



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SIMONE MARIA DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DOS ÓLEOS DE BABAÇU E
LICURI**

RECIFE

2019

SIMONE MARIA DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DOS ÓLEOS DE BABAÇU E
LICURI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes.

Co-orientador: Prof. Dr. René Duarte Martins.

RECIFE

2019

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S237a Santos, Simone Maria dos.
Atividade anti-inflamatória tópica dos óleos de babaçu e licuri / Simone
Maria dos Santos. – 2019.
91 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Rafael Matos Ximenes.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.
Inclui referências e apêndices.

1. Óleo. 2. Ácidos graxos. 3. Pele. 4. Attalea speciosa. 5. Syagrus
coronata. I. Ximenes, Rafael Matos (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2021-023)

SIMONE MARIA DOS SANTOS

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DOS ÓLEOS DE BABAÇU E LICURI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em: 13/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes - Presidente
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza – Titular Interna
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque – Titular Externa
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva – Titular Externa
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Cynthia Layse Ferreira de Almeida – Titular Externa
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me conceder sabedoria e discernimento.

A minha família, meus irmãos Sidrone, Sindeval, Sinderlan, Cilene, Cirlene, Irleide e Sueli, por nunca desistir de mim e sempre acreditar, pelo incentivo, força e orientação na tomada de minhas decisões. Em especial aos meus pais, Pedro Antônio e Maria de Fátima.

A meu marido João Paulo e minha filha Sophia, pela força, apoio e companheirismo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Ximenes por acreditar em mim, pela orientação, ensinamentos, amizade e dedicação.

À Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque, pela orientação e incentivo.

Aos amigos de laboratório Raudiney, Wellinton, Fátima, João, Noády e Camila.

Aos amigos e professores, pela colaboração na pesquisa e pela paciência.

A todos do laboratório BIOFARMATOX, pela colaboração nos experimentos.

A FACEPE pelo auxílio financeiro concedido, o qual foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Os óleos dos cocos de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) e licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.), duas palmeiras abundantes nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, possuem diversos usos etnomedicinais e cosméticos, dentre eles como anti-inflamatório. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória tópica dos óleos de babaçu e licuri em camundongos. Os óleos dos cocos babaçu e licuri foram extraídos com a utilização de uma prensa manual de bancada. As características físico-químicas e o perfil de ácidos graxos foram determinados. A atividade anti-inflamatória tópica aguda e crônica foi avaliada em camundongos usando o modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos após aprovação dos protocolos experimentais (23076/039887/2014-51). O ácido láurico foi o componente majoritário de ambos os óleos, os quais também apresentaram teor de acidez, índice de peróxido, de refração e rancidez dentro dos valores de referência. Ao verificar a atividade anti-inflamatória tópica aguda induzida por PMA (2,5 µg/orelha), os óleos de babaçu e licuri foram ativos nas doses de 3 e 10 µL/orelha. Na elucidação dos possíveis mecanismos de ação, os dois óleos (10 µL/orelha) e o ácido láurico (4 mg/orelha) reduziram o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico, fenilpropiolato de etila, e fenol, mas não o edema induzido por capsaicina. No edema crônico, os dois óleos e o ácido láurico reduziram o edema, a atividade à enzima mieloperoxidase e os indicadores histomorfométricos, contudo os animais tratados com ácido láurico apresentaram hiperkeratose. Ambos os óleos apresentaram atividade anti-inflamatória, a qual está relacionada a presença de ácido láurico. Contudo, o tratamento com ácido láurico livre causa efeitos tóxicos na pele.

Palavras-chave: Óleo. Ácidos graxos. Pele. *Attalea speciosa*. *Syagrus coronata*. Caatinga.

ABSTRACT

The oils of babassu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) and licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.), two palm trees found in North and Northeast regions of Brazil, have many ethnomedicinal and cosmetic uses, among them as anti-inflammatory. This work aimed to evaluate the topical anti-inflammatory activity of babassu and licuri oils in mice. The babassu and licuri oils were extracted using a benchtop oil expeller. The physico-chemical characteristics and fatty acid profiles were determined. The acute and chronic topical anti-inflammatory activities were evaluated using the ear edema induced by different phlogistic agents in mice after approval by Ethics Committee on Animal Use (23076/039887/2014-51). Lauric acid was the major compound in both oils, which also presented acidity, peroxide, and refraction indexes and rancidity values within ANVISA guidelines. In PMA-induced ear edema (2.5 µg/ear), babassu and licuri oils were active at 3 and 10 µL/ear. Elucidating the possible mechanisms of action, both oils (10 µL/ear) and lauric acid (4 mg/ear) were active in arachidonic acid, ethyl phenylpropiolate, and phenol-induced ear edema, but not in capsaicin-induced ear edema. In croton oil-induced chronic ear edema, both oils and lauric acid reduced the edema, myeloperoxidase activity, and histomorphometric parameters. However, animals treated with lauric acid showed hyperkeratosis. In conclusion, both oils have anti-inflammatory activity, which is related to the presence of lauric acid. However, the treatment with free lauric acid causes toxic effects on the skin.

