



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**GISELE LINS MONTEIRO ALVARES**

**SISTEMA MICROEMULSIONADO CONTENDO ÓLEO DE PEQUI  
(*Caryocar coriaceum* Wittm) PARA USO TÓPICO  
ANTI-INFLAMATÓRIO**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2016**

**GISELE LINS MONTEIRO ALVARES**

**SISTEMA MICROEMULSIONADO CONTENDO ÓLEO DE PEQUI  
(*Caryocar coriaceum* Wittm) PARA USO TÓPICO  
ANTI-INFLAMATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Karina Lidianne Alcântara Saraiva

CAMPINA GRANDE – PB

2016

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

A473s Alvares, Gisele Lins Monteiro.

Sistema microemulsionado contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) para uso tópico anti-inflamatório [manuscrito] / Gisele Lins Monteiro Alvares. - 2016.

87 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Karina Lidiane Alcântara Saraiva, Departamento de Farmácia".

1. Ácidos graxos insaturados. 2. Anti-inflamatório. 3. Microemulsões. 4. Pequi. I. Título.

21. ed. CDD 615.321


GISELE LINS MONTEIRO ALVARES

SISTEMA MICROEMULSIONADO CONTENDO ÓLEO DE PEQUI  
(*Caryocar coriaceum* Wittm) PARA USO TÓPICO  
ANTI-INFLAMATÓRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 18 / 03 /2016.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Karina Lidianne Alcântara Saraiva  
Orientadora (FIOCRUZ)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Souza Alencar Falcão  
Examinadora (UFCG)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura / UEPB  
Examinador (UEPB)

CAMPINA GRANDE

2016



Cada amanhecer é convite sereno à conquista de valores que parecem inalcançáveis.  
À medida que o dia avança, aproveita os minutos, sem pressa nem postergação do dever.

Não te aflijas ante o volume de coisas e problemas que tens pela frente.

Dirige cada ação à sua finalidade específica.

Após concluir um serviço, inicia outro e, sem mágoa dos acontecimentos desagradáveis,  
volve à lição com disposição, avançando, passo a passo, até o momento de conclusão dos  
deveres planejados.

Não tragas do dia precedente o resumo das desditas e dos aborrecimentos.

Amanhecendo, começa o teu dia com alegria renovada e sem passado negativo, enriquecido  
pelas experiências que te constituirão recurso valioso para a vitória que buscas.

Joanna de Ângelis – Divaldo Pereira Franco.

Ao meu avô **Messias** (*in memoriam*), exemplo de dedicação,  
sabedoria e fé, assim como á **Tia Bia** (*in memoriam*), por toda sua  
doação de amor, carinho dedicação e luz.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Deus nos proporciona diariamente a oportunidade de nos aprimorar, não importando se o que fazemos se tornará grande, porém o modo como fazemos cada coisa. Fazendo tudo que está ao nosso alcance, realizamos o máximo, e o que não conseguimos concluir agora, devemos terminar amanhã, fieis ao compromisso. A Ti sou grata, Senhor, pois esta valiosa jornada não seria possível sem Vosso aparo, luz, consolo e misericórdia. Todos os que citarei asseguir, foram, cada qual a sua maneira, imprescindíveis, e sei que não ao acaso se devem todos valorosos auxílios, mas sim pelo “ser social” que necessita do próximo, força que nos move a ajudarnos mutuamente, motivados pelos Teu amor, para o bem, em prol de colimar nossas metas.

Desta forma, agradeço a minha orientadora, **Karina**, que me acompanha desde os últimos anos de minha graduação até o término deste trabalho. Seu aconselhamento, direcionamento e inteligência, foram decisivos, não apenas neste trabalho, como em minha vida acadêmica, me proporcionando lições de valor inestimável. À **João Walter**, sou enormemente grata por todo o apoio cedido, disponibilidade, árduo trabalho, incentivo e parceria durante este último ano de pesquisa, sua colaboração foi imprescindível.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, aos coordenadores, Bolívar e Ana Cláudia, bem como a secretária Dilma, por todos os esclarecimentos, organização e trabalho. Sou grata a todo o corpo docente do programa, bem como os professores convidados e os cursos realizados, responsáveis por muito conhecimento apreendido e por seus valiosos ensinamentos. A CAPS, agradeço pela oportunidade de financiamento durante este período de estudo, bem como a UEPB (funcionários, técnicos, professores e etc), instituição na qual me foi possível concluir a graduação e desenvolver este estudo de mestrado.

Entretanto, sem a disponibilidade da FACISA (estudo in vivo); CETENE (ensaios morfológicos, físico-químicos, e estruturais da formulação); Olívia O. Cano, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (autenticação botânica da planta); Núcleo de Caracterização e Análise da UFPB (análise química do óleo), entre outras parcerias e auxílios, não seria possível realização deste trabalho.

Agradeço enormemente aos companheiros de pesquisa e amigos de laboratório, **Geilza, Yargo, Daniele Rocha, Daniele Diniz, Airlla**, e meus alunos ICs por pouco tempo (Laysa, Sonally, e Natan), pelo auxílio durante a realização dos experimentos, discussões e aprendizados compartilhados, pela confiança, amizade e apoio. Vocês, não importando o tempo que cada um esteve presente, possuem sua importância e fizeram este estudo acontecer. Estou sempre à disposição e a torcer por vocês, no progresso acadêmico e pessoal.

Uma experiência muito especial desempenhada neste período foi o estágio em docência, que realizei com a orientação do prof. Alexsandro. Agradeço ao professor pela confiança e oportunidade, e aos alunos pelo carinho, paciência, atenção, alegria, apoio e aprendizados trocados.

Desde o processo seletivo, até a conclusão do mestrado, só tenho a agradecer aos meus colegas: Sabrina, Marcela, Fernanda, Cíntia, Carmélia, Célia, Alana, e em especial, aos amados, “amigos/família”, que estão comigo desde a graduação, **Cleildo, Joanda e Laianne**. Compactuamos momentos, aflições, vitórias, sentimentos, conhecimento, enfim, foi muito especial ter cada um de vocês durante essa jornada.

Agradeço minha companheira de apartamento e amiga, Alexsanda, pela paciência, atenção e carinho. Aos amigos de longa data, Andréia, Joelma, Juliana, Vânia, Altina, Ana Cláudia, Paolla, Fran, Neide, Diogo e Anselmo, entre outros, que sempre se fazem presentes em minha vida. Agradeço a Rafael, pelo incentivo, otimismo e auxílio durante períodos importantes. Assim como minhas lindas: Monique, Karla Monik, Tâmires, Saniele, Laianne e Joanda. A Caio sou muito grata, por toda paciência, empatia e carinho neste período onde você demonstrou força e disposição a me auxiliar. Amigos, quantas histórias, vivências, experiências, dores e alegrias, apoio e apoio trocados... **Amo todos vocês!**

Nada se realizaria sem minha fonte inesgotável de amor, meus queridos pais, **Leda e Gilberto: holofotes de luz nos períodos de sombras!** Vocês são tudo, meus rei e rainha, e são a principal razão de tudo sempre. Agradeço tudo que sou: os valores morais, a educação e os inúmeros esforços feitos para que eu realizasse meus sonhos e fosse feliz! Não sei como falar do amor que sinto por vocês, sem me pôr em lágrimas. Então apenas aceitem meu eterno agradecimento... EU OS AMO!

“**Leila**, adoro dizer seu nome, Leila...” além da minha própria existência, o maior

presente que recebi de nossos pais! Tão pequena cuidei, agora me enche de orgulho, transformando-se em uma garota forte, inteligente, com pensamento crítico, esforçada, verdadeira e entre tantas outras qualidades! Minha pequena, você está grande, e se tornará uma grande mulher. Em momentos difíceis, basta lembrar o seu sorriso engraçado, do seu carinho e me sinto mais forte, mais capaz! Eu te amo e a cada dia que passa mais orgulho tenho de você.

Agradeço aos meus familiares que amo e possuem grande espaço em meu coração, em especial: tias **Lúcia, Laura e Lurdinha**. Aos primos e primas, Catarina, Luciana, Jânia, Lindaura, Aparecida, Vítor e Tiago. Meus avós e todos os demais familiares, que sempre se apresentaram próximos, com inumeráveis demonstrações de carinho, afeto, cuidado e amor. Só desejo retribuir sempre, a cada um, todo o apreço e lealdade.

Sou grata a Albaniza, pelas conversas, amizade, carinho e aos meus “irmãos” de pais diferentes, Aquiles e Átila, pelas experiências e momentos compartilhados, pelas noites com violão, a alegria das férias, os churrascos e as discussões malucas sobre feminismo, o mundo, política e etc. Vocês são muito importantes para mim!

## RESUMO

O pequi é fruto da angiosperma popularmente conhecida como pequiizeiro (*Caryocar coriaceum* W.), encontrado no cerrado e semiárido brasileiro. O óleo obtido da polpa possui ácidos graxos insaturados (AGI), com potenciais propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sais minerais e vitaminas, amplamente utilizado na medicina popular. Sua incorporação em sistemas microemulsionados (ME) pode permitir maior eficácia terapêutica pela habilidade do nanocarreador em interagir com o extrato córneo da pele. Buscando uma terapia anti-inflamatória tópica inovadora e eficaz, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de ME contendo óleo da polpa do pequi. Diante do exposto, o óleo foi extraído, caracterizado quimicamente e teve seu Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) determinado. Em seguida, foi desenvolvido um Diagrama de Fases Pseudoternário (DFPT) para obtenção de sistemas transparentes. Dentre estes, um sistema foi selecionado, caracterizado em aspectos de pH, condutividade, índice de refração, viscosidade, tamanho de gotículas, potencial zeta, morfologia e propriedades térmicas, além de estabilidade física preliminar. Por fim, foi verificada a atividade anti-inflamatória preliminar em modelo animal de edema de pata com carragenina e realizado estudo histológico. Os resultados apontaram a presença dos AGI majoritários oléico e palmítico, enquanto o EHL do óleo foi estabelecido na faixa  $10,5 \leq 11,75$ . O DFPT foi obtido utilizando os tensoativos Kollyphor EL<sup>®</sup> e Brij 52<sup>®</sup>, óleo de pequi e fase aquosa (água e propilenoglicol - 1:3), sendo selecionado o sistema composto por 47,6% da mistura de tensoativos, 5,3% do óleo de pequi e 47,1% da fase aquosa. Macroscopicamente, o sistema apresentou-se homogêneo e transparente. O valor de pH obtido ( $7,33 \pm 0,04$ ) é adequado para aplicação tópica. O índice de refração e a microscopia de luz polarizada revelaram formulação isotrópica. Estudo reológico indicou fluxo newtoniano, enquanto o tamanho médio das gotículas foi 13,38 nm com distribuição unimodal e dispersidade 0,17, características que somadas à medida de potencial zeta de  $|7,53 \zeta\text{mV}|$  são indicativos de ME estável. A técnica de microscopia de eletrônica de transmissão revelou grupos de gotículas de óleo revestidas por tensoativos. A condutividade elétrica foi relativamente baixa ( $15,087 \pm 0,1893 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), justificada pela maior presença do propilenoglicol na fase aquosa. Estes achados indicam comportamento de ME em transição de fase bicontínua para O/A, confirmado por meio de DSC. A formulação manteve-se estável nos estudos de estabilidade preliminar realizados. Ademais, durante o estudo *in vivo*, o grupo tratado com a ME contendo 5,3% do óleo de pequi apresentou superior inibição do edema ( $p < 0,05$ ) durante as duas primeiras horas quando comparada com os demais grupos, além de manter atividade superior ao óleo bruto durante todo estudo. A análise histológica corrobora estes resultados, visto que o grupo tratado com a ME revelou achados histopatológicos bastante reduzidos. Portanto, o nanossistema desenvolvido apresentou-se estável, com aspectos desejáveis para uso tópico e acentuada ação anti-inflamatória, sendo um promissor fitoterápico nanotecnológico, alternativo aos tratamentos usuais de inflamações cutâneas.

**PALAVRAS-CHAVE:** ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS; INFLAMAÇÃO; MICROEMULSÕES; PEQUI.

## ABSTRACT

Pequi is a fruit from an angiosperm popularly known as pequiizeiro (*Caryocar coriaceum* W.), found in the Brazilian cerrado and semi-arid biomes. The oil obtained from the pulp, has unsaturated fatty acids (UFAs), with potential antioxidant and anti-inflammatory properties, minerals and vitamins, being widely used in popular medicine. It's incorporation in microemulsion systems (MES) can allow major therapeutic effectiveness by the drug delivery system ability to interact with the stratum corneum of the skin. In search for an innovative and efficient topical anti-inflammatory therapy, the objective of this work was the development and characterization of a ME containing pequi pulp oil. In face of that, the oil was extracted, chemically described and had its Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) determined. Thereupon, a Pseudoternary Phase Diagram (PTPD) was developed for the obtainment of transparent systems. Among these, a system was selected and characterized in the aspects of pH, conductivity, refractive index, viscosity, droplet size, zeta potential, morphology, thermal properties and preliminary physical stability. Finally, preliminary anti-inflammatory activity in rat paw edema model using carrageenan was verified and a histological study was made. The results pointed the presence of the majority oleic and palmitic UFA, while the oil HLB was determined in between 10,5 - 11,75. The PTPD was obtained by the use of Kollyphor EL<sup>®</sup> e Brij 52<sup>®</sup>, pequi oil and aqueous phase (water and propyleneglycol - 1:3), being selected a system composed by 47,6% of the tensoactives mixture, 5,3% of pequi oil and 47,1% of aqueous phase. Macroscopically, the system demonstrated homogeneous and transparent aspect. The pH value obtained ( $7,33 \pm 0,04$ ) was adequate for topical application, while the refractive index and polarized light microscopy revealed an isotropic formulation. Rheological studies indicated Newtonian flow, whereas the medium droplet size was 13,38 nm with unimodal distribution and dispersity 0,17, characteristics which, added to the zeta potential measure of  $|7,53 \zeta\text{mV}|$ , are indications of a stable ME. The transmission electron microscopy (TEM) revealed droplet groups of oil covered by tensoactives. The electrical conductivity was relatively low ( $15,087 \pm 0,1893 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), justified by the major propyleneglycol presence in the aqueous phase. These findings indicate a ME behavior of bicontinuous transition phase system to W/O, confirmed by DSC. The formulation remained stable in previous stability studies realized. Furthermore, during the *in vivo* study, the group treated with the ME containing 5,3% of pequi oil presented superior edema inhibition ( $p < 0,05$ ) during the first two hours while compared to the other groups, besides maintaining superior activity than the brute oil during the whole study. The histological analysis corroborates this result, since the group treated with the ME revealed reduced histopathological findings. Therefore, the developed nanosystem demonstrated to be stable, with desirable aspects for topical usage and with high anti-inflammatory action, being a promising nanotechnological phytotherapeutic and an alternative to the usual treatments for cutaneous inflammations.

KEY-WORDS: UNSATURATED FATTY ACIDS; INFLAMMATION; MICROEMULSIONS; PEQUI.

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	Classificação taxonômica do pequi.	23
<b>TABELA 2</b>	Composição das emulsões.	42
<b>TABELA 3</b>	Grupos experimentais para o teste de edema de pata.	49
<b>TABELA 4</b>	Caracterização da formulação.	60
<b>TABELA 5</b>	Eventos detectados pelo DSC.	67



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Localização geográfica da Chapada do Araripe.	22
<b>FIGURA 2</b>	Pequi ( <i>Caryocar coriaceum</i> W.).	23
<b>FIGURA 3</b>	Fruto do pequi em corte transversal.	24
<b>FIGURA 4</b>	Representação esquemática da estrutura da pele.	27
<b>FIGURA 5</b>	Vias de sinalização na inflamação da pele.	28
<b>FIGURA 6</b>	Biossíntese dos eicosanóides a partir do AA e do EPA.	30
<b>FIGURA 7</b>	Diferentes configurações de MEs.	34
<b>FIGURA 8</b>	Diagrama de fases.	37
<b>FIGURA 9</b>	Obtenção do DFPT.	44
<b>FIGURA 10</b>	Teste de edema de pata.	48
<b>FIGURA 11</b>	Cromatograma da forma esterificada do óleo de pequi.	52
<b>FIGURA 12</b>	MS do primeiro evento detectado pelo CG.	53
<b>FIGURA 13</b>	MS do segundo evento detectado pelo CG.	53
<b>FIGURA 14</b>	Óleo da polpa de Pequi.	54
<b>FIGURA 15</b>	Diâmetro das gotas ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões com óleo de Pequi.	56
<b>FIGURA 16</b>	Valores de turbidez das emulsões com óleo de Pequi.	57
<b>FIGURA 17</b>	Diagrama de Fases Pseudoternário	59
<b>FIGURA 18</b>	Formulação selecionada na área de ST no DFPT.	60
<b>FIGURA 19</b>	Morfologia das gotículas da formulação.	62
<b>FIGURA 20</b>	Estudo reológico da formulação.	64
<b>FIGURA 21</b>	DSC da formulação e seus componentes isolados.	66
<b>FIGURA 22</b>	Percentual de inibição do edema após os tratamentos	70
<b>FIGURA 23</b>	Avaliação do efeito anti-inflamatório preliminar dos grupos tratados.	71

<b>FIGURA 24</b>	Ação anti-inflamatória preliminar dos tratamentos	71
<b>FIGURA 25</b>	Análise histológica da pele após indução de edema.	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGI	Ácido Graxo Insaturado
CG-MS	Cromatografia Gasosa e Espectroscopia de Massas
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
Cert-BIO	Laboratório de Certificação e desenvolvimento de Biomateriais
DDA	Diclofenaco Dietilamônio
DFPT	Diagrama de fases pseudoternário
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EC	Estrato córneo
ELO	Emulsão líquida opaca
EM	Emulsão
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EHLc	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo crítico
IR	Índice de refração
LABDEM	Laboratório de Desenvolvimento de produtos Farmacêuticos
LDCPF	Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de produtos Farmacêuticos
ME	Sistema microemulsionado
ME A/O	Microemulsão água em óleo
ME O/A	Microemulsão óleo em água
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
PEC	Parâmetro de empacotamento crítico
PPG	Propilenoglicol
SF	Separação de fases
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
g	Gramas
KV	Kilovolt
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
min	Minuto

$\mu\text{S}$	MicroSiemens
$\mu\text{L}$	Microlitro
nm	Nanômetro
$\zeta\text{mV}$	Potencial Zeta

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	20
2.1	Pequi ( <i>Caryocar coriaceum</i> W.)	21
2.2	A pele e o processo inflamatório	25
2.3	Sistemas microemulsionados (ME)	30
2.3.1	<i>Estrutura de ME</i>	32
2.3.2	<i>Formação de ME</i>	33
2.3.3	<i>Diagramas de fase</i>	35
3	<b>OBJETIVOS</b>	37
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	39
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	39
4.1	Materiais	40
4.2	Extração dos óleos fixos e análise química	40
4.3	Determinação do EHL do óleo	41
4.3.1	<i>Formulação das emulsões</i>	41
4.3.2	<i>Caracterização das emulsões</i>	42
4.3.3	<i>Análise do tamanho de gota por DLS</i>	42
4.3.4	<i>Turbidimetria</i>	42
4.4	Construção do DFPT	42
4.5	Seleção e preparo da formulação	43
4.6	Determinação das características físico-químicas do sistema ME	43
4.6.1	<i>Verificação de aspectos macroscópicos</i>	43
4.6.2	<i>Determinação do pH, condutividade e índice de refração</i>	44
4.6.3	<i>Características reológicas</i>	44
4.6.4	<i>Potencial Zeta</i>	44
4.6.5	<i>DLS e Dispersidade</i>	45
4.6.6	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	45
4.6.7	<i>Ultraestrutura das gotículas</i>	45
4.6.8	<i>Avaliação da estabilidade preliminar</i>	46

4.6.8.2	Estresse Térmico	46
4.6.8.3	Ciclo gelo-degelo	46
4.7	Ensaio <i>in vivo</i>	46
4.7.1	<i>Animais</i>	46
4.7.2	<i>Modelo de edema de pata em camundongos</i>	47
4.7.3	<i>Grupos e tratamentos</i>	48
4.7.4	<i>Análise histológica</i>	48
4.7.5	<i>Análise estatística</i>	48
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	50
5.1	Composição química do óleo de pequi	51
5.2	Determinação do EHL do óleo da polpa do pequi	54
5.3	Diagrama de fases pseudoternário	56
5.4	Caracterização da formulação	590
5.4.1	<i>pH, condutividade, tamanho de gotícula e estudos morfológicos</i>	659
5.4.2	<i>Potencial Zeta</i>	62
5.4.3	<i>Estudo Reológico</i>	62
5.4.4	<i>DSC</i>	63
5.5	Testes de estabilidade preliminar	67
5.6	Ensaio <i>in vivo</i>	68
5.6.1	<i>Teste de edema de pata induzido por carragenina</i>	68
5.6.2	<i>Análise Histológica</i>	71
6	<b>CONCLUSÃO</b>	73
7	<b>REFERÊNCIAS</b>	75
	<b>ANEXOS</b>	87

*Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia permite à humanidade um laço de maior proximidade com o meio ambiente, utilizando a grandeza da natureza para reverter no organismo as funções prejudicadas, recuperar a imunidade enfraquecida e promover a cura e a desintoxicação (SOUZA, 2007; RIBEIRO et al., 2014). Dessa forma, as plantas medicinais passam a atuar como uma fonte alternativa na terapêutica de muitas patologias, estimulando a exploração sustentável dos diferentes biomas brasileiros em virtude da riqueza de espécies que abrigam (GREGORIS, et al 2013).

O emprego tradicional de plantas medicinais pelas comunidades fornecem informações para elaboração de estudos farmacológicos, farmacotécnicos e fitoquímicos que impulsionam a inovação farmacêutica no setor. Com isso é possível planejar a pesquisa a partir de um conhecimento empírico já existente, muitas vezes consagrado pelo uso contínuo, mas que deve ser testado em bases científicas. Como também, estudos envolvendo produtos naturais são vantajosos no campo da saúde por buscarem substâncias menos tóxicas e eficazes no combate de enfermidades e patógenos (BARBOSA FILHO et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008). No cerrado brasileiro destaca-se o pequi, fruto de uma angiosperma pertencente à família Caryocaraceae (REGINA et al., 2014). Seu valor terapêutico é reconhecido pela medicina popular e estudos científicos buscam atestar sua real eficácia. O óleo de pequi é constituído, principalmente, pelos ácidos graxos oléico e palmítico, com menores proporções de ácidos linoléico e araquidônico. Além disso, é também rico em sais minerais e vitaminas A, C e do complexo B. Por sua composição química, são atribuídas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de alto valor nutricional. O óleo de pequi *in natura* é usado para tratamento de asma, tosse, influenza, reumatismo, inflamação da garganta, queimaduras, indigestão, dores no corpo, como também pode ser expectorante e afrodisíaco (BATISTA et al., 2010; REGINA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014). Em adição, estudos etnofarmacobotânicos comprovam a eficácia deste óleo no tratamento de afecções como gastrite e doenças inflamatórias, além de ser um modulador da lipídemia pós-prandrial em atletas (QUIRINO et al., 2009).

