



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

DANIELLE MENDES DINIZ

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE MICROEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE
PEQUI (*Caryocar coriaceum* W.)**

**CAMPINA GRANDE – PB
2015
DANIELLE MENDES DINIZ**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE MICROEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE
PEQUI (*Caryocar coriaceum* W.)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Karina Lidianne Alcântara Saraiva

CAMPINA GRANDE – PB

2015

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.

D585a Diniz, Danielle Mendes.

Atividade anti-inflamatória de microemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* W.) [manuscrito] / Danielle Mendes Diniz. - 2015.

37 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia".

"Co-Orientação: Profa. Dra. Karina Lidiane Alcântara Saraiva, Departamento de Biologia".

1. Óleo de pequi. 2. Atividade anti-inflamatória. 3. Microemulsão. 4. Ácidos graxos. I. Título.

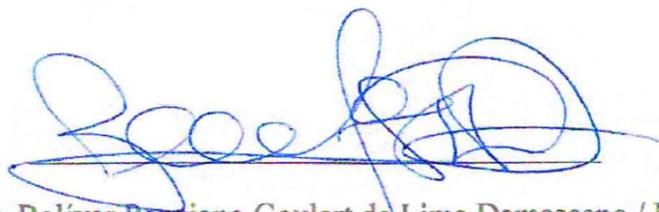
21. ed. CDD 615.32

DANIELLE MENDES DINIZ

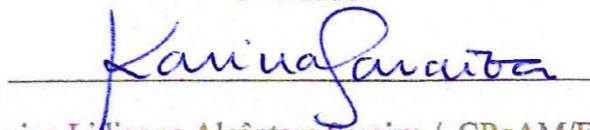
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE MICROEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar coriaceum* W.)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 15/09/2015.



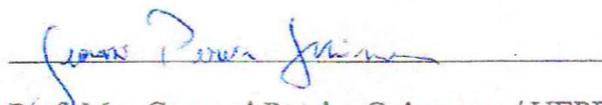
Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno / UEPB
Orientador



Profª Dra Karina Lidiane Alcântara Saraiva / CPqAM/FIOCRUZ-PE
Coorientadora



Profª Dra Karla Patrícia de Oliveira Luna / UEPB
Examinadora



Prof. Me. Geovani Pereira Guimaraes / UEPB
Examinador

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE MICROEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar coriaceum* W.)

DINIZ, Danielle Mendes

RESUMO

O pequi (*Caryocar coriaceum* W.) é uma planta nativa do Cerrado brasileiro, que apresenta propriedades biológicas consideráveis. O óleo extraído desta planta contém níveis elevados de ácidos graxos insaturados com comprovada atividade anti-inflamatória e antioxidante. Inserir óleos fixos em sistemas nanocarreadores pode, além de melhorar as suas propriedades físico-químicas, aumentar a penetração cutânea para ação local devido aos tensoativos presentes em tais formulações. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma microemulsão para administração tópica local, através da elaboração de um diagrama de fases pseudoternário (DFPT), e aplicá-la em modelo inflamatório. O DFPT foi produzido utilizando os tensoativos Kollyphor EL[®] e Brij 52[®] (88,5% e 11,5%, respectivamente), o óleo de polpa de pequi e a fase aquosa (água e propilenoglicol, 1:3). As propriedades físico-químicas, pH e condutividade foram analisadas e a atividade *in vivo* foi verificada por meio do teste do edema da pata induzido por carragenina, seguido da avaliação histológica. O sistema composto por 47,6% de tensoativos, 5,3% de óleo de pequi e 47,1% de fase aquosa apresentou aspecto homogêneo e transparente, sem separação de fases ou precipitação, com uma cor amarelada típica do óleo de pequi. O valor de pH obtido indicou um sistema adequado para aplicação tópica. O estudo biológico revelou aumento da atividade do óleo de pequi quando incorporado na microemulsão e estes resultados corroboraram com a análise histológica realizada. Este nanosistema apresenta-se, portanto, como um promissor carreador para melhorar a atividade anti-inflamatória tópica do óleo vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: Óleo de pequi, ácidos graxos, microemulsão, atividade anti-inflamatória.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido por abrigar uma das maiores biodiversidades do mundo possuindo mais de 56.000 espécies de plantas, cerca de 20% do número total de espécies distribuídas em vários biomas (GIULIETTI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2014). Um desses biomas é o Cerrado, que ocorre em 15 estados e no Distrito Federal, ocupando uma área de aproximadamente dois milhões de km² (JUNIOR e HARIDASAN, 2005). Este valioso bioma também apresenta uma das mais ricas floras do país com cerca de 35% de plantas endêmicas que são utilizadas para diversos propósitos pela comunidade local (MENDONÇA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2014). Dentre estas plantas, pode-se destacar o pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm), espécie amplamente distribuída no Nordeste brasileiro e predominante de áreas de cerrado e cerradão da Chapada do Araripe (COSTA et al., 2004).

O fruto do pequi tem grande valor econômico, sendo fonte de alimentação e renda para as comunidades locais. A polpa e a amêndoa (porções oleaginosas comestíveis do fruto) apresentam sabor e odor característicos e são fonte de lipídios e vitaminas antioxidantes (A e E), sendo bastante aproveitadas como alimento e na preparação de molhos e temperos (BRAGA, 1960; FIGUEIREDO et al., 1989; SILVA & MEDEIROS-FILHO, 2006; SARAIVA, 2009).

Além do consumo do fruto, a venda do óleo do pequi assegura uma renda extra para as famílias, especialmente fora do período de produção do fruto (OLIVEIRA et al., 2009). A extração do óleo é resultante do cozimento do fruto em caldeirões rudimentares que utilizam estacas de madeira como fonte de combustão (CAVALCANTI et al., 2015). Este óleo é largamente utilizado tanto na culinária quanto na medicina popular, para o tratamento de enfermidades como gripes, bronquites e infecções bronco-pulmonares e também para o tratamento de feridas e lesões gástricas, ações atribuídas as suas propriedades anti-inflamatórias (BRAGA, 1960; AGRA et al., 2007). De fato, ensaios pré-clínicos do óleo fixo de *C. coriaceum* realizados por Saraiva et al. (2011) apontaram atividade gastroprotetora em roedores, com significativa redução de úlceras induzidas por etanol e aspirina (PENHA, 2007; QUIRINO, 2009). Batista e colaboradores (2010) analisaram a atividade cicatrizante do óleo bruto de pequi em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos, concluindo que o óleo da polpa do fruto do *C. coriaceum* W. apresentou influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas

experimentais em ratos, com reação inflamatória menos intensa e fechamento mais rápido das feridas em relação ao grupo controle.

Fitoterápicos e, em geral, outros produtos farmacêuticos de uso tópico, encontram no estrato córneo (EC) da pele uma barreira, que atua como fator limitante na penetração e ação dos mesmos. Sistemas nanocarreadores, tais como microemulsões, sistemas lamelares e cristais líquidos, em razão de seu conteúdo elevado de tensoativos, têm potencial para interagir com o EC, desestruturando de forma reversível a bicamada lipídica, aumentando a permeabilidade cutânea e a penetração de substâncias, que normalmente não passariam através desta (BOLZINGER et al., 2008).

Observando-se a importância de estudos envolvendo fitoterápicos, a relevância do desenvolvimento de novas tecnologias e a ampla utilização do óleo de pequi na medicina popular, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema nanocarreador para uso tópico, capaz de melhorar a permeação do óleo de *Caryocar coriaceum* Wittm e otimizar a ação anti-inflamatória local.

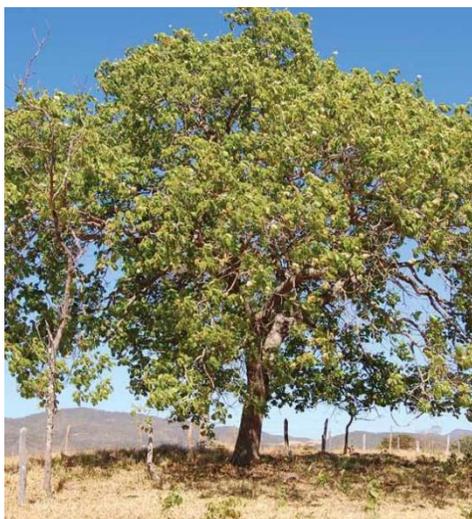
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleo de Pequi (*Caryocar coriaceum* W.)

