



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ELYSA BEATRIZ DE OLIVEIRA DAMAS

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO GEL À BASE DE
ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Cambess.) PARA TRATAMENTO DE
FERIDAS CUTÂNEAS**

Brasília - DF

2023

ELYSA BEATRIZ DE OLIVEIRA DAMAS

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO GEL À BASE DE
ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Cambess.) PARA O TRATAMENTO
DE FERIDAS CUTÂNEAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade de Brasília – Faculdade de
Saúde como requisito final para obtenção do
título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Graziella A. Joanitti

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Brasília – DF

2023

Ficha Catalográfica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudante: Elysa Beatriz de Oliveira Damas Matrícula: 170009327

Título do Trabalho: Preparo e caracterização de nanoemulsão gel à base de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) para tratamento de feridas cutâneas.

Orientador(a): Graziella Anselmo Joanitti

Matrícula FUB: 1059581

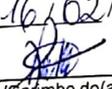
Co-orientador(a): Guilherme Martins Gelfuso

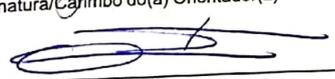
Instituição: UnB

Avaliador(a): Alicia Simalie Ombredane

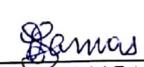
Instituição: UnB

Brasília, 16/02/2023


Assinatura/Carimbo do(a) Orientador(a)


Assinatura do(a) Avaliador(a)


Assinatura/Carimbo do(a) Co-orientador(a)


Assinatura do(a) Estudante

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, às políticas de assistência estudantil da Universidade de Brasília (UnB), que contribuíram para minha permanência na universidade e para a qualidade da minha formação.

À professora Graziella Anselmo Joanitti e à doutora Alicia Simalie Ombredane, pela oportunidade em fazer parte do Laboratório de Compostos Bioativos e Nanobiotecnologia (LCBNano). A elas agradeço e declaro minha admiração pela paciência e compromisso em formar não somente alunos, mas também profissionais responsáveis e colaborativos.

Aos membros do LCBNano, pelo apoio e compartilhamento do conhecimento científico durante as reuniões de laboratório, em especial à Vitória Regina P. Silva e Carolina Ramos dos Santos, que me auxiliaram com muito carinho no cultivo celular.

Ao professor Guilherme Martins Gelfuso, pela coorientação nesse estudo e disponibilidade para auxiliar-nos, e à sua aluna Seila Tolentino, que me acompanhou no preparo das formulações e nos ensaios físico-químicos.

À pesquisadora Danielle Galdino de Souza, pela orientação nos desafiadores ensaios de oxidação e pela ajuda com a organização de dados.

Ao meu primeiro orientador no Programa de Iniciação Científica, Jair Trapé Goulart, pela paciência e pelo compromisso em formar cientistas para além da universidade.

Aos servidores da Coordenação da Farmacopeia, que contribuíram para minha formação profissional e que sempre serão minha referência em responsabilidade, competência e respeito.

E sobretudo, ao meu companheiro Tiago Monteiro de Souza, por estar presente em toda essa caminhada, por me apoiar nos desafios dessa jornada e pelo auxílio com as imagens deste estudo.

A todos os colegas e professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

RESUMO

As propriedades farmacológicas do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) são conhecidas na medicina tradicional e nas pesquisas científicas. Dentre elas, está a atividade cicatrizante, que pode ser investigada para complementar ou substituir os tratamentos convencionais, bem como suprir as demandas terapêuticas que os produtos disponíveis no mercado ainda não atendem. Entretanto, a natureza hidrofóbica do óleo limita a utilização em algumas vias de administração. Para contornar esse problema, a nanotecnologia pode ser empregada no desenvolvimento de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) para aumentar a biodisponibilidade e estabilidade das formulações. Com base nessas informações, o presente estudo teve como objetivo formular nanoemulsões à base de óleo de pequi (NEPe) por ultrasonicação, espessar em gel base de carbômero (NEPeG), avaliar a estabilidade micro e macroscópicas ao longo do tempo, a presença de oxidação lipídica e a atividade biológica para aplicação em feridas cutâneas. Os componentes da NEPe foram compatíveis com o gel base para formulação de NEPeG. As formulações apresentaram diâmetro hidrodinâmico (DH) próximo à 100 nm, índice de polidispersividade (Pdl) em torno de 0,2 e potencial zeta (pZ) da NEPe de -30 mV e da NEPeG de -50 mV, aproximadamente. Ao longo do tempo, as amostras de NEPe armazenadas em 4°C e 25°C apresentaram ligeiras variações nas características organolépticas e microscópicas, mas sem descaracterização da formulação, enquanto na NEPeG essas variações ocorreram em menor grau. Em análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, amostras armazenadas em 4°C foram menos favoráveis à oxidação, bem como as amostras gelificadas. Nos ensaios biológicos, mesmo em concentrações altas as formulações não foram citotóxicas para as células de fibroblastos, mas a viscosidade da formulação pode obstar a migração no ensaio de *wound healing*. Dessa forma, o estudo demonstra que a nanotecnologia é uma ferramenta importante no desenvolvimento de formulações estáveis para uso na área da saúde e que a incorporação em gel aprimora a estabilidade das formulações. Em estudos biológicos, as formulações não apresentam citotoxicidade em nenhuma das formas farmacêuticas. Portanto, os resultados demonstram que as formulações preparadas representam uma opção terapêutica promissora e estável para o tratamento de feridas.

Palavras-chave: nanoemulsão; *Caryocar brasiliense* Camb.; cicatrização, ultrasonicação; citotoxicidade; oxidação lipídica.

ABSTRACT

The medicinal properties of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) are known in folk medicine and scientific research. Among these properties is the healing activity, which can be investigated to complement or replace conventional treatments, as well as to meet the therapeutic demands that the products commercially available still do not meet. However, the hydrophobic nature of the oil limits its use in some routes of administration. To overcome this problem, nanotechnology can be used in the development of oil-in-water (O/W) nanoemulsions to increase the bioavailability and stability of the formulations. Based on this information, the present study aimed to formulate nanoemulsions based on pequi oil (NEPe) by ultrasonication, thicken them in a carbomer-based gel (NEPeG), evaluate the micro and macroscopic stability over time, the occurrence of oxidation lipid content and biological activity for application in skin wounds. The NEPe components were compatible with the base gel. The formulations showed hydrodynamic diameter (DH) of 100 nm, polydispersity index (Pdl) around 0.2 and zeta potential (pZ) of NEPe of -30 mV and of NEPeG of -50 mV, approximately. Over time, NEPe samples stored at 4°C and 25°C showed slight variations in organoleptic and microscopic characteristics, but without decharacterization of the formulation, while in NEPeG these variations occurred to a lesser extent. In the analysis of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS), samples stored at 4°C were less favorable to oxidation, as well as gelled samples. In biological assays, even at high concentrations, the formulations were not cytotoxic to fibroblast cells, but the viscosity of the formulation may impede migration in the wound healing assay. Thus, the study demonstrates that nanotechnology is an important tool in the development of stable formulations for use in the medicine and that the incorporation in gel improves the stability of the formulations. In biological studies, the formulations do not show cytotoxicity in any of the pharmaceutical forms. Therefore, the results demonstrate that the prepared formulations represent a promising and stable therapeutic option for the treatment of wounds.

Keywords: nanoemulsion; *Caryocar brasiliense* Camb.; healing, ultrasonication; cytotoxicity; lipid oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess. (pequi).	3
Figura 2. Processo de cicatrização de feridas.....	4
Figura 3. Representação do ensaio de migração e invasão (<i>wound healing</i>).....	6
Figura 4. Representação de dispersões coloidais em escala nanométrica.	7
Figura 5. Representação molecular de surfactantes aniônico, catiônico, anfótero e não- iônico.	8
Figura 6. Representação da nanoemulsão O/A contendo lecitina e polioxietileno (40) estearato (PEG40).....	9
Figura 7. Representação do processo de formulação do gel de Carbopol®.....	10
Figura 8. Nanoemulsão à base de óleo de pequi gelificada (NEPeG) após 30 dias de armazenamento em 4°C.	15
Figura 9. Estabilidade macroscópica das nanoemulsões à base de óleo de pequi (NEPe) e NEPe gelificada (NEPeG) ao longo do tempo.....	16
Figura 10. Diâmetro hidrodinâmico (DH) das formulações ao longo do tempo.....	17
Figura 11. Índice de polidispersividade (Pdl) das formulações ao longo do tempo.	18
Figura 12. Potencial zeta das formulações ao longo do tempo em pH 7.....	19
Figura 13. Transformação do trimetoxipropano (TMP) em malonaldeído (MDA) e reação química entre MDA e ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um cromógeno de cor rosa.	20
Figura 14. Curva-padrão da reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e trimetoxipropano(TMP)	20
Figura 15. Sobrenadante coletado após reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e nanoemulsões à base de óleo de pequi (NEPe) armazenadas em 4, 25 e 37°C por 40 dias.	21
Figura 16. Representação molecular dos ácidos oleico e palmítico.	21
Figura 17. Representação gráfica da quantidade de malonaldeído (MDA) em amostras de nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe) e NEPe gelificada (NEPeG) após reação com ácido tiobarbitúrico (TBA).....	22
Figura 18. Efeitos do tratamento na viabilidade celular de fibroblastos.	23

Figura 19. Registro da área de cicatrização em fibroblastos de pele humana em 0h e 24h de tratamento24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (pZ) antes e após o teste de centrifuga da nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe).

Quadro 2. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (pZ) antes e após o teste de centrifuga da nanoemulsão gel à base de óleo de pequi (NEPeG).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A/O	Água em óleo
A/O/A	Água em óleo em água
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
HCl	Ácido clorídrico
MDA	Malonaldeído
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NEPe	Nanoemulsão à base de óleo de pequi
NEPeG	Nanoemulsão à base de óleo de pequi gelificada
O/A	Óleo em água
O/A/O	Óleo em água em óleo
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
PdI	Índice de polidispersividade
pZ	Potencial zeta
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TMP	Trimetoxipropano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo geral.....	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REFERENCIAL TEÓRICO	2
3.1. Óleo de pequi	2
3.2. Cicatrização	4
3.3. Nanoemulsão.....	6
3.4. Surfactantes.....	7
3.5. Géis	10
4. METODOLOGIA.....	11
4.1. Materiais e equipamentos	11
4.2. Preparo da NEPe.....	11
4.3. Preparo da NEPeG	11
4.4. Caracterização das formulações.....	12
4.4.1. <i>Dynamic light scattering (DLS)</i>	12
4.4.2. <i>Condutividade</i>	12
4.5. Estabilidade	12
4.5.1. <i>Estabilidade ao longo do tempo sob diferentes condições de temperatura</i>	12
4.5.2. <i>Centrifugação</i>	12
4.6. Análise de oxidação das formulações: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	13
4.7. Cultura celular.....	13
4.7.1. <i>Viabilidade celular</i>	14
4.7.2. <i>Migração e invasão (wound healing)</i>	14
4.8. Análise estatística.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1. Obtenção e características da NEPe e NEPeG	15
5.1.1. <i>Preparo da formulação em gel</i>	15
5.1.2. <i>Caracterização por DLS</i>	15
5.1.3. <i>Classificação da nanoemulsão</i>	15
5.1.4. <i>Ensaio de estabilidade acelerada</i>	16
5.1.5. <i>Estabilidade macroscópica ao longo do tempo</i>	16
5.2. Efeito da temperatura sobre o DH das formulações a base de óleo de pequi (NePe e NePeG).....	18

5.3. Efeito da temperatura sobre o Pdl das formulações a base de óleo de pequi (NePe e NePeG).....	19
5.4. Efeito da temperatura sobre o potencial zeta das formulações a base de óleo de pequi (NePe e NePeG).....	20
5.5. Peroxidação lipídica por TBARS	20
5.6. Viabilidade celular e <i>wound healing</i>	23
6. CONCLUSÃO	25
7. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES.....	26
8. REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca pela biodiversidade e abundância de recursos naturais que enriquecem a pesquisa científica em diversas áreas do conhecimento e levantam discussões sobre o potencial econômico e social para o país (ROSA et al., 2021; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018). A riqueza de espécies vegetais nos diferentes biomas brasileiros abriga uma ampla variedade de biomoléculas de interesse para a saúde, que são importantes tanto no auxílio como no tratamento principal de diferentes doenças (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009; DE ALMEIDA et al., 2020).