Atualmente, existe um grande interesse em incorporar produtos naturais em sistemas nanométricos para melhor veiculação do composto e aumento do efeito terapêutico local. Neste âmbito estão as microemulsões, que podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes formados a partir da mistura de



dois líquidos imiscíveis estabilizados por meio de um filme interfacial de tensoativos (DAMASCENO et al., 2011; SILVA et al., 2009; FANUN, 2012).

Além da estabilidade termodinâmica, as microemulsões oferecem vantagens de formação espontânea, simplicidade de fabricação, capacidade de solubilização de solutos lipofílicos, hidrofílicos e anfifílicos, grande área por razão de volume para a transferência de massa, e potencial para aumento da permeação (AMNON, 2015; FANUN, 2012). Com isso, a inclusão desta tecnologia no campo da fitoterapia é uma alternativa às terapias convencionais atuais.

Observando-se a importância de estudos envolvendo fitoterápicos, a relevância do desenvolvimento de novos tratamentos e a ampla utilização do óleo de pequi na medicina popular, este estudo direcionou-se no desenvolvimento de um sistema nanocarreador para uso tópico, buscando melhorar a permeação do óleo da polpa de *Caryocar coriaceum* Wittm e sua ação anti-inflamatória local.

*Referencial Teórico*

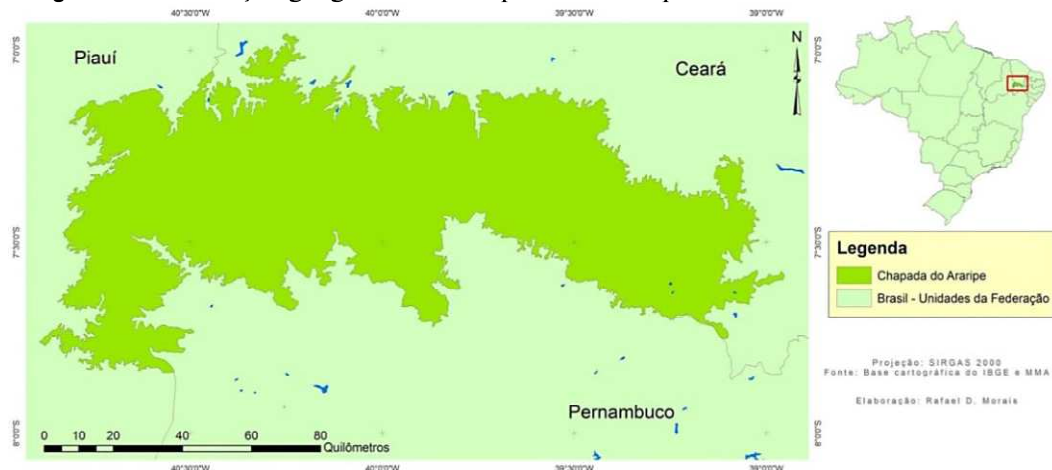
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Pequi (*Caryocar coriaceum* W.)

O Bioma Cerrado brasileiro ocorre em 15 estados e o Distrito Federal, ocupando uma área de aproximadamente dois milhões de km<sup>2</sup>, a qual corresponde a um quarto da superfície do país. A forma mais extensa, o cerrado *sensu stricto*, ocupa aproximadamente 65% da área geográfica do Bioma, enquanto que o cerradão ocupa apenas cerca de 1%. No restante da área original (34%), diversos outros tipos fitofisionômicos dividem a paisagem. O primeiro é uma vegetação savânica composta por um estrato arbóreo-arbustivo e outro herbáceo-graminoso. O cerradão é uma vegetação florestal de composição variável conforme a fertilidade do solo (JUNIOR; HARIDASAN, 2005). Apontado como grande detentor de diversidade biológica, no cerrado brasileiro são registrados 6.671 táxons nativos, distribuídos em 170 famílias e 1.140 gêneros (NETO; MORAIS, 2003; RIBEIRO et al., 2014).

O cerrado da chapada do Araripe é uma disjunção situada a uma altitude de 800 a 900m, encravado no domínio semiárido nordestino (Figura 1). Devido à maior altitude e, conseqüentemente, sob maior precipitação e menor temperatura que na área do entorno, esse enclave caracteriza-se como um hábitat ilha, constituído por espécies de ampla distribuição geográfica (COSTA et al., 2004). As espécies botânicas do cerrado são de grande importância para os habitantes locais, fornecendo-lhes alimentos, madeira para construções, combustível, produtos de beleza, forragem para animais selvagens e domésticos além de sua importância medicinal (RIBEIRO et al., 2014). Dentre elas, o pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) merece destaque por suas propriedades medicinais e socioeconômicas.

**Figura 1** Localização geográfica da Chapada do Araripe.



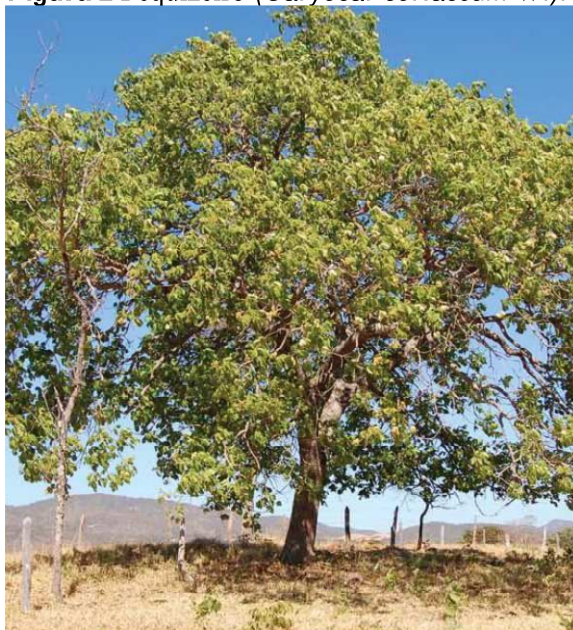
O gênero *Caryocar* pertence à família Caryocaraceae (Tabela 1) e compreende 16 espécies, com ocorrência na América Central e América do Sul. A espécie *Caryocar coriaceum* Wittm cresce naturalmente na região Nordeste do Brasil, como a região da chapada do Araripe no estado do Ceará (ARARUNA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010). Essa espécie é conhecida vulgarmente como piqui, pequi, pequiá ou pequi do Nordeste, sendo o nome pequi de origem indígena (py-qui, py = pele, casca; qui = espinho) significando “casca espinhenta”, decorrente dos espinhos do endocarpo (RAMOS, 2010). O pequizeiro apresenta-se como uma planta de porte arbóreo (Figura 2), caducifólia, com 12-15m de altura, pouco copada, e tronco largo, com cerca de 2m de diâmetro (MATOS, 2007; REGINA et al., 2014).

**Tabela 1** Classificação taxonômica do pequi.

<b>Divisão</b>	Angiospermae
<b>Claudo</b>	Eurosídeas I
<b>Ordem</b>	Malpighiales (Theales)
<b>Família</b>	Caryocaraceae
<b>Gênero</b>	<i>Caryocar</i>
<b>Espécie</b>	<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm

FONTE: Carvalho (2009).

**Figura 2** Pequizeiro (*Caryocar coriaceum* W.).



FONTE: Oliveira (2010).

Junto com outras espécies de seu gênero, como *Caryocar villosum* e *Caryocar brasiliensis*, a *Caryocar coriaceum* W. é amplamente explorada pela população regional de forma medicinal, ornamental, melífera (produção de néctar), para obtenção de tanino e na culinária. A floração ocorre principalmente nos períodos chuvosos e a frutificação entre novembro a fevereiro. A sua produção não é estável, decorrente das diferenças climáticas, sobretudo no período pós-floração. Por causa da sazonalidade, em regiões com períodos muito chuvosos há menor produção, enquanto que em tempos de seca a produção é maior devido a não derrubada das flores antes da fecundação. A heterogeneidade das regiões produtoras resulta em épocas distintas de maturação dos frutos e sementes, além de mudanças na composição química da polpa e do óleo obtido. Os frutos (Figura 3) possuem sabor forte e característico para a cozinha regional, tornando-se uma especiaria valorizada, sendo usados para produção de licores, doces e conservas de frutas. Além disso, são fontes de óleo, que é extraído manualmente do mesocarpo (polpa) e endocarpo (semente) (AQUINO, et al 2009; GEÓCZE et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2010; MARQUES et al., 2007).

**Figura 3** Fruto do pequizeiro em corte transversal.



FONTE: Oliveira (2010).

O elevado teor de óleo fornece gorduras comestíveis utilizadas na cozinha, como substituto para a manteiga, como complexo alimentar com excelentes fatores nutricionais, como antioxidantes, vitaminas (A e E) e ácidos graxos essenciais, na produção de sabonetes higiênicos caseiros e na indústria de cosméticos (PIANOVSKI et al., 2008; SENA JR. et al., 2010).

Na medicina popular, os óleos brutos da polpa e da semente do pequi têm sido

utilizados durante a cicatrização de feridas, como anti-inflamatório, no tratamento de lesões gástricas e de doenças do trato respiratório, incluindo tosse, afecções brônquicas e asma. A principal forma de uso é externa, aplicando o óleo bruto sob as lesões cutâneas, com o propósito curativo, e na forma de compressas e de massagem, durante o tratamento de dores reumáticas, musculares e contusões (MATOS, 2007; PIANOVSKI et al., 2008).

Quirino et al. (2009) apresentaram estudos evidenciando a atividade gastroprotetora do óleo *in vivo*. Regina et al. (2013) descrevem potencial atividade cardioprotetora com o uso contínuo do óleo, enquanto outros estudos relatam atividade leishmanicida e antimicrobiana do extrato das folhas, e antifúngica do óleo contra o *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Apesar de amplamente utilizado, poucos efeitos colaterais decorrentes do uso do óleo têm sido relatados (PAULA-JUNIOR et al., 2006; PASSOS et al., 2003).

A matéria seca da polpa do fruto do pequi tem aproximadamente 76% de óleo, 3% de proteínas, 14% de fibra e 11% de outros carboidratos, enquanto o endocarpo tem 6,76% de carboidratos, 1,02% de proteínas e 10% de lipídeos. A semente e polpa representam apenas 25% do fruto, sendo o epicarpo (casca) 75% deste. Na composição do óleo pode ser verificada uma predominância de ácidos graxos insaturados (AGIs), como o ácido oléico, que está presente em maior concentração, além de carotenóides, ácido graxo palmítico, mirístico, palmitoléico, esteárico, linoléico e linolênico (OLIVEIRA et al., 2010; PIANOVSKI et al., 2008; QUIRINO et al., 2009).

Os AGIs podem modular a resposta inflamatória e diversos estudos têm se voltado para esta propriedade, buscando elucidar as habilidades anti-inflamatórias do óleo fixo do pequi, já explorado pela medicina popular (MATOS, 2007). Um desses estudos foi desenvolvido por Oliveira et al. (2010), que avaliaram a ação anti-inflamação tópica e a cicatrização de feridas em ratos usando o óleo fixo de pequi de forma bruta (OFP) e em pomada. O resultado demonstrou uma redução da inflamação de forma dependente da dose, onde o OFP inibiu o edema da orelha em 38,01% e 39,20% no tempo de 15 minutos e 1 hora, respectivamente, após a indução da inflamação. Além disso, a aplicação tópica da pomada de OFP a 12% mostrou uma redução significativa da área ferida, com contração da área em 96,54 % no sétimo dia.

De modo semelhante, Saraiva et al. (2011) investigaram o efeito tópico do óleo da polpa de pequi contra diferentes agentes irritantes *in vivo* para verificar a sua atividade anti-inflamatória, exibindo resultados positivos com perfil similar de atividade anti-inflamatória de fármacos de uso tópico que, classicamente, modulam a produção de metabólitos do ácido

araquidônico. Em outro estudo, Batista et al. (2010) concluíram que o óleo da polpa do *Caryocar coriaceum* Wittm levou à rápida cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos, com reação inflamatória menos intensa. Quirino et al. (2009) também observaram fechamento mais rápido de úlceras gástricas provocadas experimentalmente em ratos que receberam oralmente o óleo da polpa de pequi. Diante desses achados medicinais, o óleo de pequi pode ser um potencial agente terapêutico contra afecções dermatológicas.

## 2.2 A pele e o processo inflamatório

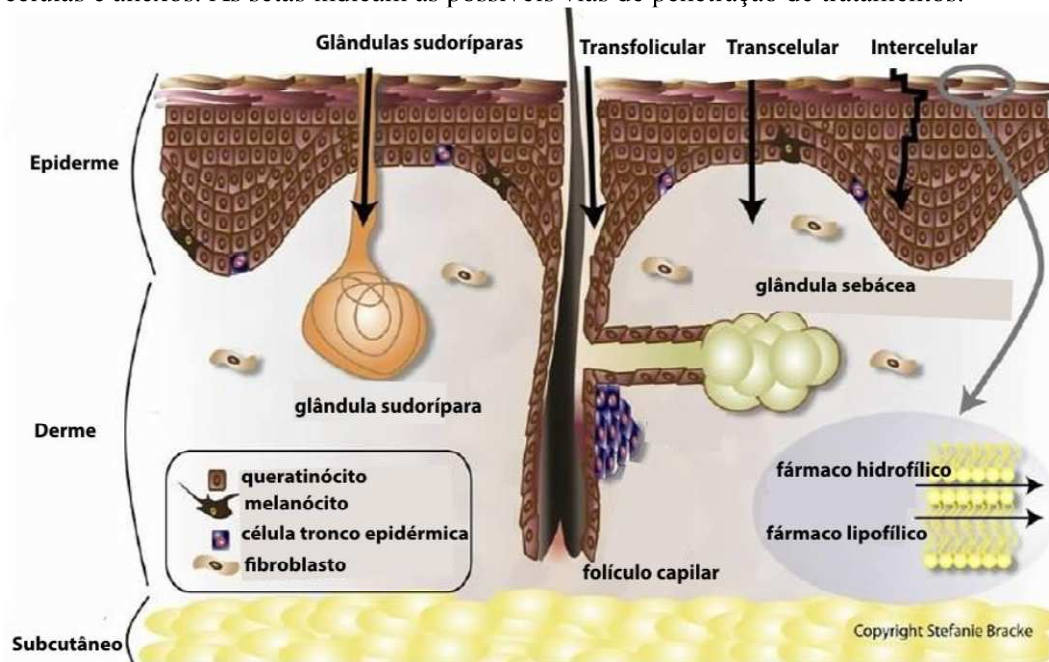
A pele é um órgão complexo formado por diferentes estruturas e células (Figura 4). Seu padrão histológico inclui as camadas da epiderme, derme e hipoderme. A epiderme possui camadas de células diferenciadas, sendo a camada córnea (*stratum corneum*) a mais superficial, plana e repleta de queratina, principal barreira contra substâncias químicas e microrganismos. A camada granulosa (*stratum granulosum*) possui morfologia intermediária com grânulos de queratohialina. A camada espinhosa (*stratum spinosum*) é composta por células de Malpighi unidas por processos citoplasmáticos.

A epiderme está firmemente aderida à derme, sendo esta formada pelas camadas papilar e reticular. A primeira, mais superficial, é delgada e formada por tecido conjuntivo frouxo, enquanto a segunda é constituída por tecido conjuntivo denso. Ambas possuem fibras de colágeno e elastina, que concedem força e elasticidade à pele, lhe proporcionando suporte. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, um tecido conjuntivo frouxo rico em gordura. Ela repousa sobre a camada basal (*stratum basale*) composta por queratinócitos e células-tronco epidermais (BARBOSA, 2011; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; SMEDEN et al., 2014).

A inflamação é um processo fisiológico de defesa cujo objetivo é eliminar a causa de uma lesão celular e suas consequências (KUMAR et al., 2010). Ela é caracterizada por dor, aumento da temperatura local, inchaço ou eritema e vermelhidão. O processo inflamatório visa à reparação da estrutura tecidual lesada, com a regeneração de células parenquimatosas nativas, e/ou a formação de fibroblastos, que vão repor as substâncias intercelulares na região, além de nova vascularização (CORMACK, 1991). O reparo tecidual envolve uma série de processos bioquímicos, celulares e fisiopatológicos que podem ser acelerados pela presença de ácidos graxos insaturados, os quais possuem a capacidade de estimular a proliferação celular e a angiogênese local (NARDI et al., 2004).



**Figura 4** Representação esquemática da estrutura da pele. Corte transversal, ilustrando as principais células e anexos. As setas indicam as possíveis vias de penetração de tratamentos.



FONTE: adaptado de Geusens et al. (2011).

Este processo faz parte de mecanismos fisiológicos que medeiam a cicatrização da pele e o reparo de lesões, embora seja uma característica central em um número de dermatoses, tais como a psoríase, a dermatite atópica e a furunculose recorrente (PINHEIRO et al., 2014; LYONS et al., 2015). Um equilíbrio delicado deve ser mantido entre os sinais pró e anti-inflamatórios (produção de fator de necrose tumoral, interleucinas, quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos), sendo fundamental para a manutenção das funções fisiológicas da pele. No desencadear de uma resposta inflamatória, a pele conta com células especializadas, incluindo queratinócitos epidérmicos, melanócitos, células de Langerhans, assim como os fibroblastos dérmicos, mastócitos e leucócitos de infiltração. Além disso, faz uso de substâncias que atuam nas funções celulares e atração entre essas células: as citocinas e quimiocinas (NICOLAOU, 2013; YOSHIKAZUMI et al., 2008).

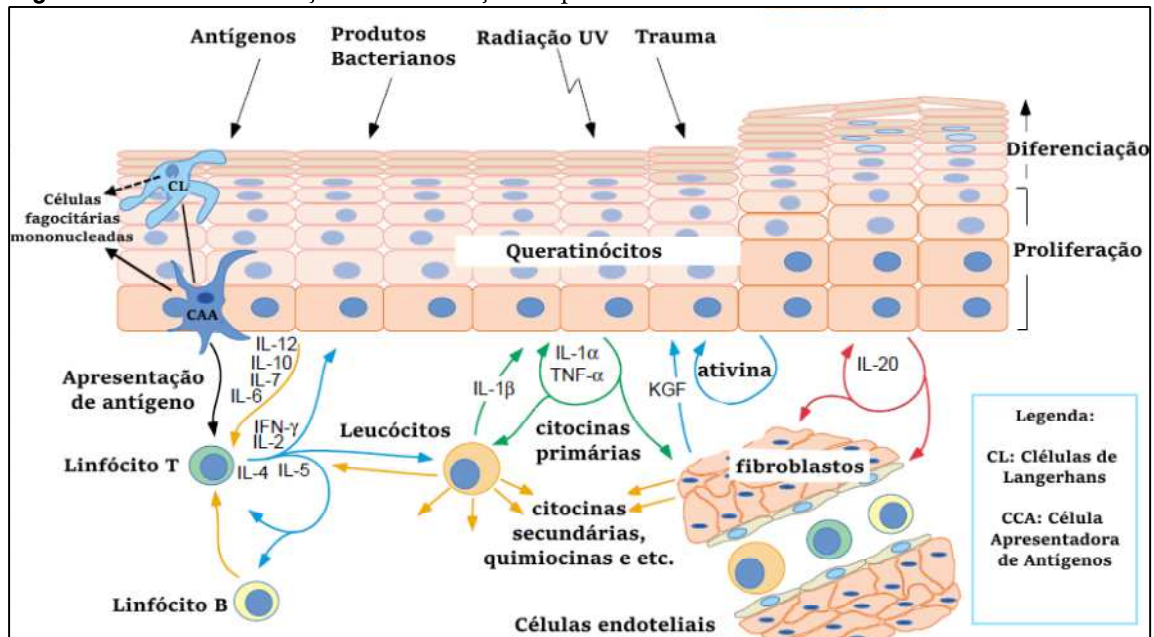
As citocinas são mediadores atuantes na emissão de sinais durante o desencadeamento das respostas imunes, atuando desde o início com influência sobre numerosos processos biológicos, incluindo a inflamação, sepse e cicatrização de feridas. As quimiocinas, por outro lado, representam um grande grupo de pequenas proteínas quimiotáticas (com tamanho de 8-11 kDa) e orientam o movimento de leucócitos para locais de inflamação através da ativação de seus receptores de superfície, pertencentes majoritariamente à família de receptores



acoplados a proteína G. Desta forma, em concentrações mínimas, há rápida estimulação e curta duração de atividade, caracterizando a regulação autócrina/parácrina desses peptídeos (GRELLNER et al., 2000; LEE; HWANG, 2012; NINA; SCHOMMER; RICHARD, 2013).

Na ocasião de injúria à pele por trauma físico, irradiação UV ou ação de produtos microbiológicos, as células secretam citocinas (Figura 5) capazes de regular o seu próprio comportamento e/ou recrutar outras células inflamatórias. As citocinas secretadas pelos queratinócitos são consideradas como as principais mediadoras da resposta inflamatória cutânea. Os principais fatores liberados por estas células incluem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e MCP-1, entre outros (KIM et al., 2013; PINHEIRO et al., 2014; RICH; KUPPER, 2001; NOTMAN; ANWAR, 2013).

**Figura 5** Vias de sinalização na inflamação da pele.



FONTE: adaptado de Pinheiro et al. (2001).

Múltiplas consequências, locais e sistêmicas, ocorrem com a produção de citocinas por queratinócitos, como migração de células inflamatórias, resposta imunológica, alterações nos processos de proliferação e diferenciação de queratinócitos e de fibroblastos e ação autócrina para os queratinócitos. Dois fatores autócrinos proeminentes ocorrem em queratinócitos: TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ . Estes estimulam a transcrição de outras citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e outros efetores de muitos tipos celulares (KADOSHIMA-YAMAOKA et al., 2009; GRAGNANI et al., 2014).