O gênero *Caryocar* compreende 16 espécies e pertence à família Caryocaraceae, com ocorrência na América Central e América do Sul (MATOS, 2007; OLIVEIRA et al., 2010). No Brasil ocorre em quase todos os agroecossistemas e tem seus frutos muito apreciados e utilizados na culinária da região Centro-Oeste, Norte e parte do Nordeste (BATISTA et al., 2010). Encontrada na região Nordeste do Brasil, a espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. é arbórea (Figura 1a) e se distribui predominantemente na área do bioma cerrado, especialmente na região de cerrado e cerradão da Chapada do Araripe (COSTA et al., 2004; SOUZA-JUNIOR, 2012). 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 (BRAGA, 1960; MIRANDA, 1986; RAMOS, 2010).

Figura 1 - (a) Pequizeiro (*Caryocar coriaceum* W.) e (b) Fruto do pequizeiro em corte transversal.

(a)



(b)



Fonte: Oliveira (2010).

O fruto do pequi (Figura 1b) é uma drupa de forma depresso-globosa, com epicarpo coriáceo, carnoso e de coloração verde-clara a levemente amarelada quando maduro,

apresentando endocarpo (semente) espinhoso, o que é uma característica do gênero (FERREIRA et al., 1988). Ramos e Souza (2011) analisaram as características químico-nutricionais de seis populações de *Caryocar coriaceum* de ocorrência natural da região Meio-Norte do Nordeste do Brasil e em média a polpa das populações estudadas apresentou 3,28% de proteínas, 57,83% de carboidratos e 33,53% de lipídeos enquanto que as sementes apresentaram 25,27% de proteínas, 8,33% de carboidratos e um rico teor de lipídios (48,52%). O alto teor de lipídeos tanto na polpa quanto na amêndoa justifica a extração do óleo realizada pelas comunidades locais para diversas finalidades, que vão desde usos na culinária regional até na indústria cosmética, para a produção de sabonetes e cremes (PIANOVSKI et al., 2008). Análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa revelaram que no óleo fixo de pequi há uma predominância de ácidos graxos insaturados, dentre os quais destacamos a presença dos ácidos graxos oleico (57,15%), palmítico (35,53%), esteárico (4,0%) e linoleico (2,38%) (OLIVEIRA et al., 2010).

Ácidos graxos insaturados (AGI) 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 para o tratamento de feridas, dores reumáticas e musculares (MATOS, 2007). Um desses estudos foi desenvolvido por Oliveira et al. (2010) que avaliaram a inflamação tópica e 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 drogas 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 fruto do *Caryocar coriaceum* Wittm apresentou influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos com reação inflamatória menos intensa e fechamento mais rápido das feridas em relação ao grupo controle. 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 quando em comparação com o grupo controle.

2.2 Processo inflamatório

A inflamação é um processo fisiológico de defesa cujo objetivo é eliminar a causa de uma lesão celular e as consequências de tal lesão (KUMAR et al., 2010). Caracterizado por dor, aumento da temperatura local, inchaço ou eritema e vermelhidão, o processo inflamatório visa a 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 os quais possuem a capacidade de estimular a proliferação celular e angiogênese local (NARDI et al., 2004).

De fato, os ácidos graxos desempenham um papel importante nas respostas imunes e inflamatórias (CABRAL, 2005). Estes metabólitos interferem em diversas etapas do processo inflamatório, tais como contração vascular, quimiotaxia, adesão, extravasamento de leucócitos, ativação e morte celular. A maioria desses eventos ocorre via derivados do ácido araquidônico como as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005). Essas atividades têm sido investigadas desde o início da década de 1970 (HATANAKA e CURI, 2007). Cardoso et al. (2004) observaram que a administração tópica dos ácidos graxos essenciais linolênico (n-3) e linoleico (n-6) e do ácido graxo não essencial oleico (n-9) modulam o fechamento de feridas induzidas cirurgicamente. Estudos posteriores mostraram que os ácidos graxos n-3 e n-6 podem aumentar a produção de citocinas no local da ferida estimulando o processo de reparo da mesma (McDANIEL et al., 2008; PEREIRA et al., 2008; FERREIRA et al. 2012).

Ácidos graxos insaturados podem ser encontrados em abundância em óleos fixos vegetais. Diversos óleos provenientes de plantas são extensivamente utilizados na medicina popular como agentes anti-inflamatórios tópicos. A elucidação e comprovação da atividade desses lipídios bioativos são necessárias e possíveis graças a diferentes técnicas de avaliação atualmente

disponíveis, dentre as quais podemos citar estudos *in vivo* como o teste de edema de pata em camundongos induzido por carragenina (SARAIVA, 2009; FERREIRA et al., 2012).

A indução de inflamação por substâncias denominadas agentes flogísticos ou irritantes em modelos animais é amplamente utilizada na pesquisa pré-clínica. Agentes flogísticos como a carragenina ativam quimicamente um processo inflamatório (SARAIVA, 2009). A carragenina, um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas da ordem Gigartinales, é amplamente utilizada para a indução da resposta inflamatória aguda em modelo experimental animal (DI ROSA, 1972; MA et al., 2013).

O desenvolvimento do edema de pata induzido pela carragenina ocorre em duas fases. Na fase inicial (0-1 h) há liberação de serotonina, histamina, bradiquinina e substância P. Já na segunda fase (após 1h) há principalmente invasão de neutrófilos no local da inflamação e a produção de grandes quantidades de mediadores pro-inflamatórios tais como PGE2 e várias citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α (MA et al., 2013). A utilização da carragenina com um irritante para induzir o edema de pata em rato foi introduzido por Winter et al., (1962) e tornou-se um dos métodos mais populares para testes de drogas e avaliação de novas terapias anti-inflamatórias (MENEGUZZO, 2010).

2.3 Microemulsão e a permeação através da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa uma importante via de direto acesso para a administração de produtos farmacêuticos, especialmente quando existem diversos processos fisiopatológicos na pele que podem ser potencialmente beneficiados pela entrega local de drogas (RUSSELL-JONES e HIMES, 2011). Este importante órgão é a primeira barreira entre o corpo e o meio ambiente e pode ser anatomicamente dividido em: epiderme, derme e estrato córneo (ZHAI e ZHAI, 2014). Esta última camada, o estrato córneo, é a mais externa da pele e representa a principal barreira limitante para a taxa de entrega percutânea (HATHOUT et al., 2010).

Fisiologicamente o estrato córneo, com cerca de 5-8 μ m de espessura, consiste em 10-15 camadas de corneócitos mortos, que são ricos em queratina e embebidos em múltiplas camadas bilipídicas compostas principalmente de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres (CEVC, 2004; HATHOUT et al., 2010). A propriedade de barreira faz com que a camada córnea restrinja

o transporte de agentes terapêuticos para o corpo. Para ultrapassar as baixas taxas de absorção e alcançar níveis terapêuticos mais elevados, a tecnologia farmacêutica vem buscando utilizar potenciadores de penetração que interajam com os componentes do estrato córneo, modificando-o de forma reversível (ANIGBOGU, WILLIAMS e BARRY, 1995; WILLIAMS e BARRY, 2012; ZHAI e ZHAI, 2014). Neste sentido, a microemulsão apresenta-se como um promissor sistema tópico para entrega local de substâncias ativas sendo comumente composto por fase aquosa, tensoativo, co-tensoativo e fase oleosa (SHEN et al., 2014). Estes componentes podem funcionar como potenciadores de penetração, o que reduz a barreira difusional do estrato córneo e aumenta a taxa de permeação através da pele (WANG et al., 2015).

As microemulsões podem ser definidas como um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água (Aboofazeli et al., 1993; Constantinides et al., 1995; Ho et al., 1996; Damasceno et al., 2011). Estruturalmente, o sistema pode ser óleo-em-água (O/A), água-em-óleo (A/O) e bicontínuo. Na microemulsão A/O, as gotículas de água estão dispersas na fase contínua oleosa, enquanto que em O/A microemulsões são gotículas de óleo que estão dispersas na fase contínua aquosa (AZEEM et al., 2009). Já a microemulsão bicontinua possui como fase contínua as duas fases, oleosa e aquosa, que se encontram em redes dinâmicas separadas por monocamadas de tensoativos semiflexíveis (SHARMA et al., 2008). Em todos os casos, com as proporções adequadas, obtém-se um sistema de formação espontânea, coloidal, termodinamicamente estável e isotrópico (ZHAI e ZHAI, 2014).