No bioma Cerrado, por exemplo, podemos destacar o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.), estudado quanto ao seu potencial antioxidante (COLOMBO et al., 2015), anticancerígeno (OMBREDANE et al., 2020), cicatrizante (DE OLIVEIRA et al., 2010), antimicrobiano (FERREIRA et al., 2011), antinociceptivo (PINHEIRO et al., 2022), entre outros. Por definição, o óleo de pequi é um óleo fixo¹, e suas principais características físico-químicas são derivadas de sua composição rica em ácido oleico e palmítico. No entanto, a natureza hidrofóbica do óleo limita a incorporação em formulações farmacêuticas por ser pouco solúvel em água. Além disso, os componentes do produto vegetal tendem a sofrer oxidação, o que limita a estabilidade do produto farmacêutico.

Como solução para esse desafio, as fórmulas farmacêuticas com base nanotecnológica podem ser aplicadas, gerando produtos mais estáveis, biocompatíveis e com maior atividade biológica do que os óleos livres (DEWI et al., 2022; OMBREDANE et al., 2020). No caso de óleos fixos, a nanotecnologia pode ser utilizada no preparo de nanoemulsões, que consistem na dispersão de dois líquidos imiscíveis, em que um deles se encontra como gotículas dispersas, em tamanho nanométrico, no outro líquido (REHMAN et al., 2020). Esses sistemas são fluidos, transparentes, translúcidos e mais estáveis fisicamente que as emulsões convencionais.

Tendo em mente uma aplicação tópica, a nanoemulsão pode ter sua consistência aumentada com a adição de agentes de consistência. No caso de nanoemulsões óleo em água (O/A), a adição de um agente gelificante hidrofílico, como os carbômeros, aumentaria a viscosidade do sistema, evitando seu escorrimento após aplicação tópica. Os carbômeros são polímeros derivados do ácido acrílico, biocompatíveis e atóxicos e, portanto, ideais para aplicação dermatológica.

¹ Segundo a 6ª edição da Farmacopeia Brasileira, óleos fixos são óleos não voláteis constituídos principalmente por triacilgliceróis esterificados.

Com base no disposto acima, o presente estudo visa desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe), com posterior gelificação da formulação (NEPeG) e avaliar a estabilidade e a atividade cicatrizante do produto (*in vitro*) com o objetivo de se obter um produto tópico efetivo e estável.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Esse estudo teve como principal objetivo o preparo e a caracterização de nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe) espessada com Carbopol® (NEPeG) e a avaliação de sua estabilidade e atividade cicatrizante *in vitro* para se obter um produto tópico efetivo e estável.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar NEPe contendo 2% de óleo de pequi e espessar para obter NEPeG;
- Avaliar o diâmetro hidrodinâmico da nanogotícula (DH), o índice de polidispersividade (Pdl), o potencial zeta (pZ) e o pH das formulações;
- Avaliar a estabilidade das formulações em diferentes temperaturas ao longo do tempo;
- Avaliação da citotoxicidade e atividade cicatrizante, *in vitro*, das formulações obtidas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Óleo de pequi

Popularmente conhecido como pequi (Figura 1), o gênero *Caryocar* conta com quinze espécies descritas na literatura, em que a mais abundante no Cerrado é a espécie *Caryocar brasiliense* Camb., distribuída do planalto central do Brasil ao sul do Paraná, alcançando também a Bolívia e o Paraguai (MOREIRA et al., 2021; PRANCE; DA SILVA, 1973). Além do uso na culinária brasileira, o óleo extraído da polpa possui propriedades medicinais e a composição química tanto da polpa como do óleo evidencia a importância nutritiva e terapêutica do produto (ARAÚJO et al., 2018).



Figura 1. *Caryocar brasiliense* Cambess. (pequi). **Fonte:** Frutos Atrativos do Cerrado, Flickr, 2008.

O óleo de pequi é um óleo fixo composto principalmente por ácidos graxos, dos quais o ácido oleico e o ácido palmítico representam a maior proporção (MIRANDA-VILELA et al., 2009). Carotenoides também estão presentes no óleo, expressando coloração alaranjada e conferindo ao óleo propriedades antioxidantes (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). A proporção desses compostos pode variar de acordo com o método de extração e com a fonte do óleo (RIBEIRO et al., 2012) e estudos são necessários para avaliar os efeitos dessas alterações na identificação e nas atividades biológicas.

Os potenciais terapêuticos do óleo de pequi derivam dessa complexidade na composição, visto que estudos mostraram que, individualmente, as substâncias como o ácido oleico ou licopeno, por exemplo, também têm os potenciais terapêuticos observados no óleo (CARDOSO et al., 2011; SAHIN et al., 2018). Dentre os efeitos terapêuticos do óleo de pequi, podemos destacar a atividade anticancerígena em células de câncer de mama (OMBREDANE et al., 2020) e a atividade antinociceptiva (PINHEIRO et al., 2022), ambos estudos que utilizaram a nanoemulsão como carreador do óleo.

Além do potencial terapêutico, a aplicação do óleo de pequi na indústria alimentícia e cosmética reforça a importância econômica do fruto. A extração do pequi possui notória importância econômica para as comunidades extrativistas, por representar fonte de renda para muitas famílias no cerrado, e ecológica, por se tratar de uma extração sustentável que não compromete o crescimento populacional da espécie (OLIVEIRA, 2009). Além disso, o uso de óleos vegetais pela indústria confere aos produtos uma natureza mais biodegradável, contribuindo para o desenvolvimento sustentável e econômico no país.

3.2. Cicatrização

O processo de cicatrização envolve cascatas de eventos celulares e bioquímicos complexos que ocorrem de forma coordenada desde a injúria até a restauração do tecido, em que as fases principais desse processo são: hemóstase, inflamação, proliferação celular e remodelamento do tecido (Figura 2). Durante a cicatrização, muitas células são envolvidas no processo, como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, células do sangue e do sistema imune (BIELEFELD; AMINI-NIK; ALMAN, 2013).

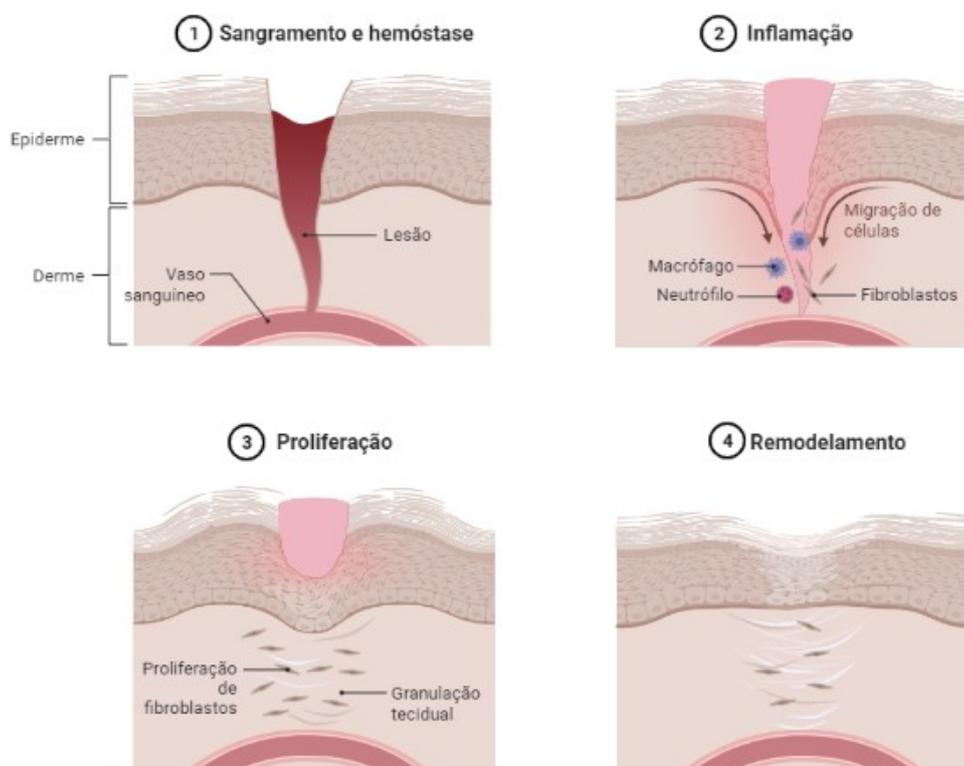


Figura 2. Processo de cicatrização de feridas. (1) Após a lesão, ocorre o sangramento que em seguida é estancado no processo de hemóstase. (2) O processo inflamatório se inicia e células do sistema imune migram para o local da lesão. (3) Ocorre, então, o processo de proliferação das células da pele. (4) Por fim, o novo tecido se remodela. **Fonte:** Imagem criada em BioRender.

A hemóstase é o processo inicial e imediato que ocorre imediatamente após injúria tecidual com extravasamento de sangue. Nessa etapa se inicia a cascata de coagulação e vasoconstrição. Na etapa da inflamação, o sistema complemento é ativado e células do sangue são quimicamente atraídas para o local da ferida. Na terceira fase, ocorre a contenção da infecção e a migração de fibroblastos, atraídos pelos fatores de crescimento produzidos durante a cicatrização, até a completa epitelização e na quarta fase remodelamento tecidual. Os fibroblastos são responsáveis pela produção de componentes importantes para o tecido, como fibronectina, colágeno e proteoglicano, que auxiliam na

construção da matriz extracelular e no remodelamento do tecido (ENOCH; LEAPER, 2007).

