



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**JOYCE CORDEIRO BORGES**

**ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA DE MICROEMULSÕES  
CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* Raddi**

**CAMPINA GRANDE - PB  
2018**

**JOYCE CORDEIRO BORGES**

**ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA DE MICROEMULSÕES  
CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* Raddi**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Farmacologia.

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

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2018**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

B732a Borges, Joyce Cordeiro.  
Atividade cicatrizante e antimicrobiana de microemulsões contendo o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi [manuscrito] / Joyce Cordeiro Borges. - 2018.  
55 p.  
Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.  
"Orientação : Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia - CCBS."  
1. Óleo de aroeira. 2. Inflamações cutâneas. 3. Infecções microbianas. I. Título

21. ed. CDD 581.634

JOYCE CORDEIRO BORGES

**ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA DE MICROEMULSÕES  
CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* Raddi**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

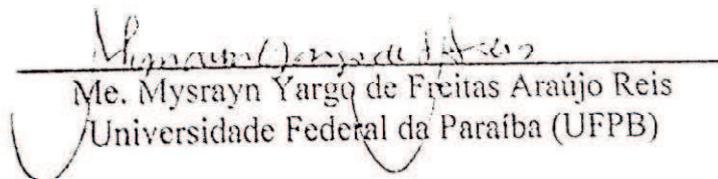
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 26/11/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Me. Airlla Laana de Medeiros Cavalcanti  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Me. Mysrayn Yargo de Freitas Araújo Reis  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente aos meus pais Jailton e Karina e ao meu irmão Jeybson, que são essenciais em minha vida e sempre me deram apoio em cada conquista.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, me dando coragem e sabedoria para enfrentar a vida todos os dias. Agradeço, por dá o auxílio que preciso para escrever a minha jornada. Pela proteção diária e a fortaleza em momentos de dificuldades. Sou grata, por todas as vitórias e por permitir a realização dos meus sonhos.

Em especial, aos meus pais e meu irmão, que são a base da minha vida, a fonte do amor mais puro, a força que necessito para vencer as batalhas, e o combustível para eu sempre continuar sonhando e indo em buscar de todos os meus objetivos. Não teria conseguido chegar até aqui sem vocês... Obrigada, a Família que Deus me deu!

Agradeço a minha família em Cristo, por sempre se fazerem presentes em minha vida... Meu obrigada a cada um, tenho a certeza que sempre posso contar com as orações de vocês e posso sentir um Mar de Amor no olhar de cada um.

Ao meu namorado, Guilherme, pelo amor, carinho, cumplicidade e compreensão nestes últimos tempos. Muito obrigada, você tem sido muito importante em minha vida, éis a jóia rara da minha vida, jamais conseguirei expressar toda a admiração que tenho por você.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno. Lhe considero o meu pai científico, por sempre ter confiado em mim e me estendido a mão todas as vezes que necessitei. Agradeço por todas as oportunidades concebidas, pela paciência e por todos os ensinamentos durante todos esses anos.

Aos os meus eternos colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), agradeço pelo companheirismo e a amizade de todos. De forma especial, a Yargo, Karoll, Livia, Emmily, Lucas, Kevin, Joandra, Vandiará, e a Técnica Airlla, que sempre estiveram dispostos a me ajudar durante as pesquisas.

Ao professor Dr. João Walter pela orientação na realização dos testes *in vivo*.

A Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FACISA) por disponibilizar o biotério para realização do teste *in vivo*.

Ao Laboratório de Análises e Diagnóstico, em nome da Prof. Dr. Edja Melo e toda sua equipe, por todo o auxílio e parceria durante essa pesquisa.

Ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da UEPB, por contribuir com as análises microbiológicas dessa pesquisa.

Ao meus amigos da vida, Caio, Bianca, Karol, Gustavo e Genezio por compartilharem comigo sonhos, também os momentos tristes e alegres. Obrigada por acreditarem em mim e torcerem sempre pelos meus sonhos.

Aos meus companheiros de turma, que se tornaram verdadeiros amigos e foram importantes para que eu pudesse chegar até aqui. Em especial, a Thalita, Thaís, Ketley, Ingrid, Augusto, Igor, Renata, Raiane e Izabel. Obrigada, pela força, amizade e as boas risadas. Levarei vocês por toda a minha vida.

Aos professores da graduação, por contribuir em minha formação acadêmica, por todo conhecimento adquirido, pelo incentivo aos estudos e a pesquisa, e a nunca desistir dos nossos sonhos. Agradeço em especial, a Avany Gusmão, Jozeline Molozzi, Vanessa Almeida, Aline de Maman, Carla Bicho, Karina Saraiva, Michelle Garcia, Délcio felismino e Walclécio Lira.

A Universidade Estadual da Paraíba, por todo o suporte, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento na vida acadêmica.

Por fim, a todos que fazem parte da minha vida e contribuíram para a realização desse trabalho.

“Assim como na ecologia, em que uma espécie usa de seus recursos para a sobrevivência e enfrenta a adaptação aos novos ambientes, um pesquisador luta pelo o sucesso de sua pesquisa”

(Joyce Cordeiro)

## RESUMO

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma espécie de planta da família Anacardiaceae, conhecida popularmente de aroeira-da-praia, aroeira-vermelha ou pimenta-rosa. O óleo essencial de aroeira (OEA) é rico em  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -felandreno e  $\alpha$ -terpineol, responsáveis pelas atividades antimicrobianas, antitumoral, antioxidante e cicatrizante de feridas cutâneas. A eficiência terapêutica do OEA na cicatrização e infecção de feridas cutâneas pode ser melhorada com a sua incorporação em novos sistemas de liberação, como as microemulsões (MEs). As MEs garantem uma liberação controlada, e podem aumentar a estabilidade física dos componentes químicos que formam o OEA, bem como, proteger das reações oxidativas com o ambiente, diminuir a volatilidade e reduzir sua toxicidade. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar microemulsões bicontínuas contendo o (OEA) nas concentrações de 5 e 10% da fase oleosa e analisar a atividade cicatrizante e antimicrobiana *in vivo*. O sistema microemulsionado foi composto pela mistura de dois tensoativos, Kolliphor<sup>®</sup> HS15 e Brij<sup>®</sup> 52 (37,5%), na proporção de 9:1, água destilada (fase aquosa) (37,5%) e miristato de isopropila (fase oleosa) (25%). A caracterização dos sistemas foi realizada através de análises macroscópicas, pH, condutividade elétrica e centrifugação. As formulações apresentaram um aspecto de um gel, bastante viscoso e límpido. Os valores encontrados de pH das três formulações desenvolvidas de 6,49, 6,54 e 6,55, para a ME sem o OEA (ME-BR), MEs com 5% e com 10% do OEA, respectivamente, se encontram dentro da faixa aceitável de pH da pele. Os valores de condutividade de 96,48  $\mu$ S/cm, 92,16  $\mu$ S/cm e 72,60  $\mu$ S/cm para a ME-BR, MEs com 5% e com 10% do OEA, respectivamente, sugestivo de MEs que apresentam uma grande fase aquosa externa, como as MEs do tipo bicontínuas. Pelo processo de centrifugação, sugeriu-se uma boa estabilidade das formulações. O teste *in vivo* revelou que a microemulsão (ME) contendo 10% do OEA promoveu um efeito de cicatrização reduzindo para  $77,7 \pm 5,1\%$  o tamanho das feridas, a partir do 4º dia após a indução da ferida, enquanto que a ME-BR retardou o processo de cicatrização. Foi demonstrada uma atividade antimicrobiana frente a *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. Portanto, a ME contendo 10% do OEA pode oferecer uma nova alternativa ao tratamento de inflamações cutâneas e/ou infecções microbianas.

Palavras-chave: Óleo de aroeira; Inflamações cutâneas; Infecções microbianas.

## ABSTRACT

*Schinus terebinthifolius* Raddi is a species of plant from the Anacardiaceae family, known popularly as beach's aroeira, red aroeira or pink pepper. The essential oil of Aroeira (EOA) has a high concentration of  $\alpha$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -phellandrene and  $\alpha$ -terpineol, related to the antimicrobial, antitumoral, antioxidant and healing cutaneous wounds roles. The therapeutic efficiency of the EOA in wound healing and infection of skin wounds can be improved through its incorporation in new delivery systems, such as microemulsions (MEs). At MEs ensure a controlled release and can increase the physical stability of the chemical components that make up the EOA, in addition, they offer protection from oxidative reactions with the environment and reduce characteristics as volatility and toxicity. The aim of this study was to develop and characterize bicontinuous microemulsions containing (EOA) at concentrations of 5 and 10% of the oil phase and to analyze the healing process and *in vivo* antimicrobial activity. The microemulsion system was composed of the mixture of two surfactants, Kolliphor<sup>®</sup> HS15 and Brij<sup>®</sup> 52 (37.5%) in the proportion of 9:1, distilled water (aqueous phase) (37.5%) and isopropyl myristate (oily phase) (25%). The characterization of the systems was performed through macroscopic analysis, pH, electrical conductivity and centrifugation. The formulations presented an aspect of a highly viscous and clear gel. The pH values found for the three developed formulations were 6.49, 6.54 and 6.55, for the microemulsion without the EOA (ME-BR), the microemulsion with 5% and 10% of EOA respectively. These results are within the acceptable range of pH for the skin. The values of conductivity were 96.48  $\mu$ S/cm, 92.16  $\mu$ S/cm and 72.60  $\mu$ S/cm for the microemulsion without the EOA, the microemulsion with 5% and 10% of EOA respectively, suggestive of MEs that present a large external aqueous phase, as the bicontinuous microemulsions. The process of centrifugation suggested a good stability of the formulations. In *vivo* testing revealed that the microemulsion (ME) containing 10% of the EOA demonstrated a healing effect reducing the size of wounds to  $77.7 \pm 5\%$ , from the 4<sup>o</sup> day after the induction of the wound, while the ME-BR slowed the healing process. It was demonstrated an antimicrobial activity against *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, microemulsions containing 10% of EOA can offer a new alternative to treat skin inflammations and/or microbial infections.

**Keywords:** Oil of aroeira; Inflammation cutaneous; Microbial infections.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação das estruturas da pele.....	15
Figura 2 – Fases da cicatrização de feridas cutâneas.....	17
Figura 3 – <i>S. terebinthifolius</i> Raddi.....	19
Figura 4 – Estrutura dos principais componentes do OEA.....	21
Figura 5 – Classificação estrutural das MEs.....	24
Figura 6 – Protocolo desenvolvido para o teste <i>in vivo</i> .....	30
Figura 7 – Protocolo desenvolvido para análise da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	32
Figura 8 – Diagrama de fase pseudoternário do sistema contendo Kolliphor® HS15/Brij® 52 (9:1), miristato de isopropila e água destilada.....	34
Figura 9 – Aspecto visual da amostra selecionada.....	35
Figura 10 – Formulações após centrifugação 13000rpm por 30min e 60min.....	37
Figura 11 – Aparência macroscópica das MEs.....	37
Figura 12 – Aspectos macroscópicos das feridas nos dias analisados.....	39
Figura 13 – Avaliação do tamanho das feridas cutâneas em relação ao dia 2 após a lesã...	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do OEA.....	20
Tabela 2 – Composições percentuais da formulação da ME-BR, ME-OEA 5% e ME-OEA 10%.....	36
Tabela 3 – Características físico-químicas das microemulsões ME-BR, ME-OEA 5% e ME-OEA10%.....	38
Tabela 4 – Atividade antimicrobiana para ME-BR e ME-OEA 10% durante o processo de cicatrização.....	41

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	15
2.1 Pele	15
2.2 Cicatrização	16
2.3 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	18
<b>2.3.1 Composição química do OEA</b>	19
<b>2.3.2 Atividade antibacteriana</b>	21
<b>2.3.3 Atividade cicatrizante</b>	22
2.4 Microemulsões Tópicas	23
<b>3 OBJETIVO</b>	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
<b>4 METODOLOGIA</b>	26
4.1 Material	26
<b>4.1.1 Matérias-primas, reagentes soluções e solventes</b>	26
<b>4.1.2 Equipamentos</b>	26
4.2 Métodos	26
<b>4.2.1 Material vegetal</b>	26
<b>4.2.2 Extração do óleo essencial</b>	27
<b>4.2.3. Obtenção das MEs</b>	27
<i>4.2.3.1 Utilização diagrama de fase pseudoternário (DFPT) e seleção da microemulsão</i>	27
<b>4.2.4 Incorporação do óleo de aroeira nas MEs</b>	27
<b>4.2.5 Aspecto macroscópico das MEs</b>	28
<b>4.2.6 Centrifugação</b>	28
<b>4.2.7 Caracterização físico-química das MEs</b>	28
<i>4.2.7.1 Determinação do pH</i>	28
<i>4.2.7.2 Condutividade Elétrica</i>	28
<b>4.2.8 Avaliação da atividade cicatrizante e antimicrobiana de MEs contendo o OEA</b>	29
<i>4.2.8.1 Animais</i>	29
<i>4.2.8.2 Grupos e tratamentos</i>	29
<b>4.2.9 Avaliação das feridas cutâneas</b>	30
<i>4.2.9.1 Aspectos clínicos das feridas cutâneas</i>	31

4.2.9.2 <i>Análise morfométrica das feridas cutâneas</i> .....	31
<b>4.2.10 Análise microbiológica das feridas cutâneas</b> .....	31
<b>4.2.11 Análise estatística</b> .....	32
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1 Seleção da ME utilizando o diagrama de fase pseudoternário (DFPT) .....	33
5.2 Seleção da formulação e incorporação do OEA.....	35
5.3 Centrifugação .....	36
5.4 Caracterização físico-química da formulação .....	37
5.5 Avaliação da atividade cicatrizante da aplicação tópica de MEs contendo o OEA .....	38
<b>5.5.1 Aspectos clínicos das feridas cutâneas</b> .....	38
<b>5.5.2 Análise morfométrica das feridas cutâneas</b> .....	39
5.6 Análise microbiológica das feridas cutâneas .....	41
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44
<b>ANEXO</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por novas alternativas terapêuticas que minimize efeitos colaterais e que reduza as altas doses diárias de fármacos tem levado, nos últimos anos, ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (NSLF), incluindo as microemulsões (ME), nanoemulsões, nanopartículas e lipossomas (ROBERTS et al., 2017). Estes nanossistemas podem oferecer vantagens no carreamento de moléculas lipofílicas e hidrofílicas, podendo aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade. Além disso, estes sistemas têm sido usados para incorporar ativos para várias vias de administração, incluindo a aplicação tópica (NASTITI et al., 2017).