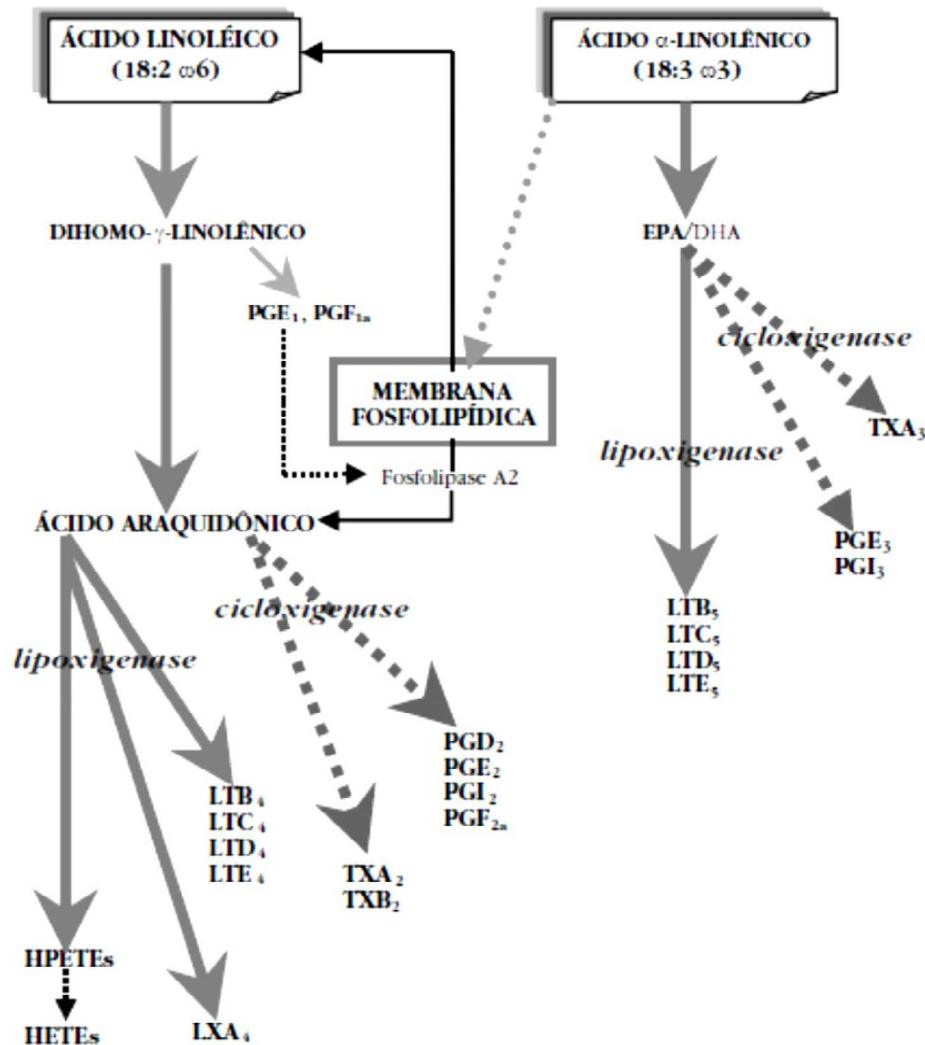
Os AGIs desempenham um papel importante nas respostas imunes e inflamatórias, interferindo em diversas etapas do processo inflamatório, tais como contração vascular,

quimiotaxia, adesão, extravasamento de leucócitos, ativação e morte celular. A maioria destes eventos ocorre via derivados do ácido araquidônico (AA), como as prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs) e lipoxinas (LXs). Cardoso et al. (2004) observaram que a administração tópica dos ácidos graxos essenciais, linolênico (n-3) e linoléico (n-6), e do ácido graxo não essencial, oléico (n-9), modula o fechamento de feridas induzidas cirurgicamente. Estudos posteriores mostraram que os ácidos graxos insaturados, n-3 e n-6, podem aumentar a produção de citocinas no local da ferida estimulando o processo de reparo da mesma (CABRAL, 2005; McDANIEL et al., 2008; PEREIRA et al., 2008; FERREIRA et al. 2012; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005; HATANAKA e CURI, 2007).

Após a ingestão através da dieta, os ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolênico podem ser dessaturados e alongados ao AA (20:4  $\omega$ 6), EPA (ácido eicosapentaenoico, 22:5 $\omega$ 3) e DHA (docosahexaenoico, 22:6  $\omega$ 3). O AA é o principal precursor dos eicosanóides, sendo metabolizado via lipoxigenases e ciclooxigenases para formação de PGs e TXs, denominados de prostanóides, bem como os LTs, LXs, entre outros (MOREIRA; CURI; MANCINI, 2002). A síntese dos eicosanóides inicia-se com a via da cicloxigenase, que converte o AA em endoperóxidos cíclicos (Figura 6), uma molécula precursora na síntese das prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), um potente vasodilatador, e TXA<sub>2</sub>, um potente vasoconstrictor, e outras prostaglandinas (PGE<sub>2a</sub>, PGF<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>), ou pela via da 5-, 12-, ou 15-lipooxigenase que fornece LTs, HPETEs, HETEs e LXs (YOUUDIM et al., 2000; TEITELBAUM; WALKER, 2001).

Estes AGIs podem ser encontrados em abundância nos óleos fixos vegetais, sendo diversos óleos provenientes de plantas extensivamente utilizadas na medicina popular como agentes anti-inflamatórios tópicos. A elucidação da atividade destes lipídios bioativos é importante e possível, dentro das diferentes técnicas de avaliação atualmente disponíveis (SARAIVA, 2009; FERREIRA et al., 2012).

**Figura 6** Biossíntese dos eicosanóides a partir do AA e do EPA.



FONTE: Moreira, Curi, Mancini (2002).

A indução de inflamação por substâncias denominadas agentes flogísticos é amplamente utilizada na pesquisa pré-clínica. Agentes como a carragenina ativam quimicamente o processo inflamatório, sendo este um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas da ordem *gigartinales*, amplamente utilizada para a indução da resposta inflamatória aguda em modelo experimental animal, promovendo a liberação de diferentes mediadores inflamatórios como a histamina, bradicinina, prostaglandinas, entre outros (DI ROSA, 1972; MA et al., 2013). A utilização da carragenina para induzir o edema de pata em ratos foi introduzido por Winter et al. (1962) e tornou-se um dos métodos mais populares para testes de fármacos e avaliação de novas terapias anti-inflamatórias (MENEGUZZO, 2010; SARAIVA, 2009).

Dentre as vias de administração de medicamentos, a pele, maior órgão do corpo

humano, representa uma importante via de acesso para a administração de produtos farmacêuticos (RUSSELL-JONES; HIMES, 2011). Este órgão é a primeira barreira entre o corpo e o meio ambiente, sendo o EC a principal barreira limitante, motivando pesquisas envolvendo novos sistemas de liberação de fármacos, como os sistemas microemulsionados (ZHAI e ZHAI, 2014; HATHOUT et al., 2010).

### **2.3 Sistemas microemulsionados (ME)**

A pesquisa tecnológica farmacêutica vem apresentando avanços significativos nas últimas décadas através da nanotecnologia, buscando novos sistemas de liberação de fármacos capazes de proporcionar alternativas terapêuticas de elevada eficácia, possibilitando a administração e absorção de fármacos com maior segurança, menor incidência de efeitos colaterais, melhorias quanto à liberação, biodisponibilidade e dissolução, especialmente envolvendo fármacos que pertencem às classes biofarmacêuticas com pouca solubilidade aquosa e baixa permeabilidade através das barreiras biológicas (DAMASCENO et al., 2011; FORMARIZ, 2005; McCLEMENTES, 2012; MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013).

Os sistemas de liberação podem modificar a distribuição de um fármaco no organismo devido ao seu tamanho reduzido (escala nanométrica), podendo apresentar vantagens como direcionamento a alvos específicos, controle da liberação, menor toxicidade, menor número de doses, diminuição dos picos plasmáticos, a proteção da degradação e/ou inativação do fármaco (VAUTHIER; COUVREUR, 2007; SAKAMOTO et al., 2010; OKUR et al., 2011). Entretanto, a maioria dos fármacos ainda é veiculada em formas farmacêuticas convencionais, muitas vezes atingindo concentrações inadequadas no tecido alvo do organismo e/ou requerendo doses mais elevadas para o intento. Além disso, entre o local de aplicação e o alvo farmacológico interpõem-se barreiras biológicas que expõem os tecidos normais do organismo aos efeitos potencialmente tóxicos dos fármacos (SURENDIRAN et al., 2009; KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012; SILVA et al., 2010).

O conceito microemulsão foi introduzido em 1940 por Hoar e Schulman, ao obterem uma solução monofásica transparente por titulação. Eles prepararam a primeira microemulsão através da dispersão de hexanol em uma solução aquosa de agentes tensoativos e a adição de um álcool como um cotensoativo (MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013). ME são geralmente formados pela combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito. Estes sistemas diferem das emulsões comuns por apresentarem baixa

tensão interfacial, pois as moléculas do tensoativo se intercalam entre as moléculas do cotensoativo na interface óleo/água, afetando a curvatura da gotícula. A redução da tensão interfacial promove a formação espontânea desses sistemas monofásicos e a formação de gotículas de tamanho reduzido, apresentando estabilidade termodinâmica (DAMASCENO et al., 2011; RAJSHREE; BHARKAD; DEVARAJAN, 2015; FORMARIZ, 2005; McCLEMENTES, 2012; MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013). Por outro lado, emulsões simples são dispersões bifásicas, termodinâmica e cineticamente instáveis, que requerem energia externa para sua formação, podendo, eventualmente, apresentar intabilidade e separação de fases (DEPIERI, 2012; SCHWARZ et al., 2012; McCLEMENTES, 2012; OKUR et al., 2011).

ME apresentam, tipicamente, diâmetro médio de gotículas entre 10 a 140 nm, contendo na interface entre as fases óleo e água, os tensoativos. Estes apresentam um grupamento de cabeça polar e uma cauda apolar. As microemulsões podem ser utilizadas como transportadores de substâncias lipófilas através de um meio aquoso, ou de substâncias hidrofílicas através de forma lipoidal. Como o tamanho da gotícula é menor que o comprimento de onda da luz visível, ME são transparentes e a estrutura não pode ser observada através de um microscópio óptico, apresentando isotropia, comportamento newtoniano e baixa viscosidade (ACHARYA; HARTLEY, 2012; BUTANI; YEWALE; MISRA, 2014; McCLEMENTES, 2012; MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013).

Veículos ideais para administração tópica devem exercer alta capacidade para a incorporação de fármacos/drogas tanto hidrófilas quanto lipófilas, bem como uma elevada permeabilidade através da pele. Muitos dos veículos tópicos podem conter potenciadores químicos para alcançar este objetivo (BUTANI; YEWALE; MISRA, 2014). Assim, as microemulsões merecem destaque visto que podem aumentar a entrega local de um fármaco por diferentes mecanismos, devido à existência de microdomínios de polaridades diferentes dentro da mesma solução monofásica, permitindo solubilidade de componentes lipofílicos e hidrofílicos (LOPES, 2014). Além disso, a barreira de difusão da pele pode ser modificada reversivelmente, dependendo da composição do sistema, bem como favorecer o particionamento do fármaco na pele (AMNON, 2015). Outra propriedade atribuída aos ME é a possibilidade de serem utilizados como sistemas que controlam a liberação de fármacos por meio de uma cinética específica, portanto melhorando a sua ação terapêutica (BUTANI; YEWALE; MISRA, 2014; MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013; TENJARLA, 1999; SILVA et al., 2009a).

Outros estudos com ME estão voltados para administração oral, intranasal,

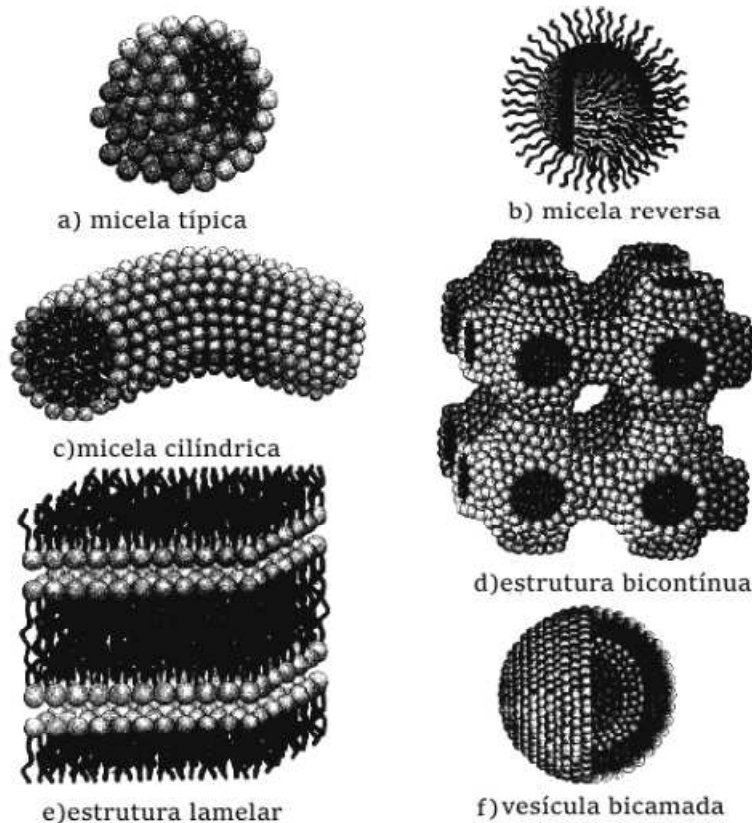
parentérica, de liberação prolongada e transdérmica, na busca por alternativas à incorporação de fármacos irritantes ao trato gastrointestinal ou que não podem ser administrados por vias convencionais. Adicionalmente, a alta capacidade de solubilização destes sistemas permite que considerável quantidade de fármacos seja incorporada (AZEEM et al., 2009; BAROLI et al., 2000; LOPES, 2014; McCLEMENTES, 2012; SHINDE et al., 2015).

### 2.3.1 Estruturas de ME

Igualmente às emulsões e/ou nanoemulsões, as microemulsões típicas podem ser do tipo óleo em água (O/A), onde o meio dispersante é a água, ou do tipo água em óleo (A/O), onde o sistema é rico em óleo e as microgotículas são ditas inversas. As moléculas dos tensoativos se comportam de acordo com cada caso. Quando se deseja uma microemulsão do tipo A/O, deve-se utilizar um tensoativo mais hidrofóbico, conseqüentemente, um tensoativo de caráter hidrofílico deve ser usado para obtenção de microemulsões do tipo O/A (MACCLAMENTES, 2012; LAWRENCE; RESS, 2000; FORMARIZ et al., 2005; ROSSI et al., 2007).

É importante ressaltar que em sistemas com elevado teor de tensoativos, o equilíbrio termodinâmico entre os constituintes pode ser representado pela formação de estruturas diferentes das microemulsões clássicas. Assim as estruturas podem ser esféricas (micelas típicas ou inversas), cilíndricas, lamelares e bicontínuas (Figura 7) (MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013). Em todos os casos, com as proporções adequadas obtém-se um sistema de formação espontânea, coloidal, termodinamicamente estável e isotrópico. Para identificar com precisão as estruturas formadas são necessários métodos analíticos robustos, tais como a técnicas microscópicas [microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de força atômica (MFA)], métodos de dispersão [espalhamento de luz dinâmico (DLS) e dispersidade, espalhamento de raios-X ou nêutrons], condutividade elétrica, ressonância magnética nuclear e estudos reológicos (RAO; McCLAMENENTES, 2012; NAOUI et al., 2011; SHARMA et al., 2008; LAWRENCE; RESS, 2000; HAYES et al., 2015; BIANCHI et al., 2013; ZHAI; ZHAI, 2014.)

**Figura 7** Diferentes configurações de ME. Sendo (a) micela aquosa comum em ME O/A; (b) micela inversa, comum em ME A/O; (c) micela cilíndrica; (d) estrutura bicontínua conectada/estruturada, comum quando há elevado teor de tensoativos; (e) estrutura lamelar, comum em elevados teores de tensoativos e volumes próximos entre as fases aquosa e oleosa; (f) vesículas construídas a partir de bicamadas semelhantes às da fase lamelar, caracterizadas por dois compartimentos distintos de água, com um núcleo e um meio externo.



FONTE: adaptado de Holmberg et al (2002)

### 2.3.2 Formação de ME

Para uma emulsão/nanoemulsão, a energia livre da dispersão coloidal é maior do que a energia livre das fases separadas (óleo e água), o que significa um sistema termodinamicamente instável. Já em ME, a energia livre da dispersão coloidal é menor do que a energia livre das fases separadas. Não obstante, ainda pode haver uma energia de ativação que difere entre os dois sistemas, cujo valor determina a taxa à qual as fases separadas formam a microemulsão após a mistura dos componentes responsáveis pela redução da tensão superficial. Várias teorias foram propostas para explicar este processo de formação, dentre elas, encontra-se a importância do cotensoativo (FANUN, 2012; LI et al., 2012; MACCLEMETS, 2012; NAOUI et al., 2011).

Quando é formado um sistema microemulsionado, os componentes combinados, em uma proporção adequada, produzem um filme misto adsorvido que se torna responsável pela redução da tensão superficial. Uma melhor compreensão sobre a obtenção de um ME ocorre

quando são elencados os processos envolvidos na formação de sua estrutura. Desta forma, a mudança de energia livre associada com a formação de uma dispersão coloidal das diferentes fases consiste no termo de energia interfacial livre ( $\Delta G_i$ ) e termo de configuração de entropia ( $-T\Delta S_{config.}$ ) (MACCLEMETS, 2012; NAOUI et al., 2011):

$$\Delta G_{formação} = \Delta G_i - T\Delta S_{config.} \quad (1)$$

Assim, a termodinâmica leva em consideração a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), que deve ser negativa para a formação espontânea de ME. Esse fenômeno, em condições de temperatura constante, pode ser expresso como:

$$\Delta G = G_2 - G_1 = \gamma_i \times \Delta S \quad (2)$$

Onde  $\gamma_i$  corresponde à tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, à temperatura, volume e número de moles constantes, e  $\Delta S$  é a mudança da área interfacial (OLIVEIRA et al., 2004).

A área interfacial não pode ser igual à zero. Assim, a tensão interfacial deve diminuir até atingir um ponto em que a energia livre do sistema também reduza. Quando a  $\gamma_i$  for negativa, a  $\Delta G$  será menor que zero e a microemulsificação será espontânea (DAMASCENO et al., 2011; MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013).

Outra teoria para a formação de ME se deve à natureza anfífilica dos tensoativos, estes são capazes de se adsorverem na superfície de um líquido ou na interface entre dois líquidos imiscíveis. A redução da tensão interfacial é o principal fator que leva os tensoativos a se adsorverem nas interfaces (SARRAZIN et al., 2009; McCLEMENTS, 2012). Desta forma, a partir de um valor de concentração do tensoativo, as interfaces dos solventes tornam-se saturadas, sendo este ponto denominado como concentração micelar crítica (CMC). A partir dele, as moléculas do tensoativo se agregam formando as estruturas conhecidas como micelas (ZHANG; HAN, 2009).

A adsorção do tensoativo na interface causa uma pressão bidimensional ( $\pi$ ) que diminui a tensão interfacial ( $\gamma_i$ ) de acordo com a equação:

$$\gamma_i = (\gamma_o/a) a - \pi \quad (3)$$

sendo  $(\gamma_o/a)$  a tensão interfacial O/A após o potencial químico do tensoativo em cada fase ter sido equalizado por partição. Consequentemente, com o aumento da área interfacial



por um aumento de  $\pi$ , a  $\gamma_i$  se aproxima de 0 (zero), favorecendo a dispersão de uma fase na outra. Os tensoativos de caráter muito hidrofílicos ou lipofílicos são inapropriados para a formulação de ME, visto que a tensão interfacial não diminuirá suficientemente para a formação do sistema (ZHANG; HAN, 2009; DAMASCENO et al., 2011). De acordo com a teoria da solubilização, a formação de ME ocorre devido ao intumescimento de micelas, onde a água é solubilizada quando em micelas inversas, ou quando o óleo é solubilizado em micelas normais (DAMASCENO et al., 2011; ZHANG; HAN, 2009; McCLEMENTS, 2012).

Griffin (1954) desenvolveu um estudo denominado “Balanço hidrofílico lipofílico”, objetivando selecionar qual seria o tensoativo mais adequado, onde as contribuições das partes polar e apolar de tensoativos não iônicos foram quantificadas (ROSSI et al., 2007). Esta observação foi conceituada como Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL), sendo este um parâmetro empírico, representativo do conteúdo de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de um tensoativo.

O valor do EHL é um indicativo para a preferência de migração do tensoativo na interface óleo/água, sendo um caminho mais prático para a seleção de tensoativos de acordo com o tipo de microemulsão desejada. Desta forma, a combinação dos tensoativos deve proporcionar valor de EHL similar àquele requerido para a fase oleosa. O EHL do tensoativo é determinado não somente pela sua estrutura química, como também por fatores, tais como: temperatura, força iônica, presença de cotensoativo, entropia de formação das microgotículas e variação dos potenciais químicos dos constituintes do sistema (ZHANG; HAN, 2009; ROSSI et al, 2007; MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013).

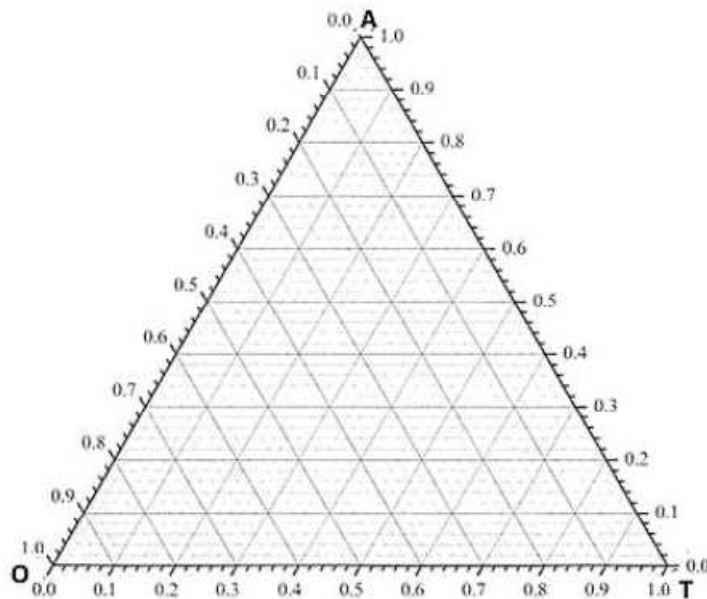
### **2.3.3 Diagramas de fase**

Os sistemas microemulsionados podem ser representados através de diagramas de fases classificados em ternários, quaternários e pseudoternários, que variam de acordo com a natureza química e com a quantidade de constituintes em cada sistema. O diagrama pseudoternário possui aspecto de diagrama ternário (Figura 8), apesar de ser constituído por quatro componentes, onde dois ou mais constituintes são agrupados de modo que a relação água/tensoativo ou cotensoativo/tensoativo seja constante (ROSSI et al., 2007). Assim, DFPTs são comumente construídos em duas dimensões, através de misturas multi-

componentes. A importância da construção deste tipo de ferramenta é determinar a área isotrópica e assim obter ME mais facilmente, observando que as proporções adequadas dos componentes podem ser escolhidas previamente, sendo um método economicamente viável (BERA et al., 2014; SCHMIDTS et al., 2009).

Para obtenção de região microemulsionada pelo método do DFPT deve haver titulação dos componentes e/ou preparo de várias amostras com composições diferentes. Em ambos os métodos, são formados sistemas transparentes e polifásicos. Normalmente, as microemulsões são associadas aos sistemas transparentes e termodinamicamente estáveis, enquanto os demais sistemas obtidos apresentam-se como emulsões líquidas leitosas, opacas, sistemas de viscosidade elevada ou separação de fases. Deve-se ressaltar a necessidade da verificação físico-química e morfológica do sistema transparente para classificá-lo como ME (BUTANI; YEWALE; MISRA, 2014; SCHMIDTS et al., 2009; ZHAO, DING & WEI, 2011; FORMARIZ et al. 2005).