O processo de cicatrização do tecido cutâneo que ocorre naturalmente muitas vezes é suficiente para o sucesso do reparo tecidual. Entretanto, as condições de saúde e hábitos do indivíduo, bem como a extensão e a origem da ferida, podem favorecer a ocorrência de cronicidade e, conseqüentemente, o desdobramento de complicações (EHRICHMAN et al., 1991). Em casos de ocorrência dessas feridas crônicas a abordagem medicamentosa se faz necessária tanto para auxiliar na cicatrização como para evitar a ocorrência de infecções.

Existem diversos produtos disponíveis comercialmente para o tratamento de feridas cutâneas e mais pesquisas estão sendo conduzidas na área de nanotecnologia com o objetivo de solucionar os problemas que as terapias convencionais ainda não atendem. Dentre os tipos de nanopartículas aplicadas para cicatrização, as nanopartículas lipídicas se mostram eficientes em permitir o encapsulamento e a liberação de fármacos lipofílicos naturais, sintéticos ou semissintético. Nos últimos anos, as pesquisas com essa tecnologia têm aumentado, conforme descrito por Carneiro et. al (2022) no capítulo 9 do livro *Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente*.

A migração das células é um fator importante na cicatrização e é uma característica que pode ser analisada por ensaios *in vitro*, como por exemplo o ensaio de migração e invasão (*wound healing*) (WALTER et al., 2010). Nesse ensaio, as células são adicionadas em placas, formando uma monocamada, e uma arranhadura é feita para simular uma ferida. As células são tratadas com o produto de interesse e após um período determinado se observa a migração das células. As imagens registradas antes e depois do tratamento podem ser adicionadas em *softwares* que calculam a área da ferida para que se possa calcular a taxa de migração (Figura 3).

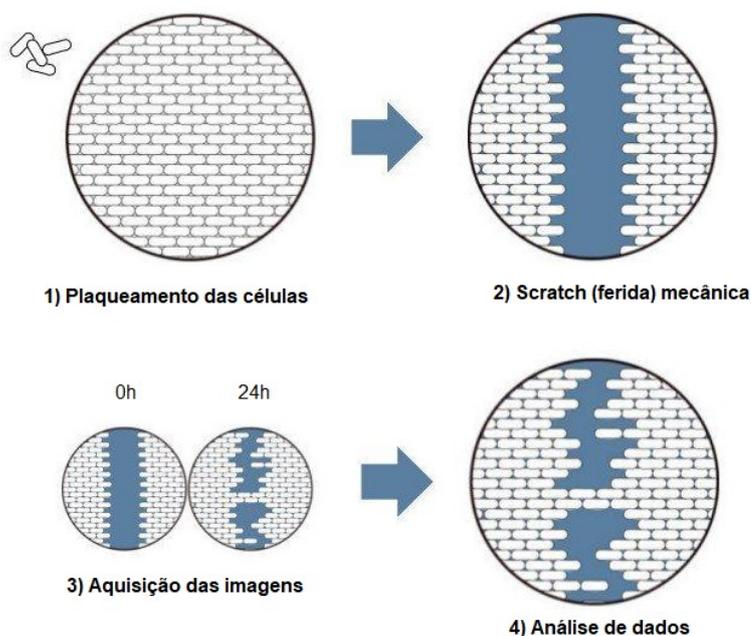


Figura 3. Representação do ensaio de migração e invasão (*wound healing*). (1) As células são cultivadas e adicionadas em poços para a formação de uma monocamada. (2) Uma ferida mecânica é feita na placa. (3) O tratamento de interesse é adicionado nas células e imagens são registradas em diferentes períodos. (4) A área da ferida é analisada por *software* para obtenção da taxa de migração celular. **Fonte:** Imagem adaptada de Axion Biosystem *website*.

3.3. Nanoemulsão

A nanociência estuda estruturas em escala nanométrica, que representa um bilionésimo de um metro (10^{-9} m). O controle e manipulação dessas estruturas a partir de diferentes tecnologias é chamado de nanotecnologia. Em quase todas as áreas da ciência é possível aplicar e estudar nanoestruturas. Nos últimos anos estudos na área da saúde mostraram que essa abordagem é promissora tanto para diagnóstico como para prevenção e tratamento de diversas doenças, especialmente do câncer (EL-SAYED; KAMEL, 2020).

Algumas propostas da nanotecnologia nas ciências farmacêuticas são o melhoramento da estabilidade de formulações e o controle da liberação de fármacos (SAHU et al., 2021), além de outros benefícios como a redução da toxicidade e aumento da eficácia terapêutica (CHEN et al., 2013). Mesmo em processos biológicos extremamente complexos, como cicatrização de feridas, a nanotecnologia apresenta resultados promissores (BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019).

Nanoemulsões consistem na dispersão coloidal de líquidos imiscíveis, em que um líquido é disperso em outro em forma de nanogotículas, podendo ser dispersões do tipo óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) ou ainda mistas, óleo em água em óleo (O/A/O) e água em óleo em água (A/O/A) (Figura 4) (JOANITTI; MORAIS; AZEVEDO, 2022).

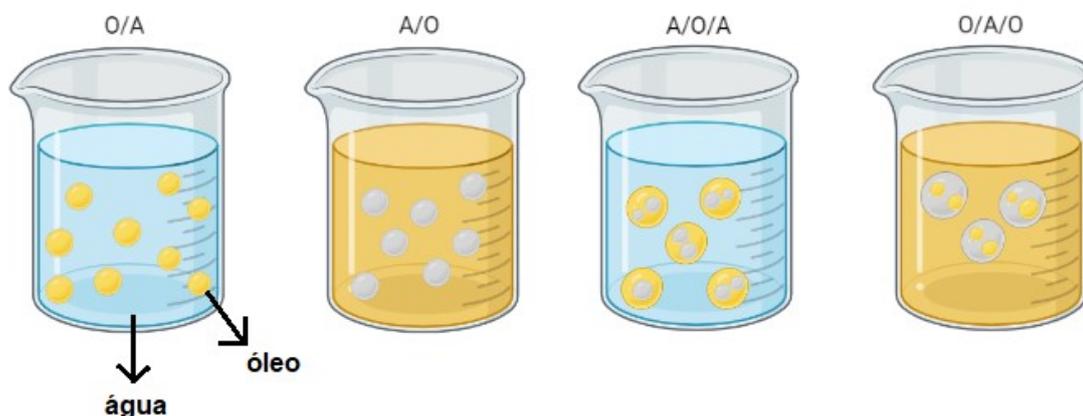


Figura 4. Representação de dispersões coloidais em escala nanométrica. Tipo de dispersões: óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) mista do tipo óleo em água em óleo (O/A/O) e mista do tipo água em óleo em água (A/O/A). **Fonte:** Imagem criada em BioRender.

Existem diferentes formas de preparo de uma nanoemulsão, classificadas em métodos de alta ou de baixa energia. Nos métodos de alta energia, as gotículas da emulsão são quebradas para formar gotículas nanométricas utilizando elevada energia mecânica, como na microfluidização, ou também por meio de homogeneização por ondas de ultrassom em alta frequência, como na ultrasonicação (JOANITTI; MORAIS; AZEVEDO, 2022; PÁEZ-HERNÁNDEZ; MONDRAGÓN-CORTEZ; ESPINOSA-ANDREWS, 2019).

A ultrasonicação é uma técnica eficiente para o preparo de nanoemulsões estáveis cujas características dependem de muitos fatores, como o tempo de sonicação, diâmetro da ponteira, amplitude escolhida, concentração e volume de amostra. Nesse método, as ondas de ultrassom passam pelo líquido gerando pressões frequentes e as nanogotículas são formadas pelo fenômeno de cavitação (SIVAKUMAR; TANG; TAN, 2014).

3.4. Surfactantes

Os surfactantes são compostos orgânicos anfífilos que apresentam uma porção polar e outra apolar. A porção apolar é normalmente formada por uma cadeia carbônica (“cauda” hidrofóbica), enquanto a porção polar (“cabeça” hidrofílica) é constituída por átomos que apresentam afinidade com a água e/ou carga, sendo responsável pela solubilidade do composto em suspensões (Figura 5) (JOANITTI; MORAIS; AZEVEDO,

2022). Quando o surfactante possui a porção polar com carga negativa, é chamado de surfactante aniônico, e quando a carga é positiva, é chamado de surfactante catiônico. Existem também os surfactantes não-iônicos e anfóteros e a escolha desse agente nas nanoemulsões é importante para o sucesso da formulação (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

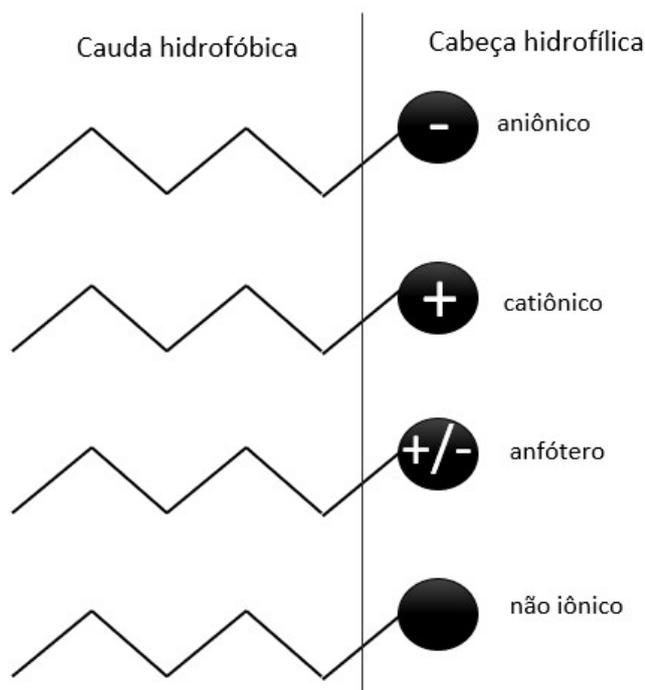


Figura 5. Representação molecular de surfactantes aniônico, catiônico, anfótero e não-iônico. **Fonte:** Imagem criada pela autora.

No desenvolvimento farmacotécnico, os surfactantes são utilizados na estabilização de nanoemulsões, promovendo dispersão coloidal de líquidos imiscíveis. Em um sistema constituído por água e lipídios, a porção polar do surfactante interage com a parte aquosa e a porção apolar interage com a parte oleosa, atuando como uma camada que reveste a gotícula e promove a estabilidade da formulação (JOANITTI; MORAIS; AZEVEDO, 2022). No caso da NEPe, o sistema é do tipo óleo em água (O/A) e o surfactante é encontrado na superfície das gotículas de óleo, protegendo as moléculas bioativas presentes (OMBREDANE et al., 2020).

A escolha do surfactante deve ser criteriosa em uma formulação, porque além de promover estabilidade, devem atender aos critérios de não toxicidade e não irritabilidade. Outra importante preocupação na escolha da composição do produto é o impacto ambiental que pode ser causado. Então, substâncias biodegradáveis também devem ser priorizadas no desenvolvimento de novos produtos.