As microemulsões (MEs) são conhecidas como um sistema isotrópico, transparente/translúcido de dois líquidos imiscíveis, geralmente água-óleo, estabilizado por uma interface de tensoativos e co-tensoativos. São sistemas termodinamicamente e cineticamente estáveis (WUTTIKUL; BOONME, 2016), com tamanho de gotícula extremamente pequeno (20 a 400 nm) e distribuição de tamanho uniforme (ZHAO et al., 2013).

Atualmente, o desenvolvimento de MEs utilizando óleos vegetais têm sido eficientes em aplicações tópicas, devido às atividades benéficas que a grande composição química presente nestes óleos pode exercer em patologias cutâneas (NEVES et al., 2018; REIS et al., 2017).

A aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*), também conhecida popularmente de aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, pimenta-rosa, cambuí e pepper tree (GILBERT, FAVORETO, 2011), é uma planta pertencente à família Anacardiaceae nativa da América do Sul e bastante difundida principalmente nos estados brasileiros de Pernambuco e Rio Grande do Sul (ESTEVÃO et al., 2013; SANTOS et al., 2010).

Desta planta, extrai-se um óleo essencial de mesmo nome da planta, rico em  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineol e limoneno (SALEM et al., 2018), responsáveis pelas suas atividades larvicida (SILVA et al., 2010), inseticida (KEWKA et al., 2010), antimicrobiana (ELSHAFIE et al., 2016), anticancerígeno (SILVA et al., 2018), parasitária (SARTORELLI et al., 2012), antifúngica (OLIVEIRA et al., 2018), antioxidante (BENDAOU et al., 2010) e cicatrizante de feridas cutâneas (ESTEVÃO et al., 2017).

Para a cicatrização de feridas, produtos à base de óleos essenciais (OEs) têm sido utilizados (ZHANG et al., 2017). Entretanto, (OEs) podem apresentar problemas em sua estabilidade. Os conteúdos voláteis dos (OEs) podem facilmente evaporar, mesmo em

condições normais de armazenamento, gerando a oxidação de compostos químicos e comprometendo suas atividades biológicas (CHAIYANA et al., 2017).

Portanto, a incorporação de OEs em sistemas de liberação nanoestruturados pode ser uma alternativa para resolver os problemas de estabilidade dos componentes químicos. Além disso, as MEs representam um NSLF promissor de aplicação tópica para vários compostos bioativos, devido às inúmeras vantagens sobre as formulações convencionais existentes como: o pequeno tamanho de suas gotículas, o que melhora a atividade biológica de compostos lipofílicos e hidrofílicos encapsulados nesses sistemas; proteção dos ativos contra a oxidação; e o transporte das moléculas ativas pelas membranas biológicas (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015).

Com base nisso, o objetivo do presente trabalho é incorporar o OEA em uma ME bicontínua e avaliar sua atividade cicatrizante e antimicrobiana em feridas de camundongos.

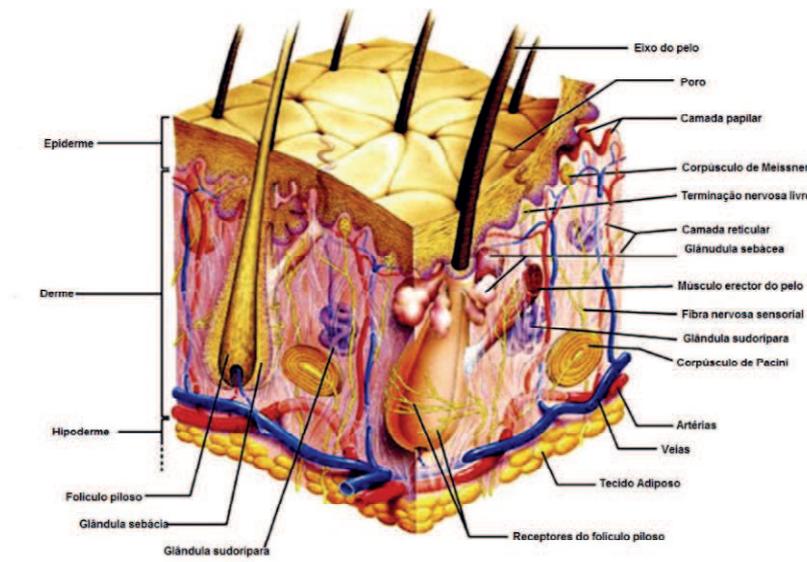
## 2 REFERÊNCIA TEÓRICO

### 2.1 Pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano em peso e área superficial, podendo variar de 1,7 m<sup>2</sup> a 2,0 m<sup>2</sup> (CARVALHO, 2010; FOLDVARI, 2008; LEONARDI, 2008; YOUNG et al., 2007).

A pele funciona como uma barreira protetora do organismo, limitando a penetração de substâncias exógenas e invasão de microrganismos. Protege contra estímulos físicos e luz ultravioleta, e é responsável pela termorregulação do corpo, metabolismo e atrito sexual (WONG et al., 2015; YOUNG et al., 2007). Sua estrutura é dividida em três camadas microscópicas: A epiderme (camada superficial), a derme (camada intermediária) e a hipoderme ou subcutânea (camada profunda) (Figura 1).

Figura 1: Representação das estruturas da pele



Fonte: adaptado de Alexander et al. 2012.

A epiderme é responsável pela cor, textura e umidade da pele. Composta principalmente de queratinócitos, mas apresenta outras células, como melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (LOSQUADRO, 2017).

A camada mais profunda da epiderme é o estrato basal ou camada basal. É composto de células basais que se dividem formando os queratinócitos, que migram superficialmente. A próxima camada é a camada espinhosa ou estrato espinhoso. Os queratinócitos nesta camada formam junções intercelulares através dos desmossomos, que em seguida, migram para a camada granular ou estrato granuloso. Nesta camada os filamentos de queratina começam a se agregar em estruturas mais complexas. Células dentro da camada granular perdem

gradualmente suas organelas e se tornam mais compactas, formando a camada epidérmica mais externa, o estrato córneo, onde a queratinização se completa. O estrato córneo é a principal barreira a substâncias, perda de água, atrito e a fármacos quando estes são aplicados de forma tópica. (DONELLY; SINGH; WOOLFSON; 2010; LEONARDI, 2008; LOSQUADRO, 2017).

A derme, camada abaixo da epiderme, tem aproximadamente 2 mm de espessura e fornece suporte estrutural e nutricional para esse tecido. É composta principalmente por matriz extracelular (MEC), produzida por fibroblastos e composta de colágeno e elastina, também contém, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, glândulas excretoras e secretoras, estruturas queratinizantes, receptores nervosos sensoriais e células imunes (LOSQUADRO, 2017; SUPP; BOYCE, 2005).

A derme é ainda dividida em camada papilar e reticular. A camada papilar está localizada logo abaixo da epidérmica e composta de fibrócitos, colágeno e vasos sanguíneos. Abaixo, está a camada reticular, muito mais espessa, contém menos fibrócitos, mas uma deposição mais densa de colágeno. O colágeno são proteínas encontradas em toda a pele e em tecidos conjuntivos do corpo humano, principalmente o colágeno tipo I e III. O colágeno tipo I compreende aproximadamente 80% da derme e confere à pele uma resistência à tração. O colágeno tipo III representa aproximadamente 15% da derme e é responsável pela flexibilidade da pele (LOSQUADRO, 2017).

A terceira camada, a hipoderme, é formada principalmente de tecido adiposo que conecta a derme com os músculos e ossos (COOPER, 2002).

A pele ainda possui anexos e dentre eles temos o folículo piloso, pelo de queratina flexível, músculo eretor do pelo, as glândulas sebáceas e sudoríparas (SOUZA, 2003).

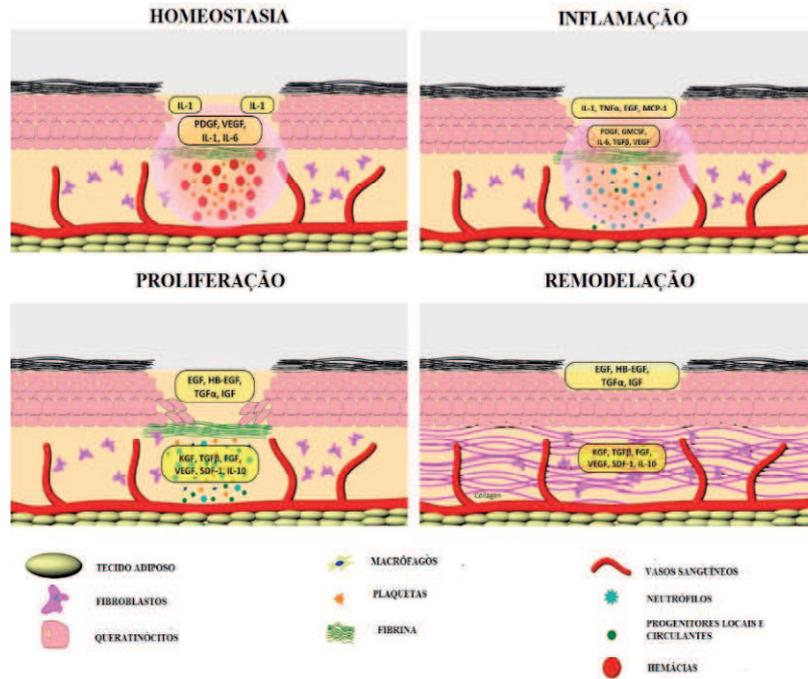
## **2.2 Cicatrização de feridas**

As feridas cutâneas são eventos que ocorrem inevitavelmente devido a lesões ou cortes formados na epiderme da pele. Estas lesões podem ser causadas por agentes extrínsecos, a partir de incisões cirúrgicas, ferimentos acidentais, zonas de pressão e isquemia externa; ou intrínsecos, a partir de infecções, alterações vasculares, isquemias internas, defeitos metabólicos e neoplasias (MENEHIN, VATTIMO, 2003; ZHANG et al., 2017).

A cicatrização da ferida cutânea é um processo que envolve células, moléculas e componentes imunológicos com o intuito de restaurar o tecido após uma lesão (GREAVES et al., 2013).

O processo de cicatrização (Figura 2) é composto por 4 fases: homeostasia, inflamação, proliferação e remodelação (HAMDAN et al., 2017).

Figura 2: Fases da cicatrização de feridas cutâneas.



Fonte: adaptado de Hamdan et al., 2017.

A fase de homeostasia se inicia logo após a lesão. As plaquetas migram para os vasos sanguíneos danificados formando um coágulo de fibrina que impede o sangramento excessivo e protege a área da ferida. As plaquetas liberam fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas para o leito da ferida (WEYRICH; ZIMMERMAN, 2004). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento fator de transformação do crescimento alfa (TGF- $\alpha$ ) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) ativam células inflamatórias como leucócitos, neutrófilos e macrófagos. Os leucócitos produzem espécies de oxigênio reativas (ROS) para realizar a limpeza de corpos estranhos e bactérias na ferida (SINGER; CLARK, 1999).

A fase inflamatória é acompanhada por apoptose de células inflamatórias, o que ocorre gradualmente dentro de alguns dias após o ferimento. Ainda citocinas anti-inflamatórias, tais como TGF- $\alpha$  e Interleucina 1 (IL-1), e a prostaglandina são produzidas nesta fase (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; GILROY et al., 2004). Nessa fase ainda ocorre a formação da fibronectina, que une o coágulo de fibrina (produzida na etapa anterior), às integrinas, colágeno e heparina presentes na derme, com o intuito de manter a adesão celular na matriz extracelular (CAMPOS; BORGES-FRANCO; GROTH, 2007).

A fase proliferativa começa mediada por fatores de crescimento e citocinas produzidas na fase inflamatória, que induzem a migração e proliferação de fibroblastos para a lesão que produz colágeno e forma o tecido de granulação (FALANGA, 2005; SINGER; CLARK, 1999). Posteriormente, ocorre a formação de novos vasos no leito da ferida para fornecer nutrientes, gases e trocas de metabólitos, processo esse conhecido de angiogênese. Em seguida, ocorre a reepitelização para reorganizar as estruturas epidérmicas que foram danificadas pela lesão. Fibroblastos proliferam dentro da ferida e sintetizam a matriz extracelular que formam tecido de granulação com os vasos sanguíneos recém-formados. Simultaneamente, a matriz provisória é formada e consiste principalmente em colágeno III, fibrina, fibronectina e ácido hialurônico (SINGER; CLARK, 1999)

A contração da ferida é caracterizada pelo movimento de fibroblastos da periferia para o centro da lesão, formando uma cicatriz primária. Miofibroblastos presentes na derme, mediados pelo TGF- $\beta$  e PDGF, ligam-se às fibras de colágeno puxando-as para sua direção (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A fase de remodelação é caracterizada pela deposição das fibras de colágeno na matriz extracelular e a diminuição do tamanho da cicatriz. Para isso, ocorre a diminuição da atividade de células endoteliais, além da apoptose dos fibroblastos, mediante a produção de metaloproteinases, aumentando a produção de colágeno do tipo I, levando à maturação da cicatriz (AKASAKA, 2004; DESMOULIERE et al., 1995; ISAAC et al., 2010).