Keywords: Oil. Fatty acids. Skin. *Attalea speciosa*. *Syagrus coronata*. Caatinga.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Espécime da <i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng. (sin. <i>Orbignya phalerata</i>) no Parque Nacional do Catimbau	19
Figura 2 –	Partes do fruto de babaçu	20
Figura 3 –	Espécime de <i>Syagrus coronata</i> (Mart.) Becc. (sin. <i>Cocos coronata</i> Mart.) em área de caatinga	22
Figura 4 –	Frutos, mesocarpos e amêndoas da <i>Syagrus coronata</i>	22
Figura 5 –	Componentes da resposta inflamatória aguda e crônica	25
Figura 6 –	Principais manifestações na inflamação aguda e crônica	26
Figura 7 –	Formação dos metabólitos do ácido araquidônico e seus efeitos na inflamação	31
Figura 8 –	Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por PMA	48
Figura 9 –	Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico	50
Figura 10 –	Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por EPP	52
Figura 11 –	Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por capsaicina	54
Figura 12 –	Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por fenol	55
Figura 13 –	Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton	57
Figura 14 –	Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton	59
Figura 15 –	Alterações histológicas no edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Grupos experimentais	39
Tabela 2 –	Perfil de ácidos graxos do óleo de babaçu do Parque Nacional do Catimbau, Brasil	43
Tabela 3 –	Perfil de ácidos graxos do óleo de licuri do Parque Nacional do Catimbau, Brasil	44
Tabela 4 –	Parâmetros físico-químicos dos óleos de babaçu e licuri do Parque Nacional da Serra do Catimbau, Brasil	45
Tabela 5 –	Análise histomorfométrica das orelhas no modelo de inflamação crônica	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AL	Ácido Láurico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Óleo de <i>Attalea speciosa</i>
LI	Óleo de <i>Syagrus coronata</i>
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas
COX (I e II)	Ciclo-oxigenase
EPP	Fenilproprilato de Etila
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama
IL	<i>Interleucina</i>
iNOS	Oxido nítrico indutivo
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
LT	Leucotrieno
LOX	Lipoxigenase
M	Molar
MEE	Método de Emulsificação Espontânea
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator ativador de plaquetas
PMA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
PG	Prostaglandina
PGI₂	Prostaciclina
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
TCD4+	Linfócitos T CD4
TCD8+	Linfócitos T CD8
TNF-α	Fator de Necrose Tecidual Alfa
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm	Mais ou menos
%	Porcentagem
ζmV	Potencial zeta
eV	Eletrovolt
γ	Gama
g	Gramas
°C	Graus Célsius
cm	Centímetro
i.p.	Via intraperitoneal
IR	Índice de refração
Kg	Quilogramas
min	Minuto
mg	Miligramas
mL	Mililitros
p/p	Peso/peso
rpm	Rotação por minutos
Seg	Segundo
v.o.	Via oral
v/p	Volume/peso
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	ETNOBOTÂNICA E SUA IMPORTÂNCIA NA PESQUISA DE PLANTAS MEDICINAIS.....	17
3.2	FAMÍLIA <i>Arecaceae</i>	18
3.2.1	<i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng	18
3.2.2	<i>Syagrus coronata</i> (Mart.) Becc	20
3.3	APLICABILIDADE DOS ÓLEOS DE PALMEIRAS	23
3.4	PROCESSO INFLAMATÓRIO	24
3.4.1	Inflamação Aguda	25
3.4.2	Inflamação crônica	27
3.4.3	Mediadores químicos da inflamação	28
3.4.3.1	<i>Aminas vasoativas</i>	29
3.4.3.2	<i>Citocinas</i>	29
3.4.3.3	<i>Eicosanoides</i>	30
3.4.3.4	<i>Outros mediadores</i>	31
3.5	DOENÇAS INFLAMATÓRIAS.....	32
3.6	FÁRMACOS ANTI- INFLAMATÓRIOS.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	36
4.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO FIXO DAS SEMENTES	36
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS ÓLEOS	36
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	37
4.4.1	Teor de acidez	37
4.4.2	Índice de peróxidos	37
4.4.3	Índice de refração a 40 °C	37
4.4.4	Reação de Kreiss (Rancidez)	38
4.5	AValiação FARMACOLÓGICA	38
4.5.1	Animais e aspectos éticos	38

4.5.2	Atividade anti-inflamatória tópica.....	38
4.5.2.1	<i>Desenho experimental</i>	38
4.5.2.2	<i>Edema de orelha induzido por PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)</i>	39
4.5.2.3	<i>Edema de orelha induzido por ácido araquidônico</i>	39
4.5.2.4	<i>Edema de orelha induzido por fenilpropiolato de etila (EPP)</i>	40
4.5.2.5	<i>Edema de orelha induzida por capsaicina</i>	40
4.5.2.6	<i>Edema de orelha induzido por fenol.....</i>	41
4.5.2.7	<i>Edema de orelha crônico induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton</i>	41
4.5.2.8	<i>Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase.....</i>	42
4.5.2.9	<i>Análise histológica</i>	42
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS FIXOS DE BABAÇU E LICURI.....	43
5.2	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA AGUDA.....	46
5.2.1	Edema de orelha induzido por PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)	46
5.2.2	Edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	48
5.2.3	Edema de orelha induzido por fenilpropiolato de etila	50
5.2.4	Edema de orelha induzido por capsaicina.....	52
5.2.5	Edema de orelha induzido por fenol.....	54
5.3	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA CRÔNICA	56
5.3.1	Edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton	56
6	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE A – ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE BABAÇU	78

