.Q.; Rêgo, A.S.; de Sousa Cartágenes, M.d.S.; Abreu-Silva, A.L.; et al. Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* and Its Component Ellagic Acid Exert Antibacterial and Anti-Inflammatory Properties against *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. *Antibiotics* **2022**, *11*, 817. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060817>

Academic Editor: Carlos M. Franco

Received: 10 May 2022

Accepted: 15 June 2022

Published: 17 June 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luís 65080-805, MA, Brazil; roberval.moraes@discente.ufma.br (R.N.M.-N.); gabrielle.guedes@discente.ufma.br (G.G.C.); ana.ataid@discente.ufma.br (A.C.S.A.); aline.rezende@discente.ufma.br (A.d.O.R.); camila.carnib@ufma.br (C.E.C.N.); rafaela.pontes@hotmail.com (R.P.d.A.); cartagenes.maria@ufma.br (M.d.S.d.S.C.); anasilva1@professor.uema.br (A.L.A.-S.); rosane.guerra@ufma.br (R.N.M.G.); melo.rachel@ufma.br (R.M.R.); valerio.monteiro@ufma.br (V.M.-N.); eduardo.martins@ceuma.br (E.M.d.S.)
  - <sup>2</sup> Graduate Program in Chemistry, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luís 65080-805, MA, Brazil; rocha.claudia@ufma.br
  - <sup>3</sup> Graduate Program in Health and Services Management, CEUMA University—UniCEUMA, São Luís 65075-120, MA, Brazil; adriana.dsousa@ceuma.br
  - <sup>4</sup> Graduate Program in Animal Science, University of Maranhão State—UEMA, São Luís 65055-310, MA, Brazil
  - <sup>5</sup> Graduate Program in Biotechnology and Biodiversity Network BIODSNORTE, Federal University of Amapá—UFAP, Macapá 68903-419, AP, Brazil; igorsantosvictor@gmail.com (I.V.F.d.S.); breno@unifap.br (C.B.R.d.S.)
  - <sup>6</sup> Graduate Program in Microbial Biology, CEUMA University—UniCEUMA, São Luís 65075-120, MA, Brazil
- \* Correspondence: carvalho.rafael@ufma.br

**Abstract:** *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* (*Mabs*) causes chronic infections, which has led to the need for new antimycobacterial agents. In this study, we investigated the antimycobacterial and anti-inflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bixa orellana* leaves (BoEA) and ellagic acid (ElAc). In silico analysis predicted that ElAc had low toxicity, was not mutagenic or carcinogenic, and had antimicrobial and anti-inflammatory activities. Apparently, ElAc can interact with COX2 and Dihydrofolate reductase (DHFR) enzymes, which could explain both activities. In vitro analysis showed that BoEA and ElAc exerted antimicrobial activity against *Mabs* (minimum inhibitory concentration of 1.56, 1.56 mg/mL and bactericidal concentration of 6.25, 3.12 mg/mL, respectively). Clarithromycin showed MIC and MBC of 1 and 6 µg/mL. Treatment with BoEA or ElAc increased survival of *Tenebrio molitor* larvae after lethal infection with *Mabs* and reduced carrageenan-induced paw edema in mice, around 40% of edema volume after the fourth hour, similarly to diclofenac. In conclusion, BoEA and ElAc exert antimicrobial effects against *Mabs* and have anti-inflammatory effects, making them potential sources of antimycobacterial drugs. The biological activities of ElAc may be due to its high binding affinities predicted for COX2 and DHFR enzymes.

**Keywords:** *Bixa orellana*; bioprospecting; in silico; *Tenebrio molitor*; anti-mycobacteria activity; anti-inflammatory activity



## ANEXO III – Artigo Publicado

Santiago et al. *Clinical Phytoscience* (2021) 7:58  
<https://doi.org/10.1186/s40816-021-00291-3>


Clinical Phytoscience

REVIEW

Open Access

# Flavonoids, alkaloids and saponins: are these plant-derived compounds an alternative to the treatment of rheumatoid arthritis? A literature review



Luis Ângelo Macedo Santiago<sup>1</sup>, Roberval Nascimento Moraes Neto<sup>2</sup>, Ana Caroline Santos Ataíde<sup>2</sup>, Dâmaris Cristina Sousa Carvalho Fonseca<sup>3</sup>, Enio Fernandes Aragão Soares<sup>4</sup>, Joicy Cortez de Sá Sousa<sup>3</sup>, Renata Mondego-Oliveira<sup>5</sup>, Rachel Melo Ribeiro<sup>2</sup>, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes<sup>2</sup>, Lídio Gonçalves Lima-Neto<sup>3</sup>, Rafael Cardoso Carvalho<sup>2\*</sup>  and Eduardo Martins de Sousa<sup>1,2,3</sup>

## Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disease characterized by synovial inflammation leading to progressive joint erosion and, eventually, joint deformities. RA treatment includes anti-inflammatories, corticosteroids, synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), and immunosuppressants. Drug administration is associated with adverse reactions, as gastrointestinal ulcers, cardiovascular complications, and opportunistic infections. Wherefore, different plant-derived phytochemical compounds are studied like new therapeutic approach to treatment of RA. Among the phytochemical compounds of plants for treatment of RA, flavonoids, alkaloids and saponins are related for present anti-inflammatory activity and act as physiological and metabolic regulators. They have low toxicity compared to other active plant compounds, so their therapeutic properties are widely studied. The intention of the review is to present an overview of the therapeutics of flavonoids, alkaloids, and saponins for RA. An extensive literature survey was undertaken through different online platforms:

PubMed, SciELO, and Virtual Health Library databases, to identify phytochemical compounds used in RA treatment and the descriptors used were medicinal plants, herbal medicines, and rheumatoid arthritis. Seventy-five research and review articles were found to be apt for inclusion into the review. The present study summarizes the phytochemicals isolated from plants that have therapeutic effects on RA models, *in vitro* and *in vivo*. The studied substances exerted anti-inflammatory, chondroprotective, immunoregulatory, anti-angiogenic, and antioxidant activities and the most compounds possess good therapeutic properties, valuable for further research for treatment of RA.

**Keywords:** Phytochemical compounds, Flavonoids, Alkaloids, Saponins, Articular disease

\* Correspondence: [carvalho.rafael@ufma.br](mailto:carvalho.rafael@ufma.br)

<sup>2</sup>Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão - UFMA, Maranhão, São Luís, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.