3.5. Géis

Escolher excipientes compatíveis com a formulação e que sejam seguros para os pacientes é um desafio. A seleção deve ser criteriosa e considerar características que garantam estabilidade, eficácia e funcionalidade da formulação, além de segurança e baixa toxicidade para os pacientes. Os impactos da adição de componentes na formulação na liberação de fármacos ou ainda na farmacocinética também precisam ser investigados para garantir o sucesso da farmacoterapia.

Os géis, por exemplo, são formulações farmacêuticas semissólidas que contém agente gelificante que promove firmeza a uma solução ou dispersão coloidal (BRASIL, 2019). Um dos representantes dos agentes gelificantes é o Carbopol[®], um polímero sintético derivado do ácido acrílico responsável pela estrutura tridimensional da formulação promissor para o desenvolvimento de nanoemulsão gel (BAEK; KIM, 2011).

O Carbopol[®] tem alto peso molecular e se apresenta como pó branco, esponjoso e higroscópico. Pode ser disperso tanto em água como em álcool e glicerina. O pó é uma rede tridimensional de polímeros emaranhados que se dilatam após hidratados. A estrutura estendida dessas cadeias ocorre com a neutralização por bases (Figura 7) (SHAFIEI; BALHOFF; HAYMAN, 2018). O gel formado tem natureza aniônica, ou seja, em solução se dissociam em íons carregados negativamente, característica que pode influenciar na estabilidade da formulação.

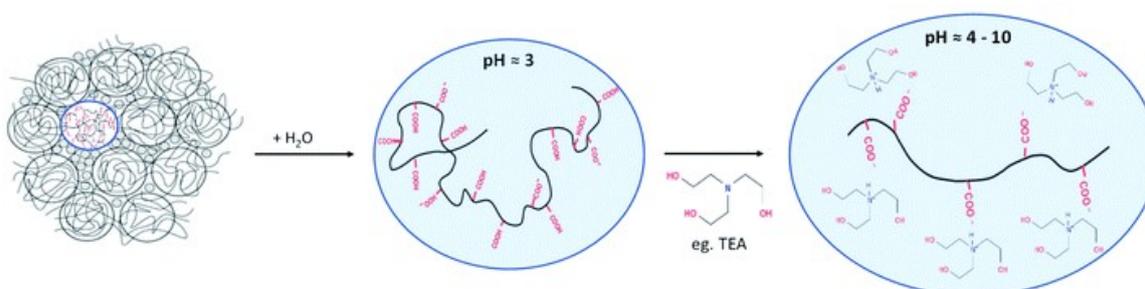


Figura 7. Representação do processo de formulação do gel de Carbopol[®]. A primeira representação é referente ao Carbopol[®] em pó. Após adição de água, o polímero se dissolve, mas o emaranhado não permite o aumento da viscosidade. A neutralização do gel com trietanolamina (TEA) permite a formação de redes poliméricas e, conseqüentemente, o aumento da viscosidade (HOULLEBERGHS et al., 2022).

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e equipamentos

Os seguintes materiais foram adquiridos para o preparo das amostras e execução dos ensaios: lecitina (Lipoid, Ludwigshafen, Germany); óleo de pequi extraído por solvente (Universidade Federal de Lavras, UFLA, Minas Gerais); polioxietileno (40) estearato (PEG 40), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA) e trimetoxipropano (TMP) (Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Dorset, UK); Carbopol® 940 e trietanolamina (TEA) (Dinâmica Química Contemporânea Ltd., São Paulo, Brasil); dimetilsulfóxido (DMSO) e ácido clorídrico (HCl) (J.T.Baker, Philisburg, Estados Unidos).

Este estudo está de acordo com a Nova Lei da Biodiversidade (Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015) e registrado na plataforma do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Genéticos e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen) sob o número AC22EF9.

4.2. Preparo da NEPe

As NEPe foram preparadas seguindo o protocolo anteriormente descrito (OMBREDANE et al., 2020) com algumas modificações. Em um tubo tipo Falcon, a lecitina e o óleo de pequi foram pesados na proporção 2:1 (p/p), em quantidade suficiente para produzir a NEPe contendo 2% de óleo. Foi adicionado polioxietileno (40) estearato (PEG 40) a 1% em relação à massa molar da lecitina e adicionados 10 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada no vórtex até completa dispersão dos componentes e posteriormente submetida à ultrasonicação em banho de gelo por 5 min com pulso alternado (1 segundo) a 20 kHz. Todo o processo foi realizado ao abrigo de luz.

4.3. Preparo da NEPeG

Afim de aumentar a viscosidade da formulação, foi preparado gel à base de carbômero conforme descrito na literatura (JANGDEY; GUPTA; SARAF, 2017), com algumas adaptações. Primeiramente, foi preparado um gel base pesando 1 g de Carbopol® 940 para diluição em 100 mL de água sob agitação manual. A solução foi armazenada por 24 horas ao abrigo de luz para completa hidratação do polímero e posterior adição de trietanolamina até pH 7. A NEPe foi incorporada no gel base na

proporção 1:1 sob leve agitação manual e armazenada ao abrigo de luz em microtubos de 1,5 mL.

4.4. Caracterização das formulações

4.4.1. Dynamic light scattering (DLS)

A estabilidade física foi avaliada mensurando o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersividade (Pdl) e o potencial zeta (pZ) no Zetasizer® Nano ZS90 (Malvern, UK) com ângulo de detecção de 90° após 1, 7, 15 e 30 dias. Para cada parâmetro, foram feitas três leituras de cada amostra a 25°C para obter a média. O pH também foi avaliado ao longo do tempo. Para caracterização da NEPe, foram diluídos 10 µL de amostra em 990 µL de água destilada e para NEPeG foram diluídos 20 µg em 980 µL de água destilada para que a concentração de óleo de pequi permanecesse a mesma em ambas análises.

4.4.2. Condutividade

A condutividade foi mensurada pelo Condutímetro CG1800 (Gehaka, São Paulo, Brasil) à 25°C. O equipamento foi calibrado com o tampão Gehaka de 1413,0 µS/cm. Após a calibração, as condutividades das amostras frescas de NEPe e NEPeG foram mensuradas à 25°C.

4.5. Estabilidade

4.5.1. Estabilidade ao longo do tempo sob diferentes condições de temperatura

Triplicatas de NEPe e NEPeG foram armazenadas ao abrigo de luz em 4°C, 25°C e 37°C em microtubos de 1,5 mL durante 30 dias. O aspecto macroscópico foi inspecionado nos dias 1, 7, 15 e 30, imagens foram registradas no 1º e no 40º dia e o DH, pZ e Pdl foram mensurados conforme descrito no item 4.4.1.

4.5.2. Centrifugação

Três alíquotas de 1,5 mL de NEPe e NEPeG recém preparadas foram centrifugadas à 5000 rpm por 30 minutos no equipamento Hettich ® Universal 320R (Tuttlingen,

Alemanha) (ALI et al., 2014). Inspeção visual das amostras foi feita para verificar se houve separação de fases ou outra instabilidade e as amostras foram lidas no Zetasizer antes e depois do processamento.

4.6. Análise de oxidação das formulações: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A análise de estresse oxidativo foi realizada pela determinação de TBARS após 40 dias de armazenamento das amostras de óleo livre, NEPe e NEPeG em 4°C, 25°C e 37°C. Também foram avaliadas NEPe e NEPeG recém-preparadas. Foi seguido o protocolo de Arancibia et al., 2017, com algumas modificações.

Primeiramente, uma solução-estoque de ácido tiobarbitúrico (TBA) misturando 15% (p/v) de ácido tricloroacético, 0,375% (p/v) de TBA em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,25 M. Uma solução-padrão de tetrametoxipropano (TMP) 3 mM foi preparada para determinação da curva-padrão. Foi preparado 1 mL de solução de TMP nas concentrações 0, 3, 9, 15, 21 e 27 μ M em tubos de ensaio com tampa, depois adicionada 1 mL da solução-estoque de TBA em cada tubo. Para ocorrer a reação entre TBA e TMP, os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria à 65°C durante 40 minutos. Após o aquecimento, os tubos foram resfriados em banho de água à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados à 3000 rpm por 15 minutos. Foi pipetado 150 μ L do sobrenadante em placa de 96 poços, em triplicata, e a leitura no espectrofotômetro (MolecularDevices, USA) foi realizada em 532 nm.

Para a determinação de TBARS nas amostras, foram diluídos 50 μ L das NEPe em 500 μ L de água destilada em microtubos. Para as NEPeG, foram pesados 100 μ g de amostra e diluídas em 450 μ L de água. Em cada microtubo, foi adicionado 550 μ L de solução de TBA. Para o óleo, foram pesados 1 μ g e adicionados 550 μ L de água e 550 μ L de solução de TBA. As amostras foram submetidas ao mesmo processo do TMP na curva-padrão. A determinação de TBARS foi feita utilizando a equação da reta da curva-padrão para cada 1 mg de óleo.

4.7. Cultura celular

Fibroblastos humanos foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino 1% de penicilina em estufa a 37°C e 5% CO₂.

4.7.1. Viabilidade celular

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços em uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células por poço e mantidas em estufa úmida (37°C e $5\% \text{CO}_2$) e tratadas no dia seguinte com o branco (água destilada e filtrada), NEPe nas concentrações de 50, 250, 500, 2500 e 5000 $\mu\text{g/mL}$ e com NEPeG nas concentrações de 50, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$, em que foi possível a diluição até que a viscosidade permitisse a utilização de pipeta. Após o tratamento as células foram incubadas pelos períodos de 24 e 48 horas.

A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Depois dos períodos de 24 e 48 horas de incubação, os tratamentos foram descartados e cada poço recebeu 150 μL de solução de MTT a 0,5 mg/mL diluído em DMEM e as placas foram novamente incubadas em estufa. Após o período de 2h, a solução de MTT foi descartada e os cristais de formazan formados diluídos com 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. A absorbância foi determinada através do espectrofotômetro com leitor de microplaca (MolecularDevices, USA) no comprimento de onda de 595 nm.

4.7.2. Migração e invasão (*wound healing*)

A capacidade de migração dos fibroblastos foi investigada pelo ensaio de *wound healing* (WALTER et al., 2010). As células foram tratadas com NEPe e NEPeG na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ e DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. As células foram incubadas em placa de 24 poços, com densidade celular de $0,6 \times 10^5$, por um período de 24h em estufa úmida (37°C e $5\% \text{CO}_2$). Após incubação, foi feita um risco na monocamada com o auxílio de uma ponteira de 200 μL , as imagens foram registradas no tempo de 0h e 24h microscópio óptico (Leica DM500®, Austria) acoplado à câmera fotográfica (Leica ICC50 HD®, Austria) e ao programa de captura e análise de imagens (Leica® LAS EZ 3.4.0), e a análise da área inicial e final da ferida foi feita pelo *software* Image J (*Image Processing and Analysis in Java*) (COLLINS, 2007).