1 INTRODUÇÃO

A humanidade faz uso de plantas medicinais para fins terapêuticos há muito tempo visando a cura ou alívio de enfermidades. Nas últimas décadas, vários estudos sobre o uso de plantas medicinais e sua eficácia no tratamento de doenças têm sido publicados em diferentes países (SHARMA et al., 2017). No Brasil, apesar do desenvolvimento da indústria farmacêutica, a busca por plantas medicinais ainda é muito comum. Em grande parte, essa busca é influenciada pela dificuldade de acesso ao sistema de saúde e ao custo dos medicamentos, principalmente entre indivíduos das zonas rurais nas diferentes regiões brasileiras (MACEDO et al., 2018).

A medicina tradicional possui importância econômica, principalmente em países em desenvolvimento, devido à vasta comercialização de matéria prima, oriundas de extrativismo ou cultivadas. Esta prática muitas vezes também acarreta um importante impacto ambiental (SANTOS; LIMA; FERREIRA, 2008, MACEDO et al., 2018). Entretanto, em muitos países desenvolvidos, apesar da ampla disponibilidade dos serviços de saúde, a busca por tratamentos naturais tem aumentado. Este aumento é relacionado principalmente a questões culturais e históricas (AGRA et al., 2008). Assim, diferentes estudos etnobotânicos têm sido realizados para o registro do conhecimento local sobre o uso de plantas medicinais e suas indicações terapêuticas. Desse modo, as moléculas obtidas a partir de plantas medicinais têm contribuído no desenvolvimento de novos fármacos e no tratamento de diferentes doenças (ARAÚJO et al., 2010). Por isso, o uso de plantas para fins terapêuticos tem se difundido mundialmente e tido o reconhecimento da Organização Mundial de Saúde (OMS). Após a Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde, realizada em Alma-Ata, em 1987, a OMS passou a incentivar os diferentes países a explorarem suas práticas de medicina tradicional e empregá-las nos cuidados básicos de saúde, principalmente nos países em desenvolvimento (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007)

As diversas pesquisas etnobotânicas realizadas na região Nordeste possibilitaram a identificação de diferentes espécies de plantas medicinais, bem como o registro de suas indicações terapêuticas, tais como: *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-Praia: inflamações e desordens respiratórias); *Anacardium occidentale* L. (Cajueiro: cicatrizante de feridas e calmante); *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Angico: infecções, inflamações e expectorante); *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B.Gillet (Amburana-de-Cambão: infecções, problemas respiratórios e digestivos); *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem.

& Schult.) T.D. Penn. (Quixabeira: inflamações e cicatrizante de feridas); *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Pau-ferro ou Jucá: infecções urinárias, problemas na próstata e inflamações); *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. (Murta-do-mato ou Quina-quina: dores, inflamações, problemas respiratórios e infecções); *Ximenia americana* L. (Ameixa: inflamações, cicatrização de feridas, dores e infecções); *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta: inflamações, infecções, dores, cicatrização de feridas e anemia); *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng. (Babaçu: inflamações, cicatrização de feridas e problemas gastrointestinais); *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (Catolé ou Licuri: inflamações, infecções e dores) (FERREIRA; LADIO; ALBUQUERQUE, 2011; ALBUQUERQUE, 2006; MACEDO et al., 2018).

As palmeiras, no Brasil e no mundo, apresentam uma ampla distribuição e têm importância econômica devido a versatilidade de usos das plantas e seus derivados (fibras, óleo, frutas, material para construção, remédios, combustível e artesanato). Em várias comunidades da zona rural e indígenas, as palmeiras têm sido muito utilizadas como fonte de alimentação (humana e animal), remédio, na construção civil, e na confecção de utensílios variados (domésticos, caça e pesca) (MACÍA, 2004; SOSNOWSKA; BALSLEV, 2009). Além disso, as palmeiras apresentam grande potencial como fontes de substâncias bioativas que podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos protótipos para tratamento e cura de enfermidades (PLOTKIN; BALICK, 1984).

Attalea speciosa Mart. ex Spreng (Areaceae) (sin. *Orbignya phalerata* Mart.), é conhecida popularmente como babaçu. Esta espécie é considerada uma das mais abundantes na região do sul da Amazônia, podendo ser encontrada em diferentes estados como: Maranhão, Piauí, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Pará, Pernambuco e Ceará. Na zona de transição entre a bacia Amazônica e o semiárido Nordeste o babaçu é muito utilizado no extrativismo pelas *quebradeiras de coco babaçu* para obtenção das amêndoas e seus derivados (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2012; MAY et al., 1985). Muitas comunidades fazem uso de diversas partes do babaçu, as quais possuem diversas aplicações, como alimento para o homem e animais, na confecção de artesanatos, na construção, na produção de cosméticos e em rituais religiosos (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2012). Na medicina popular, o babaçu apresenta diferentes indicações terapêuticas, tais como: cicatrizante, laxante, anti-inflamatório, também sendo utilizado no tratamento da hepatite, da gastrite, dentre outros. Na literatura, há estudos da atividade farmacológicas do babaçu para cicatrização, inflamação, como antitumoral, imunomodulador, vasculares etc. (SOUZA et al., 2011; SCHEIBE et al., 2016; AZEVEDO et al., 2007).