Algumas hipóteses são levantadas para explicar o porquê das microemulsões serem altamente indicadas para a entrega transdérmica (BAROLI et al., 2000). Geralmente, além dos componentes do sistema ajudarem na permeação via desestruturação reversível do estrato córneo da pele, observa-se que a alta capacidade de solubilização desse sistema permite que considerável quantidade de droga seja incorporada e, também, o tamanho de gotícula confere uma melhor aderência a membranas e permite um transporte mais controlado de moléculas (AZEEM et al., 2009). Além disso, comparando com outras formulações tópicas, a microemulsão apresenta a vantagem de apresentar preparo mais fácil e estabilidade termodinâmica (LOPES, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

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

3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar os componentes adequados para compor o sistema microemulsionado;
- Desenvolver um diagrama de fases pseudoternário para obtenção de um sistema microemulsionado do tipo óleo/água (O/A);
- Selecionar o ponto de ME;
- Caracterizar a microemulsão quanto aos aspectos físico-químicos (condutividade e pH);
- Realizar ensaios de estabilidade física do sistema por testes de estresse térmico e ciclo gelo-degelo.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória em modelo animal através do teste de edema de pata induzido por carragenina.
- Realizar a análise histológica da região edematosa.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do Óleo de Pequi

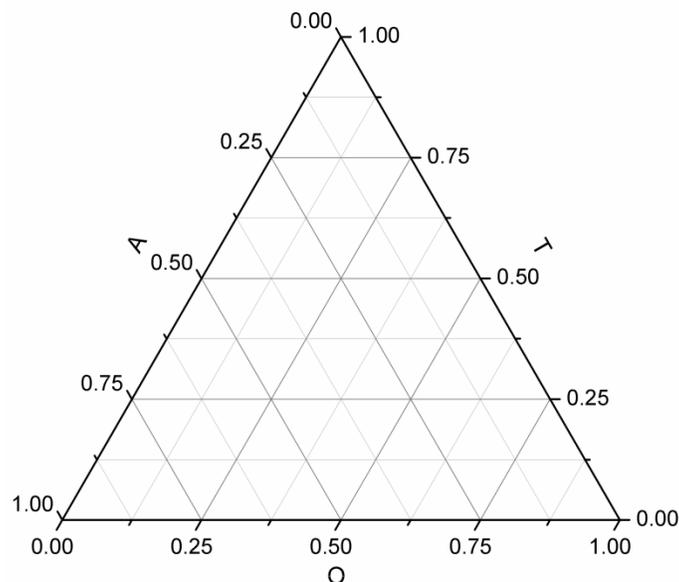
A coleta do pequi foi realizada no mês de janeiro de 2013, na Chapada do Apodi-CE, nas áreas produtoras do município do Crato-CE. A planta foi devidamente identificada e teve exsicata registrada no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (n. 90473). O óleo de pequi foi extraído da maneira tradicionalmente empregada pelos trabalhadores rurais locais seguindo-se a metodologia descrita por Mezni et al. (2012). Para tanto, após a colheita os frutos foram selecionados e higienizados e a polpa foi removida manualmente e macerada com pedra moinho.

A pasta obtida foi devidamente homogeneizada e incubada a 4 °C por 12 horas. Após este período, água gelada foi adicionada e o sobrenadante da mistura foi removido e aquecido até fervura. Posteriormente, com ajuda de um tecido a fase líquida foi separada da fase pastosa e aquecida até evaporação da água. Finalmente, o óleo resultante do processo foi filtrado e armazenado para subsequente utilização.

4.2 Construção do Diagrama de Fases Pseudoternário (DFPT) e seleção da formulação

Para obtenção do DFPT, os tensoativos Kolliphor EL[®] (88,5%) e Brij 52[®] (11,5%) foram misturados com proporções do óleo fixo de pequi variando de 1:9 a 9:1 (mistura de tensoativos : óleo fixo de pequi) e essas misturas foram posteriormente tituladas com a fase aquosa composta por propilenoglicol e água (3:1). Durante a titulação, a mistura foi homogeneizada em agitador magnético por três minutos e as mudanças no aspecto visual foram observadas contra um fundo preto. Os resultados obtidos foram classificados como sistema transparente (ST), quando apresentaram transparência, emulsão líquida opaca (ELO), emulsão leitosa líquida (ELL) e separação de fases (SF), registrados e plotadas, com o auxílio do software Origin Pro[®] 8.0, em um triângulo equilátero, onde cada ponto correspondeu às proporções definidas dos componentes da mistura (Figura 2) (LAWRENCE e RESS, 2000).

Figura 2 - Representação gráfica do triângulo equilátero de um diagrama de fases onde cada lado constitui um dos componentes da mistura. Sendo, T: mistura de tensoativos, O: fase oleosa, A: fase aquosa



Fonte: Gimarães (2013).

A partir da construção do DFPT foi escolhida a região que melhor representa a proporção das substâncias que constituíram o sistema microemulsionado.

4.3 Preparo e caracterização da microemulsão

4.3.1 Preparo

A microemulsão contendo o óleo de pequi foi preparada através da simples mistura dos componentes da formulação em três ciclos de homogeneização em sonda de ultrassom modelo DES500 (Unique, Brasil) por 1 minuto, seguindo-se da retirada de excesso de bolhas de ar em banho de ultrassom modelo USC-3300 (Unique, Brasil). A formulação foi preparada 48h antes dos testes de caracterização para permitir a estabilização termodinâmica do sistema em temperatura ambiente (SILVA et al., 2009).

4.3.2 Condutividade e pH

Os valores de condutividade elétrica da formulação foram determinados diretamente em uma alíquota de 10 mL da mesma utilizando-se um condutivímetro digital (Instrutemp MCA 150, Brasil), calibrado com uma solução de calibração apresentando condutância específica de 146,9 $\mu\text{S cm}^{-1}$ à temperatura de 25 °C (DJORDJEVIC et al., 2004).

O pH da formulação, por sua vez, 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. A formulação foi diluída em água na proporção 1:10 (FERRARI, 2002; MORAIS, 2006) e as medições foram realizadas em triplicata através da introdução do eletrodo diretamente no interior das diluições.

4.3.3 Teste de estabilidade

De acordo com Bruxel et al. (2012), diversos fatores estão envolvidos no processo de instabilização de nanosistemas, dentre estes encontram-se os fatores físicos (temperatura, agitação, congelamento e descongelamento) e químicos (pH, presença de eletrólitos, peroxidação lipídica). Para avaliar a estabilidade da formulação foram realizados os testes de estresse térmico e ciclo gelo-degelo seguindo a metodologia descrita por Pianovski et al. (2008), sendo avaliados os aspectos macroscópicos, organolépticos, bem como as alterações de pH e condutividade antes e após a submissão das amostras aos testes.

No teste de estresse térmico as alíquotas de 10 mL das formulações foram submetidas a banho-maria termostatizado, no intervalo de temperatura controlada entre 40 – 80 °C, com progressão de elevação de 10 °C a cada 30 minutos. As microemulsões foram avaliadas ao término do processo por observação visual, aferição do pH, condutividade e verificação de separação de fases após retornarem à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C).

Já no teste de ciclo gelo-degelo as alíquotas da formulação foram submetidas a seis ciclos gelo-degelo. Cada ciclo consistiu de 24 horas à temperatura de $4,0 \pm 2,0$ °C em geladeira, seguido de 24 horas a $45,0 \pm 2,0$ °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.

4.4 Ensaio in vivo: Teste de edema de pata em camundongos

Os ensaios *in vivo* foram realizados na Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FACISA), mediante aprovação prévia, por escrito, da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CESED – PB, n. 01.001.2012 (Anexo A).

Camundongos adultos (40 a 50 dias de vida), do sexo masculino, pesando entre 25-35g, foram alojados em gaiolas padrão de polipropileno em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso a água e ração, sendo submetidos a jejum 12h antes de experimento. O edema foi induzido pela injeção de 50 µL de carragenina a 1% p/v em salina estéril, administrada na região subplantar da pata direita (WINTER, 1962)

Foram avaliados quatro grupos, contendo cinco animais cada: 1) carragenina 1%; 2) microemulsão (ME); 3) óleo fixo do pequi; 4) fármaco de referência (DDA - diclofenaco de dietilamônio emulgel 11,6mg/g). Trinta minutos antes da injeção de carragenina, os

camundongos receberam os tratamentos nas patas direitas. Na pata esquerda de cada camundongo foi injetada solução salina como controle negativo. Os volumes das patas direitas foram avaliados antes da aplicação da substância pró-inflamatória e de hora em hora, até 4h após a aplicação do estímulo edematogênico, utilizando paquímetro digital. Após o fim das medições os animais foram anestesiados e eutanasiados para a retirada de fragmentos da região subplantar para estudo histológico.

Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey, com nível de significância mínimo considerado de 0,05 ($p < 0,05$). Os resultados obtidos foram plotados no programa GraphPad Prism® versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4.5 Análise histológica

Fragmentos da pele foram fixados em solução de formaldeído 40 g/L em tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7.4) por 24h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescentes de etanol, tratadas com xilol e embebidas em *paraplast*. Secções de 5 μ m foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina para observação em microscópio óptico (Leica DM500) dotado de câmera digital de alta definição (Leica ICCD50 HD).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do Diagrama de Fases Pseudoternário (DFPT) e seleção da formulação

Para formulação de um sistema microemulsionado os tensoativos são avaliados quanto ao seu valor de EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo). A escala de EHL foi desenvolvida por Griffin e traduz as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de um composto anfifílico em termos de escala numérica (PRISTA, 1981; FOX, 1986; MORAIS, 2006). A proporção entre os componentes de uma microemulsão determinam o processo de emulsificação do sistema e a ação desejada dos

tensoativos pode ser prevista de acordo com os valores de EHL dos mesmos. Segundo Griffin, tensoativos com baixo EHL irão funcionar melhor para sistemas água em óleo (A/O) e os com valores intermediários são recomendados para sistemas inversos óleo em água (O/A) (PRISTA, 1981; FOX, 1986; SILVA e SOARES, 1996).

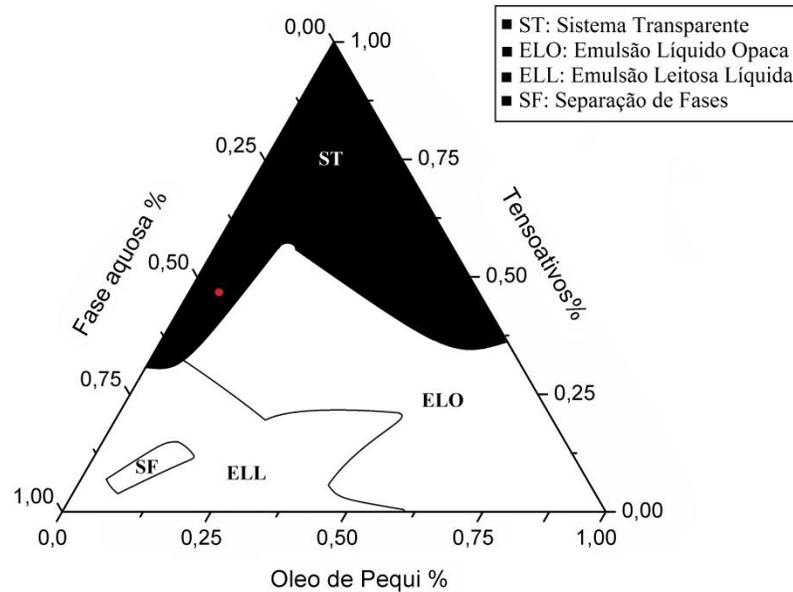
Considerando que o objetivo deste trabalho foi a formação de uma microemulsão contendo como fase oleosa o óleo de pequi, optou-se pela utilização de dois tensoativos com valores de EHL que combinados pudessem gerar valores próximos ao EHL do óleo de pequi proporcionando uma melhor estabilização da formulação, evitando assim a separação de fases. Dessa maneira aplicou-se o conceito inicial de EHL de Griffin para determinar o EHL total da mistura dos tensoativos utilizando-se a seguinte equação (1):

$$EHL_{\text{final}} = (EHL_A \times 0,01 \times A + EHL_B \times 0,01 \times B) \quad (1)$$

onde EHL_{final} é o valor de EHL resultante das misturas de tensoativos, A é a porcentagem do tensoativo hidrofílico e B a porcentagem do tensoativo lipofílico. Onde $A + B = 100$, EHL_A e EHL_B correspondem ao EHL do Kolliphor EL[®] e do Brij[®] 52 respectivamente.

Estudos preliminares pelo grupo de pesquisa revelaram que o óleo de pequi apresenta EHL entre 9-11. O Kolliphor EL[®] apresenta EHL entre 12-14 (SIGMA-ALDRICH) e o Brij[®] 52 tem EHL 5 (SIGMA-ALDRICH). Dessa maneira, através da equação 1 a proporção dos tensoativos foi determinada (88,5% de Kolliphor EL[®] e 11,5% de Brij[®] 52) e o diagrama de fases foi construído para identificação de qual proporção dos componentes formaria mais regiões de sistemas transparentes onde seria mais provável encontrar sistemas microemulsionados. O resultado obtido pode ser observado no diagrama de fases (Figura 3), no qual se observa uma vasta região de sistemas transparentes (ST) destacada em preto. Desta área foi selecionada a região com maior volume de fase aquosa que favorece a obtenção de um sistema O/A.

Figura 3 - Diagrama de Fases Pseudoternário composto por óleo de pequi, mistura dos tensoativos (Kolliphor[®] e Brij[®]) e fase aquosa (PPG e água, 3:1).



Fonte: Dados da Pesquisa

Na Figura 3 o ponto em destaque representa a composição selecionada para formação do sistema nanocarreador com 5,3% de óleo de pequi, 47,6% da mistura dos tensoativos Kolliphor e Brij (88,5% e 11,5%, respectivamente) e 47,1% de fase aquosa (PPG e água, 3:1). Este ponto foi selecionado porque apresenta alto teor de fase aquosa, sendo uma boa indicação de um sistema onde a água é a fase contínua e, portanto, a microemulsão é do tipo O/A.

5.2 Caracterização

5.2.1 Determinação do pH e condutividade

A avaliação do pH é importante para detectar a viabilidade da formulação e a estabilidade de um sistema. A formulação selecionada apresentou pH no valor de $5,25 \pm 0,015$, valor este que está dentro da faixa de tolerância biológica para produtos de aplicação tópica (TASHTOUSH, BENNAMANI e AL-TAANI, 2013; PARVEEN, AKHTAR e MAHMOOD, 2014).

A avaliação da condutividade, por sua vez, é uma técnica complementar útil para elucidar mudanças microestruturais de sistemas coloidais de formação espontânea fornecendo importantes

informações relacionadas com as transições de fase que ocorrem nas microemulsões (YAGHMUR et al., 2003; ZHANG et al., 2013). À temperatura ambiente a formulação apresentou condutividade de $15,22 \mu\text{S cm}^{-1}$. Este valor foi inferior ao esperado para sistemas O/A, porém, vale salientar que a formulação apresentou como fase aquosa uma mistura de propilenoglicol e água na proporção 3:1 e, portanto, este valor pode ser justificado pelo fato do propilenoglicol ser um composto orgânico de baixa condutividade $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ (DOW, 2013) e que está presente em maior quantidade na formulação.

5.2.2 Testes de estabilidade

Os testes de estabilidade expõem um determinado sistema em estudo a variações extremas de condições ambientais para simular possíveis alterações que este sistema possa sofrer ao longo do tempo de armazenamento. Para avaliação da estabilidade da formulação foram realizados testes de estresse térmico e ciclo gelo-degelo. Foi observado que após o teste de ciclo gelo-degelo o sistema se manteve estável e sem visíveis variações na macroestrutura, tais como alteração na transparência ou separação de fases.

No teste de estresse térmico foi realizada a medida do pH e da condutividade da amostra antes e depois do teste. Estas medidas revelam se houveram alterações de fase no sistema microemulsionado estudado. Dessa forma, antes do teste, a formulação apresentou pH de $5,25 \pm 0,015$ e condutividade de $15,22 \pm 0,03 \mu\text{S cm}^{-1}$ e após o submissão ao teste, o pH da formulação foi de $7,52 \pm 0,04$ e a condutividade de $13,80 \pm 0,025 \mu\text{S cm}^{-1}$, ambos à temperatura ambiente (25°C). Entretanto, não ocorreu alteração na transparência ou separação de fases. Considerando-se que quanto mais próximo do sistema o/a, mais condutor o sistema será enquanto que quanto mais próximo de um sistema a/o mais isolante a formulação será (NAOUI et al., 2011), pode-se implicar que essas variações de pH e condutividade podem ser explicadas pelo fato de que o estresse térmico causou alterações na microestrutura do sistema analisado.

5.3 Ensaio *in vivo*

5.3.1 Teste de edema de pata induzido por carragenina

A carragenina, um agente flogístico que ativa quimicamente o processo inflamatório, é amplamente utilizada para a indução da resposta inflamatória aguda em modelo experimental animal (SARAIVA, 2009; MA et al., 2013). Levy (1969) demonstrou que a carragenina causa edema de pata em camundongos, tornando-se um teste conveniente para verificar o potencial anti-inflamatório tópico do sistema microemulsionado contendo o óleo de pequi.