4.8. Análise estatística

As análises estatísticas para análise dos resultados desse estudo foram ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparação múltipla Tukey, feitas no *software* GraphPrism versão 8.0.1 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, California USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e características da NEPe e NEPeG

Nesse estudo, as NEPe foram preparadas com 2% de óleo (p/v) com o objetivo de avaliar o comportamento da nanoemulsão em concentrações maiores às preparadas em estudos anteriores (OMBREDANE et al., 2020), considerando a futura aplicação em feridas e a redução da concentração de óleo quando preparamos a formulação em gel.

5.1.1. Preparo da formulação em gel

O primeiro teste consistiu no preparo da NEPe e adição do pó de Carbopol® 940 a 1% diretamente na amostra. No entanto, a amostra não apresentou viscosidade e outro método precisou ser desenvolvido. Então, preparamos o gel base de Carbopol® 940 a 1% separadamente, conforme descrito na metodologia deste estudo, e depois foi adicionada NEPe até observarmos homogeneidade. Logo após o preparo, todas as formulações apresentaram homogeneidade, translucidez e coloração amarelada intensa devido à presença de carotenoides no óleo de pequi.

5.1.2. Caracterização por DLS

Após o preparo da NEPe no ultrasonicador e posterior espessamento para formulação da NEPeG, as formulações foram caracterizadas em seus aspectos microscópicos no Zetasizer. O DH mensurado estava próximo à 100 nm, o Pdl abaixo de 0,2 e o potencial zeta da NEPe era de -30 mV e da NEPeG de -50 mV, aproximadamente.

5.1.3. Classificação da nanoemulsão

Devido à alta concentração de óleo na amostra, o teste de condutividade elétrica foi conduzido para avaliar se a nanoemulsão formada é do tipo O/A. Normalmente, a condutividade de nanoemulsões do tipo A/O é baixa, visto que a mobilidade de íons é reduzida em fase oleosa, enquanto o contrário ocorre em nanoemulsões O/A (FORGIARINI et al., 2001). A condutividade das amostras foram $707,3 \pm 10,1 \mu\text{S/cm}$ (NEPe) e $992,0 \pm 14,2 \mu\text{S/cm}$ (NEPeG), o que indica formulações com fase externa aquosa e, no caso da NEPeG, o conteúdo de água é ainda maior, o que justifica maior condutividade.

5.1.4. Ensaio de estabilidade acelerada

O teste de centrífuga é um ensaio de estabilidade que aumenta a força da gravidade sobre as formulações a fim de antecipar instabilidade pela formação de aglomerados, separação de fases, sedimentação, coalescência ou cremação. Esse ensaio é recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (2008). Após o teste em amostras frescas, a NEPe e NEPeG não apresentaram mudanças nas características visuais e, microscopicamente, o DH, Pdl e pZ não tiveram diferença significativa antes ou depois de submetidos à centrifugação (Quadro 1 e 2).

Quadro 1. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (pZ) antes e após o teste de centrífuga da nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe).

	NEPe	
	Antes	Depois
DH (nm)	93,88 ± 0,8	95,95 ± 1,82
Pdl	0,194 ± 0,30	0,204 ± 0,01
pZ (mV)	- 25,47 ± 2,71	- 26,03 ± 1,64

Quadro 2. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (pZ) antes e após o teste de centrífuga da nanoemulsão gel à base de óleo de pequi (NEPeG).

	NEPeG	
	Antes	Depois
DH (nm)	103,67 ± 1,9	105,9 ± 2,91
Pdl	0,224 ± 0,01	0,240 ± 0,01
pZ (mV)	- 48,03 ± 0,81	- 48,87 ± 1,91

5.1.5. Estabilidade macroscópica ao longo do tempo

Uma amostra de NEPeG foi armazenada em placa de Pétri em 4°C com o objetivo de avaliar se haveria separação de fases. Após 30 dias, a amostra permaneceu estável e sem sinais de desprendimento da nanoemulsão das redes poliméricas do gel (Figura 8).

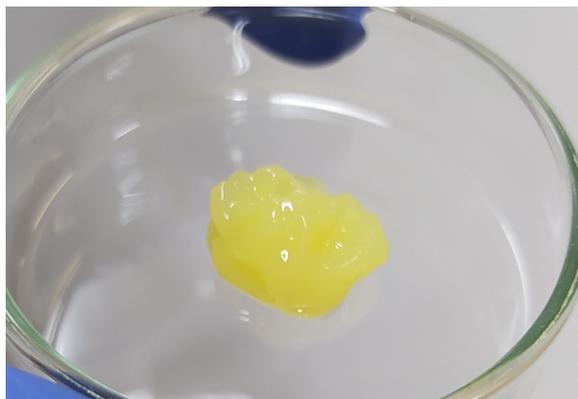


Figura 8. Nanoemulsão à base de óleo de pequi gelificada (NEPeG) após 30 dias de armazenamento em 4°C.

Ao longo do tempo, as amostras de NEPe à 37°C mudaram de cor (Figura 9). Após 15 e 30 dias, as amostras estavam mais escurecidas, e após 40 dias estavam turvas em comparação com amostras frescas. Já a NEPeG apresentou-se estável e sem alteração aparente de cor ao longo do tempo nas amostras em 4°C e 25°C, enquanto a amostra em 37°C apresentou leve mudança de cor após 40 dias, o que indica que o gel confere proteção física para o produto.

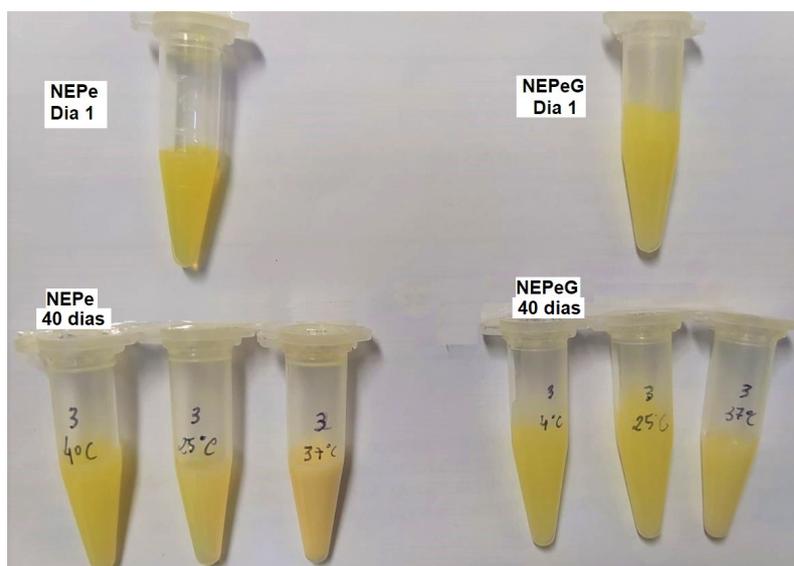


Figura 9. Estabilidade macroscópica das nanoemulsões à base de óleo de pequi (NEPe) e NEPe gelificada (NEPeG) ao longo do tempo. A imagem representa NEPe e NEPeG frescas (acima) e após 40 dias armazenadas em 4, 25 e 37°C (abaixo).

Os principais componentes que conferem coloração amarelada às nanoemulsões são os carotenoides, dentre os quais se destacam os β -carotenos, provitamina A e licopeno (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; RIBEIRO et al., 2012). A mudança de coloração observada nesse estudo pode ser atribuída à degradação de β -carotenos em temperaturas mais elevadas. Pesquisadores estudaram nanoemulsões O/A

contendo β -carotenos armazenadas em 55°C durante 15 dias e também observaram perda da coloração alaranjada/amarelada (QIAN et al., 2012). Essa perda foi reduzida quando adicionados antioxidantes nas amostras.

5.2. Efeito da temperatura sobre o DH das formulações a base de óleo de pequi (NePe e NePeG)

As nanoemulsões O/A são formadas por nanogotículas de óleo dispersas em meio aquoso com o auxílio de um surfactante. Estudos mostram que o DH das gotículas em nanoemulsões que utilizam lecitina varia entre 150 e 300 nm (KLANG; VALENTA, 2011). Quando se trata de nanoemulsões à base de óleo de pequi e lecitina produzidas por ultrasonicação, o DH das nanogotículas também se apresenta nessa faixa (KLANG; VALENTA, 2011)

No presente estudo, o tamanho das nanogotículas em NEPe e NEPeG armazenadas em 25°C estabilizou próximo à 100 nm ao longo de 30 dias de formulação. Nas demais temperaturas, houve diferença significativa entre os tamanhos, sendo à 37°C a variação mais expressiva, principalmente no gel (Figura 10).

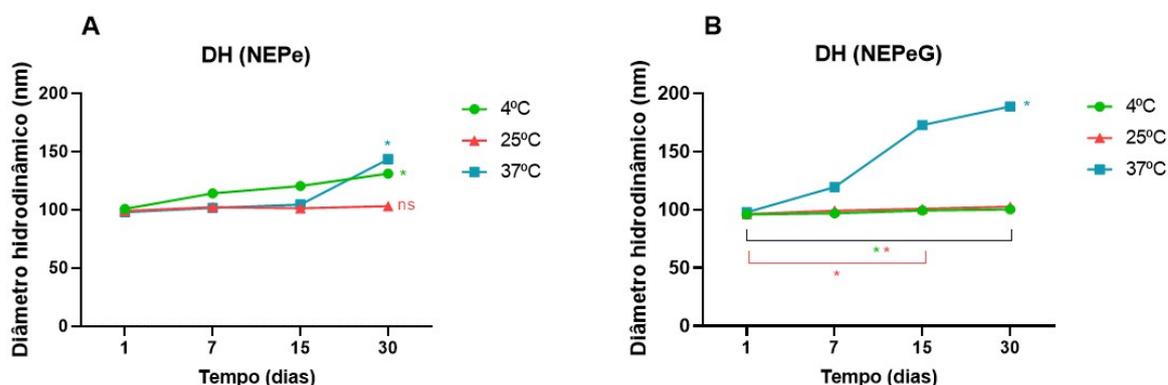


Figura 10. Diâmetro hidrodinâmico (DH) das formulações ao longo do tempo. (A) Nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe) e (B) NEPe gelificada (NEPeG). Os valores foram representados em média e desvio padrão das triplicatas. Para análise estatística, foi aplicada ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparação múltipla Tukey. ns = sem diferença significativa; * = diferença significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$).

No presente estudo, houve aumento de 37,5% entre os dias 15 e 30 no tamanho da NEPe armazenada em 37°C e um aumento progressivo ao longo do tempo na NEPeG à 37°C, que no primeiro dia era $97,8 \pm 1,5$ nm e no dia 30 era $188,7 \pm 3,2$ nm. Esses resultados corroboram com os dados demonstrados em estudos anteriores com nanoemulsões contendo terbinafina e citral, em que as formulações apresentaram aumento do tamanho tanto na nanoemulsão quanto na formulação em gel armazenadas em 45°C (ZHENG et al.,

2016). O aumento da temperatura nas formulações favorece a movimentação das nanogotículas, promovendo a coalescência, o que pode explicar esse comportamento nas amostras de NEPe e NEPeG à 37°C.

