

## RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação de mestrado será disponibilizado somente a partir de 31/10/2025.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Maria Júlia Mancim Imbriani**

**Nanoemulsão contendo hesperitina: desenvolvimento, caracterização e  
avaliação de seus efeitos anti-inflamatório e pró-osteogênico**

**Araraquara**

**2023**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Maria Júlia Mancim Imbriani**

**Nanoemulsão contendo hesperitina: desenvolvimento, caracterização e avaliação de seus efeitos anti-inflamatório e pró-osteogênico**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Madalena Palomari Spolidorio

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Milagros Maquera Huacho

**Araraquara**

**2023**

I32n

Imbriani, Maria Júlia Mancim

Nanoemulsão contendo hesperitina: desenvolvimento, caracterização e avaliação de seus efeitos anti-inflamatório e pró-osteogênico / Maria Júlia Mancim Imbriani. -- Araraquara, 2023

88 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Denise Madalena Palomari Spolidorio

Coorientadora: Patricia Milagros Maquera Huacho

1. Doenças periodontais. 2. Flavonoides. 3. Nanopartículas. 4. Regeneração Óssea. 5. Inflamação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Maria Júlia Mancim Imbriani**

**Nanoemulsão contendo hesperitina: desenvolvimento, caracterização e avaliação de seus efeitos anti-inflamatório e pró-osteogênico**

**Comissão julgadora**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia**

Presidente e orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

3º Examinador: Prof. Dr. Vinícius de Paiva Gonçalves

Araraquara, 31 de outubro de 2023.

## **DADOS CURRICULARES**

**Maria Júlia Mancim Imbriani**

NASCIMENTO: 24/03/1998 – Mococa – São Paulo

FILIAÇÃO: Rita de Cássia da Silva Mancim  
Marcelo dos Santos Imbriani

2013 – 2015: Ensino médio (2º grau)  
Fundação Universitária Vida Cristã

2016 – 2021: Graduação em Odontologia  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) –  
Araraquara

2021 – atual: Mestrado em Odontologia – Área Periodontia  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) –  
Araraquara

Dedico este trabalho à minha avó Maria Jacinta da Silva Mancim, por ser uma das mulheres mais fortes e corajosas, e ao mesmo tempo mais doce, que já convivi. Sou eternamente grata pela sorte de fazer parte da família que a senhora construiu.

Ao meu avô, Antônio José Mancim (*in memoriam*), que foi um dos homens mais batalhadores que já vi. Me ensinou muito sobre amor, humildade e honestidade. Como foi importante para mim conviver com o senhor, muito do que sou hoje devo ao seu exemplo.

À minha avó Jane dos Santos, que é um exemplo de resiliência e força, me mostrando, mesmo sem saber, que tudo é possível e que nunca devemos desistir daquilo que sonhamos.

E por fim, à minha mãe, Rita Mancim, pessoa ímpar, forte, batalhadora e o melhor exemplo de mulher e mãe que eu poderia ter. Só cheguei aonde estou hoje graças ao seu esforço e dedicação ilimitados. Muito obrigada por nunca medir esforços e sempre me dar o conforto de saber que onde quer que eu estivesse, você estaria ali e tornaria tudo possível.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por iluminar meus caminhos e pensamentos, sempre me trazendo o conforto de que tudo pode ficar bem.

À minha mãe, Rita, por ser o meu maior exemplo, me incentivar e nunca ter medido esforços para que eu alcance tudo aquilo que desejo.

Aos meus irmãos, Augusto e Rafael, por sempre me darem forças em todos os momentos, e por me mostrarem que independente de onde estivermos sempre teremos uns aos outros.

À toda minha família, que independente de qualquer distância sempre se faz presente e me dá o conforto de saber que sempre terei um lugar cheio de amor me esperando.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Madalena Palomari Spolidorio, por acreditar em mim e sempre abrir portas para que eu aprendesse e vivesse experiências incríveis.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Milagros Maquera Huacho, por toda dedicação em me ensinar durante todos estes anos, por me inspirar tanto na área acadêmica, por dividir comigo seu conhecimento e por todo incentivo.

Ao meu orientador na Université Laval, Prof. Dr. Mahmoud Rouabhia, por ter me acolhido e me orientado de forma ímpar, me inspirando muito profissionalmente e pessoalmente.

Ao meu namorado, Marcus, por me trazer calma e paz no dia a dia, e por estar sempre por perto em todos os momentos.