As feridas são classificadas como agudas, ocorridas de eventos traumáticos, porém de rápida hemostasia; ou crônicas, caracterizadas por lesões de longa duração e difícil cicatrização, além de um quadro infeccioso ou irritação local comum. Feridas crônicas, queimaduras e outras doenças de pele como as dermatoses inflamatórias, psoríase e eczema, oferecem sérios riscos aos pacientes (ISAAC et al., 2010). Por tanto, a descoberta de novos fármacos capazes de diminuir a inflamação tecidual e melhorar a cicatrização podem melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

### **2.3 *Schinus terebinthifolius* Raddi**

A *S. terebinthifolius* Raddi é uma planta pertencente à família Anacardiaceae e conhecida popularmente de aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, pimenta-rosa, cambuí e pepper tree (GILBERT; FAVORETO, 2011). É nativa da América do Sul e bastante distribuída principalmente nos estados brasileiros de Pernambuco e Rio Grande do Sul (ESTEVÃO et al., 2013; SANTOS et al., 2010).

A aroeira (Figura 3), atinge de 5-10 m de altura e pode ser encontrada na forma de arbusto ou árvore. Morfologicamente esse vegetal se apresenta com um tronco tortuoso, revestido por uma casca grossa e com superfície resinosa. Suas folhas são verde-escuras, compostas e com pecíolos cilíndricos na parte inferior, enquanto, suas flores são pequenas e apresentam coloração variando de amarelo a branco. Apresenta numerosos frutos pequenos, com coloração vermelho brilhante em fase madura, e coloração verde em fase imatura (ALMEIDA, 2005; AZEVEDO; QUIRINO; BRUNO, 2015; DEGÁSPARI, 2004; LORENZI, 2002).

Figura 3 – *S. terebinthifolius* Raddi



Fonte: agrolink, 2017

Os OEs são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, com a finalidade de lhes conferir resistência as condições adversas, como a variação climática, ataque de insetos e microrganismos. Apresentam uma ampla composição química (KAVOOSI; ROWSHAN, 2013), que conferem várias propriedades farmacológicas.

Principalmente das folhas e frutos da aroeira, extrai-se um óleo essencial, caracterizado por um odor forte, sabor pungente e coloração amarelo-clara (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013) e rico de uma complexa composição química (SALEM et al., 2018)

### 2.3.1 Composição do OEA

A literatura demonstra que o OEA pode ser obtido por hidrodestilação das folhas e frutos da planta e sua composição química é identificada, principalmente, por cromatografia

gasosa e espectrometria de massa (GC/MS) (ENNIGROU et al., 2016; SALEM et al., 2018). A identificação é de fundamental importância para as análises de suas atividades farmacológicas. Na tabela 1 mostra os valores percentuais dos principais constituintes do OEA (SALEM et al., 2018).

Tabela 1 – Composição química do OEA.

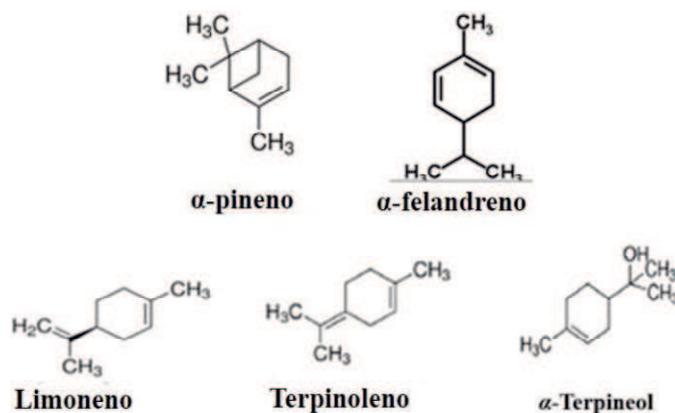
<b>Constituinte</b>	<b>Concentração (%)</b>
<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	36,9
<b><math>\alpha</math>-felandreno</b>	32,8
<b>m-cymeno</b>	0,4
<b>Limoneno</b>	11,9
<b>Terpinoleno</b>	3,1
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	0,3
<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	6,0
<b><math>\beta</math>-cadineno</b>	0,3
<b><math>\alpha</math>-Cadinol</b>	0,8
<b><math>\gamma</math>-eudesmol</b>	0,2
<b>T-muurolol 1</b>	0,3
<b><math>\beta</math>-eudesmol</b>	0,2

Fonte: adaptado de Salem et al., 2018

O OEA é rico em monoterpenos (84.33%) e sesquiterpênicos (10%), sendo os constituintes majoritários o  $\alpha$ -pineno (36.9%),  $\alpha$ -felandreno (32.8%), limoneno (11.9%),  $\alpha$ -terpineol (6.0%), e terpinoleno (3.1%) (ENNIGROU et al., 2016; SALEM et al., 2018). A fórmula estrutural desses componentes majoritários pode ser observada na Figura 4. Foi comprovado que ocorrem variações nos fitoquímicos relacionadas à maturação dos frutos da aroeira. O  $\alpha$ -pineno (26.3%),  $\alpha$ -phellandrene (44.64%), limonene (8.26%),  $\beta$ -phellandreno (7.23%) e D-germacreno (4.42%) foram os maiores constituintes encontrados nos frutos verdes, enquanto que as percentagens para  $\alpha$ -pineno (13.96%),  $\alpha$ -felandreno (45.88%), limoneno (8.14%),  $\beta$ -felandreno (4.79%) e D-germacreno (7.39%) foram as quantificadas em frutos maduros (ENNIGROU et al., 2016). Esses achados mostram, que a partir da identificação, existe uma similaridade entre os componentes presentes no OEA extraído de frutos, porém ocorrem variações em suas concentrações, devido, possivelmente à

sazonalidade, ao ritmo circadiano, ao estado de maturação e desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Figura 4 - Estrutura dos principais componentes do OEA



Fonte: adaptado de Salem et al., 2018

### 2.3.2 Atividade Antibacteriana

O OEA extraído de folhas e frutos da planta é empregado como agente antimicrobiano, demonstrando atividade a diversas cepas bacterianas, como: *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Clavibacter michiganensis*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas savastanoi* e *Pseudomonas syringae* (ELSHAFIE et al., 2016).

Recentemente no estudo de Salem e colaboradores (2018) sobre o OEA extraído de frutos maduros constatou-se uma boa atividade contra o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *P. aeruginosa* com valores da concentração inibitória mínima (CIM) de 16 µg/mL e 32 µg/mL, respectivamente. Essa atividade está relacionada, principalmente com o α-pineno, α-fenteropreno, d-limoneno, α-terpineol e terpinoleno.

Da mesma forma, em outro estudo a atividade antibacteriana do OEA extraído de folhas da planta foi determinada usando o método de difusão em disco. Os maiores valores de inibição foram observados para as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus agalactiae* com 31,83 mm e 27,5 mm, respectivamente (ENNIGROU et al., 2018).

Cole e colaboradores (2014), avaliou em seu estudo a atividade do OEA contra cepas de origem hospitalar, resultando em uma CIM para *Escherichia coli* de 28.43 µg/mL, *Pseudomonas* sp. de 7.11 µg/mL, *Klebsiella oxytoca* de 28.43 µg/mL, *Corynebacterium* sp. de 3.55 µg/mL, *S. aureus* de 14.21 µg/mL, *Enterobacter* sp. de 56.86 µg/mL, *Enterobacter*

*agglomerans* de 28.43 µg/mL, *Bacillus* sp. de 7.11 µg/mL, *Nocardia* sp. de 7.11 g/mL e *Streptococcus* sp de 14.21 µg/mL. Vale ressaltar, que nesse estudo o  $\delta$ -3-careno, limoneno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno, myrceno e o-cymeno se destacaram como os principais monoterpenos, em que a atividade antibacteriana tem influência direta.

Os mecanismos de ação antibacteriana da maioria dos OEs se relacionam com sua capacidade em alterar a permeabilidade das células bacterianas, dano na parede celular e na membrana citoplasmática, produzir estresse oxidativo na célula, interferir na geração de ATP e interromper a força próton motora, levando a apoptose celular (CALO et al., 2015; DANNENBERG et al., 2019). O mecanismo de ação do OEA contra bactérias foi avaliado, analisando o dano peroxidativo nas membranas bacterianas, determinado através do produto de degradação do malondialdeído (MDA), importante biomarcador utilizado na avaliação do estresse oxidativo desses microrganismos. A partir da quantificação do MDA gerado pelas bactérias *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *E. coli*, indica que o óleo induz a peroxidação lipídica, o que resulta na morte celular. Nesse sentido, os resultados sugerem um suposto mecanismo de ação antibacteriana do OEA pelo dano peroxidativo na membrana celular bacteriana (MONTANARI et al., 2012).

### 2.3.2 Atividade Cicatrizante

Estudos tem relatado o uso da *A. S. terebinthifolius* Raddi na medicina popular na forma chás, infusões ou tinturas como agente anti-inflamatório, tratamento feridas cutâneas e reparo de lesões em sistemas respiratório, digestivo e urinário (SANTANA et al., 2012; SANTOS, 2012).

Uma pomada com 10% do OEA foi utilizada com veículo para analisar a cicatrização de feridas e atividade anti-inflamatória em camundongos. Os resultados revelaram que a partir do 3º dia de tratamento a pomada reduziu a ferida em 37% e no 14º a ferida já estava completamente fechada. Foi observado que no 7º dia houve uma redução do acúmulo de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), CXCL-1 e CCL-2 e uma maior deposição de colágeno no 14º no grupo tratado com a pomada com o OEA (ESTEVÃO et al., 2017).

Em testes de cicatrização em ratos, o OEA induziu o aumento o número de mastócitos, ativação da proliferação de fibroblastos e de células epiteliais e aumento na deposição de colágeno (ESTEVÃO et al., 2013, 2015).

A atividade cicatrizante de *S. terebinthifolius* também é demonstrada em extratos hidroetanólicos de suas folhas (NUNES-JR et al., 2006; MARTORELLI et al., 2011). A aplicação tópica de 80 mg/ml de um extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolius* teve seu efeito na cicatrização de feridas em ratos em 11 dias de tratamento (FEDEL-MIYASATO et al., 2014).

O uso de OEs de forma pura, como agentes antimicrobianos e na cicatrização de feridas, apesar de apresentar diversas vantagens encontra algumas limitações, principalmente relacionadas a natureza hidrofóbica, oxidativa e volátil dos componentes químicos, podendo ser tóxicos quando utilizados em altas concentrações. Logo, a sua encapsulação em um sistema nanoestruturado se mostra promissor e eficiente para sua liberação controlada, aumentando seus efeitos biológicos devido ao tamanho nanométrico das partículas. Além disso, a encapsulação dos OEs, aumenta a estabilidade física, protege das reações oxidativas com o ambiente, diminui a volatilidade e reduz sua toxicidade. (DONSÍ et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2016).

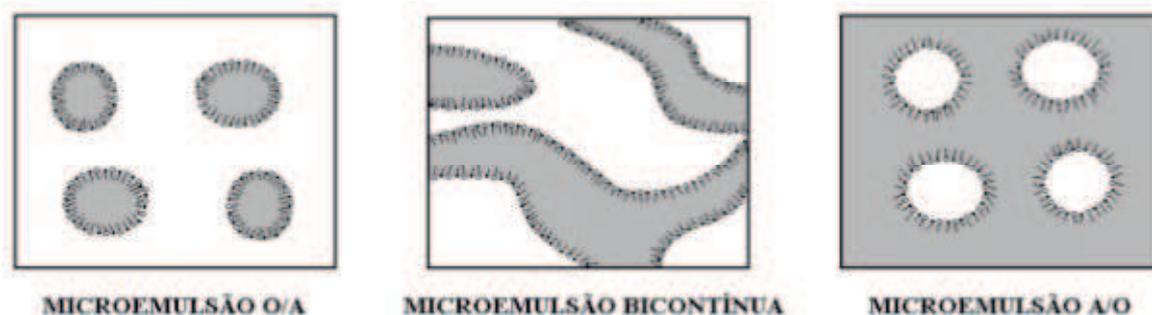
## 2.4 Microemulsões Tópicas

Nos últimos anos, pesquisas tem levado ao desenvolvimento de NSLF, como uma alternativa terapêutica para amenizar os efeitos colaterais e reduzir as altas doses diárias dos fármacos. Entre os principais NSLF, estão as MEs, nanoemulsões, nanopartículas e lipossomas (ROBERTS et al., 2017). Estes sistemas nanoestruturados podem oferecer vantagens no carreamento de moléculas de natureza lipofílicas e hidrofílicas, aumentando sua permeabilidade e biodisponibilidade (NASTITI et al., 2017).

As MEs são conhecidas com um sistema isotrópico, transparente/translúcido de dois imiscíveis líquidos, geralmente água-óleo, estabilizado por uma interface de tensoativos e co-tensoativos. São sistemas termodinamicamente e cineticamente estáveis (WUTTIKUL; BOONME, 2016), com tamanho de gotícula extremamente pequeno (20 a 400 nm) e distribuição de tamanho uniforme (ZHAO et al., 2013).

As MEs são classificadas em MEs água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) e bicontínuas (Figura 5). Nas ME A/O, as gotículas de água são envolvidas por moléculas de tensoativos, dispersa em um meio dispersante ou contínuo oleoso. Nas ME O/A, as gotículas de óleo são envolvidas por moléculas de tensoativos em um meio contínuo aquoso. MEs bicontínuas são caracterizadas por apresentar a fase aquosa e a fase oleosa com concentrações próximas e estabilizadas por tensoativos, nesse caso, não formando gotículas e sim canais entre as fases (DAMASCENO et al., 2011; NASTITI et al., 2017)

Figura 5 - Classificação estrutural das microemulsões



Fonte: Damasceno et al., 2011.