5.3. Efeito da temperatura sobre o Pdl das formulações a base de óleo de pequi (NEPe e NEPeG)

O Pdl indica a homogeneidade da nanoemulsão e varia entre 0 e 1,0, e quanto mais próximo de 0, mais as nanogotículas da nanoemulsão são uniformes e a formulação é homogênea (BHATTACHARJEE, 2016).

O Pdl nas amostras de NEPeG não apresentou variação ao longo do tempo em nenhuma das temperaturas (Figura 11), mostrando que o Carbopol® pode prevenir a variação desse parâmetro. A presença de um agente gelificante na formulação reduz a liberdade de movimentação das nanogotículas pelo aumento da viscosidade, o que explica a estabilidade do Pdl em todas as amostras.

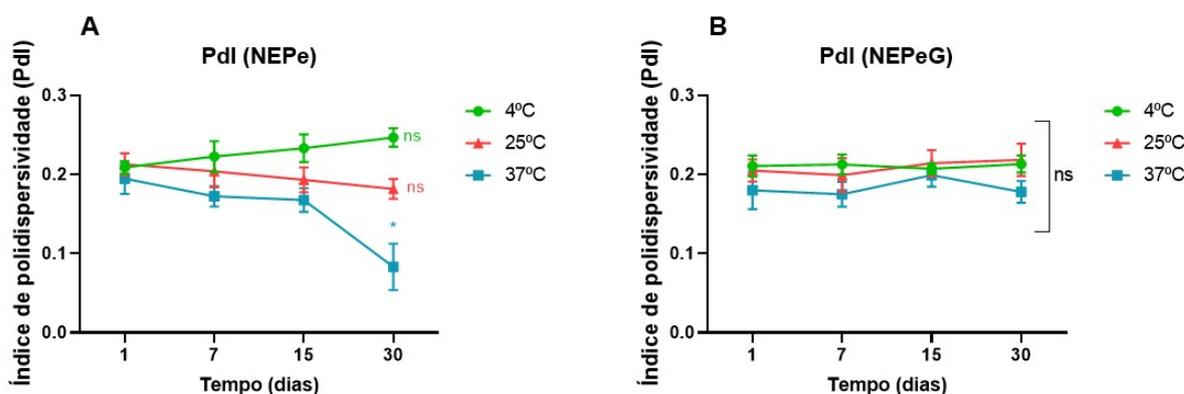


Figura 11. Índice de polidispersividade (Pdl) das formulações ao longo do tempo. (A) Nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe) e (B) NEPe gelificada (NEPeG). Os valores foram representados em média e desvio padrão das triplicatas. Para análise estatística, foi aplicada ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparação múltipla Tukey. ns = sem diferença significativa; * = diferença significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$).

A amostra de NEPe à 37°C pode ter apresentado redução do Pdl de $0,194 \pm 0,019$ para $0,083 \pm 0,012$ devido à alta taxa de coalescência das nanogotículas, em que nanogotículas menores podem estar se aglomerando. Esse resultado mostra que a temperatura elevada afeta tanto o tamanho como o índice de polidispersividade e talvez esses parâmetros podem estar correlacionados.

5.4. Efeito da temperatura sobre o potencial zeta das formulações a base de óleo de pequi (NEPe e NEPeG)

O potencial zeta é a carga superficial da nanopartícula, que depende do meio aquoso e da composição da nanoemulsão. Além dessas variáveis, estudos mostram que variações no pH afetam diretamente o valor do potencial zeta (BHATTACHARJEE, 2016).

Nesse estudo, a NEPeG teve redução de aproximadamente 20% no potencial zeta comparando o primeiro com os demais dias. Por outro lado, a NEPe permaneceu estável à 4°C e 25°C, mas com redução de 70% do potencial zeta à 37°C após 30 dias (Figura 12), o que indica instabilidade ao longo do tempo em temperatura mais elevada. O pH das amostras foi monitorado e permaneceu estável em aproximadamente 7.

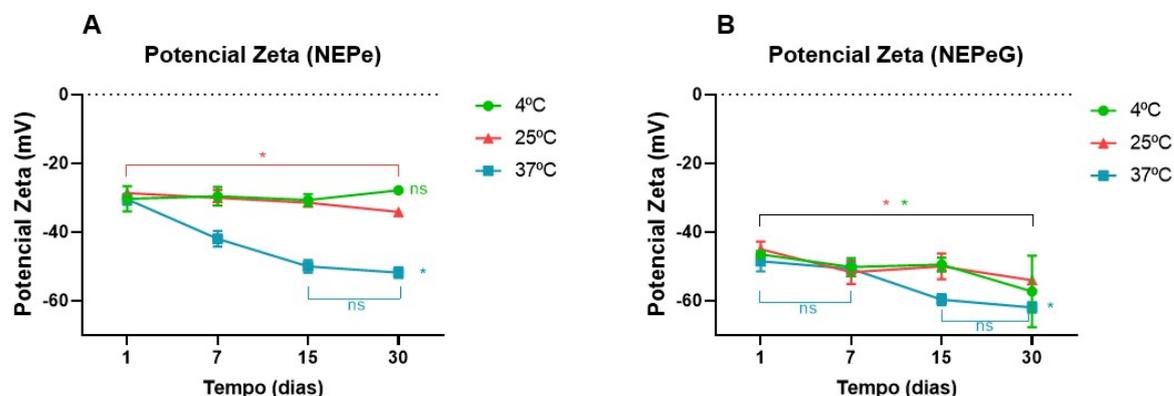


Figura 12. Potencial zeta das formulações ao longo do tempo em pH 7. (A) Nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe) e (B) NEPe gelificada (NEPeG). Os valores foram representados em média e desvio padrão das triplicatas. Para análise estatística, foi aplicada ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparação múltipla Tukey. ns = sem diferença significativa; * = diferença significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$).

O gel de Carbopol® tem natureza aniônica e no presente estudo é possível notar que essa característica influenciou o potencial zeta da formulação em gel. Outro estudo que também utilizava Carbopol® e compostos naturais reportou comportamento semelhante, em que a formulação em gel tem potencial zeta mais negativo do que a nanoemulsão (BACK et al., 2020).

5.5. Peroxidação lipídica por TBARS

O teste de TBARS quantifica o malonaldeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Nesse estudo, o objetivo foi padronizar o teste de TBARS para avaliar a peroxidação em nanoemulsões.

Em uma reação, 2 mols de TBA reage com 1 mol de MDA formando um cromógeno rosa com absorção máxima à 532 nm, conforme demonstrado na figura 13.

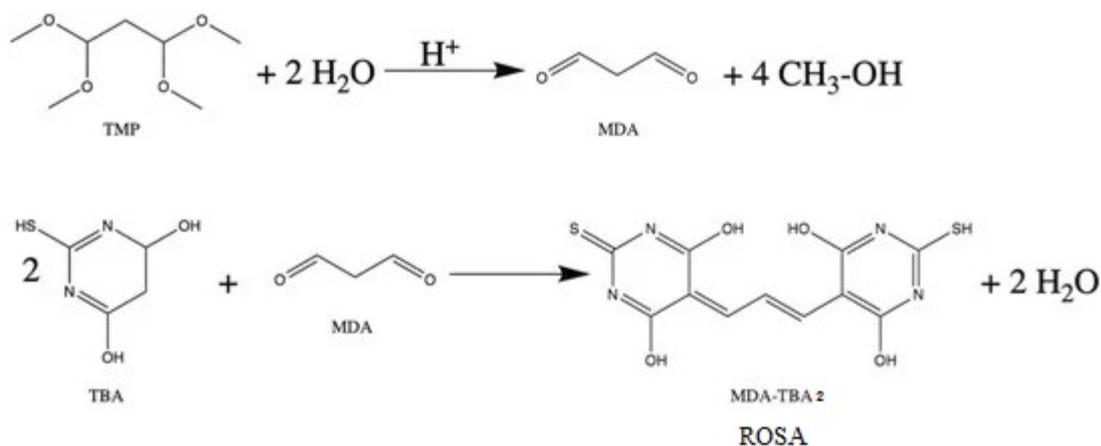


Figura 13. Transformação do trimetoxipropano (TMP) em malonaldeído (MDA) e reação química entre MDA e ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um cromógeno de cor rosa.

A curva-padrão foi obtida pela reação de TMP com TBA e o resultado pode ser observado na figura 14.

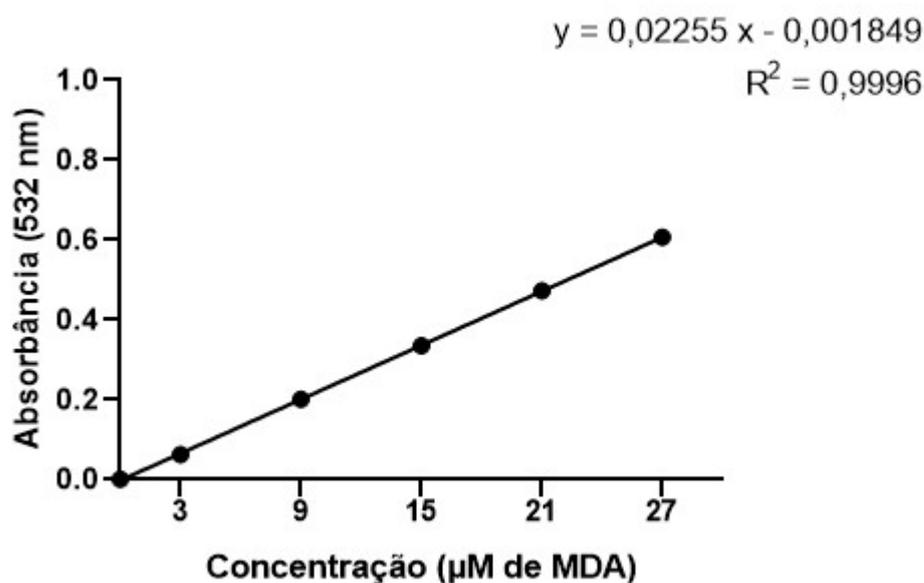


Figura 14. Curva-padrão da reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e trimetoxipropano (TMP). Dados apresentados com média e desvio padrão.

O primeiro estudo foi realizado com amostras de NEPe (50 µL) armazenadas por 40 dias em 4, 25 e 37°C. As amostras reagiram com a solução TCA-TBA em banho-maria e o sobrenadante foi coletado após centrifugação. Após essa etapa, foi observada coloração amarelada na amostra armazenada em 37°C (Figura 15).



Figura 15. Sobrenadante coletado após reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e nanoemulsões à base de óleo de pequi (NEPe) armazenadas em 4, 25 e 37°C por 40 dias.