Aos meus amigos de Araraquara e de Mococa, que me incentivam e apoiam, deixando essa caminhada muito mais leve e feliz.

À minha amiga Letícia Durão, que me permite aprender e ter trocas incríveis, tanto no laboratório como fora dele.

A todos os amigos do laboratório, com quem tive o prazer de conviver e dividir algum momento desde a iniciação científica, Jhonathan, Leo, Juliana, Zé, Paco, Álvaro, Vinícius, Flávia, Gabriel, Cristiano, Vivian (*in memoriam*), Verônica, Maria Fernanda e Vinícius Manzoli, por tornarem o dia a dia mais alegre e por toda troca que tivemos e ainda teremos.

Aos excelentes pesquisadores, Jonatas e Leonardo, e ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- FCFAr/UNESP, pelo tanto que me ensinaram e por possibilitarem que eu iniciasse este trabalho em seus laboratórios, sempre dispostos a ajudar.

Às amigas que fiz no Canadá, especialmente a Mai, que dividiram momentos inesquecíveis comigo, tornando muito melhores os momentos felizes e mais fáceis os momentos difíceis e de angústia.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2020/ 14155-0, Processo nº 2021/05881-1 e Processo nº 2022/09690-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, e todos os professores, técnicos e demais profissionais, por manterem uma faculdade de excelência, permitindo uma formação de ótima qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, e a todos os professores que colaboram de forma muito importante para a formação do meu mestrado.

“A ignorância gera mais confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não os que sabem muito, que afirmam positivamente que esse ou aquele problema nunca pode ser resolvido pela ciência”.

Charles Darwin\*

---

\* Darwin CA. Origem das espécies. São Paulo: Hemus; 2013.

Imbriani MJM. Nanoemulsão contendo hesperitina: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de seus efeitos anti-inflamatório e pró-osteogênico [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

## RESUMO

Terapias alternativas associando produtos naturais e nanobiotecnologias abrem novas perspectivas para liberação controlada das drogas. Dentro deste contexto, nanoemulsões (NE) apresentam resultados promissores devido ao seu desenho estrutural e destacadas propriedades biológicas. A hesperitina (HT) é um metabolito da hesperidina, encontrado principalmente em frutas cítricas, com diversas propriedades biológicas tais como antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, neuroprotetora, analgésica e com capacidade osteogênica. Em função dos efeitos terapêuticos da hesperitina, associado às características promissoras das NE, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma nanoemulsão contendo hesperitina (NE-HT) com a finalidade de melhorar suas propriedades farmacodinâmicas e assim obter um material biocompatível e bioativo. Por outro lado, o estímulo elétrico (EE) tem mostrado efeitos promissores no comportamento celular, melhorando funções no metabolismo ósseo. Desta forma, consideramos que uma associação entre a NE-HT e EE pode sugerir uma melhora dos efeitos um do outro. Inicialmente, no **estudo 1**, NE-HT foi sintetizada e caracterizada, sua eficiência de encapsulação e morfologia foram avaliadas e seus efeitos sobre a osteogênese foram determinados em linhagem celular de osteoblastos humanos através da proliferação celular, formação de nódulos mineralizados, expressão de genes reguladores do metabolismo ósseo, organização e maturação de colágeno e atividade da fosfatase alcalina (FAL). No **estudo 2**, foi avaliada a ação da HT em sua forma livre e da NE-HT associadas ou não com estímulo elétrico (EE) no comportamento de osteoblastos humanos MG63, através da análise da adesão celular, proliferação celular, atividade da fosfatase alcalina e migração celular. Finalmente, no **estudo 3**, a ação da NE-HT na expressão de mediadores inflamatórios e matriz metaloproteinases (MMPs), foi avaliada em monócitos/macrófagos humanos estimulados por *Fusobacterium nucleatum*. Os dados numéricos, obtidos pela aplicação dos protocolos laboratoriais, foram submetidos à análise estatística específica utilizando-se o software GraphPad Prism, e todos os testes desse estudo serão aplicados com nível de significância de 5 % ( $p < 0.05$ ). Os resultados mostraram que a nossa NE-HT apresenta índices de caracterização ideais e estáveis, além de uma eficiência de encapsulação de  $74.07 \pm 5,33\%$ . Além disso o seu efeito benéfico na osteogênese foi comprovado pelo aumento dos parâmetros avaliados, ou aceleração dos mesmos. Já a associação da NE-HT com o EE mostra um melhor efeito do EE, ao permitir que uma alta voltagem de EE possa ser usada em osteoblastos não interferindo na adesão celular, aumentando a proliferação e melhorando os índices de atividade da FAL, além de mostrar um maior efeito da NE-HT na migração celular quando comparada a HT na forma livre. E por fim, a ação da NE-HT contra a inflamação pode ser comprovada pela redução das taxas de expressão de mediadores inflamatórios e MMPs. Portanto, podemos concluir que a NE-HT desenvolvida no presente estudo foi adequadamente caracterizada e sua aplicação direta ou associada a EE apresentam-se como potencial tratamento para doenças inflamatórias que envolvem o osso, porém, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários.