Syagrus coronata (Mart.) Becc. (Arecaceae) (sin. *Cocos coronata* Mart.; *Syagrus quinquefaria* (Barb.Rodr.) Becc.), é conhecida popularmente como licuri, catolé, ouricuri ou coco-babão. No Brasil, o licuri pode ser encontrado em diferentes estados tais como: Pernambuco, Sergipe, Bahia, Alagoas e Minas Gerais, bem como em toda a região do semiárido nordestino (IHAA et al., 2014; LEAL et al., 2013; SALLES et al., 2010; BELVISO et al., 2013). O licuri possui diversos usos etnobotânicos, dentre eles: alimentício (humano e animal), paisagístico, forrageio, energético, na confecção de artesanatos, além do uso medicinal (CARVALHO, FERREIRA ALVES, 2014). Na medicina popular, o licuri é indicado no tratamento de diabetes, micoses, dores, na cicatrização de feridas e em doenças inflamatórias (HUGHES et al., 2013). Na literatura, há estudos sobre sua atividade antimicrobiana e antioxidante (BESSA et al., 2016; BAUER et al., 2013).

Diferentes plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de doenças inflamatórias. O processo inflamatório é uma resposta fisiológica caracterizada pela ativação do sistema imunológico quando em contato com um agente lesivo químico, físico ou biológico, na qual ocorre a liberação de mediadores químicos responsáveis pelos sinais clínicos de dor, calor, rubor e edema. Ainda que seja de fundamental importância para restauração da homeostase quando há uma injúria no tecido, a inflamação descontrolada é responsável pelo surgimento de diferentes patologias, tanto agudas e quanto crônicas (REDMAN; SACKS; SARGENT, 1999; OKE; TRACEY, 2007; GHASEMIAN; S. OWLIA; B. OWLIA, 2016).

Em vista disso, essa pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória tópica dos óleos de babaçu e licuri, com intuito de determinar se as propriedades curativas atribuídas pelas comunidades que fazem uso destas plantas medicinais realmente existem, e quais os mecanismos envolvidos na possível atividade anti-inflamatória destes óleos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica dos óleos de babaçu e licuri a partir de seus usos etnomedicinais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair óleos fixos das amêndoas de *A. speciosa* e *S. coronata*;
- Realizar a análise físico-química dos óleos fixos das amêndoas de babaçu e licuri;
- Determinar o perfil de ácidos graxos em ambos os óleos;
- Investigar a atividade anti-inflamatória tópica aguda dos óleos fixos das amêndoas de babaçu e licuri e seus possíveis mecanismos de ação;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica crônica dos óleos citados.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ETNOBOTÂNICA E SUA IMPORTÂNCIA NA PESQUISA DE PLANTAS MEDICINAIS

A medicina tradicional é amplamente utilizada em várias partes do mundo e apresenta sua importância econômica, principalmente em países em desenvolvimento, especialmente pelo uso das plantas medicinais. O interesse pelo uso destas plantas ocorre em virtude do acesso limitado aos serviços de saúde por parte da população, que não usufrui de recursos como consultas e medicamentos industriais, mas também de uma forte carga cultural e religiosa (AGRA et al., 2008). Segundo Rhaman et al. (2004), as pesquisas com plantas medicinais possuem importância econômica, além de contribuir para conservação da biodiversidade, quando o seu uso acontece de forma sustentável.

O uso de plantas medicinais faz parte da tradição de culturas que buscam nessas plantas a cura ou o alívio de enfermidades, sendo esse conhecimento repassado através das gerações. Assim, no Brasil é recorrente o uso de tais plantas como um meio terapêutico realizado pela população de baixa renda (MATOS, 2007). Na grande maioria das vezes, esse uso é feito de forma totalmente empírica baseado em tradições que são repassadas de forma oral (VANDEBROEK et al., 2011).

A flora presente no bioma da caatinga tem se tornado parte integrante das culturas presentes nessa região do Nordeste e seu uso tem sido repassado ao longo das gerações (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Os raizeiros são indivíduos presentes nessas culturas, os quais detêm o conhecimento sobre o uso de plantas medicinais, no entanto, parte desse conhecimento vem sendo perdido em virtude do processo de urbanização, modernização e do aumento do acesso ao sistema de saúde (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

A etnobotânica é a ciência que estuda as relações entre os homens e as plantas, dentre elas o uso de plantas para tratamento de doenças que acometem homens e animais (HEINRICH, 2006). Neste contexto, a etnofarmacologia, como ciência correlata, busca validar o uso medicinal de plantas usadas popularmente, a partir de métodos experimentais reprodutíveis que simulem o uso popular, comparando a eficácia das plantas medicinais com um tratamento padrão, normalmente alopático (GERTSCH, 2009).

Além de úteis na validação da eficácia e segurança do uso de determinadas espécies na medicina popular, estas ciências estão um passo a frente das demais no que diz respeito à

descoberta de novos fármacos, porque buscam estas novas moléculas em espécies que já foram “testadas” de modo empírico ao longo das gerações, o que leva a um percentual de êxito maior do que a escolha aleatória de espécies para estudo (HEINRICH, 2006). Assim, por muitos anos os produtos naturais, dentre eles as plantas medicinais, têm contribuído na descoberta de novos protótipos que podem ser fornecidos para indústria farmacêutica e utilizados pela medicina moderna (PINHEIRO; BOYLAN; FERNANDES, 2012).