Na Tabela 1 podem ser verificados os valores, aferidos através de paquímetro digital, da espessura das patas em milímetros (mm). Essas medidas foram realizadas antes e depois da injeção de 50µL de carragenina 1% na região subplatar da pata direita dos animais. Depois do estímulo edematogênico, as espessuras foram checadas de uma em uma hora até quatro horas após indução do edema segundo a literatura utilizada como referencia (COSTA, 2003).

Tabela 1 - Medida da pata direita dos animais tratados de acordo com o tempo da administração da carragenina 1% e percentuais de inibição do edema de pata.

Tempo de aplicação da carragenina	Medida da pata dos grupos experimentais ± Desvio Padrão (mm)			
	Carragenina	ME	Óleo de pequi	DDA
Antes da aplicação	2,53±0,16	2,68±0,05	2,55±0,13	2,74±0,11
1 hora após	3,59±0,18	3,43±0,22	3,37±0,18	3,67±0,18
2 horas após	3,59 ±0,23	3,15±0,16	3,35±0,27	3,41±0,27
3 horas após	4,04±0,16	3,77±0,09	3,94±0,35	3,90±0,04
4 horas após	4,26±0,19	4,08±0,17	4,28±0,20	4,11±0,09

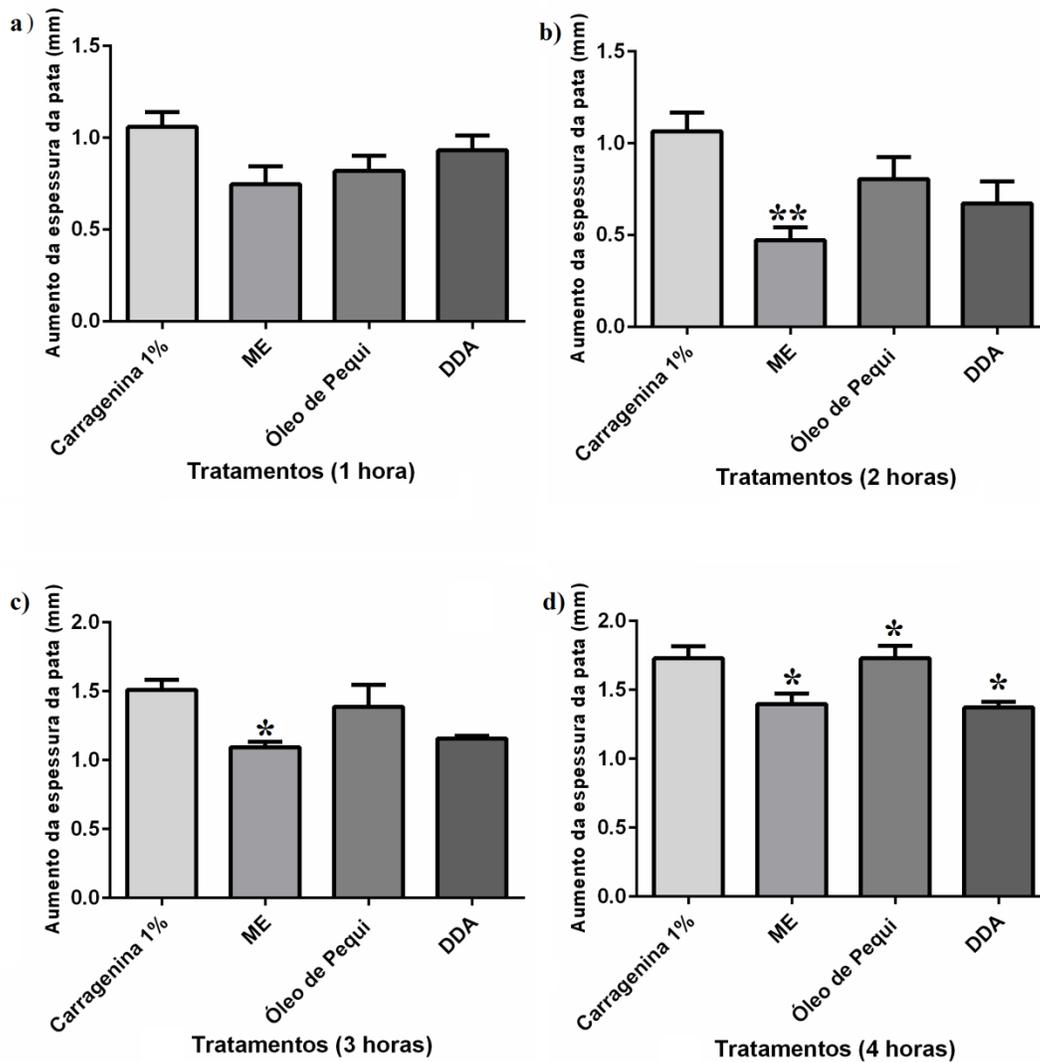
Fonte: Dados da Pesquisa

Na primeira hora transcorrente do teste foi observado que todos os grupos tratados apresentaram edema de pata causado pelo agente pro-inflamatório carragenina (Tabela 1). Na Figura 5a é possível observar a média do aumento em milímetros (mm) da espessura da pata para a primeira hora do teste, onde o grupo tratado apenas com a carragenina 1% apresentou 1,06±0,18 mm de aumento de espessura da pata. Destaca-se ainda que o grupo tratado com a microemulsão contendo o óleo de pequi apresentou um aumento da medida de pata de 0,75±0,22 mm, representando, dentre os grupos testados, o menor aumento de pata. Este resultado não foi estatisticamente significativo, porém, é indicativo de uma possível ação anti-inflamatória da formulação desde a primeira hora de contato com a pata do animal.

Na segunda hora após exposição à carragenina (Figura 5b), o grupo tratado com a ME apresentou um aumento de espessura de 0,47±0,16 mm em comparação a medida da pata antes da injeção da carragenina, o óleo de pequi puro de 0,80±0,27 mm e o DDA 0,67±0,27 mm. Embora

tenha sido observada uma redução no edema para os grupos óleo de pequi e DDA, apenas o resultado obtido para o grupo ME foi significativo. O grupo ME teve uma diminuição, em média, de cerca de 0,28 mm do edema com relação a medida da pata na primeira hora ($p < 0,01$). É importante ressaltar que o diclofenaco dietilamônio (DDA) é um anti-inflamatório não esteroidal (AINEs) que apresenta a capacidade de interagir com os fosfolípídeos da pele, contribuindo para aumentar a fluidez do mesmo no estrato córneo, fazendo com que os lipídios passem de uma forma cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada, aumentando, portanto, a permeabilidade cutânea (SILVA et al., 2009). Porém, a literatura descreve um aumento da ação anti-inflamatória para o DDA em função do tempo de contato com a pele, apresentando um aumento de cerca de 3 vezes após 10 horas de contato (KOROKOLVAS e FRANÇA, 2006). Portanto, provavelmente o tempo de contato nestas primeiras 2 horas do teste não foram suficientes para o DDA apresentar uma resposta significativa.

Figura 5 - Avaliação do efeito anti-inflamatório da formulação contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* W.) em comparação com o óleo de pequi puro e o medicamento de referência (DDA - diclofenaco de dietilamônio) 1(a), 2(b), 3(c) e 4(d) horas após indução de edema por carragenina 1%.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Legenda: Os resultados estão demonstrados como média \pm desvio padrão, (n=5), (*) - $p < 0,05$; (**) - $p < 0,01$.

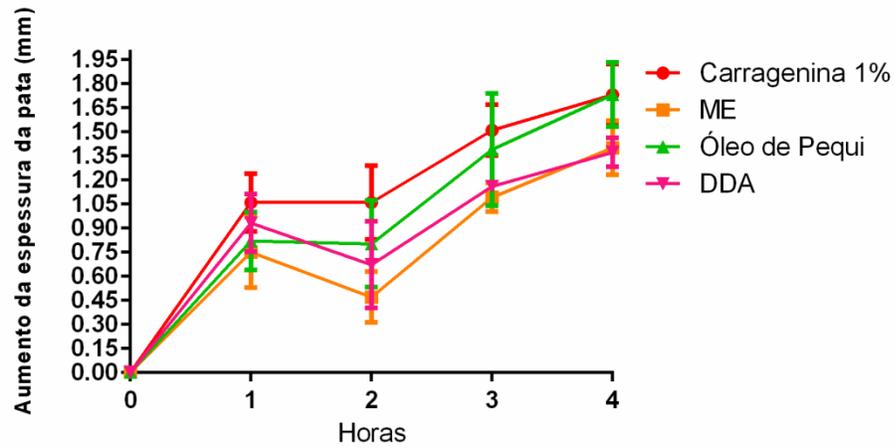
Ainda de acordo com a Figura 5, é possível perceber que a ME reduziu de forma significativa o edema na terceira hora após indução inflamatória. Essa maior atividade inibitória por parte da formulação pode ser explicada pelo fato de que a mesma constitui-se de um sistema nanocarreador, onde o óleo de pequi encontra-se dentro de nanoestruturas que devido ao seu tamanho não apenas possuem uma melhor aderência a membranas, mas também permite um transporte mais controlado de moléculas (AZEEM et al., 2009). Além disso, os tensoativos presentes na microemulsão são responsáveis por facilitar a difusão do sistema na pele através da desestruturação das estruturas lipídicas do estrato córneo permitindo uma melhor penetração e ação da formulação (Kreilgaard, 2002).