**Figura 8** Diagrama de fases. Cada vértice do triângulo corresponde a uma fase do sistema proposto: fase aquosa (A), oleosa (O), e tensoativo/cotensoativo (T).



FONTE: Origin Pro® 8.0(2015).

Diante das propriedades apresentadas sobre o nanossistema coloidal e os ácidos graxos insaturados de óleos vegetais, foi desenvolvido e caracterizado uma microemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm), na tentativa de modular a resposta inflamatória cutânea com redução da dose administrada e efeitos adversos. Seu potencial efeito anti-inflamatório foi investigado em modelo de edema de pata induzido em camundongos.

---

*Objetivos*

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e caracterizar um sistema microemulsionado contendo óleo fixo da polpa de pequi e avaliar sua atividade anti-inflamatória preliminar.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

##### **3.2.1** Extrair o óleo da polpa do pequi:

- Realizar análise química do óleo;
- Determinar o EHL do óleo.

##### **3.2.2** Formular e caracterizar sistemas microemulsionados:

- Construir diagrama de fases e sintetizar microemulsões;
- Caracterizar as microemulsões em aspectos de pH, condutividade, índice de refração, viscosidade, tamanho de gotículas e potencial zeta, ultraestrutura e propriedades térmicas.
- Realizar ensaios de estabilidade física preliminar do sistema por testes de estresse térmico e ciclo gelo-degelo.

##### **3.2.3** Avaliar a atividade anti-inflamatória preliminar em modelo animal de edema de pata com carragenina.

---

## ***Materiais e Métodos***

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Os tensoativos Span® 80, Tween® 80, Brij® 52 foram obtidos a partir da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), Kolliphor EL ® obtido pela BASF S.E. (Ludwigshafen, Alemanha) e propilenoglicol P.A. foi adquirido da Neon Comercial Ltda (São Paulo, Brasil).

O material botânico destinado à extração de óleo fixo foi coletado na flora do Araripe, município do Crato, localizado no Estado do Ceará (Brasil), em dezembro de 2013. A autenticação Botânica foi conduzida por Olívia O. Cano, do Instituto Agrônomo de Pernambuco, e a exsicata foi depositada no Herbário sob o nº IPA: 90.473.

### 4.2 Extração dos óleos fixos e análise química

O óleo da polpa do pequi foi extraído pelo método tradicional, o qual é praticado por trabalhadores rurais. Após a colheita, os frutos selecionados foram higienizados e as polpas removidas manualmente e maceradas com pedra moinho. A pasta obtida foi misturada e incubada a 4 °C por 12 horas. Após 24 horas, água gelada foi adicionada e o sobrenadante da mistura foi removido e aquecido até a fervura. Em seguida, a fase líquida foi separada da pasta, usando um tecido, sendo a primeira aquecida até a evaporação da água. Finalmente, o óleo obtido foi filtrado (AQUINO, 2007).

Os constituintes do óleo na forma de ésteres metílicos foram identificados por comparação dos índices de retenção cromatográfico experimentais e o padrão do espectro de massa (ARARUNA et al., 2013). Para a preparação destes ésteres metílicos, foram pesados 100 mg das amostras em três tubos de centrífuga de 20 mL com tampa. Foram adicionados 2 mL de n-hexano e em seguida 0,2 mL de solução metanólica de KOH 2M (METCALFE; SCHIMITZ; PELKA, 1966). As amostras foram agitadas no vortex por 30 segundos. Depois foram adicionados 3 mL de solução saturada de cloreto de sódio e deixados em repouso até separar fases. Foram pipetados 10 µL da fase superior e diluídos em 1000 µL de diclorometano grau HPLC em frascos apropriados para análise no GC/MS. A análise química do óleo foi realizada no Núcleo de Caracterização e Análise da UFPB (NUCAL) por meio de cromatografia gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massa (MS), utilizando Technologies Agilent 5975T (Palo Alto, CA, EUA) equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m × 0.25mm i.d.; filme com espessura de 0.25 mm). O forno foi inicialmente

mantido a 150 °C durante 2 minutos (taxa de aumento de 5 °C min<sup>-1</sup>) até atingir 230 °C (mantido durante 7 minutos) e, finalmente, aumentado para 260 °C (mantido durante 7,5 minutos) a uma taxa de 4 °C min<sup>-1</sup>. O gás transportador utilizado foi Hélio, fornecido com taxa de fluxo constante de 1 mL/min<sup>-1</sup>. O potencial de ionização foi de 70 eV, a faixa de varredura foi 35-450 *m/z* e a taxa de varredura foi de 0,5 scans s<sup>-1</sup>. Os constituintes do óleo na forma de ésteres metílicos foram identificados por comparação dos índices de retenção cromatográfico experimentais e o padrão do espectro de massa (ARARUNA et al., 2013).

### 4.3 Determinação do EHL do óleo

O EHL do óleo é importante para formulação de ME, sendo mensurado de acordo com a equação de Griffin (1949) (Equação 4), na qual se calcula os possíveis valores de EHL do óleo a partir da produção de um sistema emulsionado (EHL variando de 4,5 a 16,5).

$$\text{EHL} = (\text{EHL}_{\text{tensoativoA}} \times \%M_{\text{tensoativoA}} + \text{EHL}_{\text{tensoativoB}} \times \%M_{\text{tensoativoB}}) \times 0,01 \quad (4)$$

As emulsões foram caracterizadas considerando o EHL do óleo o valor de EHL do sistema de melhor estabilidade, menor turbidez e menor tamanho de gotículas (ORAFDIYA; OLADIMEJ, 2002).

#### 4.3.1 Formulação das emulsões

As emulsões óleo em água (O/A) foram produzidas através da metodologia descrita por Xavier Júnior et al. (2012). O sistema composto por 5% do óleo de polpa de pequi, 93% de água e 2% da mistura de tensoativos (Tabela 2), foi obtido usando a técnica de inversão de fases (PIT). O tensoativo lipofílico (Span® 80) foi disperso na fase oleosa e o tensoativo hidrofílico (Tween® 80) na fase aquosa, a uma temperatura de 70°C por 5 minutos, separadamente em banho maria. Em seguida, para obtenção da emulsão, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa sob agitação mecânica no Ultra Turrax (9000 RPM) por 5 minutos.

**Tabela 2** Composição das emulsões. Os respectivos EHLs nas diferentes proporções de tensoativos.

Emulsões	EHL	Tensoativos (2%)	Água	Óleo
1	4,0	Tween 80® 3,0% + Span 80® 97%		
2	5,5	Tween 80® 10% + Span 80® 90%		
3	7,0	Tween 80® 25% + Span 80® 75%		
4	8,5	Tween 80® 40% + Span 80® 60%	93%	5%
5	10,0	Tween 80® 55% + Span 80® 45%		
6	11,5	Tween 80® 65% + Span 80® 35%		
7	13,0	Tween 80® 85% + Span 80® 15%		
8	14,5	Tween 80® 95% + Span 80® 5,0%		

FONTE: dados da pesquisa.

### 4.3.2 Caracterização das emulsões

As formulações foram avaliadas segundo metodologia empregada por Xavier Júnior et al. (2012), observando características organolépticas (cor, aspectos macroscópicos, estabilidade e separação de fases) e grau de cremagem (duração de 28 dias), além do tamanho de gotas e transmitância.

### 4.3.3 Análise de tamanho de gota por DLS

A distribuição do tamanho das gotas da fase dispersa das emulsões foi determinada por DLS usando o equipamento Nanotrak onda (Microtrac Inc., Montgomeryville, PA, EUA) (CETENE). Os dados foram calculados usando o software do fabricante. Cada emulsão foi diluída com água e propilenoglicol (1:100) e analisadas em triplicata.

### 4.3.4 Turbidimetria

A turbidez foi analisada em espectrofotômetro (UV-mini, Shimadzu, Brasil) para cada amostra de emulsão diluída (0,25%) em 600 nm. Com o controle branco (água destilada) definido em transmissão de 100%, a turbidez da emulsão diluída foi calculada como: Turbidez = 100 - T%. Este estudo foi realizado no LABDEM/UEPB, com resultados obtidos em triplicata.



#### 4.4 Construção do DFPT

Após a determinação do EHL requerido do óleo, foi utilizada a equação de Griffin (4) para seleção de tensoativos não iônicos, em proporções adequadas e fase aquosa. Foi investigada a ação de propilenoglicol (PPG) na melhor solubilização do óleo, quando adicionado juntamente à fase aquosa. As proporções 1:1; 2:1 e 3:1, PPG e água respectivamente, foram verificadas, sendo determinado que a proporção de 3:1 PPG/água, promoveu a melhor estabilização dos sistemas.

Desta maneira, o diagrama de fases foi obtido no LDCPF/UEPB, mediante a preparação de misturas iniciais dos tensoativos, Kolliphor EL® (88,5%) e Brij 52® (11,5%), e óleo fixo de pequi em diferentes proporções (1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2; 9:1.), sendo a fase aquosa posteriormente adicionada através de titulações de volumes pré-definidos, seguido de agitação em desruptor de células ultrassônico (sonda de ultrassom - Modelo DES500, Unique, Brasil) por 1 min em potência de 250 W (Figura 9). Depois de realizada a agitação, a mistura foi submetida ao banho de ultrassom (Modelo USC-1800, Unique, Brasil) para retirada das bolhas e classificação do sistema em: separação de fases (SF), emulsão líquida leitosa (ELL), emulsão líquida opaca (ELO) e sistema transparente (ST). Os resultados das misturas obtidas foram registrados e plotados com o auxílio do software Origin Pro® 8.0, em um triângulo equilátero, onde cada ponto corresponde às proporções definidas dos componentes da mistura (LAWRENCE; RESS, 2000; RIBEIRO et al., 2014; MOGHIMIPOUR; SALIMI; LEIS, 2012).

**Figura 9** Obtenção do DFPT.



FONTE: dados da pesquisa.

## **4.5 Seleção e preparo da formulação**

Após a construção do DFPT e seleção da formulação que melhor representa a proporção dos componentes para formação de sistema O/A, esta foi preparada 48h antes dos testes de caracterização para permitir a estabilização termodinâmica do sistema em temperatura ambiente (SILVA et al., 2010).

## **4.6 Determinação das características físico-químicas do sistema ME**

### **4.6.1 Verificação de aspectos macroscópicos**

Uma vez selecionada a formulação, aspectos como coloração, homogeneidade, separação de fases ou a presença de precipitados foram avaliados 48 horas após a obtenção da microemulsão desejada.

### **4.6.2 Determinação do pH, condutividade e índice de refração**

O pH da formulação foi avaliado por meio de pHmetro digital (Instrutemp, ITmPA 210, Brasil) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de  $25 \pm 0,5$  °C. As determinações dos valores de pH foram obtidas pela introdução do eletrodo na formulação.

Os valores de condutividade elétrica foram determinados utilizando um condutímetro digital (Instrutemp MCA 150, Brasil), calibrado com uma solução de calibração apresentando condutância específica de  $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$  à temperatura de 25 °C.

O índice de refração foi determinado, utilizando-se Refratômetro de Abbé, Carl Zeiss-Jena, aferido com água deionizada ultrapura Milli-Q® (índice de refração 1,3325) à temperatura de  $25 \pm 0,5$  °C. Os estudos elencados foram realizados em triplicata no LABDEM e LDCPF/UEPB, seguindo metodologias de Okur et al. (2011).

### **4.6.3 Características reológicas**

As propriedades reológicas da formulação foram analisadas utilizando-se ensaios de escoamento e oscilação. Estas análises foram realizadas no reômetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Austria) com geometria de cilindros concêntricos, localizado no CETENE. As

leituras foram feitas no intervalo de 0 a 300 s<sup>-1</sup> para curva ascendente e de 300 a 0 s<sup>-1</sup> para curva descendente. A temperatura foi mantida constante (25°C) durante todo o ensaio. As curvas de fluxo relacionadas à tensão de cisalhamento ou viscosidade com taxa de cisalhamento foram obtidas com auxílio do software Rheoplus/32 versão 3.40 (Anton Paar, Austria) (SANTANA; FASOLIN; CUNHA, 2012).

#### **4.6.4 Potencial Zeta**

As medidas do potencial zeta ( $\zeta$ mV) foram realizadas utilizando o equipamento Zetatrac NPA 151, localizado no CETENE. Este potencial foi determinado com auxílio de um zetâmetro [Particle Sizing System by Light Scattering – Brookhaven Instruments Corporation, model EMI 9863 (Holtville, NY, USA)], submetendo-se a formulação a uma voltagem fixa e utilizando os valores fornecidos pelo aparelho para calcular o  $\zeta$ mV. Para cada amostra (n=3) foram realizadas 15 medidas de mobilidade eletroforética. A análise foi realizada com a microemulsão bruta (sem diluir) e diluída em água (1:100) (AHMAD et al., 2014).

#### **4.6.5 DLS e Dispersidade**

As medidas foram realizadas em triplicata, a temperatura constante de 25 °C, com feixe de luz de comprimento de onda de 659,0 nm, com ângulo de incidência de 90°, utilizando o equipamento Zetatrac NPA 151 localizado no CETENE. Para cada amostra foram feitas 5 leituras de 1 minuto cada. A análise foi realizada com a microemulsão diluída (1:100) em água deionizada (MA; ZHONG; 2015).

#### **4.6.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

DSC é uma técnica termoanalítica que mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura. A formulação selecionada foi submetida à análise de DSC no equipamento DSCQ20 (TA Instruments, EUA), localizado no CertBIO/UEPB. Amostras de microemulsão e seus componentes isolados foram pesadas com precisão ( $\pm 0,1$ mg), prensadas em placas de alumínio e mantidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio. O equipamento foi calibrado com o metal índio (99,99%) em relação à temperatura e entalpia. As amostras foram submetidas ao resfriamento a uma taxa de 5°C.min<sup>-1</sup> sendo mantida por 3 minutos a -50 °C.

Posteriormente, as amostras foram aquecidas até a temperatura de 25 °C a uma taxa de aquecimento de 5 °C.min<sup>-1</sup> (BOONME et al., 2006).

#### **4.6.7 Ultraestrutura das gotículas**

Volumes de 5µL da microemulsão selecionada foram adicionados em grades de níquel de 300 mesh cobertas com filme de carbono. Em seguida, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai) com aceleração de voltagem de 80KV (FIOCRUZ-CPqAM) (ZHANG, W. et al., 2010).

#### **4.6.8 Avaliação da estabilidade preliminar**

Para avaliação da estabilidade preliminar, 5mL das amostras foram submetidas aos testes de estresse térmico e ciclo gelo-degelo no LDCPF/UEPB (GHOSH et al., 2013).

##### **4.6.8.1 Estresse térmico**

Alíquotas das formulações foram submetidas ao estresse térmico, em banho-maria termostatzado, no intervalo de temperatura controlada entre 40 – 80 °C, com progressão de elevação de 10 °C a cada 30 minutos. As amostras foram avaliadas ao término do processo por observação visual, aferição do pH, condutividade e verificação de separação de fases, após retornarem à temperatura ambiente (25,0 ± 2,0 °C).

##### **4.6.8.2 Ciclo gelo-degelo**

Alíquotas da formulação foram submetidas a seis ciclos gelo-degelo. Cada ciclo consistindo de 24 horas à temperatura de 4,0±2,0 °C em geladeira, seguido de 24 horas a 45,0±2,0 °C em estufa. As observações quanto aos aspectos macroscópicos e organolépticos, as determinações do pH e da condutividade foram realizadas antes do início do teste e ao final do 6º ciclo, totalizando 12 dias de observação.

#### **4.7 Ensaio *in vivo***

A atividade anti-inflamatória preliminar foi avaliada em ensaio *in vivo*, realizado na

Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FACISA), mediante aprovação do comitê de ética estabelecido na instituição. Número do projeto: 0039/181222013; CIAP/CONCEA N°: 01.001.2012; Aprovado em 18/12/2013 (ANEXO A).

#### 4.7.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, adultos (40 - 50 dias de vida com 25-35g). Estes animais foram alojados em gaiolas de polipropileno padrão em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12h. Água e ração ficaram disponíveis *ad libitum* a todos os animais, sendo que 12 h antes do experimento estes foram privados da ração. Para aclimatação, os animais foram trazidos à sala de experimentação pelo menos 1 h antes do início dos testes que foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro. Todos os esforços foram feitos para minimizar tanto o número de animais quanto seu desconforto.

#### 4.7.2 Modelo de edema de pata em camundongos

O edema de patas em camundongos (WINTER ET AL., 1962; LEVY, 1969) foi induzido pela injeção subcutânea de 50  $\mu\text{L}$  de carragenina (1% p/v em salina estéril 0,9 %) na região plantar da pata direita. Os tratamentos foram aplicados topicamente 30 minutos antes da indução do edema, massageando o local por 50 segundos (Figura 10). A espessura dorsoplantar da pata direita foi aferida com paquímetro (digital calíber, 0-150 mm, Messen®) antes (medida basal) e 1, 2, 3 e 4 h após a injeção da carragenina por um mesmo experimentador e de forma cega. O tamanho do edema ( $\Delta$  edema) foi calculado subtraindo-se a medida da espessura dorsoplantar da pata direita após a injeção da carragenina (1, 2, 3 ou 4h) da medida basal (KIM et al., 2013; LIAO et al., 2013; MAIOLI et al., 2015; MIZOKAMI et al., 2016). A habilidade dos tratamentos em inibir a reação inflamatória foi expressa como a percentagem de inibição da inflamação obtida através da fórmula:

$$\text{Inibição da inflamação (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Média do tamanho do edema no grupo tratado}}{\text{Média do tamanho do edema no grupo controle positivo}}\right) \times 100 \quad (5)$$

**Figura 10** Teste de edema de pata. Foto ilustrando a aplicação tópica dos tratamentos.



FONTE: dados da pesquisa.

#### 4.7.3 Grupos e tratamentos

Quatro grupos, contendo cinco animais cada, foram utilizados neste estudo (Tabela 3): G1 (controle positivo: aplicação tópica de 50 $\mu$ L de solução salina + injeção de 50 $\mu$ L de carragenina 1%); G2 (aplicação tópica de 50 $\mu$ L da microemulsão contendo 5,3% de óleo de pequi + injeção de 50 $\mu$ L de carragenina); G3 (aplicação tópica de 50 $\mu$ L do óleo fixo do pequi polpa + injeção de 50 $\mu$ L de carragenina); G4 (controle negativo: aplicação tópica de 22,1g de diclofenaco dietilamônio [Cataflam Emulgel® 11,6 mg/10g] + injeção de 50 $\mu$ L de carragenina). Ao final do experimento, foi feita eutanásia em todos os animais através da inalação de halotano 3%, seguida de deslocamento cervical, e fragmentos de tecido da região plantar da pata direita foram obtidos para análise histológica (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO; 2007; OLIVEIRA et al., 2010; SARAIVA et al., 2011; XAVIER et al., 2011).

**Tabela 3** Grupos experimentais para o teste de edema de pata.

Grupos	Tratamentos
G1	Controle positivo
G2	Microemulsão de óleo de pequi
G3	Óleo fixo de Pequi
G4	Controle negativo

FONTE: dados da pesquisa.

#### 4.7.4 Análise histológica

A fim de analisar a morfologia do epitélio cutâneo durante o processo inflamatório e a efetividade dos tratamentos, fragmentos da pele foram fixados em solução de formaldeído 40 g/L em tampão fosfato salina 0,1 mol/L (pH 7.4) por 24h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol, tratadas com xilol e embebidas em paraplast. Secções de 5 µm foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina (CETENE) (TANG et al., 2010).

#### 4.7.5 Análise estatística

Os resultados experimentais do estudo *in vivo* foram expressos como média ± EPM ou como percentagem da inibição da inflamação. As diferenças entre os grupos foram avaliadas através da One-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni e consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas e gráficos foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism<sup>®</sup> 6.1.

## *Resultados e Discussão*



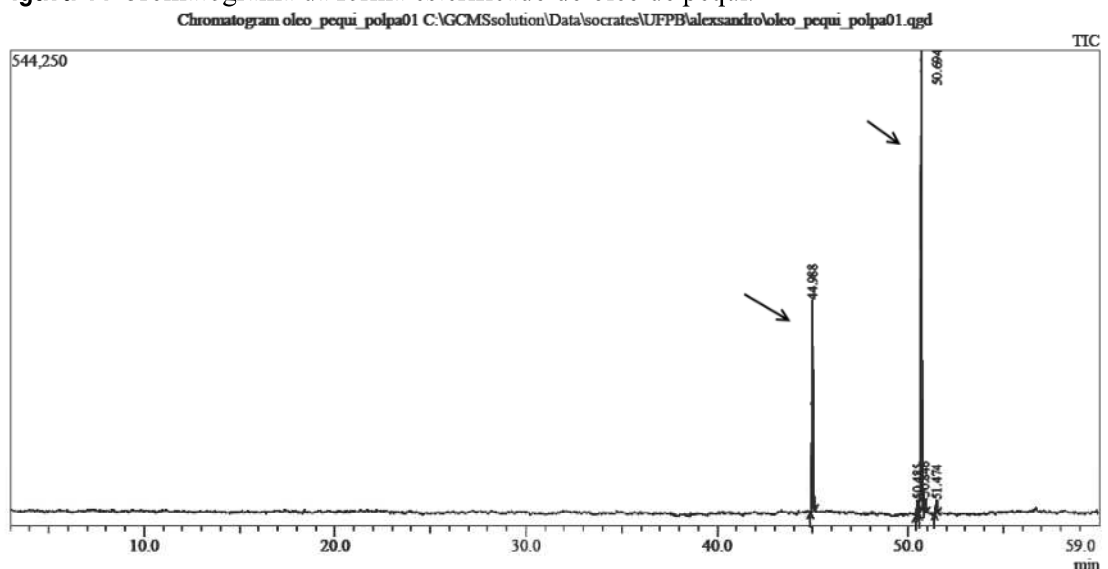
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição química do óleo de pequi

A técnica de Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a sistemas de detecção vem sendo utilizada amplamente nas últimas décadas para estudos diversos, como fitoquímicos, determinação de analitos e impurezas, etc. A facilidade do acoplamento de CG à técnica de Espectroscopia de Massas (MS), além da disponibilidade de um banco de espectros de massa padrão obtida no modo de ionização por impacto de elétrons, ajudaram na disseminação da técnica GC-MS, sendo os baixos limites de detecção obtidos por consequência da alta seletividade. O grande desafio para os analistas no desenvolvimento do método é a obtenção de percentuais satisfatórios de recuperação dos analitos, bem como a minimização das interferências através da utilização de métodos de extração apropriados (PRESTES et al., 2009; HERCEGOVÁ; ANDREA, 2007).