Diferentes famílias de interesse já foram identificadas por meio de estudos etnobotânicos na região do Nordeste, tais como: Apocynaceae; Anacardiaceae; Arecaceae; Asteraceae; Begoniaceae; Brassicaceae; Bromeliaceae; Cactaceae; Convolvulaceae; Celastraceae; Cucurbitaceae; Euphorbiaceae; e Fabaceae, dentre outras (ALBUQUERQUE et al., 2007).

3.2 FAMÍLIA *Arecaceae*

A família Arecaceae (Palmae) possui aproximadamente 185 gêneros e 2522 espécies distribuídas nas regiões equatoriais, tropicais e subtropicais. No Brasil, ocorrem 37 gêneros e 297 espécies, das quais 136 são endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020; PÉREZ, et al., 2012; GIULIETTI et al., 2005). Esta apresenta uma grande variação na distribuição geográfica e riqueza quanto a diversas das espécies (EISERHARDT et al., 2011). Em virtude da variedade de espécies, a família Arecaceae apresenta grande importância econômica devido ao uso na alimentação, na confecção de artesanato, na medicina e na construção civil (SANTOS; FERREIRA, 2012; RUFINO et al., 2008). Dentre as espécies utilizadas na medicina popular, são citadas *Acrocomia intumescens* Drude (macaúba); *Cocos nucifera* L. (coco-da-praia); *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (licuri) e *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng. (babaçu).

3.2.1 *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng

Attalea speciosa Mart. ex Spreng, (sin. *Orbignya phalerata* Mart.) é conhecida como babaçu ou coco-babaçu. Esta espécie está presente em diversos estados da região Nordeste, principalmente no bioma brasileiro conhecido como mata dos cocais, situado nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará. Nesta região, o extrativismo do babaçu é um importante recurso econômico, sendo fonte de renda para cerca de 300 mil famílias, devido a uma atividade predominantemente feminina, realizada pelas *quebradeiras de coco babaçu* (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2012). Além da ocorrência na mata dos cocais, o babaçu também é encontrado

em abundância em outras regiões mais restritas, como na Chapada do Araripe/CE e no Vale do Catimbau/PE (Figura 1). Nessas regiões, também podem ser encontradas pequenas comunidades de mulheres quebradeiras de coco babaçu (BRAGA, 1976; RUFINO et al., 2008).

Figura 1 – Espécime da *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng. (sin. *Orbignya phalerata*) no Parque Nacional do Catimbau.



Fonte: <http://www.cerratinga.org.br/babaçu/>

A literatura etnobotânica do babaçu relata numerosos usos para as diversas partes da planta. Dos frutos, as sementes são utilizadas para produção do óleo de babaçu, o mesocarpo como complemento alimentar para o gado e na produção do leite de babaçu, enquanto as cascas e endocarpo são utilizados na produção de carvão com alto poder calorífico (Figura 2). As folhas são utilizadas na construção de telhados e na confecção de artesanatos diversos, enquanto os estipes (troncos) são utilizados na construção civil (BRAGA, 1976; RUFINO et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

Figura 2 – Partes do fruto de babaçu.



Fonte: <http://www.aslubip.org.br/babacu/a-palmeira/>

Em relação ao uso medicinal, o óleo, a borra e a farinha do mesocarpo são os principais produtos utilizados. O óleo é empregado na forma tópica para o tratamento de inflamações, pancadas, artrite, otite, conjuntivite, leucorreia e na cicatrização de feridas. A farinha do mesocarpo é utilizada, tanto de forma tópica, como oral, para tratamento de gastrite, cicatrização de feridas, leucorreia e inflamações. A borra, resíduo obtido após a extração do óleo pelo método tradicional, é o produto mais utilizado no tratamento de feridas de pele (RODRIGUES et al 2015; RUFINO *et al.*, 2008; SOUZA et al., 2011). Devido ao grande potencial terapêutico e biotecnológico do babaçu, a espécie foi incluída em 2009 na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Esta espécie é referida por Renato Braga, no seu célebre livro “Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará”, como um dos maiores recursos vegetal disponíveis no Brasil (BRAGA, 1976). Atualmente, a espécie é a principal fonte silvestre de óleo do mundo, com larga utilização industrial, sendo considerado um dos principais produtos extrativistas do país, contribuindo de maneira significativa para a economia de alguns estados da federação (LORENZI, 2010).

3.2.2 *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.

Syagrus coronata (Mart.) Becc. (sin. *Cocos coronata* Mart.) é conhecida popularmente como licuri, catolé, Ouricuri ou coco-babão, e encontrada na distribuída na América do Sul

(Figura 3). No Brasil, está presente nos estados de Alagoas, Pernambuco e Sergipe, bem como em áreas costeiras da Bahia e em parte de Minas Gerais (LINS et al., 2002; RODRIGUES et al., 2011; ILHA et al., 2014; CARVALHO, FERREIRA ALVES, 2014). Diferentes partes *S. coronata* possuem indicação terapêutica (Figura 4): o endosperma líquido (água de coco) é utilizado para inflamação ocular, no processo de cicatrização e como analgésico; parte da casca do coco é empregada para o tratamento de picada de animais peçonhentos (HUGHES et al 2013); e a inflorescência e o fruto são indicados para catarata e problemas do trato digestório (ALBUQUERQUE et al 2007; RUFINO et al 2008).