**Palavras-chave:** Doenças periodontais. Flavonoides. Nanopartículas. Regeneração Óssea. Inflamação.

Imbriani MJM. Hesperetin loaded nanoemulsion: development, characterization and evaluation of its anti-inflammatory and pro-osteogenic effects” [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

## ABSTRACT

Alternative therapies combining natural products and nanobiotechnologies open new perspectives to controlled drug release. In this context, nanoemulsions (NE) show promising results due to their structural design and outstanding biological properties. Hesperetin (HT) is a metabolite of hesperidin, found mainly in citrus fruits, with several biological properties such as antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, neuroprotective, analgesic, and osteogenic capacity. Due to the therapeutic effects of hesperetin, associated with the promising characteristics of NE, the present study aimed to develop a hesperetin-loaded nanoemulsion (HT-NE) to improve its pharmacodynamic properties and thus obtain a biocompatible and bioactive drug. On the other hand, electrical stimulation (ES) has been shown promising effects on cell behavior, enhancing bone metabolism functions. In this way, we consider that an association between the HT-NE and ES provides the possibility that both can enhance the effects of each other. At first, in **study 1** the HT-NE was synthesized and characterized, its encapsulation efficiency and morphology were evaluated, and its effects on osteogenesis were determined, in human osteoblasts cell line, through cell proliferation, formation of mineralized nodules, expression of regulator genes to bone metabolism, collagen quantification, and alkaline phosphatase activity. In **study 2**, the effects of HT in its free form and HT-NE associated or not with ES were evaluated in human osteoblasts MG63 behavior, through the analysis of cell adhesion, cell proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, and cell migration. Finally, in **study 3**, the action of HT-NE on the expression of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs) was evaluated in human monocytes/macrophages stimulated by *Fusobacterium nucleatum*. The numerical data, obtained by applying the laboratory protocols, was subjected to specific statistical analysis using the GraphPad Prism software, and all tests in this study was applied with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). Our results shows ideal and stable indexes of characterization, besides of an encapsulation efficiency of  $74.07 \pm 5,33\%$ . Besides that, its benefic effect on osteogenesis was proved by the increase of evaluated assays, or the acceleration of them. The association of HT-NE with ES showed a better effect of ES, allowing high voltage to be used in human osteoblasts, not interfering the cells adhesion, increasing cell proliferation and enhancing ALP activity, besides of showing a higher effect of HT-NE in cell migration when compared with free HT. Finally, the HT-NE effect against inflammation can be proved by de reduction of inflammatory mediators and MMPs. For this reason, we can conclude that the HT-NE developed in this study was properly characterized and its direct application or its association with ES can be consider as a potential treatment to inflammatory diseases affecting bone, although *in vitro* and *in vivo* studies are necessary.

**Keywords:** Periodontal diseases. Flavonoids. Nanoparticles. Bone regeneration. Inflammation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3 PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Publicação 1 .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Publicação 2 .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3 Publicação 3 .....</b>	<b>67</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica multifatorial associada ao biofilme disbiótico, e caracterizada por causar a destruição progressiva dos tecidos de suporte dentário<sup>1</sup>. É identificada a partir da perda de inserção clínica, perda óssea radiograficamente visível, bolsa periodontal e sangramento gengival<sup>1</sup>. Os periodontopatógenos e seus componentes bacterianos tais como lipopolissacarídeos, proteases e toxinas encontradas no biofilme induzem a resposta imune do hospedeiro ativando vias de defesa para a prevenção do avanço da infecção nos tecidos periodontais<sup>2</sup>. Bactérias periodontopatogênicas Gram-negativas tais como *Porphyromona gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tanarella forsythia*, estão fortemente envolvidas em diversas etapas da doença periodontal desde seu início<sup>3-5</sup>.