Legenda: fase oleosa: cor cinza e fase aquosa: cor branca.

Estes sistemas têm sido usados para incorporar ativos para várias vias de administração, incluindo a aplicação tópica e transdérmica, devido às inúmeras vantagens sobre as formulações convencionais existentes como: tamanho pequeno das gotículas, o que melhora a atividade biológica de compostos lipofílicos e hidrofílicos encapsulados nesses sistemas, proteção dos ativos contra a oxidação e o transporte das moléculas ativas pelas membranas biológicas (NASTITI et al., 2017; SALVIA-TRUJILLO et al., 2015).

Na via tópica, as MEs funcionam reduzindo a tensão interfacial da superfície da pele e aumentando a solubilização do fármaco. Os tensoativos usados nesses sistemas são considerados promotores de permeação, uma vez, que interagem com os fosfolípidios da bicamada lipídica do estrato córneo, e acabam causando uma desorganização em sua estrutura. Dessa maneira, quebra a barreira do estrato córneo e promove a formação de poros para a passagem da droga pelo tegumento. Essa desorganização da bicamada lipídica permite a penetração do fármaco em doses específicas e de forma controlada (LEE et al., 2005; NASTITI et al., 2017; SHUKLA et al., 2018).

Atualmente, o desenvolvimento de MEs utilizando óleos vegetais têm sido eficientes em aplicações tópicas, devido às atividades benéficas que a grande composição química presente nestes óleos pode exercer em patologias cutâneas (REIS et al., 2017; NEVES et al., 2018). Nesse sentido, a utilização do óleo essencial de aroeira (OEA) em um sistema microemulsionado pode promover a otimização dos seus efeitos no tratamento de afecções tópicas, tais como inflamações, doenças infecciosas cutâneas e na cicatrização de ferida.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar microemulsões bicontínuas contendo o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi e avaliar *in vivo* as suas atividades cicatrizante e antimicrobiana.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Utilizar o diagrama de fase pseudoternário para obtenção e identificação das regiões de microemulsões;
- Incorporar o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi nas concentrações 5% e 10%, em um ponto selecionado do diagrama;
- Caracterizar as microemulsões com e sem o óleo essencial, utilizando as análises de: aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica e centrifugação
- Estudar a atividade cicatrizante e antimicrobiana da aplicação tópica de microemulsões contendo o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi em modelo de ferida cutânea em camundongos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Material:

#### 4.1.1 Matérias-primas, reagentes soluções e solventes

- Kolliphor<sup>®</sup> HS 15, Sigma-Aldrich, Alemanha;
- Brij<sup>®</sup> 52, Sigma-Aldrich, Alemanha;
- Miristato de isopropila (All Chemistry<sup>®</sup>, São Paulo);
- Água destilada;
- Óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi;
- Xilazina (Dopaser<sup>®</sup> – Hertape S.A, Minas Gerais, Brasil);
- Ketamina (Dopalen<sup>®</sup> – São Paulo, Brasil);
- Agar sangue (Himedia Laboratories<sup>®</sup>, Índia);
- Agar Eosina azul de metileno (EMB, Himedia Laboratories<sup>®</sup>, Índia);
- Agar Manitol salgado (Himedia Laboratories<sup>®</sup>, Índia).

#### 4.1.2 Equipamentos

- Aparato de Clevenger;
- Balança analítica (modelo Adventurer<sup>®</sup> AR Analytical, Ohaus, Nova Jersey, EUA);
- Condutivímetro mCA 150, MS TecnoPON, Brasil;
- Desruptor de células ultrasônico - sonicador, Unique, Brasil;
- Lavadora ultrasônica, Unique, Brasil;
- Medidor de pH mPA 210, MS TecnoPON, Brasil;
- Microcentrífuga de bancada NI1801, Nova Instruments, Brasil.

### 4.2 Métodos:

#### 4.2.1 Material vegetal

A *S. terebinthifolius* Raddi foi coletada no mês de setembro de 2017, na região do semiárido paraibano no município de Campina Grande, na área do Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), situado entre as coordenadas 7°12'36.4"S e 35°54'57.8"W. Uma exsicata foi depositada no herbário Emanuel Arruda Câmara (ACAM), da UEPB, com registro N° 1863/ACAM.

#### 4.2.2 Extração do óleo essencial

Para a obtenção do óleo essencial dos frutos verdes da *S. terebinthifolius* Raddi foi realizada hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger. Utilizou-se 50g dos frutos triturados e 200 mL de água destilada, procedendo-se à destilação por 1 hora. O óleo essencial foi acondicionado em frasco de vidro do tipo âmbar hermeticamente fechado, envolto em papel alumínio e armazenado a -22°C até o momento do uso.

O rendimento do processo extrativo do OEA foi determinado pela relação massa/massa (conforme a fórmula abaixo) segundo Oliveira Junior et al. (2013). A massa do óleo essencial foi determinada em balança analítica e seu valor comparado à respectiva massa dos frutos de *S. terebinthifolius* utilizados.

$$\eta\%_{\text{(rendimento)}} = \frac{\text{Massa do óleo extraído (g)}}{\text{Massa do material vegetal (g)}} \times 100$$

Considerando o valor da massa do óleo extraído como sendo 1(g) e a massa dos frutos de *S. terebinthifolius* em 50(g). O rendimento percentual do óleo essencial extraído dos frutos de *S. terebinthifolius* foi de 2% (p/p).

#### 4.2.3 Obtenção das MEs

##### 4.2.3.1 Utilização diagrama de fase pseudoternário (DFPT) e seleção da microemulsão

Para a seleção de uma formulação com características de uma microemulsão bicontínua, foi utilizado o DFPT desenvolvido por (ARAÚJO, 2013), composto pela mistura de quatro componentes: água destilada (fase aquosa), miristato de isopropila (MIP - fase oleosa), Kolliphor<sup>®</sup> HS15(KHS15)/Brij<sup>®</sup> 52 (tensoativos) na proporção 9:1.

Para a seleção do ponto do DFPT, levou-se em consideração, as percentagens da fase oleosa, dos tensoativos e da fase aquosa, para que, posteriormente, fosse realizado a incorporação do OEA, caracterização físico-química das MEs e testes de atividade cicatrizante e antimicrobiana de sua aplicação tópica em camundongos.

#### 4.2.4 Incorporação do óleo de aroeira nas MEs

A incorporação do OEA a 5% (ME-OEA 5%<sub>v/v</sub>) e 10% (ME-OEA 10%<sub>v/v</sub>) da fase oleosa do sistema (ESTEVÃO et al., 2013; ESTEVÃO et al., 2017), iniciou-se com a mistura de tensoativos na proporção (9:1) e da fase oleosa (MIP), levando-os para um ciclo de

agitação no desruptor de células ultrassônico (sonicador) (Modelo USC- 1800, Unique, Brasil) durante um minuto, seguido de um minuto na lavadora ultrassônica (Modelo USC - 5000, Unique, Brasil). Logo após, realizou-se a incorporação da percentagem o óleo essencial na fase oleosa, submetendo a mistura a um ciclo de sonicação e banho de ultrassom por de um minuto. Posteriormente, o volume correspondente de água para as formulações foi adicionado. Por fim, houve três ciclos de sonicação, com banho de gelo durante o processo de sonicação e seguido de banho de ultrassom para retirada do excesso de bolhas de ar por um minuto (BONIFÁCIO et al., 2015). As amostras foram acondicionadas à temperatura ambiente por 24 horas até sua utilização para iniciar os testes de caracterização.

#### **4.2.5 Aspecto macroscópico das MEs**

Os aspectos macroscópicos das formulações foram analisados através da observação visual. Fotografias foram retiradas após 48 horas de preparação, a fim de verificar modificações nas características das formulações, como cor, homogeneidade, transição de sistema transparente para semitransparente ou opaco (DAMASCENO, 2010).

#### **4.2.6 Centrifugação**

No teste de centrifugação, 1,0 mL de cada formulação foi acondicionada em microtubos do tipo Eppendorf e submetidos a ciclos de 13.000 rpm por 30 minutos e 60 minutos, à temperatura ambiente, utilizando uma microcentrífuga de bancada (Modelo 108, Nova Instruments, Brasil). A metodologia seguiu a BRASIL (2008), adaptada de sistemas cosméticos.

#### **4.2.7 Caracterização físico-química das MEs**

##### *4.2.7.1 Determinação do pH*

O pH da formulação foi mensurado utilizando pHmetro digital modelo mPA210 (Tecnoyon Brasil), com eletrodo e sensor de temperatura previamente calibrado com solução tampão 4,0 e 7,0, à temperatura de  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O eletrodo foi introduzido diretamente em um volume de 10 mL da formulação.

##### *4.2.7.2 Condutividade Elétrica*

A condutividade elétrica da formulação foi avaliada por meio de condutivímetro digital modelo mCA 150 (Tecnoyon, Brasil), previamente calibrado com solução de

calibração apresentando condutância de  $146,9 \mu\text{S cm}^{-1}$  à temperatura de  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . O eletrodo foi introduzido diretamente em um volume de 10 mL da formulação.

#### **4.2.8 Avaliação da atividade cicatrizante e antimicrobiana de MEs contendo o OEA.**

##### *4.2.8.1 Animais*

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas pesando entre 25 e 35 g provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/PB. Estes animais foram mantidos com temperatura ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e umidade (60-80%) controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. 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.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e normas e considerações éticas aprovadas pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/PB (FCM/CESED) com número de protocolo:0076022022018 (ANEXO 1).

##### *4.2.8.2 Feridas cutâneas*

Para a realização das feridas cutâneas experimentais os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de solução contendo cetamina 100 mg/kg e xilazina 0,05 mg/kg. Procedeu-se com a tricotomia de uma área de aproximadamente  $16 \text{ cm}^2$  da região dorsal de cada animal, antissepsia local com clorexidina 4%, e, finalmente, foi feita duas excisões circulares de pele com *punch* dermatológico estéril para biopsia de 7 mm de diâmetro (uma de cada lado da linha mediana longitudinal do dorso), retirando os fragmentos da pele e deixando exposto o *panniculus carnosus* (LOWE et al., 2001; FRANK; KÄMPFER, 2003; LEE; LI; HUANG, 2003; WANG et al., 2013; WEINHEIMER-HAUS; MIRZA; KOH, 2015; CIARLILLO et al., 2017).

##### *4.2.8.2 Grupos e tratamentos*

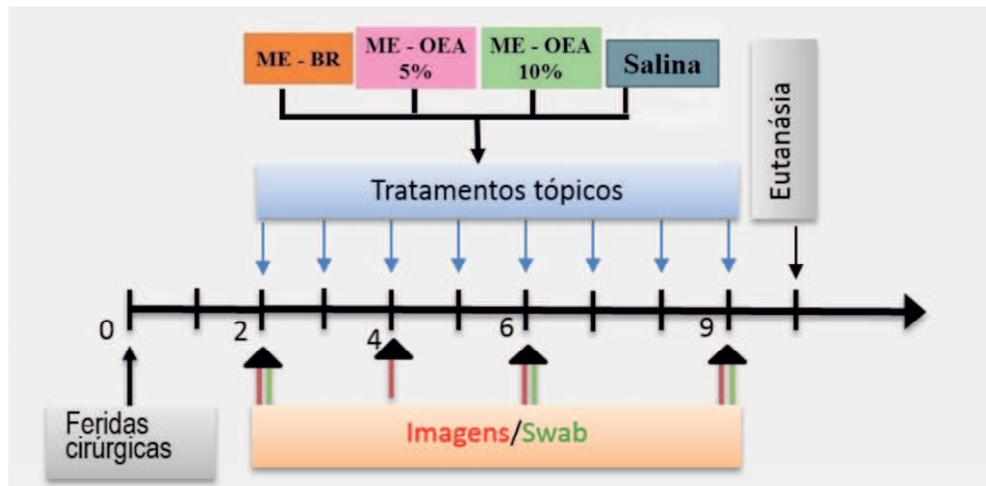
Os animais experimentais foram divididos em 5 grupos, contendo 6 animais cada. Os tratamentos tópicos foram aplicados diariamente (uma vez ao dia) a partir do dia 2 após a realização das feridas cutâneas (o dia da realização da ferida foi considerado o dia 0) até o dia 9, conforme o protocolo desenvolvido para o teste *in vivo* (Figura 6). Nos dias 2, 4, 6 e 9, foram obtidas as fotografias (para auxiliar a avaliação clínica, e realização da avaliação morfométrica das feridas) e nos dias 2, 6 e 9 coletadas amostras das áreas das lesões com o

auxílio de *swabs* (usados para a análise microbiológica das feridas). Procedeu-se com uma rápida limpeza prévia, com o uso de salina estéril 0,9%, nas feridas e aplicação tópica dos diferentes tratamentos de acordo com cada grupo experimental como descritos abaixo:

- G1 (controle negativo): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 µl de solução salina estéril 0,9%;
- G2 (controle microemulsão): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 µg da microemulsão branca (sem conter o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius raddi*);
- G3 (tratamento 1 microemulsão): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 µg da microemulsão contendo o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius raddi* 5%;
- G4 (tratamento 2 microemulsão): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 µg da microemulsão contendo o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius raddi* 10%;

Foi realizada a eutanásia em todos os animais através de anestesia inalatória profunda (halotano 3%) seguida de deslocamento cervical (CFMV, 2012).

Figura 6 - Protocolo desenvolvido para o teste *in vivo*.



Fonte: BORGES,2018.