Além da empregabilidade medicinal, o licuri é utilizado em ornamentação (LINS et al 2002) e tem importância econômica na produção de biodiesel. Sua composição química é comparável com a do babaçu, com o qual compartilha diversas propriedades (SALLES et al 2010). Além disso, nas comunidades onde são realizadas as coletas de *S. coronata*, este contribui com a economia de subsistência na produção de diferentes produtos, como ração animal, artesanatos e na produção de sabão e velas (HUGHES et al., 2013).

Na literatura há relato de diferentes estudos farmacológicos com *S. coronata* tais como: a atividade antimicrobiana das folhas, inflorescência e endosperma sólido (HUGHES et al., 2013), com óleos fixo e essenciais das amêndoas (SANTOS et al., 2019; BESSA et al., 2016); atividade anti-*Leishmania amazonensis* da casca do coco de *S. coronata* (RODRIGUES et al 2011); atividade antioxidante do óleo de amêndoas de *S. coronata* (BAUER et al., 2013); e atividade larvicida do óleo de amêndoas de *S. coronata* contra *Aedes aegypti* (SANTOS et al., 2017).

Figura 3 – Espécime de *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (sin. *Cocos coronata* Mart.) em área de caatinga.



Fonte: Márcia Vanusa da Silva (Arquivo pessoal).

Figura 4 – Frutos, mesocarpos e amêndoas da *Syagrus coronata*.



Fonte: https://br.pinterest.com/pin/291256300876237827/?nic_v2=1a7fDrUTe

3.3 APLICABILIDADE DOS ÓLEOS DE PALMEIRAS

Diferentes espécies oleaginosas pertencentes à família Arecaceae apresentam aplicabilidade do óleo, tanto econômica e quanto farmacológica, tais como: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., *Acrocomia intumescens* Drude, *Attalea speciosa*, *Elaeis guineensis* Jacq., *Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud, *Mauritia flexuosa* L.f. e *Syagrus coronata*. Assim, os óleos de palmeiras podem ser fontes promissoras de substância bioativas para a indústria farmacêutica e cosmética.

Acrocomia aculeata e *A. intumescens* (macaíba ou macaúba) estão entre as espécies oleaginosas mais produtivas (MOURA, VENTRELLA, MOTOIKE, 2010). O óleo fixo extraído do mesocarpo da *A. aculeata* é empregado na produção de biodiesel em virtude do grande teor de ácidos graxos insaturados, bem como na produção de cosméticos devido ao alto teor de ácido láurico (ABREU et al., 2011; LOPES et al., 2013). Além disso, a presença desses ácidos graxos também é responsável pela atividade anti-inflamatória e diurética deste óleo (LESCANO et al., 2015).

Elaeis guineensis (dendê), no Brasil é uma espécie de grande importância econômica devida sua empregabilidade na produção de biodiesel. Sua utilização como combustível está relacionada ao elevado valor de aquecimento, ausência de enxofre na sua composição química e por ser uma fonte renovável de alto rendimento (KUSS et al., 2015). Além disso, o óleo de palma é um dos mais explorados no mundo, por apresentar um alto rendimento é responsável por uma variedade de produtos comercializados tais como: óleo de cozinha, margarina, como matéria prima na produção de sabão e na área de cosméticos (SYAHMI et al., 2010; TAN et al., 2009). O óleo extraído das folhas de *E. guineensis* apresenta efeitos anti-hipertensivos, cardiovascular, antioxidante e antimicrobiana, bem como, segurança quanto a sua toxicidade (JAFFRI et al., 2011; ANYANJI, MOHAMED, HAIR BIN BEJO, 2013; YIN, ABDULLAH, PHIN, 2013).

Phoenix canariensis, conhecida popularmente por tamareira das canárias devido a sua origem, é empregada principalmente na ornamentação de cidades (NEHDI, et al., 2010). O óleo extraído da tamareira pode ser utilizado na indústria de alimentícia, cosméticos, bem como na produção de biodiesel (AMANI, et al., 2013; AZEEM et al., 2016; HERCH, KALLEL, BOUKHCHINA, 2014). Além da empregabilidade na indústria, o óleo da *P. canariensis* apresenta atividade antioxidante (HERCH, KALLEL, BOUKHCHINA, 2014).

Syagrus coronata (licuri) é uma espécie típica da região do semiárido e por ser considerado como fonte oleaginosa é indicada na produção de biocombustível, bem como, na

produção de cosméticos, como hidratantes (IHAA *et al.*, 2014, LEAL *et al.*, 2013). Na literatura, o óleo do licuri apresenta atividade antimicrobiana (BESSA *et al.*, 2016); e antioxidante (BELVISO *et al.*, 2013).