Complexos eventos imunoinflamatórios estão envolvidos na patogênese da periodontite, como por exemplo, aumento na produção de citocinas inflamatórias, como as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) assim como, a perda da relação entre metaloproteases de matriz (MMP) e o tecido inibidor de metaloproteinase (TIMP), fazendo com que a MMP degrade colágeno, elastina, matriz glicoprotéica e proteoglicanos<sup>5-7</sup>. Além disso, o LPS das bactérias via receptores toll like (TLRs) e marcadores inflamatórios como TNF (fator de necrose tumoral), levam a ativação de receptor desencadeador expresso em células mielóides (sTREM-1) por células de defesa como neutrófilos e monócitos ou macrófagos, acarretando a expressão de citocinas pró inflamatórias, quimiocinas e receptores de superfície celular<sup>8,9</sup>. Além disso, o sTREM é detectado em altas concentrações no fluido gengival de indivíduos com doença periodontal<sup>8,9</sup>. Dessa forma, estes mediadores inflamatórios promovem, indiretamente, degradação dos tecidos periodontais pela indução da produção de metaloproteases de matriz, ativador do receptor nuclear Kappa-B ligante (RANKL) e atividade de osteoclastos, resultando na reabsorção óssea alveolar<sup>10</sup> que constitui a principal característica da periodontite e, eventualmente, resulta com a perda do dente<sup>7,11</sup>.

O tratamento da periodontite tem como objetivo evitar a futura progressão da doença, minimizar os sintomas da mesma e muitas vezes possibilitando a restauração dos tecidos perdidos, evitando a perda do elemento dental e mantendo a saúde do

periodonto<sup>12</sup>. A terapia de redução bacteriana por meio do controle mecânico do biofilme dentário, assim como da terapia básica de raspagem e alisamento radicular manual, são tratamentos que apresentam bons índices de sucesso e ainda é a terapia mais indicada na prática clínica<sup>12</sup>. Contudo existem casos em que esta abordagem não é suficiente, exigindo complementações à terapia tradicional, podendo-se utilizar terapias coadjuvantes focada na tentativa de modular a resposta do hospedeiro e assim tentar suprimir a destruição dos tecidos periodontais pela reação inflamatória crônica<sup>12</sup>.

Novas drogas bioativas e de origem natural têm se tornado atraentes devido aos seus efeitos benéficos na saúde humana, principalmente no que diz respeito às doenças infecciosas<sup>13,14</sup>. Os flavonoides são compostos bioativos do grupo dos polifenóis, apresentam mais de 5000 tipos e possuem diferentes estruturas<sup>13,14</sup>. Podem ser encontrados em diversos tipos de plantas, frutas e vegetais, apresentando um sistema de baixa citotoxicidade e propriedades biológicas como anti-oxidante, anti-inflamatória, cardioprotetiva, vasodilatadora, anti-cancerígena, antibacteriana e efeitos no metabolismo ósseo<sup>14-18</sup>. Devido às suas complexas estruturas os flavonoides podem ser divididos em flavonois, flavonas, flavononas, flavon-3-ol, isoflavononas e antocianins<sup>19</sup>.

A hesperitina (HT) é um metabólito da hesperidina, pertencente ao subgrupo flavanona, encontrado principalmente em frutas cítricas como laranja e toranja<sup>20</sup>. Diversos estudos têm utilizado a HT como uma estratégia alternativa de novos usos terapêuticos, devido as suas diversas propriedades biológicas, incluindo efeitos analgésicos, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antioxidantes, neuroprotetoras e efeitos benéficos ao metabolismo ósseo<sup>14-18</sup>. Estudos destacam sua propriedade anti-inflamatória, mostrando sua capacidade em reduzir a atividade de mieloperoxidase, produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MIP-2, ciclooxigenase-2 (COX-2), alanina aminotransferase (AST) e enzimas ativas de aspartate transferase (ALT), além de inibir a ativação da via de sinalização NF- $\kappa$ B<sup>21-23</sup>. Protocolos experimentais *in vivo* e *in vitro* puderam demonstrar a capacidade da HT em inibir fortemente as expressões proteicas de TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, COX-2, iNOS, IL-6 e IL-1 $\beta$ <sup>24-26</sup>. Por meio da sua atuação na ligação MD2/TLR4, responsável pela identificação de LPS na superfície celular, a HT é capaz de atenuar lesões agudas de pulmão, diminuindo a concentração total de proteínas, número de neutrófilos e nível de citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>27</sup>. Chen et al.<sup>28</sup> (2017) mostraram em estudo *in vivo*, com indução de lesão hepática em ratos, e *in vitro*

com a indução de inflamação em macrófagos RAW 264.7 por LPS, que a HT apresenta efeito hepatoprotetivo e anti-inflamatório através da inibição das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.