## 4.2.9 Avaliação das feridas cutâneas

### 4.2.9.1 Aspectos clínicos das feridas cutâneas

Para a avaliação da evolução dos aspectos clínicos da cicatrização das feridas foi feita análise macroscópica, observando-se os sinais flogísticos: edema, hiperemia, formação de crosta e exsudato nos dias 2, 4, 6 e 9 após a realização das feridas cirúrgicas (GUPTA et al., 2015).

#### 4.2.9.2 *Análise morfométrica das feridas cutâneas*

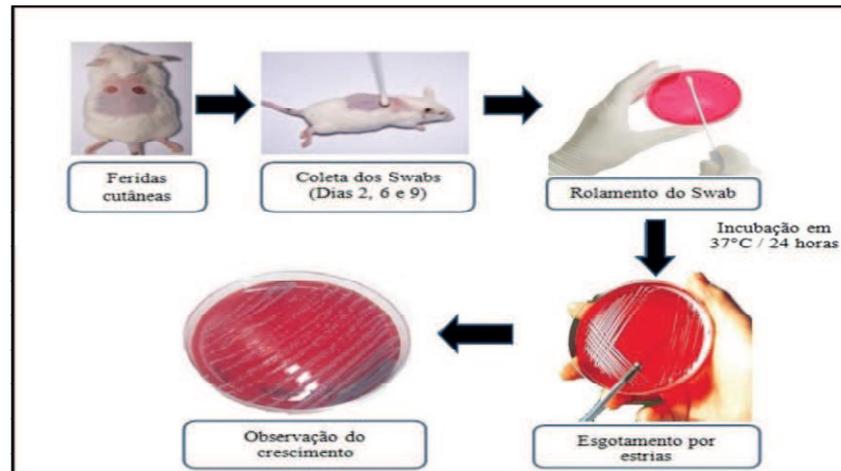
Foram obtidas imagens das feridas nos dias 2, 4, 6 e 9 após a realização da lesão, com o auxílio de uma câmera fotográfica digital (Nikon® D5300 24,2 MP + lente Tamron® 16-300mm F/3,5-6,3 Di II VC PZD MACRO) à uma distância fixa de 15 cm do objeto. As imagens em alta definição das feridas foram obtidas juntamente com a imagem de uma escala graduada mantida ao lado da ferida, o que permitiu realizar a mensuração das áreas das lesões (mm<sup>2</sup>), em cada tempo experimental utilizou-se o software ImageJ® 1.51j8 (disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>) (TANG et al., 2014; KOLUMAM et al., 2017). Foi obtida a área residual de cada ferida através da equação abaixo (IMMONEN; ZAGON; MCLAUGHLIN, 2014; TANG et al., 2014):

$$\text{Área residual da ferida} = \frac{\text{área atual da ferida}}{\text{área do dia 2}} \times 100$$

#### 4.2.10 **Análise microbiológica das feridas cutâneas**

Para análise dos micro-organismos presentes nas feridas cutâneas foram coletadas amostras das áreas das feridas em três animais do grupo G2 e do G4 nos dias 2, 6 e 9, sendo empregados para coleta *swabs* estéreis em meio de transporte Stuart. Após a coleta, as amostras foram levadas para o laboratório de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba (LAC-UEPB). Colocou-se os *swabs* em caldo BHI por 24 horas com a intenção de aumentar a multiplicação das bactérias favorecendo assim, para uma melhor identificação posteriormente das bactérias. Após essas 24 horas realizou-se o repique das amostras que estavam no caldo BHI em meios de cultura, realizando o esgotamento por estrias-em placas de Petri contendo quatro meios de cultura, com intuito de isolar as bactérias a serem identificadas, sendo eles: Ágar Sangue, Agar CLED, Ágar MacConkey, Ágar EMB e Ágar Mueller-Hinton. Estas foram incubadas a 37 °C por 24 horas (Figura 7).

Figura 7 – Protocolo desenvolvido para análise da atividade antimicrobiana *in vitro*.



Fonte: BORGES,2018.

Após a incubação das placas, verificou-se as características das colônias, determinando-as como Gram-positivas ou Gram-negativas, bem como o crescimento microbiológico e as características morfológicas das colônias em cada meio de cultura, conforme mostrado na Figura 7. Em seguida, realizou-se os testes de catalase, coagulase e os teste de identificação, onde estes se encontravam em tubos de vidro, sendo: TSI (picada até o final e estria por cima), SIM (picada até 2/3), LIA (duas picadas até o final e estria por cima), citrato (traço na superfície) e ureia (estria por cima). A semeadura desses meios foi realizada, sendo, em seguida, colocada em estufa a 37 °C por 24 h.

#### 4.2.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  EPM. Análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Neuman-Keuls, foram utilizados para comparação entre os grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção da ME utilizando o diagrama de fase pseudoternário (DFPT)

Para o desenvolvimento de MEs, geralmente é empregado o método da construção do DFPT. A ferramenta do DFPT se mostra simples e bastante reprodutível para o preparo de ME. Fornece uma representação gráfica dos domínios de regiões de ME e as proporções de água, tensoativos e óleo ideais para uma formulação desejada. Além disso, características e aplicações dos componentes que formam o DFPT são de grande importância para a obtenção das MEs desejadas. Dessa forma, a capacidade de irritação na pele dos componentes que formam o DFPT foi adotado como critério na seleção do ponto no DFPT em estudo (CAVALCANTI et al., 2016; NEVES et al., 2018; REIS et al., 2017).

Diversos estudos na literatura citam o MIP como componente da fase oleosa no desenvolvimento de MEs para liberação de fármacos, principalmente para administração nas vias tópicas e transdérmicas por aumentar o efeito de permeabilidade dos fármacos (SHUKLA et al., 2018). JUNG e colaboradores (2013) estudaram o efeito de promotores de permeação transdérmica na liberação de fluoxetina. Os resultados obtidos demonstraram que o MIP promoveu aumento significativo da liberação de fluoxetina pelas as camadas da pele (JUNG et al., 2013).

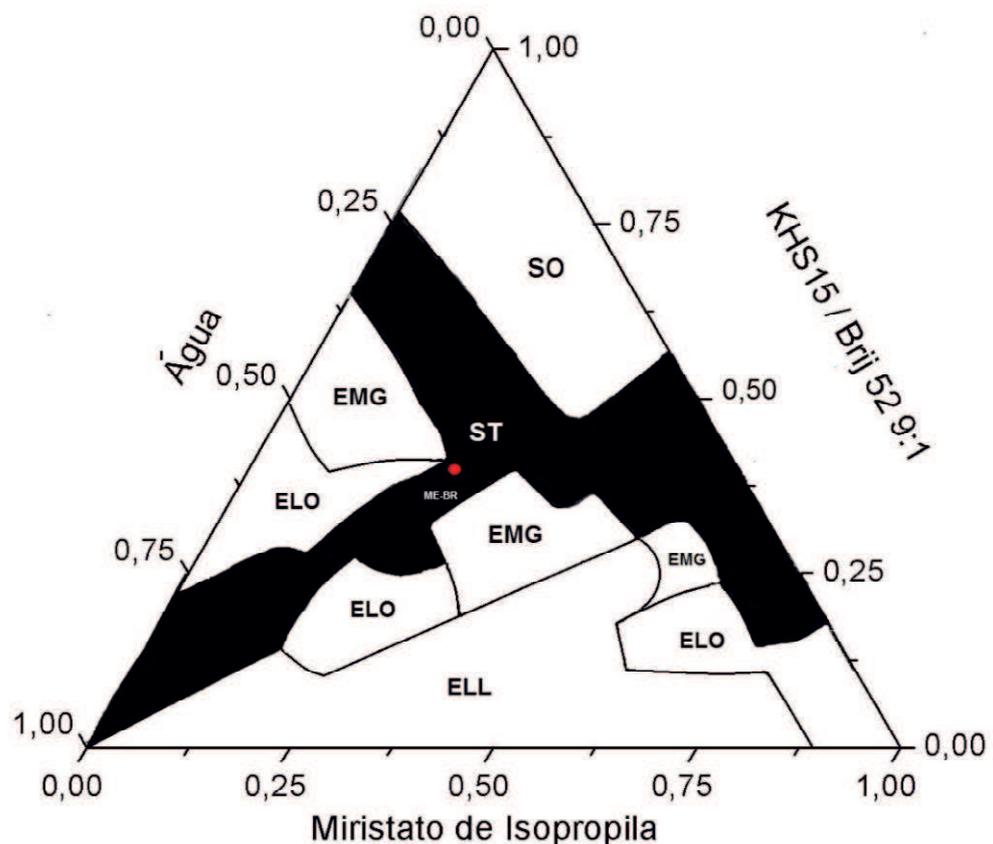
Os tensoativos são substâncias caracterizadas pela presença em suas estruturas moleculares de uma região polar e outra apolar (BILLANY, 2005). Dentre as classes de tensoativos, os não-iônicos mostram vantagens particulares devido a suas baixas toxicidade e irritabilidade cutânea, conseqüentemente, vem sendo utilizados em preparações de formulações para veiculação tópica e transdérmica. Além disso, possuem uma menor capacidade de promover irritação ou hemólise em superfície celulares e são menos sensíveis às alterações de pH quando utilizado como agente solubilizante (MAHALE et al, 2012; KUMAR & RAJESHWARRAO, 2011).

Dentre os tensoativos não-iônicos, o KHS15 é um tensoativo não-iônico hidrossolúvel usado para o desenvolvimento de MEs (ZHANG; WANG; LIU, 2016). Estudos relatam que sistemas de micelas compostas pelo KHS15 garantiram uma maior estabilidade para o sistema e uma maior eficácia na liberação de fármacos pouco solúveis (LIU et al., 2015). As moléculas Brij<sup>®</sup> também são tensoativos não-iônicos, conhecidos como promotores de permeação e utilizados em sistemas microemulsionados com ação anti-inflamatória (CAVALCANTI et al., 2016). Foram realizados testes de formulações para incorporação de fármacos preparadas com classes dos Brij<sup>®</sup>, dentre eles, o Brij<sup>®</sup> 52,

em que se avaliou *in vivo* um modelo de lesão oxidativa cutânea. Após a aplicação tópica, uma diferença significativa no tamanho da lesão foi observada, aumento da estabilidade do fármaco e demonstrou ser promissor em lesões oxidativa na pele (ABDEL-MAGEED et al., 2018).

Dessa forma, pelos componentes atenderem todas essas necessidades, o DFPT (figura 8) construído pela mistura de KHS15 e Brij® 52 (9:1), MIP e água destilada foi escolhido para esse estudo. Ao analisar o diagrama em estudo, pode ser identificado diversos estados de transição: sistema opaco - SO; emulsão líquida opaca -ELO; emulsão líquida leitosa - ELL; emulgel - EMG e Sistema Transparente – ST. Com destaque para uma grande região de ST, indicada em negrito, caracterizada pela obtenção de sistemas homogêneos, límpidos e translúcidos (ARAÚJO,2013).

Figura 8 - Diagrama de fase pseudoternário do sistema contendo KHS15/Brij® 52 (9:1), miristato de isopropila e água destilada.



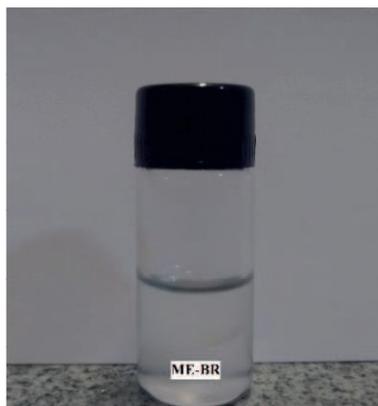
Legenda: SO – sistema opaco; ELO – emulsão líquida opaca; ELL – emulsão líquida leitosa; EMG – emulgel; ST – Sistema Transparente; ● ME-BR- Microemulsão branca.

Fonte: ARAÚJO,2013.

## 5.2 Seleção da formulação e incorporação do OEA

A formulação escolhida (Figura 9) apresentou um aspecto de um gel, bastante viscoso, límpido e transparente, sendo essas características macroscópicas esperadas de sistemas microemulsionados bicontínuos (Kogan et al., 2009). A formulação se manteve estável mesmo após um período de 48 horas.

Figura 9 - Aspecto visual da amostra selecionada.



Fonte: BORGES,2018.

A tabela 2 mostra as proporções percentuais dos componentes da ME sem o OEA (ME-BR). A escolha da composição e da concentração dos componentes da ME é de extrema importância. Para uma melhor solubilidade dos ativos na fase oleosa, sugere-se utilizar tanto óleos de origem natural quanto sintética ou uma mistura destes, variando a concentração desta fase entre 5 e 30% (SHAH et al., 2010). Em relação a concentração dos tensoativos, MEs com a concentração de tensoativo dentro do intervalo de até 40%, se mostram um sistema promissor para a administração cutânea, pois em concentrações maiores podem causar irritação (OYAFUSO et al., 2015). Neste sentido, optou-se em selecionar o ponto do diagrama composto por 37,5% de KHS15 e Brij<sup>®</sup> 52 na proporção 9:1, 25% de MIP e 37,5% da fase aquosa (água destilada).

Tabela 2 – Composições percentuais da formulação da ME-BR, ME-OEA 5% e ME-OEA 10%.

FORMULAÇÃO	COMPONENTES (%)				
	Kolliphor® HS15	Brij® 52	Miristato de isopropila	Água destilada	Óleo Essencial de Aroeira
<b>ME-BR</b>	33,3	4,2	25,0	37,5	----
<b>MEOEA 5%</b>	33,3	4,2	23,75	37,5	1,25
<b>MEOEA 10%</b>	33,3	4,2	22,5	37,5	2,5

Fonte: BORGES,2018.