Apenas na quarta hora transcorrente do teste foi possível verificar uma redução de edema significativa na pata dos animais tratados com DDA (Figura 5d). A ação do diclofenaco de dietilamônio apenas na quarta hora do teste sugere que este fármaco teve sua ação retardada nas condições testadas. Neste sentido, este fármaco pode ter apresentado ação apenas após na segunda fase da inflamação causada pela carragenina, já que atua na inibição da enzima COX, reduzindo a síntese das PG e diminuindo a intensidade do processo inflamatório (MA et al., 2013; MURI, SPOSITO e METSAVAHT, 2009). Já os resultados encontrados para o óleo de pequi contrariaram resultados anteriores registrados na literatura. Saraiva (2009), por exemplo, demonstrou que o óleo fixo de pequi reduziu significativamente o percentual de edema da orelha de camundongos Swiss após 1 hora de exposição aos agentes flogísticos: óleo de croton, ácido araquidônico, capsaicina e fenol. Já Oliveira et al. (2010) demonstraram que o óleo de pequi 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.

Na Figura 6 os dados obtidos foram agrupados em função do tempo decorrido do teste. É possível observar que durante todo o teste a formulação desenvolvida neste trabalho contendo 5,3% de óleo de pequi, 47,6% da mistura dos tensoativos Kolliphor e Brij (88,5% e 11,5%, respectivamente) e 47,1% de fase aquosa (PPG e água, 3:1) foi responsável pelos menores aumentos da espessura da pata dos animais implicando em maiores taxas de inibição do edema de pata induzido por carragenina (Figura 5 e 6). Esse resultado demonstra que a formulação proposta reproduz as características encontradas em literatura que sugerem que os componentes de um sistema microemulsionado não apenas ajudam na permeação via desestruturação reversível do estrato córneo da pele como também possuem uma alta capacidade de solubilização do ativo, permitindo que suficiente quantidade de óleo seja incorporada (AZEEM et al., 2009).

Nas condições testadas o grupo tratado com o óleo de pequi puro, apesar de ter demonstrado suave diminuição da espessura da pata nas 3 primeiras horas, não foi capaz de reduzir de forma estatisticamente significativa o edema causado pela carragenina (Figura 6).

Figura 6 - Avaliação do efeito anti-inflamatório da microemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* W.) em comparação com o óleo de pequi puro e o medicamento de referência (diclofenaco de dietilamônio) em função do tempo decorrido após indução de edema por carragenina 1%.

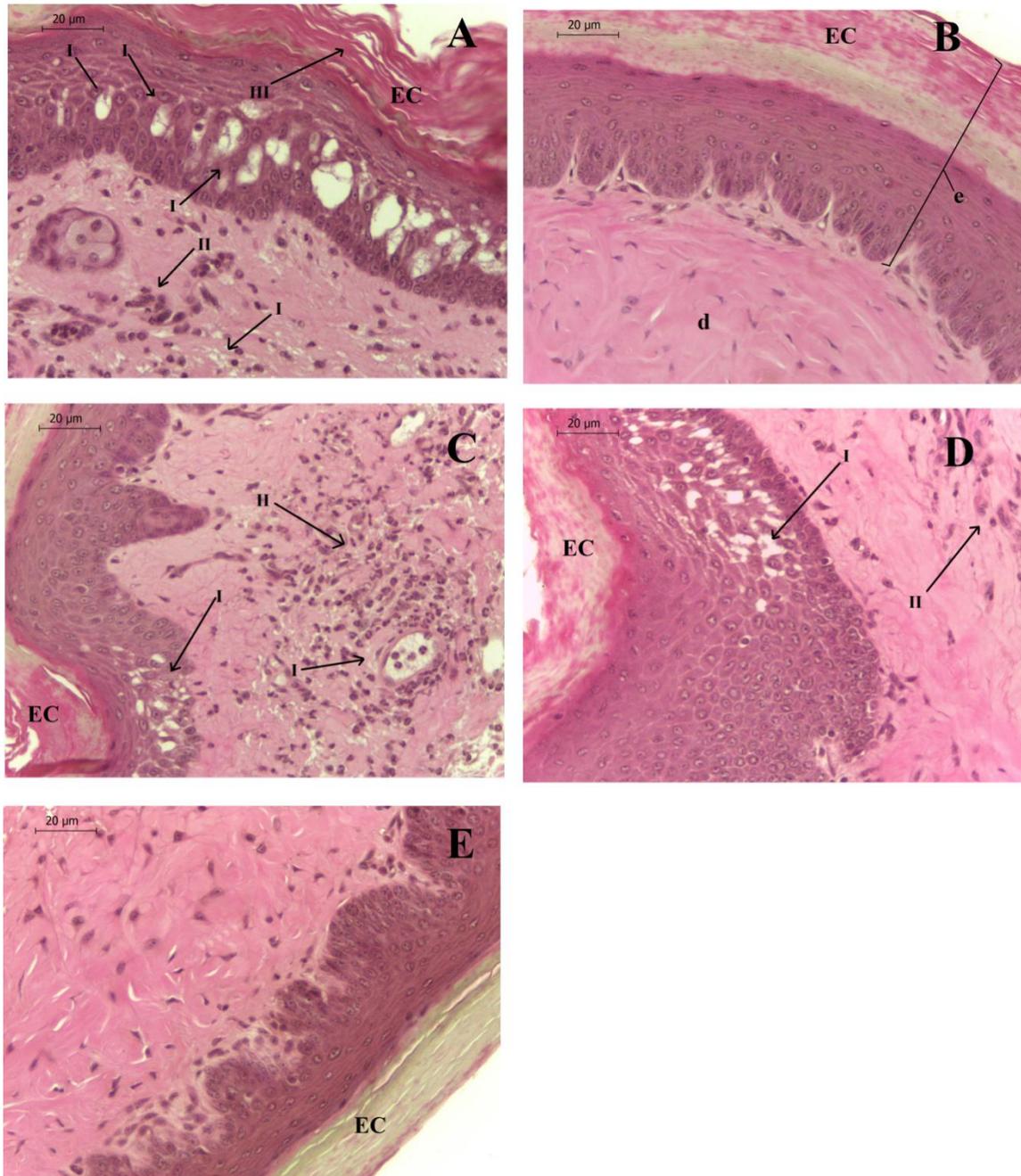


Fonte: Dados da Pesquisa.

5.3.2 Análise histológica

Para complementação da avaliação da atividade anti-inflamatória do sistema microemulsionado contendo óleo de pequi, cortes histológicos foram feitos a partir de secções retiradas da pata direita dos animais submetidos ao estudo de edema de pata (Figura 7).

Figura 7 - Visualização microscópica histopatológica das secções das patas dos animais tratados. (A) carragenina 1%, (B) solução salina, (C) DDA, (D) óleo de pequi puro e (E) formulação. Setas indicam (I) edema, (II) infiltrado de neutrófilos, (III) desestruturação no estrato córneo. (EC) Estrato Córneo, (d) derme e (e) epiderme. Aumento: 400x.



Fonte: Dados da Pesquisa

Nas secções acima representadas é possível visualizar duas das três camadas da pele, a epiderme e a derme. Na Figura 7B é possível observar o corte obtido de uma pata que recebeu apenas salina como tratamento (controle negativo) com estado conservado das estruturas do epitélio, tais como epiderme, derme e estrato córneo indicando que a solução salina não foi capaz

de provocar processo inflamatório. Já a Figura 7A, correspondente ao tratamento apenas com a carragenina 1%, apresenta diversas alterações histopatológicas indicadas pelas setas. Neste caso o agente pró-inflamatório carragenina causou alteração da função do tecido, tais como migração celular (Figura 7A – II), edema (Figura 7A – I) e desestruturação do estrato córneo (COSTA, 2004). A presença de um infiltrado de neutrófilos 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 com aumento massivo da população de células imunológicas (KENDALL e NICOLAOU, 2013).