Nos últimos anos autores sugeriram que a HT está envolvida no metabolismo ósseo e mecanismos de ação na osteogênese<sup>29,30</sup>. Estudos mostraram que a HT alivia os efeitos inibitórios da alta glicose na diferenciação osteoblástica de células-tronco do ligamento periodontal<sup>31,32</sup>. Além disso, a HT promove a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas através das vias de sinalização ERK e Smad1/5/8<sup>34</sup>. A ação benéfica da HT aos ossos, também se deve ao fato de a mesma aumentar a expressão de importantes genes, como ALP, RUNX 2, osteocalcina (OCN), Osterix, osteopontina (OPN), e COL1A1 em osteoblastos, células mesenquimais e células do ligamento periodontal<sup>29,32,33</sup>. Entretanto, os mecanismos de ação da HT sobre o metabolismo ósseo não estão completamente elucidados sendo de suma importância a busca de novas informações e constatações desse composto sobre estes postulados.

A nanotecnologia é o desenvolvimento de novas tecnologias em nível atômico, molecular e macromolecular para aplicações práticas, como dispositivos, moléculas e estruturas em escalas de nanômetros<sup>34</sup>. A mesma contribui para quase todos os campos da ciência, como por exemplo, física, ciência dos materiais, química, biologia, ciência da computação e engenharia, sendo recentemente aplicada na saúde humana com resultados altamente promissores<sup>34</sup>. Por outro lado, a biotecnologia se define como uma área multidisciplinar de aplicação tecnológica que utiliza sistemas biológicos e organismos vivos, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica<sup>35</sup>. Estas novas tecnologias estão revolucionando o mundo da ciência e o resultado dessa união é a chamada “nanobiotecnologia”, ou seja, uma ciência avançada e altamente interdisciplinar que vem sendo frequentemente utilizada para várias aplicações<sup>35</sup>. Espera-se que a sociedade seja beneficiada pela fusão dessas duas tecnologias devido às potenciais aplicações em medicina, odontologia, agricultura, meio ambiente dentre outras áreas<sup>35</sup>.

O interesse na nanotecnologia cresce cada vez mais como sistema de entrega de drogas com múltiplas vantagens: sua relação superfície/massa que é maior que de outras partículas, suas propriedades quânticas<sup>36</sup>, conferindo numerosas vantagens para a entrega de medicamentos, especialmente controlando o comportamento físico-

químico do fármaco (solubilidade e liberação) e medicamentos visando o potencial do sítio ativo, diminuindo os efeitos adversos<sup>37-40</sup>. Dentre as diferentes nanopartículas, sabe-se que as nanoemulsões são um tipo de carregador lipídico nanoestruturado<sup>41</sup> e podem ser formuladas de diversas formas, como líquidos, géis, cremes, aerossóis, dentre outras, e possibilitam diferentes formas de aplicação, além de poder apresentar administração de forma nasal, intravenosa, pulmonar e ocular<sup>42</sup>. Além disso, as gotículas de óleo presentes são capazes de solubilizar compostos farmacêuticos lipofílicos, além de protegê-los contra fatores externos, como pH, a oxidação e a hidrólise, sendo também mais resistentes a floculação e coalescência<sup>43</sup>. Portanto as nanoemulsões permitem a redução da variabilidade do composto encapsulado, destacando-se a sua capacidade de protegê-lo contra enzimas degenerativas e controlando sua liberação no sítio ativo de escolha<sup>44</sup>. Além disso a mesma pode gerar uma melhor biocompatibilidade do fármaco permitindo a utilização do mesmo em altas concentrações<sup>44</sup>. Por tanto, ao incorporar um composto natural com baixa toxicidade dentro de um sistema de liberação controlada como são as nanoemulsões, irá permitir de que a nova formulação se torne mais biocompatível, permita a redução de seus efeitos colaterais, aumente sua estabilidade e melhore os efeitos biológicos destes compostos naturais<sup>45</sup>.