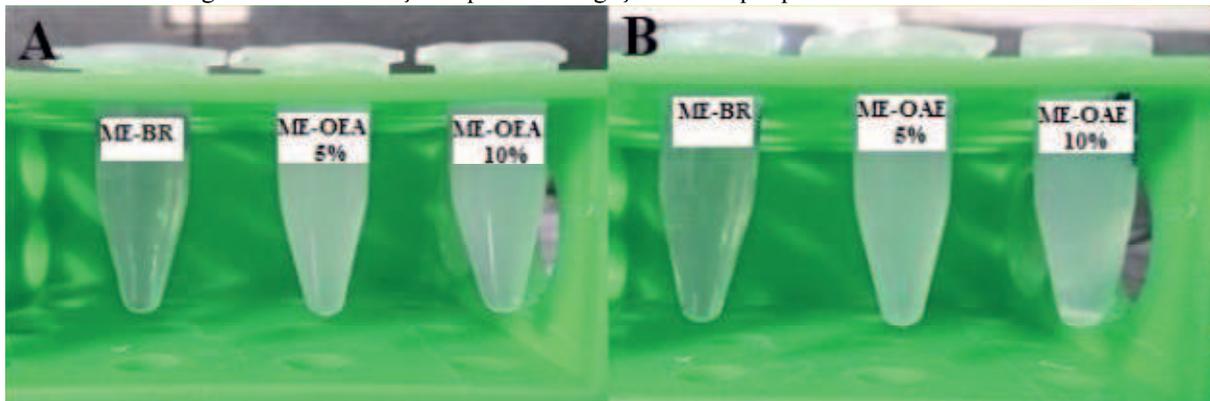
A incorporação do OEA a 5% e 10% da fase oleosa do sistema, foi baseada nos estudos realizados por Estevão et al. (2013) e Estevão et al. (2017), que relataram efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes da aplicação tópica de uma pomada contendo o OEA na concentração de 5% e 10% (v/v). Dessa forma, optou-se pela incorporação do OEA a concentrações de 5% a 10% (v/v) (Figura 10). A tabela 2 mostra as proporções percentuais da ME contendo 5% do OEA na fase oleosa (ME-OEA 5%) e a ME contendo 10% do OEA na fase oleosa (ME-OEA 10%). Sendo essa incorporação do OEA nessas concentrações inéditas para sistemas microemulsionados.

### 5.3 Centrifugação

A centrifugação gera um estresse na amostra, fazendo uma simulação do aumento na força gravitacional, aumentando, conseqüentemente, a mobilidade das partículas e prevendo possíveis instabilidades (Faria et al., 2012). Segundo a BRASIL (2008), formulações devem permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação.

Todas as formulações submetidas ao teste de centrifugação nas rotações de 13000 rpm por 30 e 60 min permaneceram estáveis, sem evidências de separação de fases ao final do teste, como observado na Figura 10.

Figura 10 – Formulações após centrifugação 13000rpm por 30min e 60 min.



Fonte: BORGES,2018.

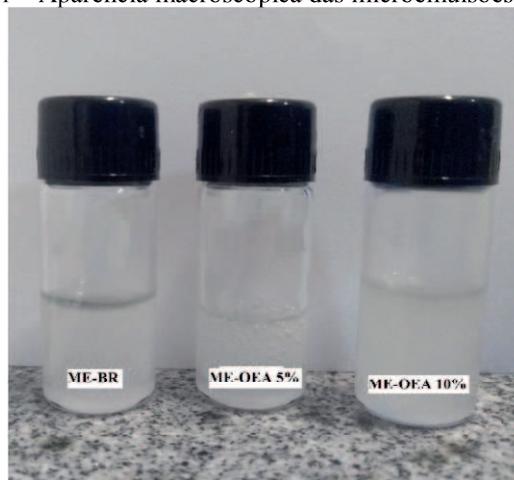
Legenda: A: Formulações após centrifugação 13000rpm por 30min. B: Formulações após centrifugação 13000rpm por 60 min.

Esses resultados do teste de centrifugação, mostram que as MEs em estudo permanecem estáveis e sem separação de fase e que a incorporação do óleo essencial no sistema foi adequada e não causou alterações em sua estabilidade.

#### 5.4 Caracterização físico-química da formulação

Em relação à análise macroscópica após 48 h de preparação, as ME-BR, MEOEA 5% e MEOEA 10% apresentaram características de um gel límpido, viscoso, homogêneo e de fácil espalhabilidade (Figura 11). Vale salientar que a incorporação do OEA provocou uma pequena alteração na viscosidade do sistema, que pode ser explicado pela menor concentração percentual da fase oleosa (MIP) no sistema para a incorporação do OEA, principalmente, na ME com 10% do OEA.

Figura 11 – Aparência macroscópica das microemulsões.



Fonte: BORGES,2018.

O pH é um dos parâmetros mais importantes para a caracterização físico-química de uma formulação quando se destina a formulação para aplicação tópica. A faixa aceitável para aplicações biológicas de produtos cutâneos estão entre 5,5 e 8,0 (BRUXEL et al., 2012). Esse parâmetro deve ser levado em conta para se evitar possíveis irritações no momento de aplicação. Além disso, um pH adequado reflete em uma boa estabilidade para o produto (ROLIM, 2016). A tabela 3 mostra os resultados do pH das três microemulsões em estudo, os valores encontrados estão dentro da faixa de aceitação para aplicação biológica.

Tabela 3 – Características físico-químicas das microemulsões ME-BR, ME-OEA 5% e ME-OEA 10%

<b>AMOSTRAS</b>	<b>pH ± DP*</b>	<b>Condutividade ± DP*</b> <b>(µS/cm)</b>
<b>ME-BR</b>	6,49±0,08	96,48±1,19
<b>MEOEA 5%</b>	6,54±0,08	92,16±1,13
<b>MEOEA 10%</b>	6,55±0,08	72,60±0,89
<b>OEA</b>		0,18±0,006

\*Média ± Desvio padrão, n=3

Fonte: BORGES,2018.

Através da condutividade elétrica podemos caracterizar o tipo de estrutura formada nas MEs (BUMAJDAD; EASTOE, 2004). A porcentagem da fase aquosa (37,5% ) nas formulações de pode ter refletido nos valores de condutividade elétrica encontrados para as MEs em estudo (Tabela 3), podendo, juntamente com a viscosidade dos sistemas, indicar a formação de estruturas bicontínuas. Segundo Kogan et al (2009), os sistemas com 25-65% de fase aquosa, é um indicativo que estruturas bicontínuas são formadas. Comparando a condutividade elétrica da ME-BR com as MEOEA 5%, pode-se notar que houve uma diminuição dos valores de condutividade nas MEs com o OEA. Se observa uma diferença expressiva entre os valores de ME-BR e MEOEA 10%. Esse fato pode ser justificado pela maior concentração do OEA (10%) incorporado na ME, visto que óleo puro apresentou um valor de condutividade elétrica bem baixo. (0,18 µS/cm).

## **5.5 Avaliação da atividade cicatrizante de MEs contendo o OEA**

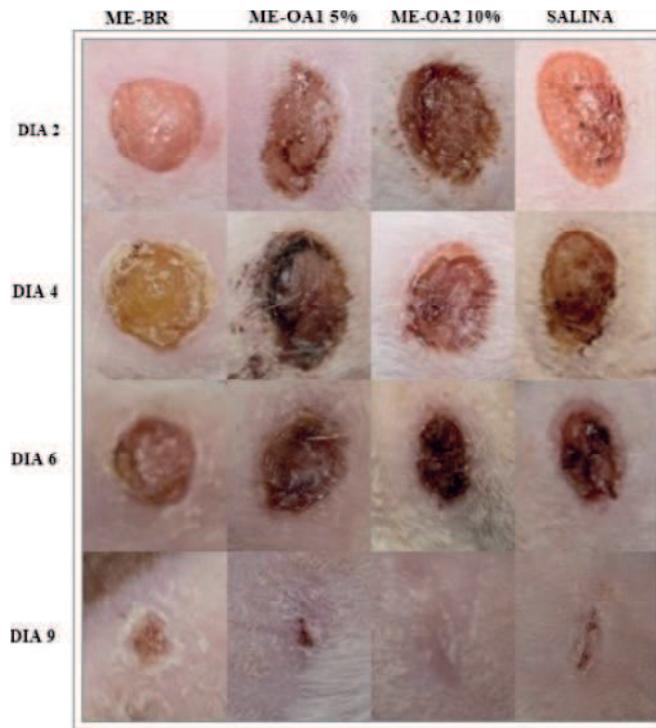
### **5.5.1 Aspectos clínicos das feridas cutâneas**

Quanto ao aspecto macroscópico das feridas (Figura 12), foi observado que os grupos analisados apresentaram hiperemia branda, exsudato partir do 4º dia e formação de crostas de coloração marrom escuro aderida à lesão, porém uma redução do tamanho da ferida é observada no grupo ME-OEA 10%. Já os grupos ME-BR e ME-OEA 5% mostraram formação de crostas mais evidente e com consequente aumento do tamanho da ferida.

Já no 6º dia, foi observada uma diminuição da área das feridas em todos os grupos com diminuição de crostas, especialmente para os grupos tratados com as ME-OEA 10% e solução salina.

Ao 9º dia de análise, apenas o grupo tratado com a ME-OEA 10% apresentou o fechamento total da lesão (Figura 12). O grupo tratado com ME-OEA 5% apresenta uma pequena lesão, enquanto o grupo ME-BR ainda apresentou uma lesão aberta. Esse resultado evidencia o poder cicatrizante do OEA. (ESTEVÃO et al., 2017).

Figura 12- Aspectos macroscópicos das feridas nos dias analisados



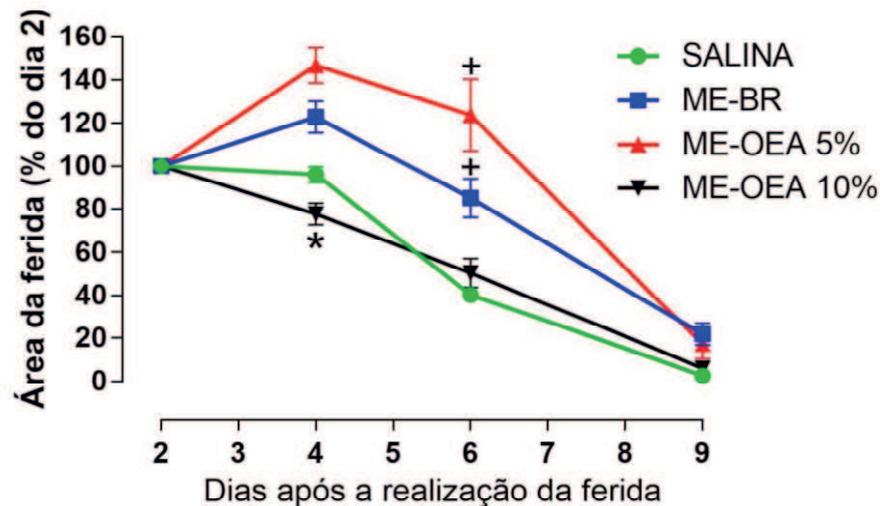
Fonte: BORGES,2018.

### 5.5.2 Análise morfométrica das feridas cutâneas

Na figura 13 podemos observar, por meio da análise morfométrica, as diferenças entre os tratamentos aplicados. No 4º dia após a lesão foi possível observar que o grupo tratado com ME-OEA 10% foi o único que apresentou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da área da ferida, de 100 % para  $77,7 \pm 5,1\%$  em relação aos outros grupos de tratamento. Nota-se que no dia 4, o tratamento da ME-BR e ME-OEA 5% apresentou um efeito deletério, uma vez, que aumentou o tamanho da área da ferida para  $123 \pm 7,3\%$ ,  $146,8 \pm 8,2\%$ , respectivamente. O aumento da ferida pode ter ocorrido, principalmente, pela maior formação de crostas e aspecto com bordas mais volumosas (Figura 12). Resultados semelhantes foram observados

na avaliação da ferida utilizando uma pomada contendo o OEA a 5%, em que a área da ferida aumentou e ocorreu a formação de crostas, interferindo na redução do halo da ferida, fato que só ocorreu a partir do 7º dia de tratamento (ESTEVÃO et al., 2015).

Figura 13: Avaliação do tamanho das feridas cutâneas em relação ao dia 2 após a lesão.



\* $p < 0,05$ , diferente de todos os outros grupos; + $p < 0,05$  diferente dos grupos Salina e MEOEA 10%; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

Fonte: BORGES, 2018..

Esses dados demonstram que para a redução da área da ferida é necessária uma concentração maior do OEA, visto que a ME-OEA 10% apresentou esse efeito a partir do 4º dia após a lesão. Pode-se atribuir esse efeito farmacológico a presença de uma grande quantidade de monoterpenos presentes no OEA.

No 6º dia após a lesão, os grupos tratados de ME-OEA 10% e solução salina apresentaram efeito na redução do tamanho da ferida, sem diferença significativa. Acredita-se que esse efeito do OEA se dá pelo aumento o número de mastócitos, diminuição do acúmulo de leucócitos de feridas e dos marcadores de inflamação como TNF- $\alpha$ , CXCL-1 e CCL-2, ativação da proliferação de fibroblastos e de células epiteliais e aumento na deposição de colágeno (ESTEVÃO et al., 2015, 2017).

Em relação ao processo de cicatrização no 9º dia, foi possível observar que as feridas estavam pequenas, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o grupo tratados com ME-OEA 10%. Esses resultados corroboram com os obtidos por ASSIS (2017), onde se avaliou a cicatrização de uma microemulsão bicontínua com o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

Ao 9º dia de tratamento a ME com 3,45% do óleo exibiu um melhor efeito terapêutico em comparação com tratamentos controles.

As feridas cutâneas cicatrizam completamente, normalmente entre 12-16 dias, dependendo de sua gravidade (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Dessa forma, os resultados do presente estudo mostraram que os tratamentos utilizados aceleraram o processo de cicatrização de feridas em camundongos.