O grupo tratado com diclofenaco de dietilamônio (DDA) refletiu na análise histológica o que foi observado no estudo de edema de pata para a quarta hora após o estímulo inflamatório (Figura 7C e Tabela 1). A presença de moderado infiltrado de neutrófilos e exsudatos de edema tanto na derme quanto na epiderme são indícios de que, nas condições testadas, o DDA não foi capaz de suprimir o processo inflamatório da forma como se era esperado. Como discutido anteriormente, a ação anti-inflamatória do DDA é em função do tempo de contato com a pele e, portanto, pode-se deduzir que o tempo de 4 horas de exposição e única aplicação do DDA foi suficiente para promover significativa inibição do processo inflamatório no modelo animal testado, porém com pouca alteração histológica (KOROKOLVAS e FRANÇA, 2006). A Figura 7D representa o grupo tratado com óleo de pequi puro. Neste corte histológico foi possível visualizar uma estruturação dos componentes do epitélio cutâneo semelhante ao DDA, com um infiltrado moderado de neutrófilos e alguns focos de edema na epiderme. O fato de que o grupo tratado com o óleo de pequi não apresentou inibição significativa do edema em todo o teste. Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, os principais constituintes do óleo, os ácidos graxos, foram capazes de interferir em etapas do processo inflamatório inibindo, possivelmente, diferentes vias através de derivados do ácido araquidônico tais como as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas ocasionando um infiltrado menos evidente de células inflamatórias (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005).

A microemulsão desenvolvida proporcionou resultados histológicos compatíveis com as características esperadas para a ação anti-inflamatória do óleo, obtendo melhores resultados tanto com relação ao tratamento com o óleo puro quanto com relação ao fármaco de referencia (Tabela 1 e Figura 6). Configurando-se como o grupo que apresentou maior redução de edema quando comparado com o grupo carragenina (29,24% em 1h, 55,66% em 2h, 27,81% em 3h e 19,07% em

4h – ver Tabela 1), o grupo tratado com a microemulsão também apresentou a melhor resposta na avaliação histológica, com estrato córneo bem estruturado, ausência de edema na epiderme e leve presença de infiltrado na derme. O melhor resultado para esse grupo sugere que o alto teor de tensoativos na formulação (47,6%) foi capaz de melhorar a permeabilidade através do estrato córneo, modificando-o de maneira reversível, e permitindo uma maior absorção de substâncias ativas no local da inflamação (AZEEM et al., 2009; WILLIAMS e BARRY, 2012; ZHAI e ZHAI, 2014).

Os dados obtidos através dos estudos *in vivo* indicaram que a microemulsão contendo óleo de pequi foi capaz de melhorar a atividade anti-inflamatória do óleo puro, fazendo dessa formulação uma potencial alternativa aos tratamentos convencionais dos processos inflamatórios tópicos.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho desenvolveu uma microemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm). O diagrama de fase pseudoternário obtido possibilitou a seleção de um sistema capaz de melhorar a atividade anti-inflamatória do óleo vegetal. Os componentes selecionados para a formulação foram capazes de formar sistemas líquidos, transparentes e estáveis característicos das microemulsões. A avaliação dos parâmetros físico-químicos de pH e condutividade indicou que a formulação desenvolvida mostrou-se compatível para o uso tópico. Já a análise *in vivo* comprovou os efeitos anti-inflamatórios da microemulsão, sendo estes

estatisticamente significativos a partir da 2h após o estímulo inflamatório. A microemulsão obtida, portanto, apresentou-se como um promissor nanocarreador para o óleo de pequi, melhorando a atividade anti-inflamatória desse óleo.

ABSTRACT

The pequi (*Caryocar coriaceum* W.) is a native plant of the Brazilian Savanna that presents considerable biological properties. The oil extracted from this plant contains high levels of unsaturated fatty acids with proven anti-inflammatory and antioxidant activities. Inserting fixed oils in nano delivery systems may improve not only its physicochemical properties but also enhance skin penetration to local action due to the surfactant composition in the formulation. The aim of this work was to develop a microemulsion system, for topical local administration, through the elaboration of a pseudo-ternary phase diagram and apply it in an inflammatory model. A pseudo-ternary phase diagram was, then, produced using the surfactants Kollyphor

EL® and Brij 52® (88,5% and 11,5%, respectively) the pequi pulp oil and the aqueous phase (water and propylene glycol, 1:3). Physic-chemical parameters pH and conductivity were evaluated as well as in vivo activity through paw edema test and microscopic histological evaluation. The selected system composed by 47.6% of surfactants, 5.3% of pequi oil and 47.1% of aqueous phase presented homogeneous and transparent aspects, without phase separation or precipitation, with a typical yellow color from the pequi oil. The pH and conductivity values indicated a system suitable for topical application. The biological assessment through paw edema test showed enhancing activity of the pequi oil when inside of the microemulsion and this data corroborated with histological analysis. Thus, this nanosystem could be promising to enhance the anti-inflammatory activity of the vegetable oil.

PALAVRAS-CHAVE: Pequi oil, fatty acids, microemulsion, anti-inflammatory activity.

REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R.; LAWRENCE, M.J. **Investigations into the Formation and Characterization of Phospholipid Microemulsions .1. Pseudo-Ternary Phase-Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Alcohol-Isopropyl Myristate.** International Journal of Pharmaceutics, v. 93, n. 1-3, p. 161-75, 1993.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AZEEM, A.; KHAN, Z.I.; AQIL, M.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K.; TALEGAONKAR, S. **Microemulsions as a Surrogate Carrier for Dermal Drug Delivery.** Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 35, p. 525–547, 2009.
- 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.

BATISTA, J.S.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, C.M.F.; COSTA, K.M.F.M.; OLIVEIRA, A.F.; PAIVA, E.S.; NUNES, F.V.A.; OLINDA, R.G. **Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos.** Arquivos do Instituto Biológico, v.77, n.3, p.441-447, 2010.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; FESSI, H.; CHEVALIER, Y. **Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.68, p. 446–451, 2008.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** 2 ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, p. 540, 1960.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. **Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos.** Química Nova, v.35, n.9, p.1827-1840, 2012.

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

CARDOSO, C.R.; SOUZA, M.A.; FERRO, E.A.; FAVORETO, S.; PENA, J.D. **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.

CAVALCANTI, M.C.B.T.; RAMOS, M.A.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. **Implications from the Use of Non-timber Forest Products on the Consumption of Wood as a Fuel Source in Human-Dominated Semiarid Landscapes.** Environmental Management, 2015.

CEVC, G. **Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 56, p. 675–711, 2004.

CONSTANTINIDES, P.P.; YIV, S.H. **Particle-Size Determination of Phase-Inverted Water-in-Oil Microemulsions under Different Dilution and Storage-Conditions.** Int J Pharm. 1995 Mar 7;115(2):225-34.

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.; ARAUJO, F.S.; LIMA-VERDE, L.W. **Flora e aspectos auto-ecológicos de um encrave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil.** Acta Botânica Brasílica, n. 18, p. 759–770, 2004.

COSTA, K.A. **Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da proteína quinase C, PDD: caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina,** 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas –Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações.** p. 262. São Paulo: Blucher, 2011.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. **Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis.** Rev Ciênc Farm Básica Apl., v. 32(1), p. 9-18, 2011.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. **Characterization of caprylocaproyl macroglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug.** Int J Pharm, v. 271(1-2), p. 11-9, 2004).

DOW. Dow Electronic Materials. **Propylene Glycols - Physical Properties.** answer ID 7213, 2013.

FANUN, M. **Microemulsions with Nonionic Surfactants and Mint Oil.** The Open Colloid Sci. J. v. 3, p. 9-14, 2010.

FERRARI, M. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (*Carapa guyanensis*), 2002.** 142p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FERREIRA, A.M.; SOUZA, B.M.V.; RIGOTTI, M.A.; LOUREIRO, M.R.D. **The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature.** Rev Esc Enferm USP, v. 46(3), p. 745-53, 2012.

FERREIRA, F.R.; BIANCO, S.; DURIGAN, J.F.; BELINGIERI, P.A. **Caracterização física e química dos frutos maduros de pequi.** In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 1987. Campinas, SP. Anais. Campinas: SBG, v.2, p.643-646, 1988.