Attalea speciosa é uma espécie endêmica do Brasil e amplamente distribuída na região Norte e Nordeste. Por ser uma fonte sustentável de biomassa, apresenta aplicabilidade em diferentes áreas, tais como, na indústria farmacêutica, alimentícia (produção de sorvetes, chocolates e margarinas), na indústria de cosméticos, assim como, na produção de biodiesel, tintas e sabão (TEXEIRA, 2008; VINHAL, LIMA, BARBOSA, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015). Além disso, no óleo do babaçu podem ser identificados diferentes ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa ou média. Estes são responsáveis por diferentes atividades farmacológicas, como atividade antioxidante (NOBRE *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2015), na hiperplasia prostática (SOUZA *et al.*, 2011) e na ativação do sistema imune (HONORIO-FRANÇA *et al.*, 2014).

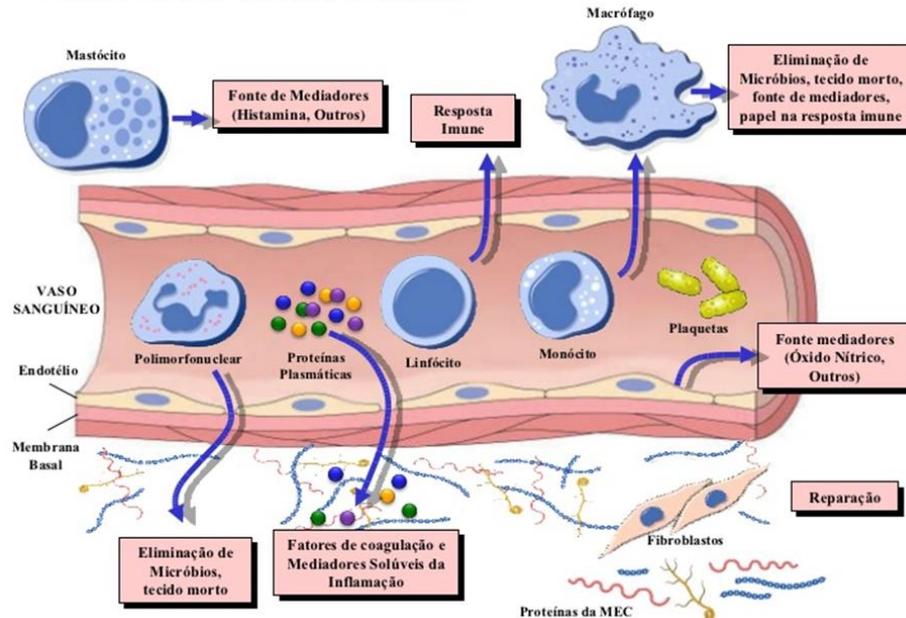
3.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta complexa do organismo, sempre com intuito de eliminar o causador de lesões tecidual ou áreas de necrose. Assim, a inflamação tem função protetora contra ação de agentes lesivos (ex. micro-organismos, toxinas, radiações), a fim de eliminá-los. Desta forma, sem essa resposta, as infecções poderiam prosseguir e a cicatrização não existiria (PATIL, K. R.; PATIL, C. R., 2017; CHEN *et al.*, 2018). Todavia, a atuação da resposta inflamatória na remoção do agente lesivo e início do reparo, ativando o sistema imune (celular e humoral), também pode causar dano considerável ao tecido sadio, em virtude da liberação de mediadores químicos e da ação dos fagócitos (EL-DEMERDASH, 2011; IMANIFOOLADI; YAZDANI; NOURANI, 2010; BABU; PANDIKUMAR; IGNACIMUTHU, 2009).

As principais características da resposta inflamatória são: reconhecer o agente lesivo; promover o recrutamento dos leucócitos; realizar a remoção do agente causador da lesão; estabelecer o controle da resposta; e por fim reparar o dano (FIGURA 5). A presença das células e o tempo de duração da resposta pode caracterizar a inflamação como aguda, quando rápida e de curta duração, ou crônica quando o tempo de duração é maior (dias a anos) (SILVA *et al.*, 2014; WALEAVA *et al.*, 2007).

Figura 5 – Componentes da resposta inflamatória aguda e crônica.