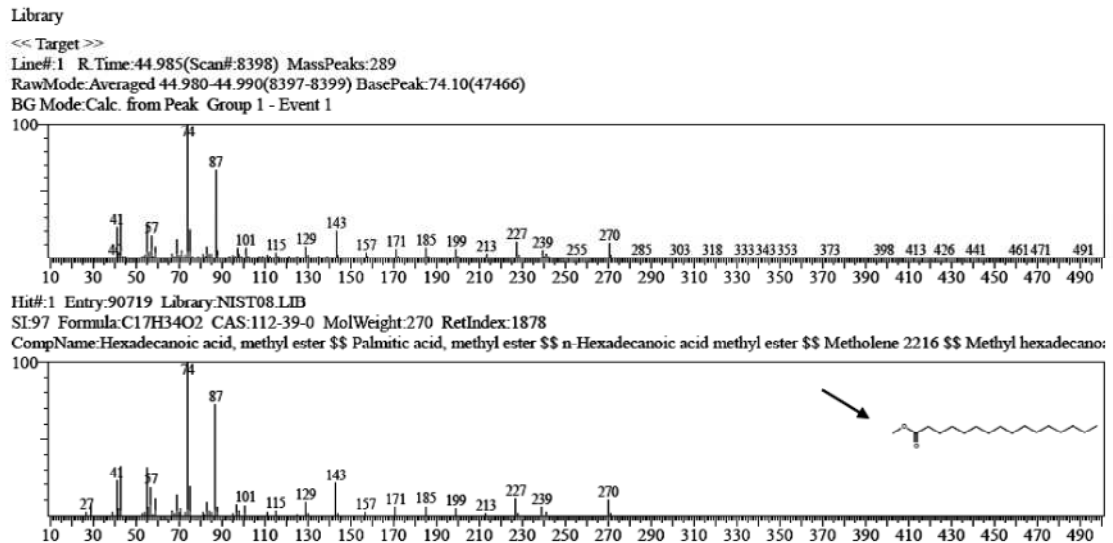
A CG da forma esterificada do óleo de pequi apresentou dois eventos, sendo o primeiro responsável por um tempo de retenção de 44,988 minutos e o segundo por 50,69 minutos (Figura 11). O Espectro de Massas do primeiro evento identificou ácido hexadecanóico, fórmula química  $C_{17}H_{34}O_2$ , também denominado ácido palmítico. O segundo evento identificado foi o ácido 9-octadecanóico, fórmula química  $C_{18}H_{36}O_2$ , correspondente ao ácido oléico (Figuras 12 e 13).

**Figura 11** Cromatograma da forma esterificada do óleo de pequi.



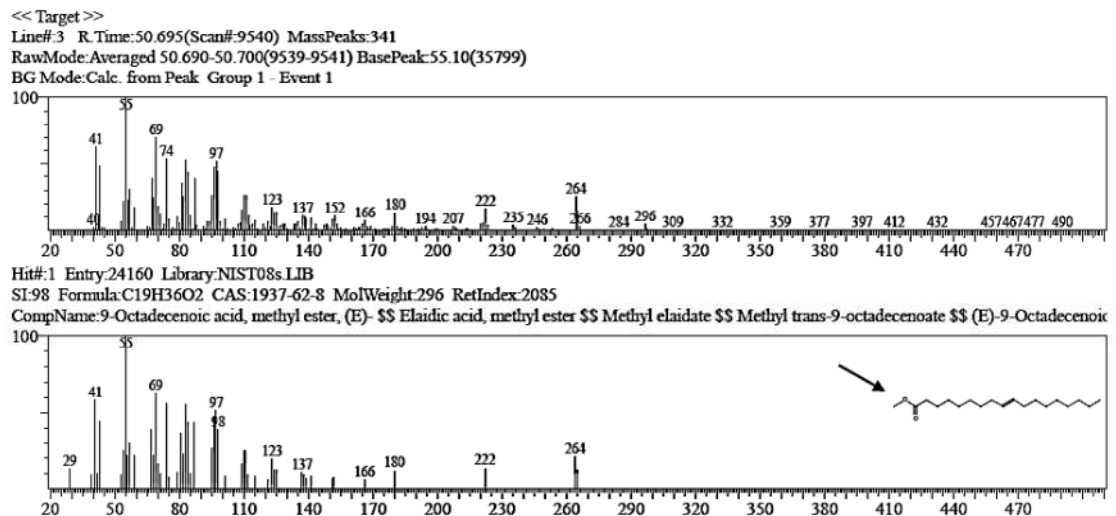
FONTE: dados da pesquisa.

**Figura 12** MS do primeiro evento detectado pelo CG. Molécula identificada como a forma esterificada do ácido palmítico.



FONTE: dados da pesquisa.

**Figura 13** MS do segundo evento detectado pelo CG. Molécula identificada como a forma esterificada do ácido oléico.



FONTE: Dados da pesquisa.

Sena et al. (2010) descreveu a caracterização físico-química do óleo da polpa de pequi (*C. coriaceum* Wittm), por meio de Cromatografia Líquido-Gasosa com detector de ionização de chama (GLC-FID) observando a presença dos AGIs: oléico (55,79%), palmítico (34,18%), linoléico (1,80%), esteárico (1,73%), eicosenóico (0,37%) e palmitoléico (0,27%). Outros trabalhos apresentaram elevado teor de ácido oléico (64,21%) e a ausência de ácido heptadecanóico (FIGUEIREDO et al., 1989). Estudo utilizando CG-MS para o óleo de *C. coriaceum* revelou presença de ácidos graxos oléico (57,15%), palmítico (35,53%), esteárico (4,0%) e linoléico (2,38%) (Oliveira et al., 2010).

Os AGIs podem modular a resposta inflamatória em feridas e diversos estudos têm se voltado para esta propriedade, buscando elucidar as habilidades anti-inflamatórias do óleo fixo do pequi, já explorado pela medicina popular (MATOS, 2007; MOREIRA, CURI; MANCINI, 2002). Assim, a análise de constituintes realizada para o óleo da polpa de pequi extraído em dezembro de 2013, no município do Crato (Ceará, Brasil), apresentou a concentração dos AGIs majoritários, já identificados em outros estudos presentes da literatura (ácidos graxos oléico e palmítico), entretanto não detectou AGIs minoritários, como esteárico e linoléico.

Diversos fatores podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários, conforme elencaram Neto e Lopes (2007), tais como a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento da planta, visto que a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante todo o ano. Além disso, os autores relatam que a temperatura, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta, a nutrição, a altitude, a indução por estímulos mecânicos ou o ataque de patógenos, podem justificar a ausência de detecção de componentes. Entretanto é importante ressaltar a concordância com a literatura dos resultados obtidos quanto à presença dos principais AGIs, que estão em maior concentração no óleo da polpa de pequi, podendo ser a estes atribuída a ação medicinal do óleo em estudo (AQUINO et al., 2009; AQUINO et al., 2007). Quanto ao aspecto macroscópico, o óleo apresentou características típicas, com cor amarelada (Figura 14) devido à presença de carotenóides (Figura 14), aroma e sabor *sui generis* (AQUINO et al., 2009).

**Figura 14** Óleo da polpa de pequi.



FONTE: dados da pesquisa.

## 5.2 Determinação do EHL do óleo da polpa do Pequi

Considerado um fator chave para o desenvolvimento de emulsões e microemulsões, o EHL é uma ferramenta fundamental para a seleção dos tensoativos e sua mistura adequada, proporcionando obtenção de sistemas estáveis e diminuindo o trabalho experimental (SCHIMIDTS et al., 2012). Vários parâmetros podem influenciar este estudo, entre eles a estabilidade dos sistemas emulsionados, aspectos macroscópicos, cremeação, tamanho das gotículas dispersas, turbidez da formulação, entre outros. Portanto, o menor tamanho de gotas e menor turbidez deve produzir a emulsão mais estável (FREDRICK; WALSTRA DEWETTINCK, 2010; ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002).

O EHL é uma escala semi-empírica em que tensoativos e óleos apresentam valores característicos. Desta forma, durante o estudo de determinação de EHL de um determinado óleo é importante a seleção de tensoativos de EHL bastante distintos, sendo um mais hidrofílico, como o Tween® 80 (EHL=15), e um tensoativo mais lipofílico, como o Span® 80 (EHL=4,3), para se obter uma faixa bem variável de EHL (XAVIER JÚNIOR et al., 2012). As emulsões foram obtidas, como demonstrado no item 4.2.1. Decorridas 24 horas do preparo, as emulsões foram caracterizadas quanto aos seus aspectos físico-químicos, incluindo estabilidade relacionada à turbidez e tamanho de gotículas por DLS.

As emulsões de óleo de pequi apresentaram menor tamanho de gotículas entre EHL 10,5 e 11,75 (Figura 15). O tamanho das gotículas dispersas na emulsão pode interferir na estabilidade, favorecendo a coalescência, sendo a força externa e o fator de concentração de tensão diretamente proporcional ao diâmetro da gota. Adicionalmente, a velocidade de separação de fases é maior quanto maior forem as gotas da fase dispersa, quanto maior for a diferença de densidade entre as duas fases e quanto menor for a viscosidade da fase externa (FREDRIK; WALSTRA; DEWETTINCK, 2010), como demonstrado pela Lei de Stokes:

$$v = \frac{2r^2 \cdot g \Delta\rho}{9\eta} \quad (6)$$

sendo,  $r$  = raio da gotícula;  $g$  = aceleração da gravidade;  $\Delta\rho$  = diferença entre as densidades da fase interna e da fase contínua;  $\eta$  = viscosidade da fase contínua.

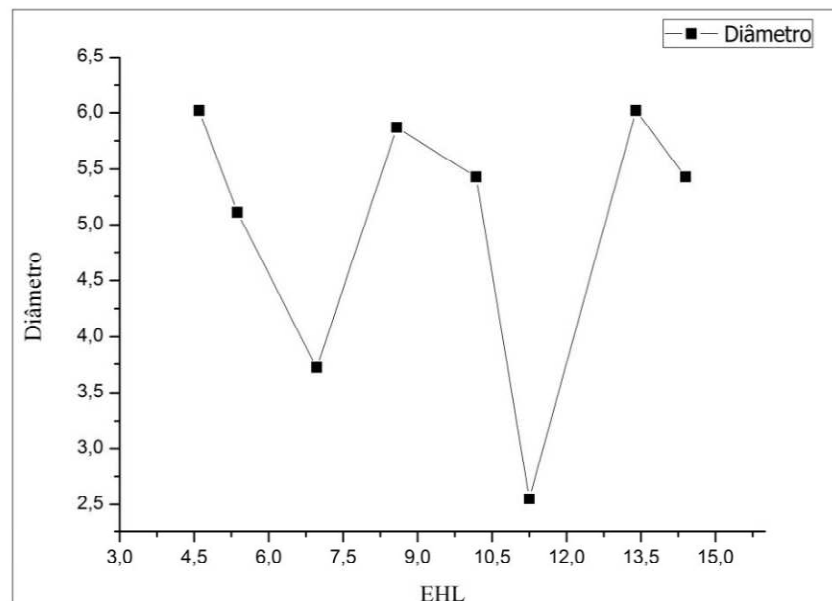
A espectroscopia UV-Vis é uma técnica de medida de dispersão da luz capaz de fornecer informações sobre a composição, o tamanho das gotas, a estrutura interna e a concentração da fase dispersa de uma emulsão (GLASSE et al., 2014). A análise baseia-se na

medida da transmitância pela formulação, quando sob esta é aplicado um feixe de luz. Assim, o sistema que apresentar maior valor de transmitância terá o menor tamanho de gotículas, enquanto sistemas com gotas de maior diâmetro irão absorver mais luz (DAMASCENO et al., 2011; ORAFIDYA; OLADIMEJ, 2002). Para emulsões de óleo de pequi, as formulações de EHL 10,5-11,75 apresentaram-se menos túrbidas (Figura 16).

Durante a realização do estudo de determinação do EHL do referido óleo, foram feitas análises macroscópicas, como cor e estabilidade visual, além da observação de separação de fases, volume de cremação e estudos de estabilidade. As formulações com EHL baixos (4,0, 5,5 e 7,0) e mais elevados (13,0 e 14,5) apresentaram, respectivamente, separação de fases e alto índice de cremagem. As faixas mais extremas de EHL também foram mais suscetíveis a alterações frente aos estudos de estabilidade preliminar. Entretanto, os resultados de cremagem foram inexatos e questionáveis quanto a determinação exata do EHLc (EHL crítico) do óleo da polpa de pequi.

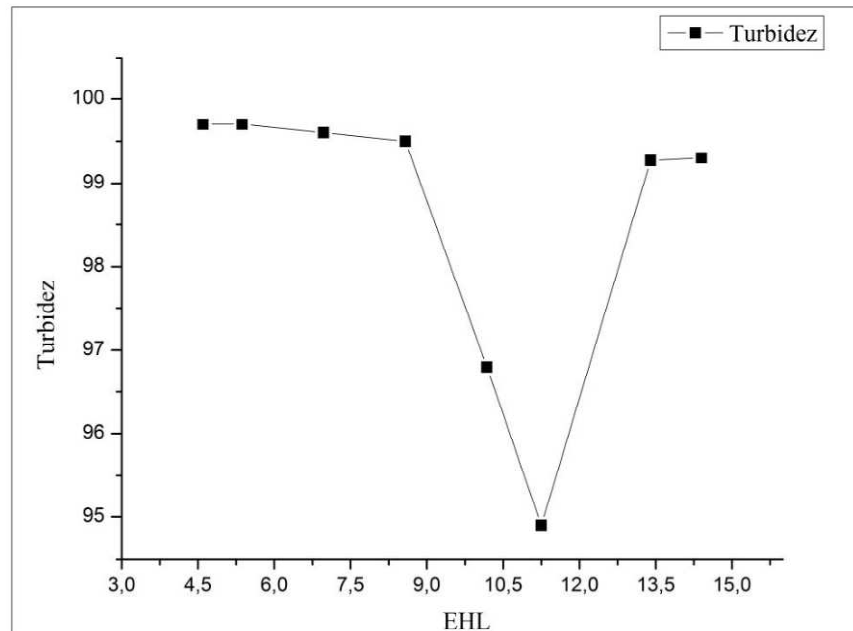
Resultados semelhantes foram obtidos por Orafidya e Oladimej (2002) durante o estudo de determinação de EHL de óleos essenciais, observando que o grau de cremagem não poderia ser utilizado para determinar o EHL dos óleos, pois a maioria das emulsões não apresentou uma demarcação distinta entre a fase aquosa inferior separada e a camada de creme. Entretanto, no mesmo estudo foi atestada a credibilidade do método turbidimétrico, através da correlação entre o tamanho das gotas e turbidez das emulsões.

**Figura 15** Diâmetro das gotas ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões com óleo de Pequi. Os menores diâmetros de gotas foram obtidos entre EHL 10,5 e 11,75.



FONTE: dados da pesquisa.

**Figura 16** Turbidez das emulsões com óleo de Pequi. Os menores valores foram obtidos entre EHL 10,5 e 11,75.



FONTE: dados da pesquisa.

### 5.3 Diagrama de fases pseudoternário

Após a determinação do EHL requerido do óleo, os tensoativos podem ser selecionados e a proporção entre os componentes determina a formação do sistema. Tensoativos com baixo EHL irão favorecer a formação de micelas reversas (A/O), enquanto com valores intermediários são recomendados para obtenção de sistemas O/A. Assim, a construção do DFPT é uma ferramenta prática e usual para caracterizar o domínio das regiões isotrópicas (FOX, 1986; SILVA e SOARES, 1996; DAMASCENO et al., 2011; MORAIS, 2006).

Considerando que o EHL requerido pelo óleo de pequi encontra-se na faixa de 10,5 e 11,75, optou-se pela utilização de tensoativos não iônicos com valores de EHL que combinados pudessem gerar valores próximos ao EHL<sub>c</sub> do óleo, proporcionando uma melhor estabilização da formulação. Deve-se ressaltar que os tensoativos não iônicos são mais adequados para aplicações farmacêuticas por serem pouco afetados com as mudanças de pH e força iônica, além da baixa toxicidade. Dessa forma, aplicou-se o conceito inicial de EHL de Griffin e a Equação 4 para obtenção das proporções adequadas do tensoativo mais hidrofílico, Kolliphor EL<sup>®</sup> (EHL 12-14, SIGMA-ALDRICH) e o mais lipofílico, Brij<sup>®</sup> 52 (EHL 5, SIGMA-ALDRICH). Dessa maneira, foi determinada a proporção de 88,5% de Kolliphor EL<sup>®</sup> e 11,5% para Brij<sup>®</sup> 52.

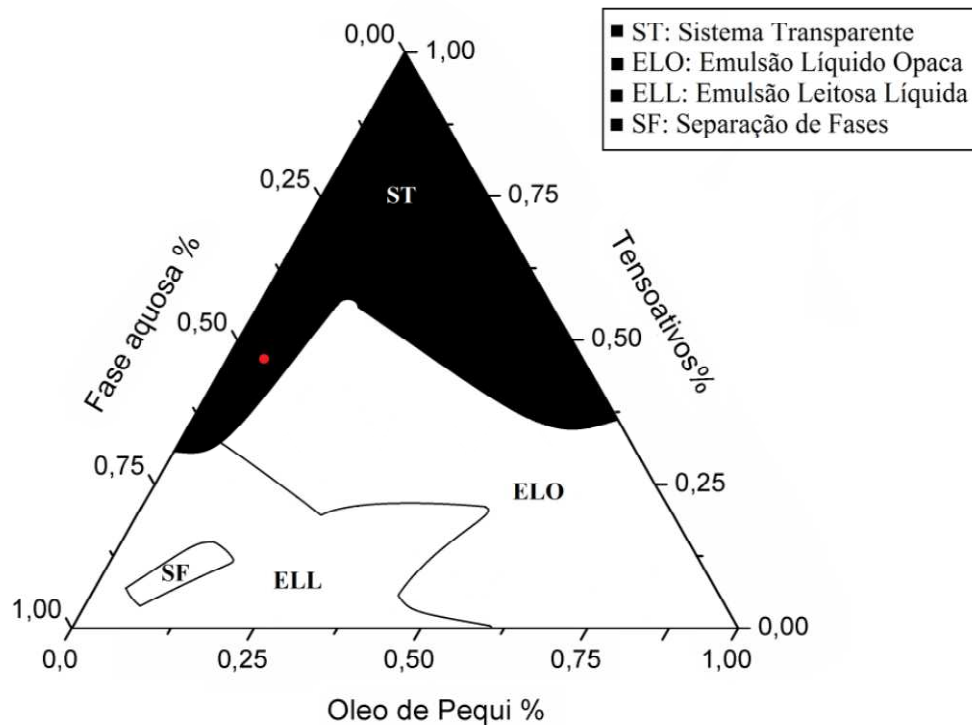
Garti et al. (2001) descrevem o comportamento de sistemas microemulsionados sob à

influência de polióis e álcoois de cadeia curta, analisando o grau de solubilização do óleo na fase aquosa. Foi observado que estes componentes podem modificar a curvatura interfacial e a flexibilidade do filme de tensoativos, melhorando a capacidade de solubilização do óleo nas microemulsões, indicando ainda que com o aumento da concentração destes, os sistemas tendem a uma mudança na microestrutura interna de A/O para uma O/A. Além disso, alcanóis de cadeia curta são amplamente utilizados como potenciadores de permeação em ME (KOGAN; GARTI, 2006).

Durante a realização deste trabalho, foi observado que os tensoativos, Kolliphor EL<sup>®</sup> e Brij<sup>®</sup> 52, nas proporções calculadas, não forneciam sistemas transparentes estáveis, levando a turvação após 48h. Algumas investigações com óleos naturais demonstram melhor solubilização da fase oleosa e tensoativos à fase aquosa associada à polióis e álcoois de cadeia curta, quando misturas de água e glicerol ou PPG são usados o invés de água pura. Estes compostos formam ligações de hidrogênio, têm constantes dielétricas relativamente elevadas e minimizam a formação de cristais líquidos (GARTI et al, 2001; PESSOA et al., 2015; ZHENG et al., 2013). Observando os resultados existentes na literatura sobre o papel destes agentes na solubilização de óleos naturais e o objetivo deste estudo em produzir ME O/A, volumes de PPG + água foram estudados, sendo a proporção 3:1 de PPG e água respectivamente o mais adequado, fornecendo sistemas transparentes estáveis e espontâneos.

O DFPT pode ser observado na Figura 17, apresentando uma vasta região de sistemas classificados como transparentes (ST), destacada em preto. Desta área foram selecionados pontos com maior volume de fase aquosa que favorecem a obtenção de um sistema O/A (CRUZ; UCKUN, 2001; DAMASCENO et al., 2011; FORMARIZ et al., 2005; OLIVEIRA, 2004).

**Figura 17** Diagrama de Fases Pseudoternário. Cada vértice representa uma fase da formulação, sendo a oleosa composta pelo óleo de pequi, a mistura dos tensoativos por Kolliphor<sup>®</sup> e Brij<sup>®</sup> e a fase aquosa PPG e água (3:1).



FONTE: dados da pesquisa.

O ponto vermelho destacado na área de ST (Figura 17) apresentou melhores aspectos organolépticos, maior estabilidade e adequado teor de fase aquosa, sendo sugestivo que o óleo está no interior das micelas e o sistema seja O/A. A composição do referido sistema apresenta: 5,3% de óleo da polpa de pequi, 47,6% da mistura dos tensoativos Kolliphor<sup>®</sup> EL e Brij<sup>®</sup> 52 (42,12% e 5,47%, respectivamente) e 47,1% de fase aquosa (PPG e água, 3:1). Outros três pontos presentes na área em destaque foram avaliados em aspectos de pH, condutividade e estabilidade preliminar, entretanto o ponto selecionado apresentou coloração amarela suave, transparência, homogeneidade e maior estabilidade (Figura 18), sendo promissor nanocarreador do óleo de pequi para uso tópico.



**Figura 18** Formulação selecionada na área de ST do DFPT.



FONTE: dados da pesquisa.

## 5.4 Caracterização da formulação

### 5.4.1 pH, condutividade, tamanho de gotícula e estudos morfológicos

Através de estudos físico-químicos é possível confirmar a formação de ME ou, até mesmo, verificar modificações específicas em seu comportamento. Na Tabela 4 são apresentados os resultados das análises físico-químicas e estruturais, realizadas para o sistema em estudo. O pH é um parâmetro importante para detectar a viabilidade da formulação e a estabilidade de um sistema. A formulação selecionada apresentou pH adequado, no valor de  $7,33 \pm 0,04$ , que está dentro da faixa de tolerância biológica para produtos de aplicação tópica (TASHTOUSH, BENNAMANI; AL-TAANI, 2013; PARVEEN, AKHTAR; MAHMOOD, 2014).