### 5.6 Análise microbiológica das feridas cutâneas

As bactérias identificadas nas amostras e agrupadas de acordo com o dia de coleta de swabs podem ser observadas na tabela 4. No 2º dia de coleta, foi observado o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* no grupo ME – BR e, além dessas, *Enterobacter aerogenes* no grupo MEOEA 10%.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana para ME-BR e ME-OEA 10% durante o processo de cicatrização.

Amostra	Coleta de Swabs Dia 2	Coleta de Swabs Dia 6	Coleta de Swabs Dia 9
ME – BR	<i>S. aureus/ E. coli/ P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus/ E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
MEOEA 10%	<i>S. aureus/E. coli/ E. aerogenes/P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus/ E.coli</i>	<i>S. aureus/ E.coli</i>

Fonte: BORGES,2018.

Identificou-se a presença de bactérias Gram-negativas de *E. coli* e *E. aerogenes* que fazem parte da microflora normal intestinal (PRAXEDES et al., 2012). Conseqüentemente, pode-se pressupor que houve infecção das feridas por estas bactérias devido ao contato dos camundongos com o ambiente contaminado por suas fezes.

No 6º dia, observou-se crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, no grupo ME - OEA 10%, ressaltando, que a partir do 6º dia de tratamento já não houve crescimento das bactérias *P. aeruginosa*, e *E. aerogenes*, o que pode indicar uma possível atividade antimicrobiana do OEA. Cole e colaboradores (2014) evidenciaram uma forte atividade antimicrobiana do OEA contra cepas de: *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Corynebacterium* sp., *S. aureus*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus* sp., *Nocardia* sp. e *Streptococcus* sp.

A *P. aeruginosa* é uma importante bactéria oportunista Gram-negativa que causa alta mortalidade em pacientes imunocomprometidos, sendo o terceiro agente de infecções hospitalares (PAPAGHEORGHE, 2012; SAMONIS et al., 2013). Os produtos naturais desempenham um papel importante no tratamento de infecções causadas pela *P. aeruginosa*, devido aos problemas terapêuticos, resistência a fármacos e alta mortalidade (MESKINI; ESMAEILI, 2018). Recentemente, no estudo de Salem e colaboradores (2018), constatou-se uma boa atividade do OEA extraído de frutos contra o crescimento de dessa bactéria com valor da concentração inibitória mínima (CIM) de 32 µg/mL. Essa atividade está relacionada com os compostos químicos, principalmente, α-pineno, D-limoneno, α-terpineol e terpinoleno.

No entanto, no 9º dia, nesse estudo observou-se a presença de *S. aureus*, em todos os grupos e a presença de *E. coli*, apenas no grupo MEOEA 10%, indicando que esse grupo de tratamento não foi capaz de inibir o crescimento da *E. coli*, destacando assim, que o tratamento com a ME – BR, foi eficaz frente a *E. coli*. Esses resultados mostram que o sistema ME-BR em estudo, possui uma atividade antimicrobiana, onde pode se sugerir, que esse efeito é responsável pela concentração da fase oleosa (MIP) dessa microemulsão (BARDHAN et al., 2014; BHARTI; KESAVAN, 2016).

Já Zhang e colaboradores (2017) demonstraram o potencial antimicrobiano de uma nanoemulsão contendo 4% de mistura de óleos essenciais de cravo-da-índia e canela (1:1) frente a *E.coli*. A atividade foi observada em comparação com a mistura de óleos pura, onde mesmo em concentrações menores incorporadas no sistema, os resultados evidenciaram a otimização da ação desses óleos quando veiculados pelo nanossistema. Bolzan e colaboradores (2015) comprovaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano em nanoemulsões frente à *Candida albicans*, *E. coli*, *Streptococcus sp*, *S. aureus*, *Salmonella enteritites* e *P.s aeruginosa*.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A utilização do DFPT composto por água destilada, MIP e KHS15/Brij<sup>®</sup> 52 (tensoativos) na proporção 9:1, foi de grande importância para identificação da região de microemulsão e seleção do ponto para a incorporação do OEA;
- A incorporação do OEA nas concentrações 5% e 10% na fase oleosa do sistema microemulsionado foi eficiente e não alterou suas características macroscópicas;
- A partir das propriedades físico-químicas foi possível classificar em sistemas de microemulsão bicontínuos e adequada à aplicação tópica;
- Por meio do teste de centrifugação foi observado que as MEs se mantiveram estáveis e sem separações de fases;
- Na análise *in vivo*, a MEOEA 10% mostrou um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) no processo de cicatrização de feridas cutâneas a partir do 4º dia de estudo, além de demonstrar atividade antimicrobiana frente a *E. aerogenes* e *P. aeruginosa*;
- Os resultados demonstram que a ME contendo o OEA desempenha bons efeitos na cicatrização e infecções microbianas de feridas. Vale ressaltar, que análises histológicas serão conduzidas para uma melhor avaliação da cicatrização da utilização do sistema microemulsionados em estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAGEED, H. M.; FAHMY, A. S.; SHAKER, D. S. MOHAMED, S. A. Development of novel delivery system for nanoencapsulation of catalase: formulation, characterization, and in vivo evaluation using oxidative skin injury model. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnologym**, p.1-10, 2018.
- AGRO LINK. **Aroeirinha**. 2017. Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/problemas/aroerinha\\_1354.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/aroerinha_1354.html)>. Acesso em: 11 nov. 2018.
- AKASAKA, Y; ONO, I; YAMASHITA, T; JIMBOW, K; ISHII, T. Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds. **J Pathol**, 203:710–20, 2004.
- ALEXANDER, A.; S. DWIVEDI, T.K.; AJAZUDDIN; GIRI, S.; SARAF, S.; TRIPATHI, D. K. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery, **J. Control Release**, 164, 1, 26–40, 2012.
- ALMEIDA LS. **Avaliação Morfológica de mudas de *Allophylus edulis* (A. ST. (A. ST.-HIL., A. JUSS. & CAMBESS.) RADL. (Vacum) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) produzidas em diferentes substratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. p. 105. 2005.
- ARAÚJO, F. A.; KELMANN, R. G.; ARAÚJO, B. V.; FINATTO, R.B.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 238-245, 2011.
- ARAÚJO, Gabriela Muniz Felix. **Nanoemulsões de Anfotericina B: Desenvolvimento, Caracterização e Atividade Leishmanicida**. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
- ASSIS, Karoll Moangella Andrade de. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO MICROEMULSÕES CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA**. 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

AZEVEDO, C.F; QUIRINO, Z.G.M.; BRUNO, R.L.A. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p.26-35, mar. 2015.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARDHAN, S.; KUNDU, K.; DAS, S.; PODDAR, M.; SAHA, S.K.; PAUL, B.K.; Formation, thermodynamic properties, microstructures and antimicrobial activity of mixed cationic/non-ionic surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 430, p.129-139, 2014.

BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUJILA, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of Schinus Molle L. and Schinus Terebinthifolius Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, v.75, n.6, p.466-472, 2010.

BHARTI, Shanni Kant; KESAVAN, Karthikeyan. Phase-transition W/O Microemulsions for Ocular Delivery: Evaluation of Antibacterial Activity in the Treatment of Bacterial Keratitis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 25, n. 4, p.463-474, 2016.

BHATT, A.; BISHT, P.; TYAGI, S. Novel drug delivery system-nanoemulsions: a recent review. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 27-35, 2013.

BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.23, p. 353-356.

BOLZAN, A. A.; LOPES, L. Q.; MARIN, L. S.; SANTOS, R. C. V.; RAFFIN, R.; FAGAN, S. B.; BULHÕES, L. O. S. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo de orégano livre e em nanoemulsões. **Disciplinarum Scientia. Série: Naturais e Tecnológicas**, Santa Maria, v. 16, n. 2, p. 325-332, 2015.

BONIFÁCIO, B. V.; DOS SANTOS, R. M.; RAMOS, A. S.; DA SILVA, P. B.; NEGRI, K. M. S.; LOPES, E. O.; DE SOUZA, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; BAUAB T. M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-Candida albicans activity of Astronium sp. **International Journal Of Nanomedicine**, p.5081-92, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Gerência Geral de Cosméticos. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. Brasília: ANVISA, 2008.

BUMAJDAD, Ali; EASTOE, Julian. Conductivity of mixed surfactant water-in-oil microemulsions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 7, p.1597-1602, 2004.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CARVALHO, D. Pele – abordagem cosmetológica. **Cosmet toiletries**, 22: 30, 2010.

CAVALCANTI, A. L.; REIS, M. Y.; SILVA, G. C.; RAMALHO, Í. M.; GUIMARÃES, G. P.; SILVA, J. A.; SARAIVA, K. L. A.; DAMASCENO, B. P. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: In vitro release and in vivo evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 506, n. 1, p. 351-360, 2016.

CFMV. **Resolução N° 1000/2012: Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências**: secondary title. Brasília-DF: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012.

CHAIYANA, W.; ANUCHAPREEDA, S.; LEELAPORNPID, P.; PHONGPRADIST, R.; VIERNSTEIN, H.; MUELLER, M. Development of Microemulsion Delivery System of Essential Oil from Zingiber cassumunar Roxb. Rhizome for Improvement of Stability and Anti-Inflammatory Activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n.4, p. 1332–1342, 2017.

CIARLILLO, D.; CELESTE, C.; CARMELIET, P.; BOERBOOM, D.; THEORET, C. A hypoxia response element in the Vegfa promoter is required for basal Vegfa expression in skin and for optimal granulation tissue formation during wound healing in mice. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0180586, 2017.

COLE, E.R.; SANTOS, R.B.; JÚNIOR, V. L.; MARTINS, J.D.L.; GRECO, S.J.; CUNHANETO, A. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of Schinus terebinthifolius Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 45, p.821-828, 2014.

COOPER, S. The biology of the skin. **J. R. Soc. Med**, 95, p. 109-109, 2002.

DAMASCENO, B. P. G. L. **Sistemas microemulsionados como carreador lipídico para fármacos insolúveis**. 59f. 2010. Tese (Doutor em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

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, n.1, p. 9-18, 2011.

DANNENBERG, G, S; Funck, G.D. F; Silva, W. P; Fiorentini, A M. Fiorentini Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, v. 95, p.115-120, 2019.

DEGÁSPARI, C. H. Propriedades Antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI). Curitiba - Paraná: Universidade Federal do Paraná; 2004.

DESMOULIERE, A; REDARD. M; DARBY, I; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **Am J Pathol**, 146:56–66, 1995.

DONNELLY R.F; SINGH, T.R.R; WOOLFSON, A.D. Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety. **Drug deliv**, 17(4): 187-207, 2010.

DONSÍ, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsionbased delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342-350, 2012.

ELSHAFIE, H. S.; GHANNEY, N.; MANG, S. M; FERCHICHI, A.; CAMELE, I. An In Vitro Attempt for Controlling Severe Phytopathogens and Human Pathogens Using Essential Oils from Mediterranean Plants of genus *Schinus*. **Journal Of Medicinal Food**, v. 19, n. 3, p.266-273, mar. 2016.

EMING, S.A; KRIEG, T; DAVIDSON, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol**, 127:514–25, 2007.

ENNIGROU, A.; CASABIANCA, H.; LAARIFC, A.; HANCHID, B.; HOSNI, K. Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 407-415, 2016.

ESTEVIÃO, L. R. M. MEDEIROS, J.P.; SIMÕES, R. S.; ARANTES, R. M. E.; RACHID, M. A.; SILVA, R. M. G.; MENDONÇA, F. S. EVÊNCIO-NETO, J. Mast cell concentration and

skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 4, p.289-295, 2015.

ESTEVÃO, L. R. M.; SIMÕES, R. S.; CASSINI-VIEIRA, P.; CANESSO, M. C. C.; BARCELOS, L. S.; RACHID, M. A.; DA CÂMARA, C. A. G.; EVÊNCIO-NETO, J. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) leaves oil attenuates inflammatory responses in cutaneous wound healing in mice. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, n. 9, p.726-735, set. 2017.

ESTEVÃO, L.G.M.; MENDONÇA, F.S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R.S.; BARROS, M.E.G.; ARANTES, R.M.E.; RACHID, M.A.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.23, n.3, p.202-208, 2013.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet**, 366:1736–43, 2005.

FARIA, A. B.; PERES, D. D.; VLADI, T. M. K.; CONSIGLIERI, O.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos para a higiene capilar contendo tensoativos “não-sulfatados”. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n.4, p. 521 – 527, 2012.

FEDEL-MIYASATO, L. E.S.; KASSUYA, C. A.L.; AUHAREK, S. A.; FORMAGIO, A. S.N.F.; CARDOSO, C. A.L.; MAURO, M. O. ; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. J. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 5, p.565-575, 2014.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drug through the skin: challenges in delivery system design. **PSTT**, 3(12): 417-25, 2008.

FRANK, S.; KÄMPFER, H. Excisional Wound Healing. In: Dipietro, L. A. e Burns, A. L. (Ed.). **Wound Healing: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2003, p.3-15.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v.6, n.1, p.43-56, 2011.

GILROY, D.W; LAWRENCE, T; PERRETTI, M; ROSSI, A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, 3:401–16, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GREAVES NS, ASHCROFT KJ, BAGUNEID M, BAYAT A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **J Dermatol Sci**, 72:206-17, 2013.

GUPTA, M.; POONAWALA, T.; FAROOQUI, M.; ERICSON, M. E.; GUPTA, K. Topical fentanyl stimulates healing of ischemic wounds in diabetic rats. **J Diabetes**, v.7, n. 4, p. 573-583, 2015.

HAMDAN, S.; PASTAR, I.; DRAKULICH, S.; DIKICI, E.; TOMIC-CANIC, M.; DEO, S.; DAUNERT, S. Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. **Acs Central Science**, v.3, n. 3, p.163-175, 2017.