E por fim, a estimulação elétrica (EE) tem mostrado efeitos positivos nas atividades celulares, como por exemplo, no transporte de íons, na expressão gênica, produção de proteínas, espécies reativas de oxigênio intracelulares, secreção de citocinas e quimiocinas e migração celular<sup>46</sup>. Um estudo mostrou que a EE é capaz de gerar efeitos positivos na cicatrização através da regulação de citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias, fatores de crescimento e migração celular em fibroblastos humanos de pacientes diabéticos<sup>47</sup>. Por outro lado, Meng et al.<sup>48</sup> (2011) mostraram que a EE melhora a proliferação e adesão de osteoblastos, aumenta a formação de nódulos de mineralização e a expressão de genes relevantes para o metabolismo ósseo. Estudos mais recentes tiveram como foco a melhora da aplicação do EE e, por esta razão, diferentes membranas foram usadas<sup>47-50</sup>. Dentre estas membranas, as compostas por Polypirrole (PPy), um polímero que possui uma boa compatibilidade, mostrou resultados promissores<sup>51</sup>. Apesar do PPy apresentar características positivas, o mesmo apresenta algumas limitações que levam a um prejuízo de sua função, como a fragilidade e insolubilidade. Assim, outro polímero o poly(L-lactido) (PLLA) foi associado na síntese da membrana para torná-la mais forte e

resistente<sup>49,51</sup>. Além disso, foi testada a adição de heparina (HE) à formulação da membrana, obtendo-se resultados positivos como um aumento significativo da condutibilidade em meio aquoso e da adesão e crescimento celular<sup>52</sup>. Portanto com a utilização de uma membrana de PPy/HE/PLLA, a EE pode apresentar resultados promissores.

Contudo tem-se a hipótese de que a encapsulação da HT à uma nanoemulsão pode gerar uma melhora nos efeitos anti-inflamatório e pró-osteogênico assim como uma melhor estabilidade do flavonoide. Além disso, a associação entre a nanoemulsão contendo hesperitina (NE-HT) e EE podem apresentar perspectivas de aumento dos efeitos biológicos, uma da outra, sobre o metabolismo ósseo através da influência no comportamento dos osteoblastos.

## 4 CONCLUSÃO

Contudo, sobre os resultados apresentados, pode-se observar que:

A HT em nanoemulsão apresentou parâmetros satisfatórios de caracterização, com excelente eficiência de encapsulação, morfologia e biocompatibilidade; além de apresentar resultados biologicamente favoráveis no aumento da proliferação celular em osteoblastos, formação de nódulos de mineralização, regulação de genes importantes para o metabolismo ósseo e melhora na produção do colágeno e atividade da fosfatase alcalina;

A HT, assim como a NE-HT associadas ao estímulo elétrico mostraram resultados satisfatórios dos seus efeitos sobre osteoblastos. Sendo que a NE-HT apresentou maior efeito do que HT em sua forma livre, permitindo a adesão celular, aumentando a proliferação celular e regulando a atividade da fosfatase alcalina. Além disso, a NE-HT age melhor na migração celular do que a HT em sua forma livre;

E, por fim, os resultados da NE-HT sobre a inflamação mostram o potencial da mesma em amenizar marcadores inflamatórios, reduzindo a expressão das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e das MMPs MMP-1, MMP-3 e MMP-9 por monócitos/macrófagos humanos.