**Tabela 4** Caracterização da formulação.

Caracterização da formulação	
<b>pH</b>	$7,33 \pm 0,04$
<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{S cm}^{-1}</math>)</b>	$15,087 \pm 0,1893$
<b>Índice de Refração</b>	$1,430 \pm 0,0005$
<b>Tamanho de Gotículas (nm)</b>	13,38
<b>Viscosidade (Pa.s)</b>	0,8
<b>Dispersidade</b>	0,17
<b>Potencial Zeta (<math>\zeta\text{mV}</math>)</b>	7,53
<b>Microscopia de Luz Polarizada</b>	Isotropia

FONTE: dados da pesquisa.

A condutividade elétrica é normalmente utilizada como técnica complementar para elucidação de mudanças microestruturais em sistemas coloidais de formação espontânea,

fornecendo importantes informações relacionadas com as transições de fase que ocorrem nas microemulsões, ou seja, a transformação de sistemas que possuem água retida (A/O) em estruturas intermédias e, em seguida, a microestruturas O/A. Desta forma, tipicamente, a condutividade é baixa para micelas reversas. À temperatura ambiente a formulação apresentou condutividade de  $15,087 \mu\text{S cm}^{-1}$  (Tabela 4). Este valor está abaixo do esperado para sistemas O/A, entretanto, deve ser considerada a influência da fase aquosa da formulação, que apresenta a mistura de PPG/água na proporção 3:1, sendo o PPG um composto de baixa condutividade  $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$  (DOW, 2013) e que está presente em maior quantidade na fase externa (YAGHMUR et al., 2003; ZHANG et al., 2013).

MEs são agregados esféricos incapazes de desviar o plano de luz incidente. No entanto, durante um processo de inversão de fases tornam-se anisotrópicas, sem apresentar qualquer descontinuidade aparente nas suas propriedades físicas, mas que pode ser evidenciado pela variação do índice de refração. Os agregados isotrópicos esféricos não apresentam fenômenos de dupla refração ou birrefringência, ou seja, não são capazes de desviar o plano de luz incidente. Contudo, as micelas cilíndricas e lamelares são classificadas como dispersões anisotrópicas, exibindo o fenômeno de birrefringência colorida (pleiocroísmo) (EVANDRO, 2009; ROSSI; VANAG; EPSTEIN, 2011). A análise do índice de refração da formulação com óleo de pequi possibilitou auxiliar na caracterização do sistema quanto à sua isotropia (Tabela 4). O valor de  $1,430 \pm 0,0005$ , obtido como o índice de refração da formulação, não apresentou variação durante os estudos realizados, sugerindo que a formulação seja um ME isotrópico.

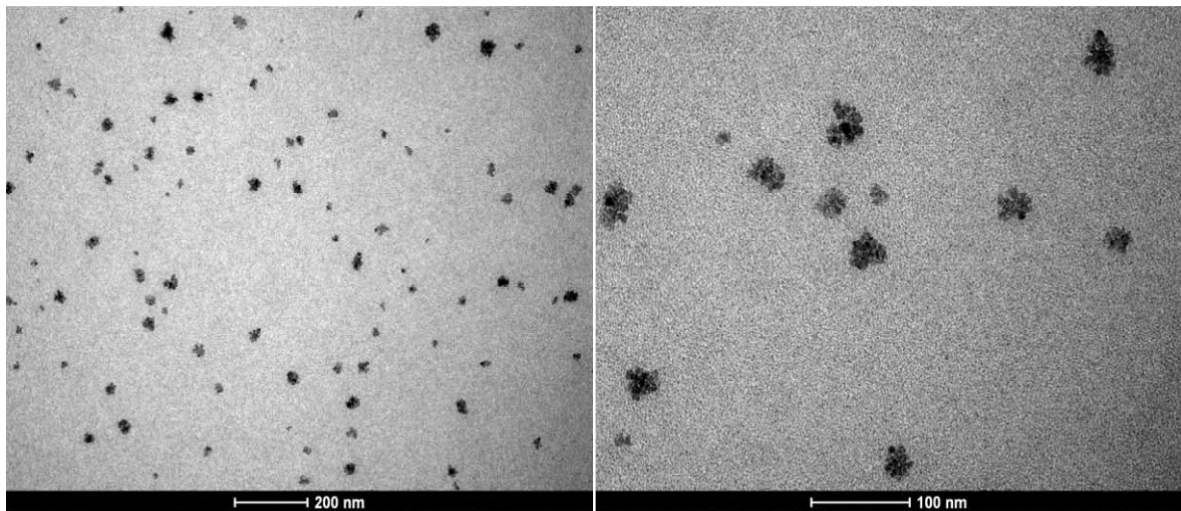
Formulações ou materiais isotrópicos apresentam apenas um índice de refração e nenhuma restrição no plano de vibração de luz que passa através destes, apresentando as mesmas propriedades ópticas em todos os sentidos (CHORILLI et al., 2011). Desta forma, sob um campo de luz polarizada, os sistemas isotrópicos são caracterizados pela presença de um campo escuro, conforme foi evidenciado por Ferreira et al. (2015) e verificado para a formulação com óleo de pequi do presente estudo (Tabela 4). Materiais anisotrópicos, por sua vez, apresentam propriedades ópticas que alteram a orientação da luz incidente em relação aos eixos cristalográficos, apresentando assim diferentes índices de refração, que estão relacionados com a direção da propagação da luz através da matéria e da orientação do plano vibracional (FORMARIZ et al., 2007; ZHENG et al., 2011).

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) têm sido amplamente utilizada para estudar nanoestruturas em seu aspecto ultraestrutural. A abordagem geral para a análise por MET é preparar a amostra como uma película fina de tal modo que um feixe de elétrons possa

passar através desta. A imagem é obtida com contraste resultante da absorção diferencial e espalhamento de elétrons de diferentes regiões da amostra. Entretanto como em todas as técnicas baseadas em microscopia, artefatos de imagem devido à preparação e desidratação da amostra podem ocorrer (ACHARYA; HARTLEY, 2012; ZHENG et al., 2011).

A morfologia das gotículas da formulação com óleo de pequi foi avaliada por meio de MET. Foram observados aglomerados dispersos de nanogotículas de óleo de pequi envolvidas por material elétron-denso na interface óleo-água (Figura 19). Este comportamento pode ser explicado pela presença majoritária de tensoativos/cotensoativos que leva à fusão de gotículas (KOGAN et al., 2009; HAYES et al., 2015). Assim, o sistema formulado difere daqueles clássicos, sendo classificado com microemulsão em transição de fase bicontínua para O/A.

**Figura 19** Morfologia das gotículas da formulação. Imagens obtidas através de MET, apresentando grupos de gotículas em escala nanométrica.



FONTE: dados da pesquisa.

Para a análise de tamanho e distribuição de gotículas em ME, diversas técnicas podem ser utilizadas. Um dos métodos mais adequados é o espalhamento de luz dinâmico, também referido como espectroscopia de correlação fotônica, sendo esta técnica baseada no movimento Browniano das gotículas em meio disperso (*PCS*, do inglês *photon correlation spectroscopy*) (ACHARYA; HARTLEY, 2012; DAMASCENO et al., 2011; OKUR et al., 2011). As amostras estudadas foram diluídas, pois sistemas concentrados podem levar a interações interpartículas e assim o número de gotículas por unidade de volume pode interferir na difusão, levando a erros experimentais no tamanho das gotículas (ABOOFAZELI et al., 2000; BERGONZI et al., 2014).

O diâmetro de gotas do óleo menor que 100 nm é indicativo de ME. O DLS (Tabela 4) evidenciou a presença de sistemas homogêneos com uma distribuição monomodal, valor de dispersidade de 0,17 e valor de diâmetro médio de gotículas de 13,38 nm, corroborando a aparência transparente, típica de ME (MA; ZONG, 2015). A dispersidade de 0,17 obtida é favorável, pois valores inferiores a 0,5 determinam homogeneidade no tamanho das gotículas, refletindo na qualidade e estabilidade da formulação (SAHLE et al., 2012; OKUR et al., 2011).

#### **5.4.2 Potencial Zeta**

O potencial zeta (PZ) pode ser positivo ou negativo em polaridade, dependendo das particularidades químicas dos componentes da formulação, sendo o potencial elétrico criado pela presença de uma carga na superfície da gotícula. Desta forma, o PZ é um indicador do grau de repulsão entre as gotículas carregadas de forma semelhante, observando que forças repulsivas tendem a impedir a agregação das gotículas durante o armazenamento. Assim, o valor de PZ é utilizado em módulo (Tabela 4), como um importante indicativo de provável estabilidade física de uma formulação (SHAH et al., 2014).

As medidas de PZ da microemulsão formulada com óleo de pequi apresentou média negativa (-7,53 mV), que indica superfície carregada negativamente nas micelas, possivelmente devido à presença de grupamentos químicos negativos dos ácidos graxos do óleo, tensoativo e cotensoativo. Usualmente, um valor absoluto de potencial zeta entre  $|30\text{mV}|$  e  $|5\text{mV}|$  resultam em boa estabilidade, já valores inferiores podem acarretar agregação das gotículas mais rapidamente (AHMAD et al., 2014; MOSTAFA et al., 2014; BOSE et al., 2013). Entretanto, a determinação da estabilidade de formulações, contendo em sua composição tensoativos não-iônicos, não depende unicamente do potencial zeta, mas também de estudos reológicos e de estabilidade a curto e longo prazo.

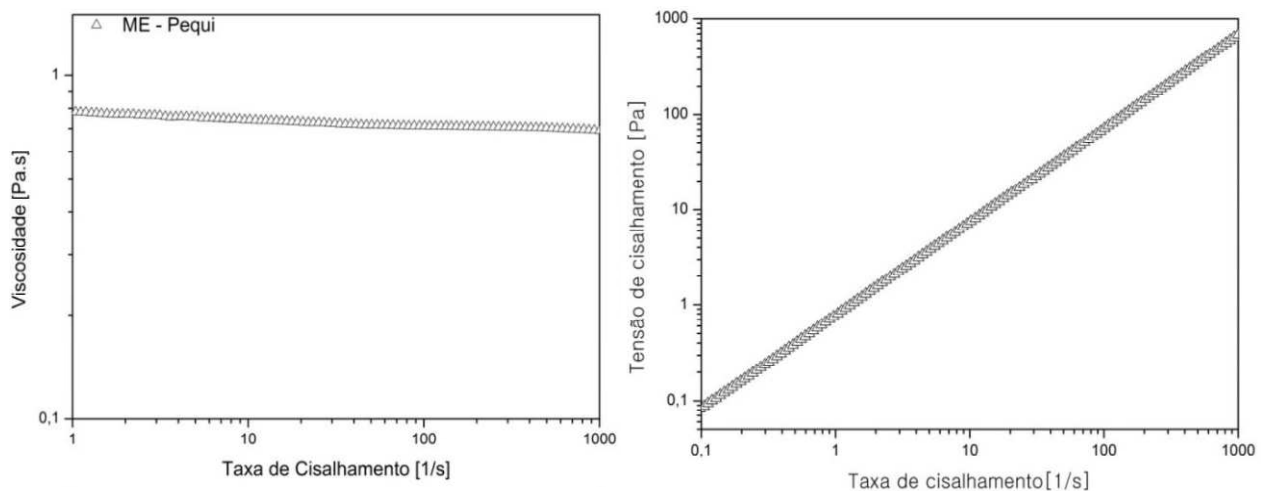
#### **5.4.3 Estudo Reológico**

As propriedades reológicas de microemulsões são dependentes do tipo, morfologia, densidade e interações das estruturas presentes. Desta forma, mudanças microestruturais, tais como transições de fase são refletidas neste estudo (DAMASCENO et al., 2011). Microemulsões bicontínuas apresentam comportamento newtoniano, entretanto viscosidade mais elevadas, possivelmente devido à desestruturação na microestrutura. Microemulsões

típicas A/O e O/A, por outro lado, apresentam um comportamento newtoniano e baixas viscosidades, até mesmo quando em elevadas concentrações de gotículas, provavelmente devido à coalescência reversível destas.

No entanto, a diferenciação dos tipos de microemulsões não pode ser feita unicamente com dados reológicos, observando que este tipo de caracterização macroscópica é insuficiente para detecção de alterações microestruturais (ACHARYA; HARTLEY, 2012; BRUXEL et al., 2012). A formulação com óleo de pequi apresentou comportamento newtoniano (Tabela 4, Figura 20), visto que a tensão de cisalhamento foi proporcional ao aumento da taxa de cisalhamento, e a viscosidade, de aproximadamente 0,8 Pa.s, permaneceu constante em função da taxa de cisalhamento (SANTANA; FASOLIN; CUNHA, 2012). O comportamento newtoniano e a viscosidade mais elevada são desejáveis para formulações de aplicação tópica, devido à baixa influência frente a mudanças de temperatura e pressão, além de exibir melhor espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na pele (LI et al., 2012; FASOLIN, SANTANA, CUNHA, 2012, SAHLE et al., 2012).

**Figura 20** Estudo reológico da formulação. Comportamento Newtoniano evidenciado pela tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento e viscosidade de 0,8 Pa.s constante com o aumento da taxa de cisalhamento.



FONTE: dados da pesquisa.

#### 5.4.4 DSC

A técnica de DSC mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência (termicamente estável) em função da temperatura (SILVA et al., 2007). A análise por DSC em microemulsões típicas resulta comumente em três comportamentos: formulações

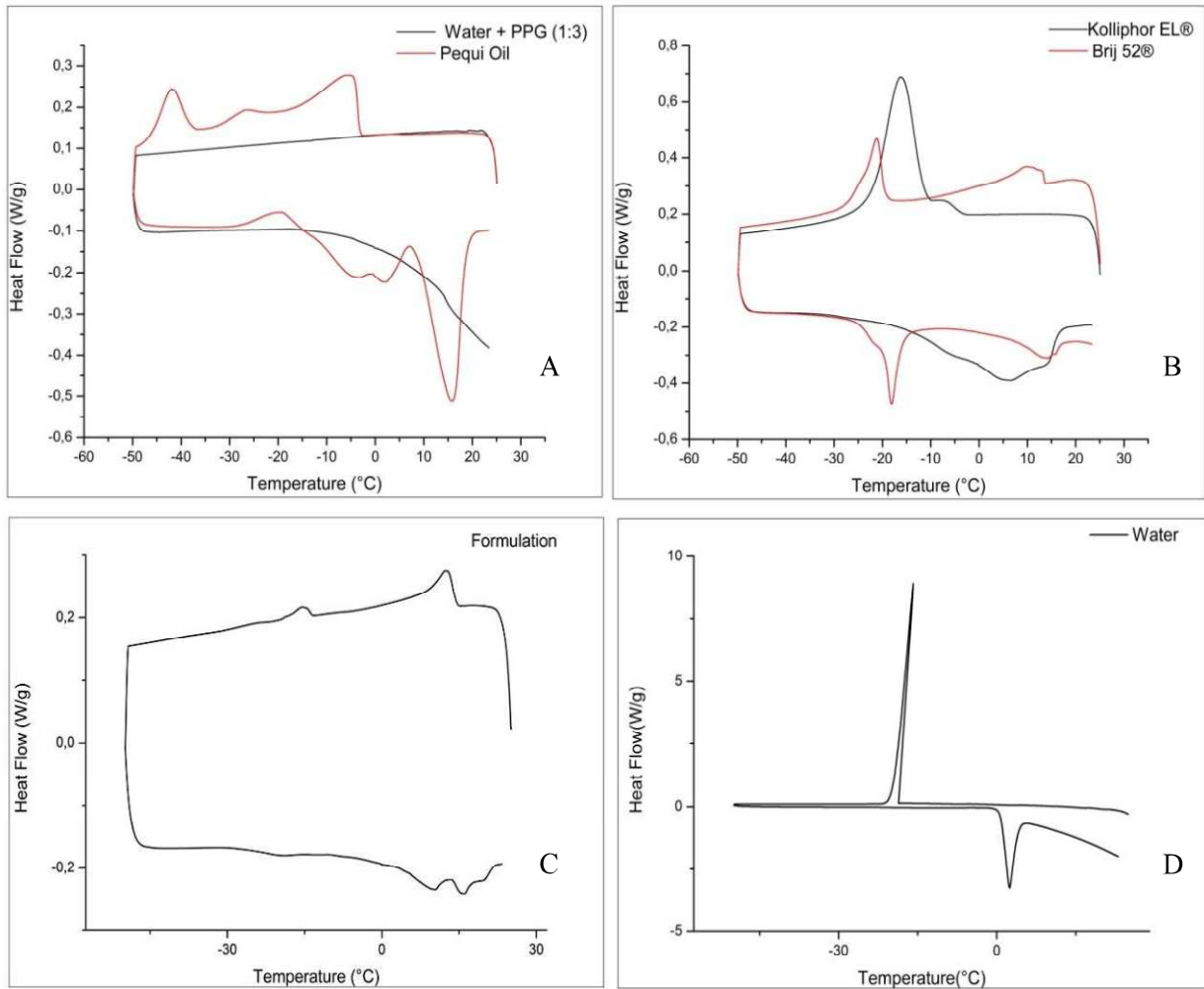
do tipo água em óleo (A/O) apresentam termograma com os picos semelhantes ao comportamento da fase oleosa; formulações do tipo óleo em água (O/A), por outro lado, apresentam no termograma picos relativos aos processos térmicos da água. Microemulsões bicontínuas, por sua vez, apresentam termograma com picos separados e distintos relacionados ao comportamento da fase aquosa e oleosa (BOONME et al., 2006; MICHNIAK-KOHN; ZHANG, 2011; ZHANG, H. et al., 2013).

Desta forma, DSC é uma ferramenta analítica que pode ser utilizada na determinação indireta da microestrutura de ME. Assim, é possível avaliar a estrutura de microemulsões através das propriedades da água, avaliando diferenças no comportamento de fusão e de congelamento. Através do ponto de fusão é possível diferenciar a água livre ( $\sim 0^{\circ}\text{C}$ ), a água interfacial ( $\sim -10^{\circ}\text{C}$ ) e a água ligada ( $< -10^{\circ}\text{C}$ ) (BOONME et al., 2006; MICHNIAK-KOHN; ZHANG, 2011; ZHANG, H. et al., 2013; PODLOGAR et al., 2004).

O comportamento térmico da água na formulação foi investigado por DSC e comparado com o da água pura (Figura 21 e Tabela 5), assim como os constituintes do sistema foram analisados. A transição térmica da mistura PPG/água (3:1) não foi observada nas temperaturas e fluxos utilizados (Figura 21-A). Este resultado corresponde ao achado de Weng, Li e Zuo (2011), em estudo de análises quantitativas do conteúdo de água em soluções aquosas com álcoois (metanol, etanol, etilenoglicol, propilenoglicol e glicerol) através de DSC, perscrutando que o PPG foi o mais forte agente “bloqueador” da água, enquanto o metanol foi o mais fraco.

O óleo da polpa do pequi mostrou eventos endotérmicos e exotérmicos (Tabela 5 e Figura 21) em virtude do polimorfismo de lípidos mistos (NASSU; GONÇALVES, 1999). O desvio da temperatura de fusão em relação à água pura depende da natureza da interação entre o agente tensoativo e a água, notando que devido à ação bloqueadora do PPG, não foi possível detectar os eventos típicos da água na formulação (Figura 21 - C). Entretanto, foi possível observar a interferência da fase oleosa (Tabela 5), pois o durante o ciclo de aquecimento da formulação evidenciou-se evento endotérmico com área de 1,339 J/g à  $15,8^{\circ}\text{C}$ , próximo da temperatura de fusão do óleo. A diferença de entalpia da microemulsão quando em comparação ao óleo puro é justificada pela presença dos tensoativos (BOONME; KRAUEL, 2006). A presença de dois picos de fusão é um comportamento característico de microemulsão bicontinua (KOGAN et al., 2009), entretanto, o presente estudo reforça um sistema em transição de fase bicontínua para O/A (PODLOGAR et al., 2004; GARTI et al., 2000).

**Figura 21** DSC da formulação e seus componentes isolados. Termogramas (A) fase aquosa (PPG e água, 3:1) e do óleo fixo da polpa do pequi ; (B) dos tensoativos Kolliphor® EL e Brij® 52; (C) da formulação com óleo de Pequi e (D) da água utilizada.



FONTE: dados da pesquisa.

**Tabela 5** Eventos detectados pelo DSC. Os valores positivos das áreas dos picos (J/g) correspondem a picos exotérmicos, enquanto os valores negativos correspondem aos picos endotérmicos com seu ponto máximo (°C).

<b>Microemulsão com óleo de pequi</b>					
Ciclo de resfriamento			Ciclo de aquecimento		
Evento	Área (J/g)	Máx. (°C)	Evento	Área (J/g)	Máx. (°C)
<b>1</b>	1,50	-15,62	<b>1</b>	-2,125	10,26
<b>2</b>	2,69	12,39	<b>2</b>	-1,339	15,85

<b>Kolliphor® EL</b>					
Ciclo de resfriamento			Ciclo de aquecimento		
Evento	Área (J/g)	Máx. (°C)	Evento	Área (J/g)	Máx. (°C)
<b>1</b>	8,31	-16,25	<b>1</b>	-9,75	6,29

<b>Brij® 52</b>					
Ciclo de resfriamento			Ciclo de aquecimento		
Evento	Área (J/g)	Máx.(°C)	Evento	Área (J/g)	Máx. (°C)
<b>1</b>	4,18	9,78	<b>1</b>	-4,47	-18,13
<b>2</b>	3,97	-21,2	<b>2</b>	-3,59	14,08

<b>Óleo de Pequi</b>					
Ciclo de resfriamento			Ciclo de aquecimento		
Evento	Área (J/g)	Máx. (°C)	Evento	Área (J/g)	Máx. (°C)
<b>1</b>	2,19	-41,95	<b>1</b>	-1,73	-3,24
<b>2</b>	2,23	-26,43	<b>2</b>	-4,13	15,8
<b>3</b>	3,98	-5,88	<b>3</b>	-1,43	1,91

FONTE: dados da pesquisa.

Observação: o valor da área do pico em (J/g) é sempre considerada em módulo, entretanto a tabela trás os valores desta forma para facilitar a diferenciação entre eventos exotérmicos (área com valor positivo) e endotérmicos (área com valor negativo).



## 5.5 Testes de estabilidade preliminar

Devido à baixa tensão interfacial nos sistemas microemulsionados, sua estabilidade termodinâmica é elevada quanto à sedimentação em temperatura constante. Entretanto, frente ao aumento de agitação térmica algumas formulações desestabilizam e suas gotículas formam grandes agregados advindos da coalescência. Assim, a temperatura pode modificar as propriedades do filme de tensoativos, resultando em mudanças estruturais. A estabilidade termodinâmica das microemulsões formuladas frente a mudanças de temperatura foi verificada a partir de ciclos de congelamento/descongelamento e de estresse térmico. Desta forma, testes de estabilidade expõem um determinado sistema a variações extremas de condições ambientais para simular possíveis alterações que este sistema possa sofrer ao longo do tempo de armazenamento (MORAIS et al., 2006; ROSSI et al., 2007; GHOSH et al., 2013).