O óleo de pequi é composto por diferentes ácidos graxos, e dentre eles um dos mais abundantes é o ácido palmítico, com cadeia carbônica saturada (Figura 16). O aldeído formado na quebra dessa cadeia forma o complexo aldeído saturado-TBA, que confere coloração amarela para a reação, segundo a literatura (OANCEA et al., 2022). Outro ácido presente em maior quantidade é o ácido oleico, que tem cadeia monoinsaturada, cujo produto da peroxidação lipídica são aldeídos monoinsaturados, que também formam complexo de coloração amarelada na presença de TBA.

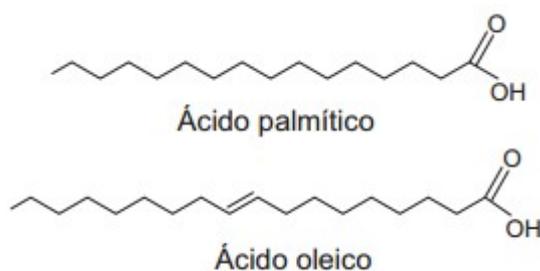


Figura 16. Representação molecular dos ácidos oleico e palmítico.

Na NEPe armazenada em 37°C foi possível observar a ocorrência dessas reações secundárias com coloração amarelada, que também indicam oxidação da amostra, mas que impede a quantificação de MDA pelo espectrofotômetro. A principal hipótese é que, à 37°C, componentes do óleo podem estar degradando e extravasando a membrana da nanoemulsão, causando a turbidez das amostras e mudança na coloração do produto. Portanto, é possível afirmar que a amostra de NEPe nessa temperatura é instável tanto do ponto de vista microscópico como do macroscópico.

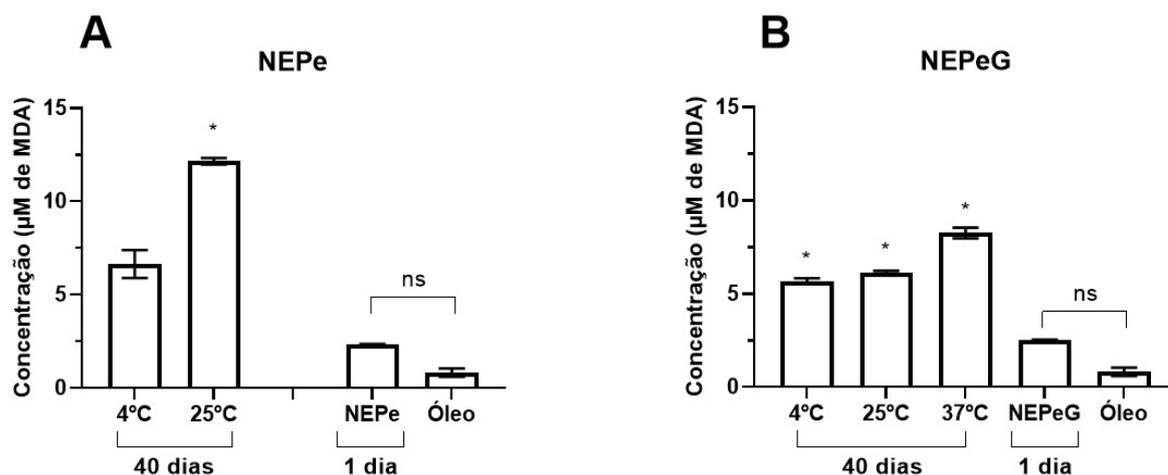


Figura 17. Representação gráfica da quantidade de malonaldeído (MDA) em amostras de nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe) e NEPe gelificada (NEPeG) após reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). O gráfico representa a média e desvio padrão dos valores de MDA obtidos a partir da equação da reta da curva-padrão em 1mg de óleo de pequi. Óleo = óleo de pequi livre extraído por solvente. Para análise estatística, foi aplicada ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparação múltipla Tukey. ns = sem diferença significativa; e * = diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A partir dos resultados obtidos pela absorvância (Figura 17), é possível observar que a produção de MDA nas formulações recém-preparadas de NEPe e NEPeG foi de aproximadamente 2,5 µM, enquanto no óleo livre foi abaixo de 1 µM. Após 40 dias, a NEPe armazenada em 25°C teve produção de MDA 6 vezes maior do que na amostra recém-preparada. A NEPe à 4°C após 40 dias não teve diferença significativa na produção de MDA, o que indica que a temperatura influencia na oxidação das nanoemulsões. Apesar de estar representada no gráfico, a amostra de NEPe à 37°C não foi considerada nos cálculos estatísticos devido às reações secundárias ocorridas.

Nas NEPe e NEPeG foi possível observar que houve produção de MDA após 40 dias em todas as amostras. Então, para o desenvolvimento de formulações mais estáveis do ponto de vista da oxidação, futuramente será necessário o melhoramento do produto com a adição de excipientes que evitem ou retardem o oxidação lipídica.

5.6. Viabilidade celular e *wound healing*

Para avançar nos estudos com as formulações para uso tópico, é importante avaliar a citotoxicidade em células que atuam no processo de cicatrização. Neste estudo, células humanas de fibroblastos foram tratadas com NEPe e NEPeG e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT em duplicata. As células foram submetidas à diferentes concentrações de NEPe (5000, 2500, 500, 250 e 50 µg/mL de óleo) e de NEPeG (500, 250

e 50 $\mu\text{g/mL}$). A alta viscosidade do gel não permitiu que maiores concentrações fossem testadas.

Com base nos dados da figura 18, nenhuma das concentrações apresentou citotoxicidade em células de fibroblastos. Portanto, as formulações nas condições testadas podem avançar nas etapas dos estudos de atividade biológica.

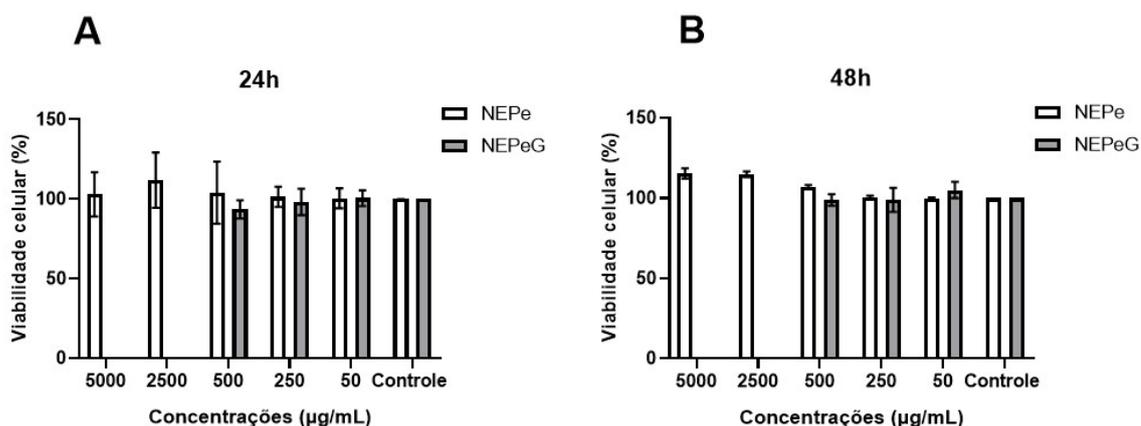


Figura 18. Efeitos do tratamento na viabilidade celular de fibroblastos. As células foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe) e NEPe gelificada (NEPeG). As células foram tratadas com as formulações nas concentrações de óleo de pequi de 5000, 2500, 500, 250 e 50 $\mu\text{g/mL}$. (A) Viabilidade após 24h de tratamento. (B) Viabilidade após 48h de tratamento. Para análise estatística, foi aplicada ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparação múltipla Tukey ($p < 0,05$). Controle = água destilada e filtrada.

A etapa seguinte foi a avaliação do potencial cicatrizante das formulações. Então, fibroblastos foram submetidos ao estudo de *wound healing* e a taxa de migração foi calculada após 24 horas. No grupo controle (água destilada), as células proliferaram em uma taxa de 31,6%, enquanto nos grupos tratados com NEPe a taxa foi de 75,5% e nos grupos tratados com NEPeG foi de 17,2%.

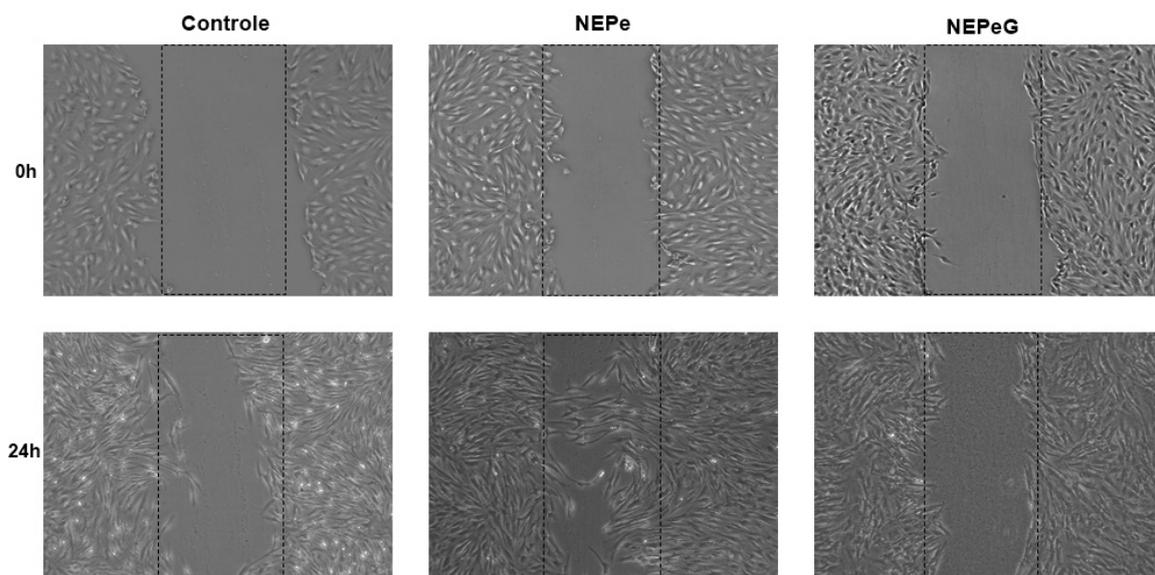


Figura 19. Registro da área de cicatrização em fibroblastos de pele humana em 0h e 24h de tratamento com nanoemulsão à base de óleo de pequi (NEPe) e NEPe gelificada (NEPeG) na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. A representação da área é ilustrativa e o cálculo da taxa de migração foi feito pelo *software* Image J.

Com base nos dados apresentados, é possível concluir que a NEPe é capaz de induzir proliferação de fibroblastos, mas quando a formulação é gelificada, a taxa de migração não difere do grupo controle. A presença do agente gelificante causa diminuição na viscosidade do tratamento, promovendo resistência física na migração das células nos poços. Os resultados apontam que a presença do gel pode ser um limitante para o ensaio e, portanto, outros métodos precisam ser avaliados para melhor compreensão do efeito do gel na atividade cicatrizante da NEPe.