## REFERÊNCIAS\*

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH et al. Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Periodontol. 2018; 89(Suppl 1): S173-S182.
2. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. J Periodontol. 2005; 76(11): 2033-41.
3. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R. Host response mechanisms in periodontal diseases. J Appl Oral Sci. 2015; 23(3): 329-55.
4. Ebbers M, Lübcke PM, Volzke J, Kriebel K, Hieke C, Engelmann R et al. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. Sci Rep. 2018; 8(1): 15129.
5. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host microbial interactions – consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol. 2011; 38(11): 44-8.
6. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. J Dent Res. 2011; 90(2): 143-53.
7. Abdulkareem AA, Abdulbaqi HR, Milward MR. In vitro Homeostasis of rat oral epithelial cell cultures following withdrawal of periodontal pathogens. Braz Dent J. 2020; 31(2): 135-42.
8. Lagha AB, LeBel G, Grenier D. Dual action of highbush blueberry proanthocyanidins on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and the host inflammatory response. BMC Complement Altern Med. 2018; 18(1): 10.
9. Schenk M, Bouchon A, Seibold F, Mueller C. TREM-1–expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. J Clin Invest. 2007; 117(10): 3097–106.
10. Nanci A, Bosshardt D. Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol 2000. 2006; 40(1): 11–28.
11. Matarese G, Currò M, Isola G, Caccamo D, Vecchio M, Giunta ML et al. Transglutaminase 2 up-regulation is associated with RANKL/ OPG pathway in cultured HPDL cells and THP-1-differentiated macrophages. Amino Acids. 2015; 47(11): 2447-55.
12. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease?. Periodontol 2000. 2017; 75(1): 152-88.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Preethi Soundarya S, Sanjay V, Haritha Menon A, Dhivya S, Selvamurugan N. Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2018; 110: 74-87.
14. Nones J, E Spohr TC, Gomes FC. Hesperidin, a flavone glycoside, as mediator of neuronal survival. *Neurochem Res*. 2011; 36(10): 1776-84.
15. Ahmad S, Alam K, Hossain MM, Fatima M, Firdaus F, Zafeer MF et al. Anti-arthritis and cardioprotective action of hesperidin and daidzein in collagen-induced rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem*. 2016; 423(1-2): 115-27.
16. Mamun MA, Hosen MJ, Khatun A, Alam MM, Al-Bari MAA. Tridax procumbens flavonoids: a prospective bioactive compound increased osteoblast differentiation and trabecular bone formation. *Biol Res*. 2017; 50(1): 28.
17. Nobakht M, Trueman SJ, Wallace HM, Brooks PR, Streeter KJ, Katouli M. Antibacterial properties of flavonoids from kino of the eucalypt tree, *Corymbia torelliana*. *Plants (Basel)*. 2017; 6(3): 39.
18. Rothwell JA, Knaze V, Zamora-Ros R. Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017; 20(6): 512-21.
19. Cassidy A, Minihane AM. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr*. 2017; 105(1): 10–22.
20. Muhammad T, Ikram M, Ullah R, Rehman SU, Kim MO. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling. *Nutrients*. 2019; 11(3): 648.
21. Ma H, Feng X, Ding S. Hesperetin attenuates ventilator-induced acute lung injury through inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2015; 769: 333-41.
22. Ren H, Hao J, Liu T, Zhang D, Lv H, Song E et al. Hesperetin suppresses inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells via the inhibition of NF- $\kappa$ B and activation of Nrf2/HO-1 pathways. *Inflammation*. 2016; 39(3): 964-73.
23. Duran Y, Karaboğa İ. Effect of hesperetin on systemic inflammation and hepatic injury after blunt chest trauma in rats. *Biotech Histochem*. 2020; 95(4): 297-304.
24. He W, Li Y, Liu M, Yu H, Chen Q, Chen Y et al. Citrus aurantium L. and its flavonoids regulate TNBS-induced inflammatory bowel disease through anti-inflammation and suppressing isolated jejunum contraction. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(10): 3057.
25. Wang B, Li L, Jin P, Li M, Li J. Hesperetin protects against inflammatory response and cardiac fibrosis in postmyocardial infarction mice by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2017; 14(3): 2255-60.
26. Wang WJ, Huang YC, Su CM, Ger TR. Multi-functional drug carrier micelles with anti-inflammatory. *Drug Front Chem*. 2019; 7: 93.
27. Ye J, Guan M, Lu Y, Zhang D, Li C, Li Y et al. Protective effects of hesperetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting MD2. *Eur J Pharmacol*. 2019; 852: 151-8.