Todos os desafios elencados não afetaram a estrutura macroscópica do sistema estudado. Após o ciclo gelo-degelo a formulação permaneceu estável e sem visíveis variações na macroestrutura, mantendo a transparência, não apresentando separação de fases, fissuras ou cremosidade. No teste de estresse térmico foi realizada a medida do pH e da condutividade elétrica da amostra antes e depois do teste. Dessa forma, antes do teste, a formulação apresentou pH de  $7,33 \pm 0,04$  e condutividade de  $15,087 \pm 0,1893 \mu\text{S cm}^{-1}$  e após o submissão ao teste, o pH da formulação foi de  $7,52 \pm 0,04$  e a condutividade elétrica de  $13,80 \pm 0,025 \mu\text{S cm}^{-1}$ , ambos à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), entretanto, não houve alteração macroscópica.

Considerando-se que, quanto mais próximo do sistema O/A, mais condutor será o sistema, enquanto que, quanto mais próximo de um sistema A/O, mais isolante será a formulação (NAOUI et al., 2011). Pode-se inferir que essas pequenas variações de pH e condutividade induzidas pelo estresse térmico causou alterações na microestrutura do sistema analisado, no entanto após 30 minutos em temperatura ambiente, a formulação voltou a apresentar as propriedades físico-químicas iniciais.

## 5.6 Ensaio *in vivo*

### 5.6.1 Teste de edema de pata induzido por carragenina

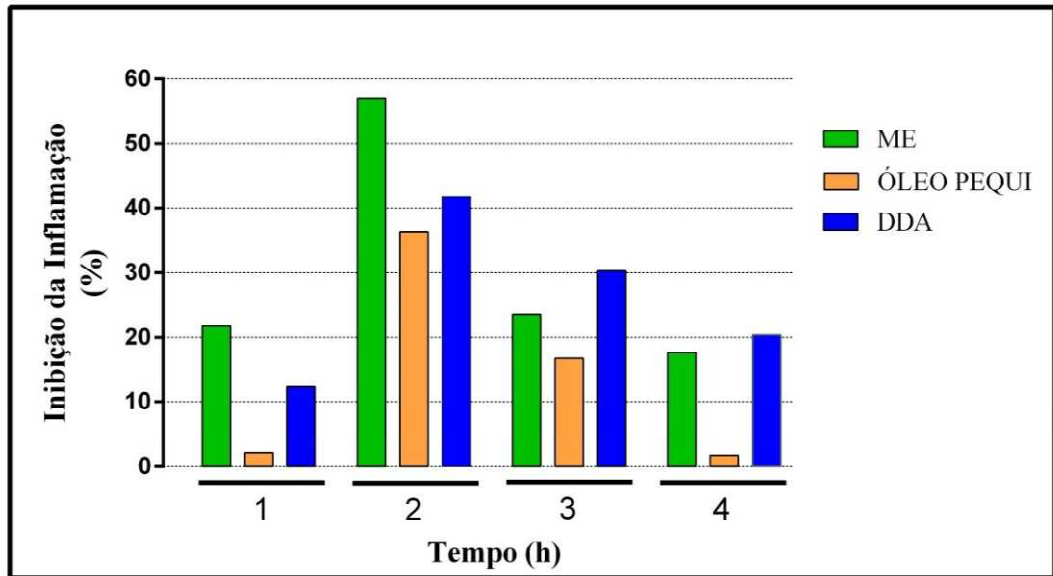
O modelo de edema de pata foi originalmente proposto por Winter et al. (1962) em ratos e, posteriormente, desenvolvido em camundongos, permitindo testar pequenas amostras de novos compostos em poucas horas. Este modelo tornou-se rapidamente o mais usado em ensaios de atividade anti-inflamatória (SWINGLE, 1974), e ainda continua sendo utilizado como um *screen* primário para novos agentes anti-inflamatórios (WINYARD; WILLOUGHBY, 2003; MARTINEZ et al., 2015; MIZOKAMI et al., 2016), além de conveniente para verificar o potencial anti-inflamatório tópico de diversos fármacos e fitofármacos, inclusive o sistema contendo óleo de pequi (SARAIVA, 2009; MA et al., 2013).

Através dos valores aferidos da espessura das patas, os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM ou como porcentagem da inibição da inflamação em milímetros (mm), e valor de  $\Delta$ Edema (mm), calculado subtraindo-se a medida da espessura dorsoplantar da pata direita após a aplicação do agente flogístico (1, 2, 3 ou 4h) da medida basal (SAKAT et al., 2014; HAGGAR; REEM; AL-WABLI; 2015).

Neste estudo, a medida da espessura dorsoplantar das patas dos camundongos mostrou que a injeção de carragenina após o tratamento tópico com salina causou significativo edema desde a primeira hora, se estendendo durante todo o tempo do experimento ( Figuras 23 e 24). Nesta primeira hora, nenhum dos tratamentos foi eficaz em reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) o edema. Entretanto, é possível observar na figura 22 que a maior inibição percentual da inflamação foi verificada para o grupo tratado com a microemulsão (inibição de 21,81%), enquanto o óleo de pequi bruto inibiu apenas 2,16% e o DDA 12,31%.

Por outro lado, duas horas após a injeção de carragenina na pata, os tratamentos com óleo de pequi, DDA e, especialmente, com a microemulsão contendo óleo de pequi, reduziram o edema de forma significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle positivo. O percentual de inibição da inflamação para o grupo tratado com ME é muito superior aos demais tratamentos (57,09%) (Figura 22), bem como é destaca a acentuada ação anti-inflamatória da formulação, atingindo um  $\Delta$  edema de 0,5 mm (Figuras 23 e 24). O óleo de pequi puro apresentou inibição da inflamação (36,33%) apenas neste intervalo, estando de acordo com estudos que propõe sua ação anti-inflamatória aguda (OLIVEIRA et al., 2010; SARAIVA et al., 2011). Já o DDA inibiu a inflamação em 41,72%, (Figuras 23 e 24).

**Figura 22** Percentual de inibição do edema após os tratamentos. Resultados obtidos através da Equação 4.



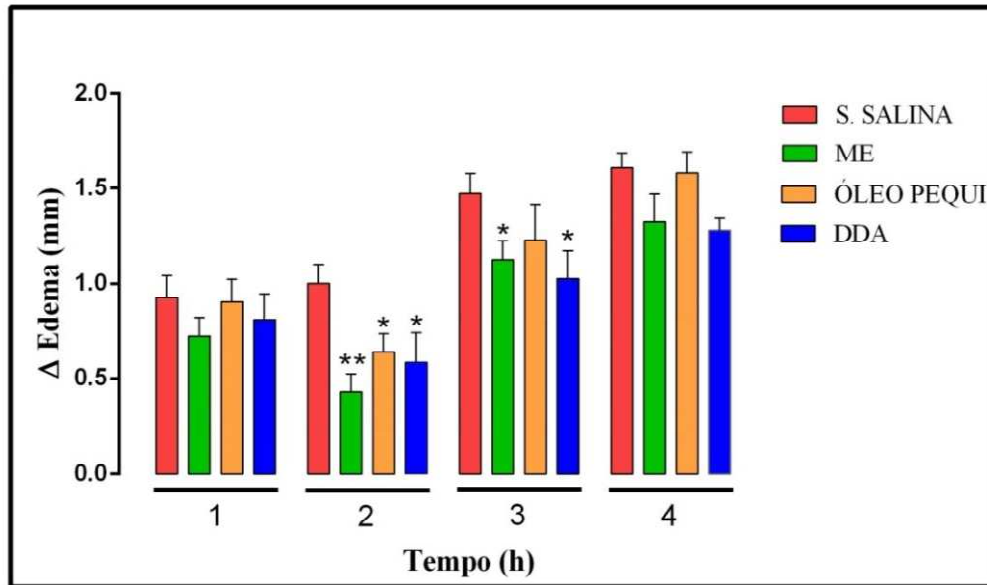
FONTE: dados da pesquisa.

Quando o edema foi avaliado na terceira hora, apenas os grupos tratados com ME e DDA apresentaram redução significativa do edema ( $p < 0,05$ ), sendo a microemulsão responsável por 23,64% de inibição e o DDA por 30,30% (Figuras 22-24). O grupo tratado com o óleo puro reduziu o edema de forma discreta e não significativa (16,71%) (Figuras 23 e 24). A partir deste momento, o DDA apresentou um percentual de inibição maior que o grupo tratado com ME, possivelmente pelo fato do anti-inflamatório não esteroide apresentar a capacidade de interagir com os fosfolípidos da pele, contribuindo para aumentar sua fluidez, a permeabilidade cutânea e a ação anti-inflamatória em função do tempo (SILVA et al., 2009b; KOROKOLVAS; FRANÇA, 2006).

Na quarta hora transcorrente do teste, não foi possível verificar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em nenhum dos grupos tratados (Figuras 23 e 24), apesar dos grupos ME e DDA terem apresentado discreta redução do edema (inibição da inflamação: ME=17,56%; DDA=20,42%; óleo de pequi=1,74%).

A ação do nanossistema, contendo apenas 5,3% de óleo de pequi, desde a segunda hora da indução do edema, permite inferir seu efeito anti-inflamatório agudo superior ao óleo bruto, proporcionado pela interação com o EC e liberação dos ativos de forma eficiente. Este resultado contraria aquele encontrado por Saraiva (2009), que descreve a capacidade do óleo fixo de pequi em reduzir significativamente o percentual de edema da orelha de camundongos após 1 hora de exposição aos agentes flogísticos: óleo de croton, ácido araquidônico, capsaicina e fenol.

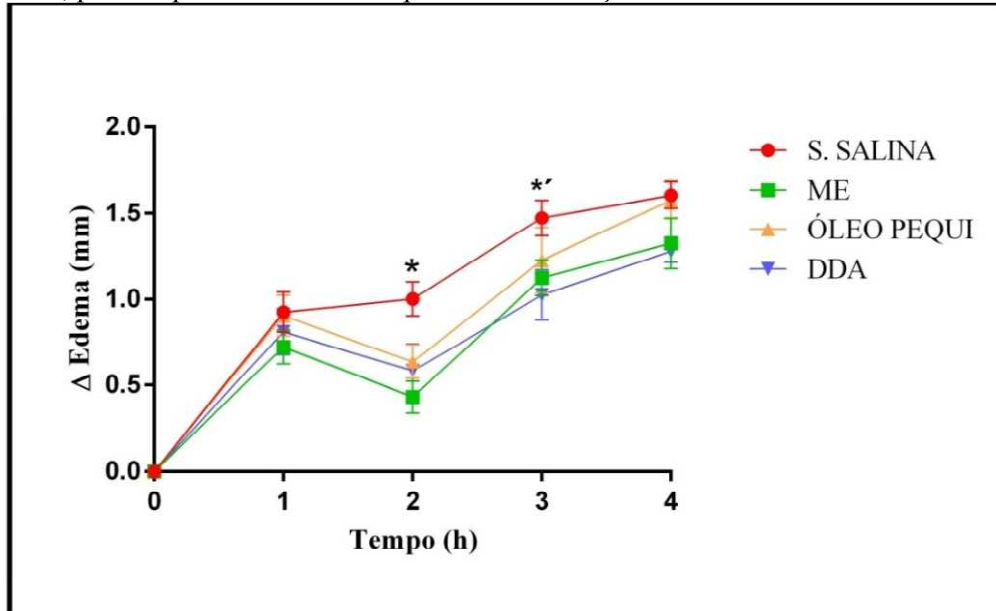
**Figura 23** Avaliação do efeito anti-inflamatório preliminar dos grupos tratados. Ação significativa de ME na segunda e terceira horas após indução do edema.



Teste One-way Anova seguido pelo teste de Boferroni;

\* Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); \*\* Diferenças significativas ( $p < 0,01$ )

**Figura 24** Ação anti-inflamatória preliminar dos tratamentos. Todos apresentam inibição na segunda hora, porém apenas ME e DDA produziram inibição na terceira hora.



Teste One-way Anova seguido pelo teste de Boferroni;

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e controle positivo;

\*' Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com DDA e ME e o controle positivo.

A maior atividade inibitória por parte da formulação, na segunda hora, pode ser explicada pelo fato de que a mesma constitui-se de um sistema nanocarreador, onde o óleo de pequi encontra-se dentro de nanoestruturas, cuja escala nanométrica não apenas favorece uma

melhor aderência a membranas, mas também pode permitir um transporte mais controlado de moléculas (AZEEM et al., 2009). Além disso, os tensoativos presentes na microemulsão podem facilitar a difusão do óleo terapêutico na pele através da desestruturação de lipídios do estrato córneo, permitindo uma melhor permeação e ação anti-inflamatória (KREILGAARD, 2002; AZEEM et al., 2009).

## 5.7 Análise histológica

Para melhor avaliação da atividade anti-inflamatória do sistema contendo óleo de pequi e demais tratamentos, cortes histológicos foram feitos a partir de secções retiradas da pata direita dos animais submetidos ao estudo de edema de pata (Figura 25). Foi possível visualizar duas das três camadas da pele: a epiderme e a derme. A pele que recebeu apenas solução salina apresentou estado conservado das estruturas do epitélio e ausência de achados inflamatórios (Figura 25-A).

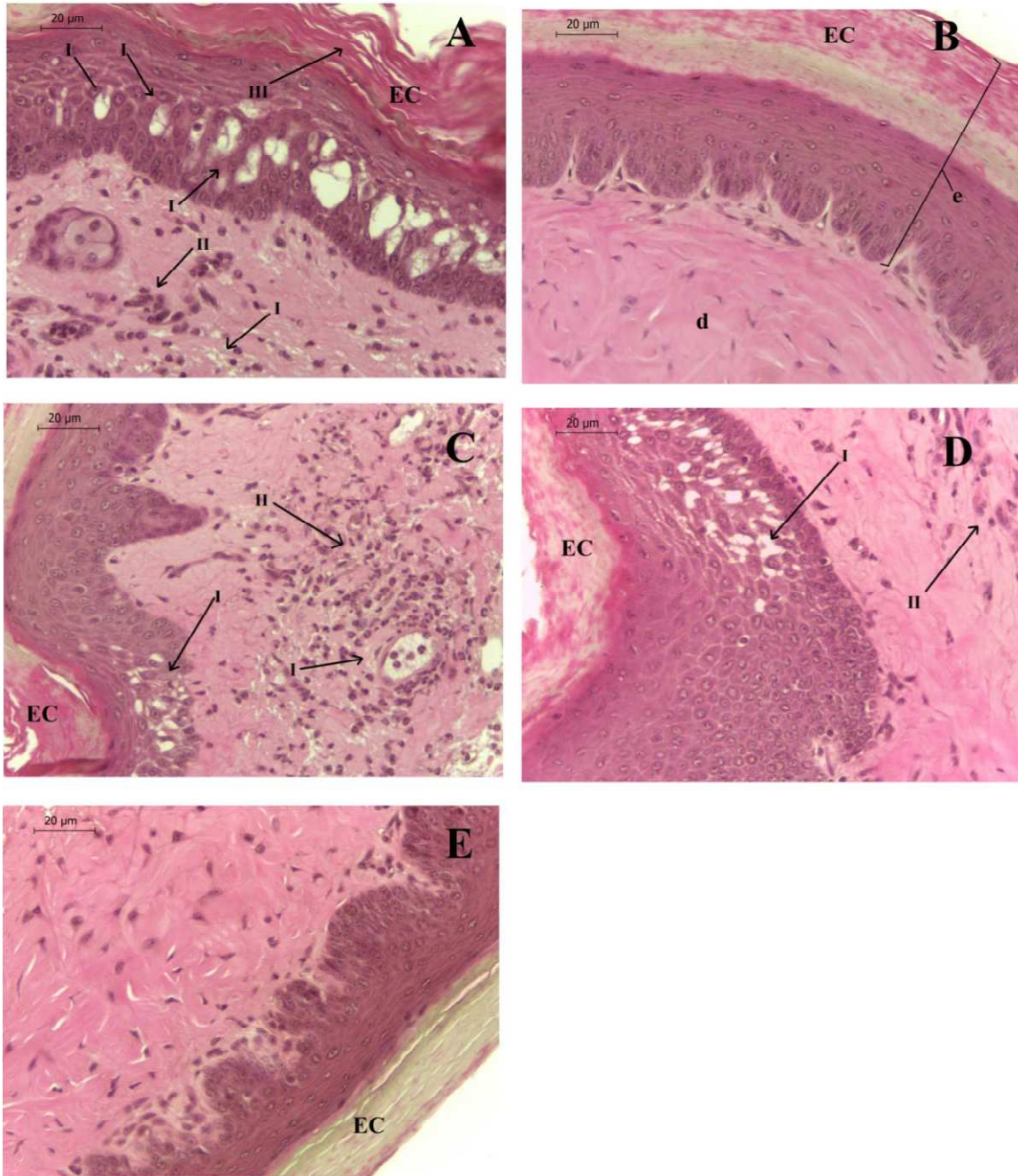
O grupo controle positivo (solução salina + carragenina 1%) apresentou diversas alterações histopatológicas (setas), tais como elevada migração celular (Figura 25A – II), edema (Figura 25A – I) e desestruturação do estrato córneo (Figura 25A – III). A presença de um infiltrado de células inflamatórias na derme e edema tanto na derme quanto na epiderme são eventos característicos de um tecido em processo inflamatório causado pela liberação de mediadores inflamatórios (KENDALL; NICOLAOU, 2013).

O grupo controle negativo (DDA + carragenina 1%) demonstrou uma recuperação tecidual, com diminuição do edema (Figura 25C – I), entretando ainda com intenso infiltrado de células inflamatórias (Figura 25C – II). Como este fármaco possui ação anti-inflamatória em função do tempo, a exposição à única dose talvez não tenha sido suficiente para promover significativa inibição do processo inflamatório (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2006). Da mesma forma, a pele tratada com óleo de pequi bruto e carragenina 1% apresentou certo grau de edema (Figura 25D – I) e infiltrado inflamatório (Figura 25D – II). Segundo Oliveira et al. (2010), a redução destes efeitos é dependente da dose do óleo.

O tratamento com ME, contendo 5,3% do óleo de pequi, proporcionou o melhor resultado histológico (Figura 25-E), mostrando um estrato córneo bem estruturado, ausência de edema na epiderme e leve presença de infiltrado na derme. Este resultado atesta a eficiência anti-inflamatória da formulação, devido à natureza estrutural do sistema e propriedades de permeação e liberação local de ativos. De forma mais eficiente, os AGIs incorporados foram capazes de restaurar o tecido cutâneo, como descrito em estudos

anteriores (SARAIVA, 2009; QUIRINO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010). Assim, os resultados obtidos demonstraram que a microemulsão contendo óleo de pequi é um produto fitoterápico inovador, capaz de melhorar a atividade anti-inflamatória do óleo *in natura*, em concentração muito menor.

**Figura 25** Análise histológica da pele após indução de edema. (A) carragenina 1% e salina, (B) solução salina, (C) carragenina 1% e DDA, (D) carragenina 1% e óleo de pequi puro e (E) carragenina 1% e ME. Setas indicam (I) edema, (II) infiltrado inflamatório, (III) desestruturação do estrato córneo. (EC) Estrato Córneo, (d) derme e (e) epiderme. Aumento: 400x.



FONTE: dados da pesquisa.

## 6 CONCLUSÃO

- A caracterização química do óleo de pequi, extraído no município do Crato/CE, apresentou os principais AGIs, oléico e palmítico, responsáveis pela atividade anti-inflamatória da formulação.
- A determinação do EHLc do óleo foi decisiva para a construção do diagrama de fases pseudoternário, que apresentou-se como ferramenta simples e satisfatória para obtenção de sistemas transparentes e escolha da formulação para análise.
- A caracterização físico-química da formulação selecionada sugeriu um sistema microemulsionado de pH adequado para uso tópico, com gotículas nanométricas monodispersas e carregadas negativamente, com comportamento Newtoniano e estável. Estas características favorecem a aplicação tópica contra afecções dermatológicas.
- O sistema foi classificado com sendo uma microemulsão em transição de fase bicontínua para O/A, sendo justificado pela formação de grupos dispersos de nanogotículas contendo o óleo de pequi, razoável concentração de tensoativos e composição da fase aquosa (rica em propilenoglicol).
- A avaliação da estabilidade preliminar confirmou a constância termodinâmica do sistema, que não apresentou separação de fases, cremosidade, turvação ou mudanças bruscas de pH e condutividade durante a realização dos testes.
- Durante as primeiras duas horas da indução do edema de pata, a microemulsão contendo 5,3% de óleo de pequi apresentou atividade anti-inflamatória superior ( $p < 0,05$ ), bem como maior redução percentual do edema durante as primeiras duas horas, quando comparado ao controle negativo (emulgel/DDA), além de manter atividade superior ao óleo bruto durante todo o teste. Diante disto, sugere-se aumento significativo do transporte e atividade dos componentes bioativos do óleo, quando incorporados na formulação.
- A avaliação microscópica das secções das patas obtidas após a quarta hora do edema, demonstraram um tecido recuperado após tratamento com ME de pequi. Para os grupos tratados com DDA e óleo puro, reduzidas alterações histopatológicas foram



detectadas. Isto mostra a eficácia aguda proporcionada pela microemulsificação do óleo.

- Desta forma, este trabalho destaca-se no âmbito da nanotecnologia farmacêutica pelo ineditismo de uma formulação microemulsionada com óleo de pequi com ação anti-inflamatória, valorizando o uso desta espécie para fins terapêuticos. Vale ressaltar a importância ambiental deste trabalho por abordar tratamento fitoterápico, bem como o uso sustentável da flora brasileira, ainda pouco explorada pelo setor farmacêutico, mas promissora fonte de produtos de alto valor medicinal, capaz de reduzir a importação de insumos farmacêuticos;
- Estudos posteriores deverão abordar a liberação e a capacidade de permeação da formulação através da pele, atividade farmacológica e mecanismo de ação do óleo, bem como a mutagenicidade, toxicidade, irritabilidade cutânea e estudos de estabilidade a longo prazo, objetivando garantir o controle de qualidade do produto, que poderá fornecer alternativa terapêutica a inflamações tópicas e ser um fitoterápico de interesse da indústria farmacêutica.