IMMONEN, J. A.; ZAGON, I. S.; MCLAUGHLIN, P. J. Topical Naltrexone as Treatment for Type 2 Diabetic Cutaneous Wounds. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 3, n. 6, p. 419-427, 2014.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: Cicatrização fisiológica. **Revista Médica da Universidade de São Paulo**, v.89, n.4, p.125-131, 2010.

JUNG, E.; KANG, Y.P.; YOON, I.S.; KIM, J.S.; KWON, S.W.; CHUNG, S.J.; SHIM, C.K.; KIM, D.D. Effect of permeation enhancers on transdermal delivery of fluoxetine: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 456, n. 2, p.362-369, nov. 2013.

KAVOOSI, Gholamreza; ROWSHAN, Vahid. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. **Food Chemistry**, v. 138, n. 4, p.2180-2187, 2013.

KEWKA, E.J.; NYINDO, M.; MOSHA, F.; SILVA, A.G. Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. **Parasites&Vectors**, v.4, p.1-10, 2010.

KOGAN, A.; SHALEV, D.E.; RAVIV, U.; ASERIN, A.; GARTI, N. Formation and Characterization of Ordered Bicontinuous Microemulsions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 113, p. 10669-10678, 2009.

KOLUMAM, G.; WU, X.; LEE, W. P.; HACKNEY, J. A.; ZAVALA-SOLORIO, J.; GANDHAM, V.; DANILENKO, D. M.; ARORA, P.; WANG, X.; OUYANG, W. IL-22R Ligands IL-20, IL-22, and IL-24 Promote Wound Healing in Diabetic db/db Mice. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170639, 2017.

KUMAR, G.P; RAJESHWARRAO, P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery – an overview. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 1:208–19, 2011.

LEE, J. Y.; LEE, J.; YOON, K. M.; CHOI, Y.W. Formulation of microemulsion systems for transdermal delivery of aceclofenac, **Arch. Pharm. Res**, 28 (9), 1097–1102, 2005.

LEE, P.Y.; LI, Z.; HUANG, L. Thermosensitive Hydrogel as a Tgf- $\beta$ 1 Gene Delivery Vehicle Enhances Diabetic Wound Healing. **Pharm Res**, v. 20, n. 12, p. 1995-2000, 2003.

LEONARDI, G.R. Cosmetologia Aplicada. 2ª Ed. São Paulo: Santa Isabel; 2008.

LIU, L.; MAO, K.; WANG, W.; PAN, H.; WANG, F.; YANG, M.; LIU, H. Kolliphor® HS 15 Micelles for the Delivery of Coenzyme Q10: Preparation, Characterization, and Stability. **Aaps Pharmscitech**, v. 17, n. 3, p.757-766, 2015.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Instituto Plantarum, 368, p. 4, 2002.

LOSQUADRO, William D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p.283-289, ago. 2017.

LOWE, A. S.; WALKER, M. D.; COWAN, R.; BAXTER, G. D. Therapeutic ultrasound and wound closure: lack of healing effect on x-ray irradiated wounds in murine skin. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 82, n. 11, p. 1507-1511, 2001.

MAHALE, N.B; THAKKAR, P.D; MALI, R.G; WALUNJ, D.R; CHAUDHARI, S.R. Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems – an overview. **Adv Colloid Interface Sci**, 183–4:46–54, 2012.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares. **Revista Educação Médica Continuada**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MARTORELLI, S.B.F., PINHEIRO, A.L.B., SOUZA, I.A., HIGINO, J.S., BRAVO, F. Extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) 30% em orabase. **Int. J. Dent**. 10, 80-90, 2011.

MENEGHIN, P.; VATTIMO, M. F. F. Fisiopatologia do processo cicatricial. In: JORGE, A. S.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. São Paulo: Atheneu, 348p, 2003.

MESKINI, M.; ESMAEILI, D. The study of formulated Zoush ointment against wound infection and gene expression of virulence factors *Pseudomonas aeruginosa*. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p.1-10, 2018.

MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L.C.; DEMUNER, A.J, SILVA, C.J.; ANDRADE, N.J.; ISMAIL, F.M.; BARBOSA, M.C. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 9728-9740, 2012.

NASTITI, C. M.R.R.; P, T.; ABD, E.; GRICE, J.E.; BENSON, H.A.E.; ROBERTS, M.S. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, v.9, n. 4, p.37-41, 2017.

NEVES, J. K.O. APOLINÁRIO, A. C.; SARAIVA, K. L. A.; SILVA, D. T. C.; REIS, M. Y. F. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; JR, A. P. M.; GALVÃO, A. M.; SOARES, L. A. L.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; SILVA, J. A.; CONVERTI, ATTILIO. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for  $\beta$ -caryophyllene delivery. **Industrial Crops And Products**, v. 111, p.185-192, 2018.

NUNES-JR, J.A.T.; RIBAS-FILHO, J.M.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N.G.; INÁCIO, C.M.; NEGRÃO, A.W.; LUCENA, P.L.H.; MOREIRA, H.; WAGENFUHR-JR, J.; CRUZ, J.J. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) no processo de cicatrização da linha alba de ratos. **Acta Cir. Bras.** 21, 8-15, 2006.

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G.; SANTOS, R.B.; REIS, F.O.; MATSUMOTO, S.T.; BISPO, W.M.S.; MACHADO, L.P.; OLIVEIRA, L.F.M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p.150-157, 2013.

OLIVEIRA, M. S.; GONTIJO, S. L.; TEIXEIRA, M. S.; TEIXEIRA, K. I. R.; TAKAHASHI, J, A.; MILLAN, R. D. S.; SEGURA, M. E. C. Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p.135-146, 2018.

OYAFUSO, M. H.; CARVALHO, F.C.; CHIAVACCI, L.A.; GREMIÃO, M.P.; CHORILLI, M. Design and Characterization of Silicone and Surfactant Based Systems for Topical Drug Delivery. **J. Nanosci. Nanotechnol**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.

PAPAGHEORGHE, R. Bloodstream infections in immunocompromised hosts. **Roum Arch Microbiol Immunol**, 14:87-94, 2012.

PRAXEDES, C. I. S.; ZÚNIGA, N. O. C.; BASTOS, P. A. M. B.; FRANCO, R. M. F.; MANO, S.B. Identificação de *Enterobacteriaceae* da microbiota intestinal de frangos de corte submetidos a dieta com nitrofuranos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 1, p.46-49, 2012.

REIS, M. Y. F. A.; DOS SANTOS, S.M., SILVA, D.R., SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S.; NAVARRO, D.M.A.F.; SANTOS, G.K.N.; HALLWASS, F.; BIANCHI, O.; SILVA, A.G.; MELO, J.V.; MATTOS, A.B.; XIMENES, R.M.; MACHADO, G.; SARAIVA, K.L.A. Anti-Inflammatory Activity of Babassu Oil and Development of a Microemulsion System for Topical Delivery. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-14, 2017.

ROBERTS, M.S.; MOHAMMED, Y.; PASTORE, M.N.; NAMJOSHI, S.; YOUSEF, S.; ALINAGHI, A.; HARIDASS, I.N.; ABD, E.; LEITE-SILVA, V.R.; BENSON, H.; GRICE, J.E. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **J. Control**, 247, 86–105, 2017.

RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M. J.; RUIZ, M. A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41-59, 2016.

SALEM, M. Z.M; EL-HEFNY, M.; ALI, H.M.; ELANSARY, H.O.; NASSER, R.A.; ELSETTAWY, A.A.A.; EL-SHANHOREY, N.; ASHMAWY, N.A.; SALEM, A.Z.M. Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of *Schinus terebinthifolius* ripened fruits against some pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, p.1-38, 2018.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids** 43, 547–556, 2015.

SAMONIS, G.; VARDAKAS, K.Z.; MARAKI, S.; TANSARLI, G.S.; DIMOPOULOU, D.; KOFTERIDIS, D.P.; ANDRIANAKI A.M.; FALAGAS, M.E.; A prospective study of characteristics and outcomes of bacteremia in patients with solid organ or hematologic malignancies. **Supportive Care In Cancer**, v. 21, n. 9, p.2521-2526, 2013.

SANTANA, J.S., SARTORELLI, P., LAGO, J.H.G., MATSUO, A.L. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quim. Nova**, 35, 2245-2248, 2012.

SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L.A.; BUENO, M.; CRIPPA, L.B.; SARTORI, V.C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de

Schinus molle L. e Schinus terebinthifolius Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.154-159, 2010.

SANTOS, O.J., BARROS-FILHO, A.K., MALAFAIA, O., RIBAS-FILHO, J.M., SANTOS, R.H., SANTOS, R.A. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) in the healing process of gastrorrhaphy in rats. **Arq. Bras. Cir. Dig.**25, 140-146, 2012.

SARTORELLI, P., SANTANA, J. S., GUADAGNIN, R. C., LAGO, J. H. G., PINTO, E. G., TEMPONE, A. G., STEFANI, H. A., SOARES, M. G., AND SILVA, A. M. In vitro trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from schinus terebinthifolius raddi (anacardiaceae), **Quim. Nova**, 35, 743–747, 2012.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v.1, n. 1, p. 24–32, 2010.

SHUKLA, T.; UPMANYU, N.; AGRAWAL, M.; SARAF, S.; SARAF, S.; ALEXANDER, A. Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p.1477-1494, 2018.

SILVA, A.G.; ALMEIDA, D.L.; RONCHI, S.N.; BENTO, A.C.; SCHERER, R.; RAMOS, A.C.; CRUZ, Z.M.A. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). **Parasites & Vectors**, v.3, p.1-7, 2010.

SILVA, B. G.; FOGLIO, M. A.; ROSA, P. T. V. R.; TARANTO, O. P.; FILETI, A. M. F. Optimization of hydrodistillation and in vitro anticancer activity of essential oil from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits. **Chemical Engineering Communications**, p.1-11, 2018.

SINGER AJ, CLARK RA. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, 341:738–46, 1999.  
SOOD, S.; JAIN, K.; GOWTHAMARAJAN. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment, **Colloids Surf. B.** 113, 330-337, 2014.

SOUZA, V.M. Ativos dermatológicos. São Paulo: Tecnopress, Volume 1. 214p, 2003.

SUPP, D.M; BOYCE, S.T. Engineered skin substitutes: practices and potentials **Clin. Dermatol**, 23, p. 403-412, 2005.

TANG, J.; LIU, H.; GAO, C.; MU, L.; YANG, S.; RONG, M.; ZHANG, Z.; LIU, J.; DING, Q.; LAI, R. A small peptide with potential ability to promote wound healing. **PLoS One**, v.9, n. 3, p. e92082, 2014.

WANG, N.; WU, Y.; ZENG, N.; WANG, H.; DENG, P.; XU, Y.; FENG, Y.; ZENG, H.; YANG, H.; HOU, K.; WANG, A.; PARTHASARATHY, K.; GOYAL, S.; QIN, G.; WU, M. E2F1 Hinders Skin Wound Healing by Repressing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression, Neovascularization, and Macrophage Recruitment. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160411, 2016.

WANG, X.; GE, J.; TREDGET, E. E.; WU, Y. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. **Nat Protoc**, v.8, n. 2, p. 302-309, 2013.

WEINHEIMER-HAUS, E. M.; MIRZA, R. E.; KOH, T. J. Nod-like receptor protein-3 inflammasome plays an important role during early stages of wound healing. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119106, 2015.

WEYRICH AS, ZIMMERMAN GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. **Trends Immunol**, 25:489–95, 2004.

WONG, R; GEYER, S; WENINGER, WOLFGANG; GUIMBERTEAU, J; WONG, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p.92-98, 13 out. 2015.

WUTTIKUL, K.; BOONME, P. Formation of microemulsions for using as cosmeceutical delivery systems: effects of various components and characteristics of some formulations. **Drug Delivery and Translational Research**, v.6, n. 3, p. 254- 262, 2016.

YOUNG B, LOWE JS, STEVENS A, HEATH JW. Pele. In: Wheater Histologia Funcional: Texto e Atlas em cores. Tradução de Raimundo Rodrigues Santos. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.167-85, 2007.

ZHANG, Honggen; WANG, Zhenyu; LIU, Oscar. Simultaneous determination of kolliphor HS15 and miglyol 812 in microemulsion formulation by ultra-high performance liquid chromatography coupled with nano quantity analyte detector. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6, n. 1, p.11-17, 2016.

ZHANG, S., ZHANG, M., FANG, Z., LIU, Y. Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, 75, 316- 322, 2017.

ZHAO, LING et al. Nanoemulsion improves the oral bioavailability of baicalin in rats: in vitro and in vivo evaluation. **International Journal Of Nanomedicine**, p.3769-3779, 2013.

## ANEXO I



## PARECER

NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 0076022022018

CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012

DATA DO PARECER: 22/02/2018

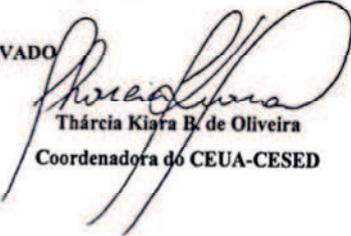
1. Pesquisador Responsável: João Walter de Souza da Silveira

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA/CICATRIZANTE DA APLICAÇÃO TÓPICA DE FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA CONTENDO PENTOXIFILINA OU DE NANOEMULSÕES CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI

2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de \_22\_/02/\_/2018\_.

Vigência do Projeto	2018
Espécie / linhagem	Camundongos Swiss (Mus musculus)
Nº de animais	56
Peso / idade	25 e 35g /
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	BIOTÉRIO CESED

3. Parecer Final: APROVADO

  
Thárcia Kiara B. de Oliveira  
Coordenadora do CEUA-CESED