6. CONCLUSÃO

O uso de óleos vegetais extraídos da flora brasileira tem importância econômica, ambiental e terapêutica. O óleo de pequi tem muitas propriedades medicinais e a aplicação da nanotecnologia pode aumentar e melhorar a biodisponibilidade e aplicação desse produto.

Nesse estudo, observamos compatibilidade entre os componentes da formulação e a presença do carbômero não descaracterizou a formulação. Ao longo do tempo, não foi observado precipitação ou coalescência e, apesar de ligeiras variações nos aspectos microscópicos, as amostras armazenadas em 4°C e 25°C permaneceram viáveis,

enquanto as formulações armazenadas em 37°C apresentaram alterações significativas no diâmetro hidrodinâmico e no índice de polidispersividade.

Quando armazenadas em 4°C, as amostras de NEPe apresentaram aproximadamente metade da concentração de malonaldeído em comparação com a amostra em 25°C, o que indica que a temperatura pode ser um fator que favorece a oxidação nas nanoemulsões. Em relação à NEPeG, a quantidade de produtos de oxidação era próxima à da amostra de NEPe em 4°C, o que mostra que a presença do gel pode retardar efeitos da temperatura sobre a formulação. No entanto, como foi observada oxidação ao longo do tempo, são necessários estudos com inclusão de excipientes com ação antioxidante.

Nos ensaios *in vitro*, observamos que as amostras não são tóxicas para fibroblastos, células que desempenham funções importantes na cicatrização de feridas cutâneas. Entretanto, no ensaio de migração celular, a presença do gel foi um fator limitante para observação dos efeitos cicatrizantes por conferir menor viscosidade ao tratamento e, conseqüentemente, resistência física para a migração das células no poço. Portanto, outros ensaios de migração podem ser conduzidos para melhor compreensão dos efeitos do gel na atividade cicatrizante da nanoemulsão.

Com base no estudo realizado, podemos concluir que nanoemulsão gel é um produto com potencial para aplicação em feridas cutâneas e uma alternativa promissora aos tratamentos convencionais devido a origem natural dos componentes e abundância do óleo de pequi no Brasil. Sobretudo, na perspectiva de tornar o produto viável e acessível para a sociedade, estudos complementares podem ser conduzidos para ajustar os componentes da formulação e aumentar a estabilidade à longo prazo.

7. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Graziella Anselmo Joanitti, Ricardo Bentes de Azevedo e Victor Hugo Sousa Araujo são nomeados inventores do seguinte pedido de patente (Patente Provisória: BR 10 2017 025294 9, 24 de novembro de 2017, Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI) referente ao desenvolvimento e uso de nanoemulsões à base de óleo de pequi. Esta patente não representa conflito de interesse com os dados relatados neste manuscrito.

8. REFERÊNCIAS

ALI, M. S. et al. Preparation, Characterization and Stability Study of Dutasteride Loaded Nanoemulsion for Treatment of Benign Prostatic Hypertrophy. 2014.

ARANCIBIA, C. et al. Comparing the effectiveness of natural and synthetic emulsifiers on oxidative and physical stability of avocado oil-based nanoemulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 44, p. 159–166, dez. 2017.

ARAÚJO, A. C. M. A. et al. Bioactive compounds and chemical composition of Brazilian Cerrado fruits' wastes: pequi almonds, murici, and sweet passionfruit seeds. **Food Science and Technology**, v. 38, n. suppl 1, p. 203–214, dez. 2018.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3–4, p. 385–396, jun. 2004.

AXION BIOSYSTEMS, 2023. Wound healing assay: what, why and how. Disponível em: <https://cytosmart.com/resources/resources/wound-healing-assay-what-why-and-how>. Acesso em: 03 de janeiro de 2023.

BACK, P. I. et al. Hydrogels containing soybean isoflavone aglycones-rich fraction-loaded nanoemulsions for wound healing treatment – *in vitro* and *in vivo* studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 196, p. 111301, dez. 2020.

BAEK, G.; KIM, C. Rheological properties of Carbopol containing nanoparticles. **Journal of Rheology**, v. 55, n. 2, p. 313–330, mar. 2011.

BALBANI, A. P.; SILVA, D. H.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 4, p. 461–473, abr. 2009.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.

BHATTACHARYA, D.; GHOSH, B.; MUKHOPADHYAY, M. Development of nanotechnology for advancement and application in wound healing: a review. **IET Nanobiotechnology**, v. 13, n. 8, p. 778–785, out. 2019.

BIELEFELD, K. A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, Benjamin A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 2059–2081, 2013.

BIORENDER, 2023. Disponível em: biorender.com. Acesso em: 01 de janeiro de 2023.

BRASIL, Farmacopeia Brasileira. 6ª edição. Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

BRASIL, Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2008.

CARDOSO, C. R. et al. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 409–415, mar. 2011.

CHEN, S. et al. Nanomaterials in medicine and pharmaceuticals: nanoscale materials developed with less toxicity and more efficacy. **European Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 2, 1 jan. 2013.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **BioTechniques**, v. 43, n. 1S, p. S25–S30, jul. 2007.

COLOMBO, N. B. R. et al. Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 852–862, set. 2015.

DE ALMEIDA, E. M. et al. Therapeutic potential of medicinal plants indicated by the Brazilian public health system in treating the collateral effects induced by chemotherapy, radiotherapy, and chemoradiotherapy: A systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 49, p. 102293, mar. 2020.

DE OLIVEIRA, M. L. M. et al. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 214–219, maio 2010.

DELMAS, T. et al. Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 360, n. 2, p. 471–481, ago. 2011.

DEWI, M. K. et al. Improved Activity of Herbal Medicines through Nanotechnology. **Nanomaterials**, v. 12, n. 22, p. 4073, 18 nov. 2022.

DRESCHER, S.; VAN HOOGEVEST, P. The phospholipid research center: Current research in phospholipids and their use in drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 12, p. 1235, 2020.

EHRlichMAN, R. J. et al. Common Complications of Wound Healing: Prevention and Management. **Surgical Clinics of North America**, v. 71, n. 6, p. 1323–1351, dez. 1991.

EL-SAYED, A.; KAMEL, M. Advances in nanomedical applications: diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19200–19213, jun. 2020.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. 2007.

ESTERBAUER, Hermann; CHEESEMAN, Kevin H. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 407-421.

FERREIRA, B. S. et al. Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5875–5885, 13 jul. 2011.

FORGIARINI, A. et al. Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 7, p. 2076–2083, 1 abr. 2001.

FRUTOS ATRATIVOS DO CERRADO, 2008. Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/frutosatrativoscerrado/9410539429>. Acesso em: 10 de dezembro de 2022.

HOULLEBERGHS, M. et al. Dispersing carbomers, mixing technology matters! **RSC Advances**, v. 12, n. 13, p. 7830–7834, 2022.

JAIswAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, abr. 2015.

JANGDEY, M. S.; GUPTA, A.; SARAF, S. Fabrication, *in-vitro* characterization, and enhanced *in-vivo* evaluation of carbopol-based nanoemulsion gel of apigenin for UV-induced skin carcinoma. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1026–1036, 1 jan. 2017.

JAVID, A. et al. Biocompatible APTES–PEG Modified Magnetite Nanoparticles: Effective Carriers of Antineoplastic Agents to Ovarian Cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 36–54, maio 2014.

JOANITTI, G. A.; MORAIS, PAULO CÉSAR DE; AZEVEDO, R. B. **Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente**. 1. ed. Editora Universidade de Brasília, 2022. v. 1

KHALID, M. N. et al. Long Circulating Poly(Ethylene Glycol)-Decorated Lipid Nanocapsules Deliver Docetaxel to Solid Tumors. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 4, p. 752–758, abr. 2006.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 55–76, 2011.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutrition Research**, v. 29, n. 12, p. 850–858, dez. 2009.

MOREIRA, T. M. O. et al. Pequi: Características biométricas e físico-químicas. **CIÊNCIAS AGRÁRIAS: O AVANÇO DA CIÊNCIA NO BRASIL-VOLUME 1**, v. 1, n. 1, p. 55-67, 2021.

OANCEA, A. G. et al. Determination of Optimum TBARS Conditions for Evaluation of Cow and Sheep Milk Oxidative Stability. **Applied Sciences**, v. 12, n. 13, p. 6508, 27 jun. 2022.

OLIVEIRA, W. L. Ecologia Populacional e extrativismo de frutos de *Caryocar brasiliense* Camb. no Cerrado no norte de Minas Gerais. **Dissertação (Mestrado em Ecologia)** - Universidade de Brasília, Brasília. 2009.

OMBREDANE, A. S. et al. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, p. 101819, ago. 2020.

PÁEZ-HERNÁNDEZ, G.; MONDRAGÓN-CORTEZ, P.; ESPINOSA-ANDREWS, H. Developing curcumin nanoemulsions by high-intensity methods: Impact of ultrasonication and microfluidization parameters. **LWT**, v. 111, p. 291–300, ago. 2019.

PINHEIRO, A. C. et al. Evaluation of Biocompatibility, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Activities of Pequi Oil-Based Nanoemulsions in In Vitro and In Vivo Models. **Nanomaterials**, v. 12, n. 23, p. 4260, 30 nov. 2022.

PRANCE, G. T.; DA SILVA, M. F. *Caryocaraceae*. **Flora Neotropica**, p. 1-75, 1973.

QIAN, C. et al. Inhibition of β -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: Influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1036–1043, dez. 2012.

REHMAN, A. U. et al. Lipid nanocarriers: Formulation, properties, and applications. Em: **Smart Nanocontainers**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 355–382.

RIBEIRO, M. C. et al. Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 386–392, 10 maio 2012.

ROSA, C. et al. The Program for Biodiversity Research in Brazil: The role of regional networks for biodiversity knowledge, dissemination, and conservation. 2021.

SAHIN, K. et al. Lycopene Protects Against Spontaneous Ovarian Cancer Formation in Laying Hens. **Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 1, p. 25–36, 30 mar. 2018.

SAHU, T. et al. Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102487, jun. 2021.

SHAFIEI, M.; BALHOFF, M.; HAYMAN, N. W. Chemical and microstructural controls on viscoplasticity in Carbopol hydrogel. **Polymer**, v. 139, p. 44–51, mar. 2018.

SIVAKUMAR, M.; TANG, S. Y.; TAN, K. W. Cavitation technology – A greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 6, p. 2069–2083, nov. 2014.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1 suppl 1, p. 763–778, 16 abr. 2018.

WALTER, M. N. M. et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 7, p. 1271–1281, abr. 2010.

ZHENG, Y. et al. Effects of Carbopol 934 proportion on nanoemulsion gel for topical and transdermal drug delivery: a skin permeation study. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 5971–5987, nov. 2016.