FIGUEIREDO, R.W.; MAIA, G.A.; FIGUEIREDO, E.A.T. **Propriedades físico-químicas e composição dos ácidos graxos da fração lipídica da polpa e amêndoa do piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm).** Revista de Ciências Agrônômicas, Fortaleza, v.20, n. 1/2, p. 135-139, 1989.

FOUADA, S.A.; BASALIOUS, E.B.; EL-NABARAWI, M.A.; TAYEL, S.A. **Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: In vitro/in vivo evaluation.** International Journal of Pharmaceutics, v. 453, p. 569–578, 2013.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; VANDENBERG, C. **Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil.** Megadiversidade, v. 1, p. 52–61, 2005.

GUIMARÃES, G.P., **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado do tiofeno.** p 120, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

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

HATHOUT, R.M.; MANSOUR, S.; MORTADA, N.D.; GENEIDI, A.S.; GUY, R.H. **Uptake of Microemulsion Components into the Stratum Corneum and Their Molecular Effects on Skin Barrier Function.** Molecular Pharmaceutics, v. 7, n. 4, p. 1266–1273, 2010.

- HO, H.O.; HSIAO, C.C.; SHEU, M.T. **Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs.** J Pharm Sci. v. 85, n. 2, p. 138-43, 1996.
- HUI ZHANG, H.; TAXIPALATI, M.; QUE, F.; FENG, F. **Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques.** Food Chemistry, v. 141, p. 3050–3055, 2013.
- JUNIOR, B.H.M.; HARIDASAN, M. **Comparação da vegetação arbórea e características edáficas de um cerradão e um cerrado sensu stricto em áreas adjacentes sobre solo distrófico no leste de Mato Grosso, Brasil.** Acta Botanica Brasílica, n.19, v. 4, p. 913-926, 2005.
- KENDALL, A.C.; NICOLAOU, A. **Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity.** Progress in Lipid Research, v. 52, p. 141–164, 2013.
- KOROKOLVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- KREILGAARD, M. **Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery.** Adv. Drug Deliv. Rev., v. 54, p. S77–S98, 2002.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 8th Edition.** Philadelphia, Pa: Elsevier Inc, 2010.
- LAM, A. C.; SCHECHTER, R. S. **The theory of diffusion in microemulsions.** J. Colloid Interface Sci., v. 120, p. 56–63, 1987.
- 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.
- LEVY, L. **Carrageenan paw edema in the mouse.** Life Sci., Oxford, v. 8, n. 11, p. 601-606, 1969.
- LIMA, A.; SILVA, A.M.O.; TRINDADE, R.A.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J. **Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).** Revista Brasileira de Fruticultura n. 29, p. 695–698, 2007.
- LOPES, L.B. **Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions.** Pharmaceutics, v. 6, p. 52-77, 2014.
- MA, Y.; LI, Y.; LI, X.; WU, Y. **Anti-Inflammatory Effects of 4-Methylcyclopentadecanone on Edema Models in Mice.** Int. J. Mol. Sci., v. 14(12), p. 23980-23992, 2013.
- MAHAN L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia.** 11 ed. São Paulo: Roca, 2005.
- MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia do Nordeste do Brasil.** 3 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MCDANIEL, J.C.; BELURY, M.; AHJEVYCH, K.; BLAKELY, W. **Omega-3 fatty acids effect on wound healing**. *Wound Repair and Regeneration*, v.16, p. 337–345, 2008.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA-JR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; FAGG, C.W. **Flora vascular do cerrado: Check list com 12.356 espécies**. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P.; Ribeiro, J.F. *Cerrado: ecologia e flora*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p. 417–1279, 2008.

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.; MAAROUFI, A.; MSALLEM, M.; BOUSSAID, M.; KHOUSA, M.L.; KHALDI, A. **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.

MIRANDA, J.S. **Contribuição ao estudo da cultura do piqui (Caryocar spp.): propagação e concentração de nutrientes**, 103f, 1986. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB.

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.

MURI, E.M.F.; SPOSITO, M.M.M; METSAVAHT, L. **Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local**. *Acta Fisiatr*, v. 16(4), p. 186 – 190, 2009.

NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; BAUDI, D.L.K.; CASTRO, J.H.T. **Secondary cicatrization in dermoepidermal wounds treated with essential fatty acids, vitamins A and E, soy lecithin and polynylpyrrolidone-iodine in dogs**. *Arch Vet Sci*, v. 9(1), p. 1-16, 2004.

OLIVEIRA, M.E.B.; GUERRA, N.B.; MAIA, A.H.N.; ALVES, R.E.; XAVIER, D.S.; MATOS, N.M.S. **Caracterização física de frutos do pequizeiro nativos da Chapada do Araripe - CE**. *Rev. Bras. Frutic.*, n. 31, p. 1196–1201, 2009.

OLIVEIRA, M.L.M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; TOMÉ, A.R.; MOTA, E.F.; LIMA-VERDE, I.A.; PINHEIRO, F.G.M.; CAMPELLO, C.C; MORAIS, S.M. **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.

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(6), p. 351–355, 2014.

PENHA, A. R. S. **Estudo de atividade antiulcerogênica de plantas da chapada do Araripe**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), 2007. Universidade Regional do Cariri, Crato, 2007.

- PEREIRA, L.M.; HATANAKA, E.; MARTINS, E.F.; OLIVEIRA, F.; LIBERTI, E.A.; FARSKY, S.H.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. **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.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; LIMA, C.G.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. **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.
- QUIRINO, G. S. **Atividade cicatrizante e gastroprotetora de *Caryocar coriaceum* Wittm.** Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular), 2009. Universidade Regional do Cariri, Crato, 2009.
- 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.
- RAMOS, K.M.C.; SOUZA, A.B. **Características físicas e químico-nutricionais de frutos de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) em populações naturais da Região Meio-Norte do Brasil.** *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, v. 33, n. 2, p. 500-508, 2011.
- RIBEIRO, D.A.; OLIVEIRA, L.G.S.; MACÊDO, D.G.; MENEZES, I.R.A; COSTA, J.G.M.; SILVA, M.A.P.; LACERDA, S.R.; SOUZA, M.M.A. **Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado área of Chapadado Araripe, Northeastern Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 155, p. 1522–1533, 2014.
- RUSSELL-JONES, G.; HIMES, R. **Water-in-oil microemulsions for effective transdermal delivery of proteins.** *Expert Opin. Drug Deliv.*, v. 8(4), p. 537-546, 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.
- SARAIVA, R.A.; ARARUNA, M.K.A.; OLIVEIRA, R.C.; MENEZES, K.D.P.; LEITE, G.O.; KERNTOPF, M.R.; COSTA, J.G.M.; ROCHA, J.B.T.; TOME, A.R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I.R.A. **Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, p. 504 - 510, 2011.
- SHEN, L-N.; ZHANG, Y-T.; WANG, Q; XU, L.; FENG, N-P. **Preparation and evaluation of microemulsion-based transdermal delivery of total flavone of rhizoma arisaematis.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 3453–3464, 2014.
- SILVA, J. A.; BEDOR, D.G.C.; DAMASCENO, B.P.G.L.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P. **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.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.G.C.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A.M.M.; EGITO, E.S.T. **Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like.** *Quimica Nova*, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SILVA, M.A.P.; MEDEIROS-FILHO, S. **Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.).** *Revista de Ciências Agronômicas*, Fortaleza, v. 37, n. 3, p. 320-325, 2006.

SOUSA-JÚNIOR, J.R. **Conhecimento e manejo tradicional de *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) na Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil,** p. 19, 2012. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.

TASHTOUSH, B.M.; BENNAMANI, A.N.; AL-TAANI, B.M. **Preparation and characterization of microemulsion formulations of nicotinic acid and its prodrugs for transdermal delivery.** *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 18(4), p. 834–843, 2013.

WANG, Z.; MU, H-J.; ZHANG, X-M; MA, P-K.; LIAN, S-N.; ZHANG, F-P.; CHU, S-Y.; ZHANG, W-W.; WANG, A-P.; WANG, W-Y.; SUN, K-X. **Lower irritation microemulsion-based rotigotine gel: formulation optimization and in vitro and in vivo studies.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 633–644, 2015.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. **Penetration enhancers.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 64, p. 128–137, 2012.

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.** *Proc Soc Exp Biol*, v. 111, p. 544–547, 1962.

YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; ANTALEK, B.; GARTI, N. **Microstructure considerations of new five-component Winsor IV food-grade microemulsions studied by pulsed gradient spin-echo NMR, conductivity, and viscosity.** *Langmuir*, v. 19, p. 1063–1068, 2003.

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.

ANEXO A – Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CESED – PB



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

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