28. Chen X, Ding HW, Li HD, Huang HM, Li XF, Yang Y et al. Hesperetin derivative-14 alleviates inflammation by activating PPAR- $\gamma$  in mice with CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury and LPS-treated RAW264.7 cells. *Toxicol Lett.* 2017; 274: 51-63.
29. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, Barron D, Urpi-Sarda M, Manach C et al. Molecular mechanism of hesperetin-7-O-glucuronide, the main circulating metabolite of hesperidin, involved in osteoblast differentiation. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(1): 668-75.
30. Liu L, Zheng J, Yang Y, Ni L, Chen H, Yu D. Hesperetin alleviated glucocorticoid-induced inhibition of osteogenic differentiation of BMSCs through regulating the ERK signaling pathway. *Med Mol Morphol.* 2021; 54(1): 1-7.
31. Rojas BF, Gutierrez-Venegas G. Flavonoids exert multiple periodontic benefits including anti-inflammatory, periodontal ligament-supporting, and alveolar bone-preserving effects. *Life Sci.* 2018; 209: 435-54.
32. Kim SY, Lee JY, Park YD, Kang KL, Lee JC, Heo JS. Hesperetin alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells. *PLoS One.* 2013; 8(6): e67504.
33. Xue D, Chen E, Zhang W, Gao X, Wang S, Zheng Q. The role of hesperetin on osteogenesis of human mesenchymal stem cells and its function in bone regeneration. *Oncotarget.* 2017; 8(13): 21031-43.
34. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules.* 2019; 25(1): 112.
35. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloid Surf. B.* 2010; 75: 1–18.
36. Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine.* 2008; 3(2): 133–49.
37. Abdollahi S, Lotfipour F. PLGA- and PLA-based polymeric nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Biomed Int.* 2012; 3: 11–6.
38. Santos FK, Oyafuso M, Kiill C, Gremiao MP, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of hyperproliferative skin diseases: a review. *Curr Nanosci.* 2013; 9: 159–67.
39. de Souza ALR, Kiill CP, dos Santos FK, da Luz GM, Rocha e Silva H, Chorilli M et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for dermatomycosis treatment. *Curr Nanosci.* 2012; 8: 512–9.
40. Sato MR, da Silva PB, de Souza RA, dos Santos KC, Chorilli M. Recent advances in nanoparticle carriers for coordination complexes. *Curr Top Med Chem.* 2015; 15(4): 287-97.
41. Jafarifar Z, Rezaie M, Sharifan P, Jahani V, Daneshmand S, Ghazizadeh H et al. Preparation and Characterization of Nanostructured Lipid Carrier (NLC) and nanoemulsion containing vitamin D<sub>3</sub>. *Appl Biochem Biotechnol.* 2022; 194(2): 914-29.

42. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK et al. Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2017; 252: 28-49.
43. Chen LH, Cheng LC, Doyle PS. Nanoemulsion-loaded capsules for controlled delivery of lipophilic active ingredients. *Adv Sci (Weinh)*. 2020; 7(20): 2001677.
44. Chime SA, Kenechukwu FC, Attama AA. Nanoemulsions. Advances in formulation, characterization and applications in drug delivery. In: Sezer AD, editor. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. [S.l.]: InTech; 2014 [Acesso em 10 ago. 2023]. Disponível: <http://dx.doi.org/10.5772/57028>.
45. Kant V, Kumari P, Jitendra DK, Ahuja M, Kumar V. Nanomaterials of natural bioactive compounds for wound healing: novel drug delivery approach. *Curr Drug Deliv*. 2021; 18(10): 1406-25.
46. Meng S, Rouabhia M, Zhang Z. Electrical stimulation and cellular behaviors in electric field in biomedical research. *Materials (Basel)*. 2021; 15(1): 165.
47. Abedin-Do A, Zhang Z, Douville Y, Méthot M, Rouabhia M. Effect of electrical stimulation on diabetic human skin fibroblast growth and the secretion of cytokines and growth factors involved in wound healing. *Biology (Basel)*. 2021; 10(7): 641.
48. Meng S, Zhang Z, Rouabhia M. Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation. *J Bone Miner Metab*. 2011; 29(5): 535-44.
49. Cui S, Rouabhia M, Semlali A, Zhang Z. Effects of electrical stimulation on human skin keratinocyte growth and the secretion of cytokines and growth factors. *Biomed Mater*. 2021; 16(6).
50. Rouabhia M, Park HJ, Abedin-Do A, Douville Y, Méthot M, Zhang Z. Electrical stimulation promotes the proliferation of human keratinocytes, increases the production of keratin 5 and 14, and increases the phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAP kinases. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020; 14(7): 909-19.
51. Cui S, Mao J, Rouabhia M, Elkoun S, Zhang Z. A biocompatible polypyrrole membrane for biomedical applications. *RSC Adv*. 2021; 11(28): 16996-17006.
52. Meng S, Rouabhia M, Shi G, Zhang Z. Heparin dopant increases the electrical stability, cell adhesion, and growth of conducting polypyrrole/poly(L,L-lactide) composites. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 87(2): 332-44.