## 7 REFERÊNCIAS

- AHMAD, J. et al. Solid-Nanoemulsion Preconcentrate for Oral Delivery of Paclitaxel: Formulation Design, Biodistribution, and  $\gamma$  Scintigraphy Imaging. **BioMed Research International**, 2014.
- ALTHANYAN, M.S.; ASSI, K.H.; CLARK, B.J.; HANAEE, J. Microemulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for the determination of terbitaline in pharmaceutical preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, n.3, p.397–402. 2011.
- AMNON, C. S. Transdermal delivery of curcumin via microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**. n. 481, p. 97-103, 2015.
- AMARAL, T. N. D. **Extração e caracterização de óleo do pequi (*Caryocar brasiliensis camb.*) para o uso sustentável em formulações cosméticas óleo/água (o/a)**. Brasília, 2008. [Dissertação de Mestrado em ecologia e produção sustentável, Universidade de Brasília].
- ARARUNA, M. K. A., et al. Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm. **European Journal of Integrative Medicine** n. 5, p. 178–183, 2013.
- ASCARI, J.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. The phytochemistry and biological aspects of Caryocaraceae family. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.293-308, 2013.
- ASTIER, A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 64, n.1, p.23-35, 2006.
- AZEEM, A., et al. Microemulsions as a Surrogate Carrier for Dermal Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, p. 525–547, 2009.
- BAGWE, R.P., KANICKY, J.R., PALLA, B.J, PATANJALI, P.K., SHAH, D.O. Improved drug delivery using microemulsions: Rationale, recent progress, and new horizons. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v.18, n.1, p.77-140, 2001.
- BARBOSA, F. S. **Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea**. Rio de Janeiro, 2011. [Dissertação de Mestrado, Engenharia Biomédica, Universidade Federal do Rio de Janeiro].
- BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.141-148, 2007.
- BATISTA, J. S. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivo do Instituto Biológico**. v.77, n.3, p.441-447, 2010.
- BAROLI, B.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A.; DELGADO-CHARRO, M. B. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 209–218, 2000.

BERA, A. et al. Screening of microemulsion properties for application in enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 121, p. 198–207, 2014.

BIANCHI, O., et al. Reactive melt blending of PS-POSS hybrid nanocomposites. **J. Appl. Polym. Sci.** v. 128, p. 811-827, 2013.

BOONME, P. et al. Characterization of Microemulsion Structures in the Pseudoternary Phase Diagram of Isopropyl Palmitate/Water/Brij 97:1-Butanol. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, n. 7, vol. 2, 2006.

BOSE, S. et al. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.441, n.1-2, p.56-66, 2013.

BUTANI, D. YEWALE, C. MISRA, A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. n. 116 p. 351- 358, 2014.

CABRAL, G. A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Sciences**, v. 77, p. 1699–1710, 2005.

CARDOSO, C.R., et al; Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair Regeneration**, v. 12(2), p. 235-243, 2004.

CERA, R. F. L. **Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsão lipídicas: formulação e liberação in vitro**. Araraquara, 2001. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].

CORMACK, D. H. **Ham Histologia. 9. ed. Trad. Jorge José de Carvalho [et al]**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 570, 1991.

COSTA I. R., et al. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta bot. bras.**, n. 18 v. 4. p. 759-770, 2004.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 32, n.1, p.9-18, 2011.

DALMORA, M.E.A., et al. Inclusion complex of piroxicam with  $\beta$ -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, p.45-55, 2001.

DEPIERI, L. V. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia gênica**. São Paulo, 2012. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo].

DINA M. et al. Transdermal microemulsions of Glycyrrhiza glabra L.: characterization, stability and evaluation of antioxidant potential. **Drug Deliv**, v. 21, n. 2, p. 130 –139, 2014.

EL-HAGGAR, R.; ALWABLI, R. I. Anti-inflammatory Screening and Molecular Modeling of

some Novel Coumarin Derivatives. **Molecules**. n. 20, p. 5374-5391, 2015.

EVANDRO, S. A. **Caracterização elétrica e óptica da transições de fase em colóides e microemulsões**. Bahia, 2009. [Dissertação de Mestrado, Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco].

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Cienc. Cult.** v.55 n.3 São Paulo July/Sept, 2003.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 306–313, 2012.

FASOLIN, L.H., SANTANA, R.C., CUNHA, R.L. Microemulsions and liquid crystalline formulated with triacylglycerols: Effect of ethanol and oil unsaturation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.415 , p. 31– 40, 2012

FERREIRA, J. P. et al An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of colloid and interface Science**, 2015.

FERREIRA, A. M., et al. The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46(3), p. 745-53, 2012.

FERREIRA, A. M., et al. The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46(3), p. 745-53, 2012.

FREDRICK, E.; WALSTRA, P.; DEWETTINCK, K., Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 153, p. 30–42, 2010.

FORMARIZ, T. P., et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 03, 2005.

FORMARIZ, T. P., et al. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and surfaces Biointerfaces**, v. 60, p. 28 -35, 2007.

FOX, C. **Rationale for the selection of emulsifying agentes**. *Cosmetics & Toiletries*, v. 101, n. 11, p. 25-44, 1986.

GLASSE, B. Turbidimetry for the Stability Evaluation of Emulsions Used in Machining Industry. **The Canadian Journal Of Chemical Engineering**. v. 92, 2014.

GARTI, N. et al. Improved Oil Solubilization in Oil/Water Food Grade Microemulsions in the Presence of Polyols and Ethanol. **Journal. Agric. Food Chem** vol. 49, p. 2552-2562. 2001.

GARTI, N., et al. A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. **Colloids and Surfaces A Phys. and Eng. Aspects**, n. 170, p. 1-18, 2000.

GEÖCZE K. C., et al. Essential oils from pequi fruits from the Brazilian Cerrado ecosystem.

**Food Research International**, n. 54, p. 1–8, 2013.

GRAGNANI, A., et al. Gene expression profile of cytokines and receptors of inflammation from cultured keratinocytes of burned patients. **Burns**, v. 40, p. 947 – 956, 2014.

GREGORIS, E. et al. Antioxidant properties of Brazilian Teopical Fruits by Correlation between Diferent **Assays. Biomed Research International**, 2013.

GRELLNER, W.; GEORG, T.; WILSKA, J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in human skin wounds. **Forensic Science International**, v. 113, p. 251–264, 2000.

GRAMPUROHIT, N.; RAVIKUMAR, P.; MALLYA, R. Microemulsions For Topical Use A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v.45, n.1, p.100-107, 2011.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-activity Agents by “HLB”. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**. v,1, p.311-326, 1949.

GHOSH, S. V. et al. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 152– 157, 2013.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

HAYES, D. G., et al. Effect of Protein Incorporation on the Nanostructure of the Bicontinuous Microemulsion Phase of Winsor-III Systems: A Small-Angle Neutron Scattering Study. **Langmuir** v. 31, p. 1901-1910, 2015.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 88(2), p. 53-58, 2007.

HERCEGOVÁ, A. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of chromatography A**. v. 1153 p. 54 -73, 2007.

HOLMBERG, K. et al. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, 2002. **John Wiley & Sons**, Ltd. p 0-471.

JUNIOR, B. H. M., HARIDASAN, M. Comparação da vegetação arbórea e características edáficas de um cerrado e um cerrado sensu stricto em áreas adjacentes sobre solo distrófico no leste de Mato Grosso, Brasil. **Acta bot. bras.** n.19, v. 4, p. 913-926, 2005.

KADOSHIMA-YAMAOKA, K., et al. ASB16165, a phosphodiesterase 7A inhibitor, reduces cutaneous TNF- $\alpha$  level and ameliorates skin edema in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation model in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 613, p. 163–166, 2009.

KIM, Y. et al. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation

through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. **Immunology Letters**, v. 149, p. 110–118, 2013.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, n. 123 p. 369–385, 2006.

KOGAN, A. N., et al. Formation and characterization of ordered bicontinuous microemulsions. **J. Phys Chem. B**, n.113, p.10669-10678, 2009.

KUMAR, V., et al. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 8th Edition**. Philadelphia, Pa: Elsevier Inc, 2010.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, n.1, p.89-121, 2000.

LEE, C.; HWANG, S. T. Pathophysiology of chemokines and chemokine receptors in dermatological science: A focus on psoriasis and cutaneous T-cell lymphoma. **Dermatologica Sinica**, v. 30, p. 128-135, 2012.

LI, G. et al. In vitro and in vivo evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. **International Journal of Pharmaceutics**, v.425, n.1-2, p. 53-61, 2012.

LYONS, J. J., et al. Atopic Dermatitis in Children: Clinical Features, Pathophysiology, and Treatment. **Immunol Allergy Clin N Am**, v. 35, p. 161–183, 2015.

LOPES, L. B. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. **Pharmaceutics**, v. 6, p. 52-77, 2014.

MA, Q.; ZHONG, Q., Incorporation of soybean oil improves the dilutability of essential oil microemulsions. **Food Research International**, n. 71, p. 118–125, 2015.

MA, Y., et al. Anti-Inflammatory Effects of 4-Methylcyclopentadecanone on Edema Models in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14(12), p. 23980-23992, 2013.

McCLEMENTS, J. D. Nanoemulsions *versus* microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, n. 8 p. 1719-1729, 2012.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil, 3a edição. **Imprensa Universitária**, Fortaleza, Brazil, p. 39, 2007.

MARQUES, M. C. S., et al. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* and *Fusarium oxysporum*. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 9 p. 440–1449, 2007.

MAHAN L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11 ed. São Paulo: Roca, 2005.

METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Anal. Chem.** n.38, p. 514-517, 1966.

- MENEGUZZO, D.T. **Fototerapia com laser em baixa intensidade em processo inflamatório agudo induzido por carragenina em pata de camundongos – estudos de dosimetria**, 2010. [Tese Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo, São Paulo-SP].
- MEZNI, F., et al. Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of Pistacia lentiscus L. fruit oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, n. 6, v. 39, p. 5266-5271, 2012.
- MCDANIEL, J.C., et al. Omega-3 fatty acids effect on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.16, p. 337–345, 2008.
- MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A.; FATEMEH, L. Preparation and Evaluation of Tretinoin Microemulsion Based on Pseudo-Ternary Phase Diagram. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.2, p. 141-147, 2012.
- MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões o/a com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. [Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto].
- MOURI A. et al. Phase behavior of reverse microemulsions based on PeceolR. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 416, p. 139-146, 2014.
- MOTA, A. A. R., et al. Structural Organization and Supramolecular Interactions of the Task-Specific Ionic Liquid 1-Methyl-3-carboxymethylimidazolium Chloride: Solid, Solution, and Gas Phase Structures. **J. Phys. Chem. C**, n. 118, p. 17878-17889, 2014.
- MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.** vol. 24, págs.105-123, 2002.
- MUZAFFAR, F; SINGH, U. K.; CHAUHAN. Reviw on microemulsion as futursitic drug delivery. **Internacional Journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences**. v. 5 n. 3, 2013.
- NARDI, A. B., et al. Secondary cicatrization in dermoepidermal wounds treated with essential fatty acids, vitamins A and E, soy lecithin and polynylpyrrolidone-iodine in dogs. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, p. 1-16, 2004.
- NASSU, R. T.; GONCALVES, L. A. G. Determination of melting point of vegetable oils and fats by differential scanning calorimetry (DSC) technique. **Grasas y Aceites**, n.50, p.16-22, 1999.
- NAOUI, W., et al., Microemulsion microstructure influences the skin delivery of na hydrophilic drug. **Pharm. Res.** n. 28, p.1683-1695, 2011.
- NETO, G. G., MORAIS R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta bot. bras.** n. 17, v. 4, p. 561-584, 2003.

- NETO, L. N.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. n. 2, vol. 30, 2007.
- NOTMAN, R.; ANWAR, J. Breaching the skin barrier — Insights from molecular simulation of model membranes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 237-250, 2013.
- KESHARWANI, P.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N. K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. **Biomaterials**, v. 33, p. 7138-7150, 2012.
- KOGAN, A. NISSIM, G. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles **Advances in Colloid and Interface Science**. p. 123–126, 2006.
- NICOLAOU, A. Eicosanoids in skin inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 88, p. 131–138, 2013.
- OLIVEIRA A. G., et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim Nova**, n. 27, p. 131-138, 2004.
- OLIVEIRA, M. L. M., et al. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. Seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 129, p. 214–219, 2010.
- OLIVEIRA, W. L. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do pequi /Washington Luis de Oliveira e Aldicir Scariot, Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2010.
- OKUR, N.U. et al. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 416, p. 136– 144, 2011.
- ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 237, p. 241–249, 2002.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.
- PATHAN, I.B., SETTY, C.M.. Enhancement of transdermal delivery of tamoxifen citrate using nanoemulsion vehicle. **Int. J. Pharm. Tech. Res.**, v.3, p.287–297, 2011.
- PACHARYA, D. P.; PATRICK G.; HARTLEY. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 17 p. 274–280, 2012.
- PASSOS, X. S., et al. Atividade Antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 35, p. 623–627, 2003.
- PAULA-JUNIOR, W., et al. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.625-630, 2006.

PARVEEN, R.; AKHTAR, N.; MAHMOOD, T. **Topical microemulsion containing Punica granatum extract: its control over skin erythema and melanin in healthy Asian subjects.** *Postep Derm Alergol*, v. 31, p. 351–355, 2014.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.120, p.1-3, 2007.

PEREIRA, L. M., et al Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. **Cell Biochemistry and Function**, v.26, p. 197–204, 2008.

PIANOVSKI, A. R., et al. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 44, n. 2, 2008.

PINHEIRO, A. T. et al. Impact of inflammation on iron stores in involved and non-involved psoriatic skin. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, 2014.

PRISTA, L. N. et al. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**, 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, p. 179-210 e 1125-81, 1981.

PODLOGAR, F. et al. Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. **Int. J. Pharm.** v. 276, p. 115-128, 2004.

QUIRINO, G da S., et al. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum Wittm.*) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**. v.2, p.179–183, 2009.

RAJSHREE, L. S.; BHARKAD, G. P.; DEVARAJAN, P. V. Intranasal microemulsion for targeted nose to brain delivery in neucysticercosis: role of docosahexaenoic acid. **European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics**. n. 96, p 363- 379, 2015.

RAMOS, K. M. C. Variabilidade genética e uso dos frutos de pequi (*Caryocar coriaceum Wittm.*) na Região Meio-Norte do Brasil. 2010. [Dissertação Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI].

RAO, J.; McCLEMENTS, D. J. Lemon oil solubilization in mixed surfactante solutions: rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. **Food Hydrocolloids**, v. 26 p 268-276, 2012.

REGINA, M. R., et al. Óleo de pequi (*Caryocar coriaceum W*) e a potencial atividade Cardioprotetora. **Ensaio e Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, n. 4, v. 17, 2013.

RIBEIRO, A. Q., et al. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n.15, p. 65-70, 2005.

RIBEIRO, D. A, et al. Promising medicinal plants for bioprospection in cerrado área of Capada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1522–1533, 2014.



RICH, B. E.; KUPPER, T. S. Cytokines: IL-20 — a new effector in skin inflammation. **Current Biology**, v. 11, n. 13, 2001.

ROSA C.; CÂMARA S.G.; BÉRIA J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v, 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

ROSSI, C. G. F. T. et al. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 26, p. 45-66, 2007.

ROSSI, F.; VANAG, V. K.; EPSTEIN, I. R. Pentanary Cross-Diffusion in Water-in-Oil Microemulsions Loaded with Two Components of the Belousov–Zhabotinsky Reaction. **Chem. Eur. J.**, v. 17, p. 2138–2145, 2011.

SANTANA, R. C.; FASOLIN, L. H.; CUNHA, R. L., Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. **Colloids and Surfaces A: Physicochem.** n. 398, p. 54– 63, 2012.

SANTOS, O. et al. Development of Vegetable Oil Emulsions with Lamellar Liquid-Crystalline Structures. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, p. 433-438, 2011.

SAGALOWICZ, L. et al. Monoglyceride self- assembly structures as delivery vehicles. **Trends in Food Science & Technology**. v. 17, p. 204–214, 2006.

SAKAMOTO, J.H., et al. Enabling individualized therapy trough nanotechnology. **Pharmacological research**, v.62, p.57-89, 2010.

SAKAT, S. S., et al. Realease-Active Dilutions of Diclofenac Enhance Antin-inflammatory Effect of Diclofenac in Carrageenan-Induced Rat Paw Edema Model. **Inflammation**. v. 37, n. 1, 2014.

SAHLE, F.F. et al. Polyglycerol fatty acid ester surfactant–based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: Formulation, characterisation, in vitro release and penetration investigation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, n.1, p.139-50, 2012.

SARAIVA, R. S., et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agentes. **Journal of Ethnopharmacology**, n.136, p. 504–510, 2011.

SARAIVA, R. Synergistic action between *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed oil with aminoglycosides in vitro. **European journal of lipid science and technology**. v. 113 p. 967 - 972, 2011.

SARAIVA, R.A. **Efeito anti-inflamatório do óleo fixo do mesocarpo interno de *Caryocar coriaceum* Wittm. sobre o edema induzido por agentes flogísticos em modelos animais.** p. 115, 2009. [Dissertação Mestrado em Bioprospecção Molecular. Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato-CE].

SCHMIDTS, D. et al., Required HLB Determination of Some Pharmaceutical Oils in Submicron Emulsions *Journal of Dispersion Science and Technology*, n.33, p. 816–820, 2012.

SCHMIDTS, T et al. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, n 340, p. 187–192, 2009.

SMEDEN, J. V., et al. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 295–313, 2014.

SENA JR., D. M., et al. Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (*Caryocar coriaceum Wittm.*) pulp oil. **Grasas y Aceites**. n. 61, p. 191–196. 2010.

SHAH, R. et al. Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. **Journal of Physical Science**, v. n.25, p 59–75, 2014.

SHARMA, S. C., et al. Formation and characterization of microemulsions containing polymeric silicone. **Langmuir**, n. 24, p.7658-7662, 2008.

SHIL, S., et al. Indigenous knowledge of medicinal plants used by the Reang tribe of Tripura state of India. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 152, p. 135–141, 2014.

SWINGLE, K. F. Evaluation for antiinflammatory activity. (Scherrer R A & Whitehouse M W, eds.) **Antiinflammatory agents, chemistry and pharmacology**. New York: Academic Press, v. 2. p. 33-122, 1974.

SILVA CUNHA, A. et al. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 385-389, 2003.

SILVA, J. A. et al. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**. v.31, n.1, p.1-8, 2009.

SILVA, J. A., et al. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n.1, p. 1-8, 2010.

SILVA, G. B. R. F. **Desenvolvimento e análise estrutural de microemulsões lipídicas contendo a substância Antitumoral metiljasmonato. Estudos da Atividade antiproliferativa *in vitro*, liberação *in vitro* e toxicidade aguda**. São Paulo, 2010.

[Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade, Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho].

SILVA, J. A., et al. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n.1, p. 1-8, 2010.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. **Tecnologia de emulsões**. *Cosmetics & Toietries* (ed. Port.), v. 8, n. 5, p. 37-46, 1996

SILVA, G. D. et al, Análise térmica aplicada à cosmetologia, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 43, n. 3, 2007.

SOUZA, J. A. **Plantas medicinais: aspectos populares e científicos no tratamento das afecções da infância**. Campina Grande, 2007. [Trabalho Orientado Acadêmico. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba de Campina Grande].

SOUZA, C. M. P., et al. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande - Paraíba. **Revista Brasileira Plantas Medicinais** [online]. v.15, n.2, p. 188-193, 2013.

SCHWARZ, J. C. et al. Natural microemulsions: Formulation design and skin interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, p. 557–562, 2012.

SCHOMMER, N. D.; RICHARD, L. Gallo Division of Dermatology, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA **Trends in Microbiology**, December 2013, Vol. 21, n. 12.

SHI, Y.; LUO, H.Q.; LI, N.B. Determination of the critical premicelle concentration, first critical micelle concentration and second critical micelle concentration of surfactants by resonance Rayleigh scattering method without any probe. **Spectrochimica Acta Part A**, v.78, p.1403-1407, 2011.

SURENDIRAN, A., et al. Novel applications of nanotechnology in medicine. **Indian Journal of Medical Research**, v.130, n.6, p.689-701, 2009.

TANG, L. M. et al. Activation of Adenosine A2A Receptor Attenuates Inflammatory Response in a Rat Model of Small-for-Size Liver Transplantation **Transplantation Proceedings**, n. 42, p. 1915–1920, 2010.

TEITELBAUM, J E.; WALKER, W. A. Review: The role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.12, p.21-32, 2001.

TENJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.16, n.5, p.461-521. 1999.

TSAI, Y., et al. In vitro permeation and in vivo whitening effect of topical hesperetin microemulsion delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p.257–262, 2010.

VAUTHIER, C.; COUVREUR, P. Nanomedicines: A new approach for the treatment of serious diseases. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.3, p.223-234, 2007.

XAVIER JÚNIOR, F. H. et al. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. **Drud Delivery Science and Technology** v.22, n.4, p.273-373, 2012.

XAVIER W. K. S. Topical anti-inflammatory action of *Caryocar villosum* oil (Aubl) Pers. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. n. 01 v. 03, p. 62-67, 2011.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.M. Carrageenin-induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544–547, 1962.

YOSHIZUMI, M.; et al. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. **Cell Biology International**, v. 32, p. 1405-1411, 2008.

YOUUDIM, A. K.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A Essential fatty acids the brain: possible health implications. **Int. J. Dev. Neurosci.**, Oxford, v.18, p.383-399, 2000.

ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 90–99, 2014.

ZHANG, J.; HAN, B. Supercritical CO<sub>2</sub>-continuous microemulsions and co<sub>2</sub>-expanded reverse microemulsions. **Journal of Supercritical Fluids**, v.47, p.531-36, 2009.

ZHANG, J., MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.421, p. 34– 44, 2011.


ZHANG, W. et al. Nanostructured lipid carriers constituted from high-density lipoprotein components for delivery of a lipophilic cardiovascular drug. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 391, p. 313–321, 2010.

ZHENG, H. M. et al. Preparation Methods for Monodispersed Garlic Oil Microspheres in Water Using the Microemulsion Technique and Their Potential as Antimicrobials. **J Food Sci**. n. 78 v. 8, p. 1750-3841, 2013


ZHENG, M. et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Study on the microstructure and rheological property of fish oil lyotropic liquid crystal. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, n. 385 p. 47– 54, 2011.

## ANEXOS


## ANEXO A



Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento  
**CESED**



**CEUA**



*FACIS*  
**FCM**

**CENTRO DE ENSINO SUPERIOR E DESENVOLVIMENTO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE CAMPINA GRANDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/CESED**


**PARECER**

**CEUA: n °11**  
**NÚMERO DO PROJETO: 0039/18122013**  
**CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012**  
**APROVADO EM: 18.12.2013**

1. **Pesquisador Responsável:**  
Karina Lidianne Alcântara Saraiva
  
- Título do Projeto:**  
Óleos Vegetais da Flora Brasileira Aplicados a Nanomedicina
  
3. **Objetivo:**  
Desenvolver microemulsões de óleos vegetais como novos medicamentos fitoterápicos.
  
4. **Considerações:**  

O projeto apresentado esta bem discriminado e coerente com as normas de utilização de animais. Cumprindo os requisitos da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. O protocolo de pesquisa está devidamente preenchido, com todos os itens solicitados entregue a CEUA/CESED, porém o colegiado sugere que seja feito um grupo controle com animais que recebessem apenas a medicação estudada.
  
5. **Parecer Final:**  

**APROVADO**



**Tharcia Kiara Beserra de Oliveira**  
Coordenadora do CEUA/CESED