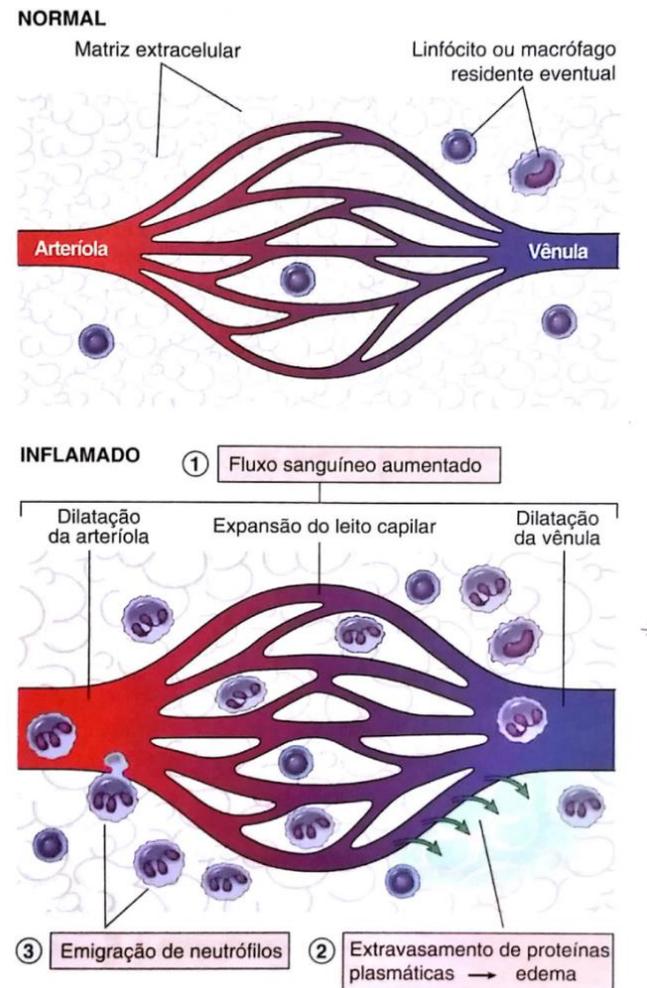
Visão Geral da Inflamação



Fonte: Kumar (2008, p. 35).

3.4.1 Inflamação Aguda

Uma reação inflamatória aguda é uma resposta rápida a uma injúria ou a agressão de um microrganismo tipificada com os sinais clínicos de edema, eritema, dor e calor (CALDER, 2006; FEGHALI; WRIGHT,1997; CHEN et al., 2018). A presença de um agente lesivo pode promover alterações vasculares, com vasodilatação e aumento da permeabilidade nos capilares, elevação do fluxo sanguíneo, levando formação de edema e eritema. Além dos eventos celulares, com migração leucocitária, recrutamento e ativação das células de defesa (leucócitos polimorfonucleares) dos vasos para o tecido, a o deslocamento de citocinas e proteínas, aumentando assim a concentração dos mesmos no tecido circundante (Figura 6) (BABU; PANDIKUMAR; IGNACIMUTHU, 2009; KUSHNER, 1993; NASCIMENTO et al., 2006; HORADAGODA et al 1999).

Figura 6 – Eventos vasculares na inflamação aguda.

Fonte: Kumar (2008, p. 35).

As alterações vasculares são amplificadas pela liberação de mediadores químicos, tais como histamina, serotonina, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, citocinas pró-inflamatórias, dentre outros. Assim a resposta inflamatória atua desencadeando a ativação do sistema imunológico de modo que possa promover a eliminação do agente lesivo com a reparação do dano tecidual (CALDER, 2006; FEGHALI; WRIGHT, 1997; HORADAGODA et al., 1999).

A migração das células de defesa do vaso para o tecido é favorecida pelo processo de recrutamento dos leucócitos, envolvendo as etapas de rolamento, adesão e diapedese na qual há um aumento de moléculas quimioatrativas e da adesão celular. O tipo de leucócitos presente no local da lesão varia com o tempo e depende do estímulo. Entre 6 e 24 horas, predominam os neutrófilos, passado esse tempo, entre 24 a 48 horas (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). Diferentes células que participam da resposta inflamatória são os

neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos, cada célula atua desempenha uma função específica.

Na presença de um agente lesivo, os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune que respondem as quimiocinas. Dentre as que estão na corrente sanguínea, é a que apresenta maior concentração e consegue aderir a células endoteliais de forma mais rápida (COLLINGTON; WILLIAMS; WELLER, 2011; MELNICOFF; HORAN; MORAHAN, 1989; INGERSOLL, et al., 2011; SADIK; KIM; LUSTER, 2011).

Assim, como os neutrófilos, os monócitos estão presentes na resposta inflamatória e respondem a sinais endógenos (quimiocinas e citocinas) e exógenos (toxinas), tais substâncias são responsáveis pela migração dos monócitos e diferenciação em macrófagos ou células dendríticas (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). Além disso, diferentes funções podem ser atribuídas aos macrófagos. Estes são responsáveis pela eliminação de microrganismos e células mortas, e favorecem o processo de cicatrização e a resposta adaptativa gerando memória imunológica (INGERSOLL, et al., 2011; ZIEGLER-HEITBROCK, 2006; YRLID; JENKINS; MACPHERSON, 2006).

Em concentrações significativas no sangue, os monócitos podem estar presentes tanto em resposta inflamatória aguda quanto na crônica. Isso pode ser observado em uma linhagem de monócitos do tipo CD14 e CD16 que foram identificadas no sangue de pacientes com artrite reumatoide, aterosclerose, doença de Kawasaki, pancreatite e infecções por bactérias que levam a inflamação. Entretanto, a ativação dos macrófagos por meio de presença de toxinas, injúria no tecido ou citocinas é responsável por promover a liberação de citocinas como fator de necrose tumoral e IL (ZIEGLER-HEITBROCK, 2006).

3.4.2 Inflamação crônica

A inflamação crônica é uma resposta prolongada, na qual diferentes células de defesa atuam de forma desorganizada, acarretando hiperplasia e persistência de infiltrado inflamatório no tecido lesado. Este processo leva a eventos simultâneos de destruição tecidual e cicatrização. Além disso, a concentração e a natureza do infiltrado vai determinar o dano no tecido (BUCKLEY et al., 2001). Deste modo, uma inflamação crônica é caracterizada por infiltração de células mononucleadas, tais como macrófago, plasmócitos, linfócitos, além das células dendríticas e fibroblastos. Tal processo inflamatório também é responsável pela destruição do tecido induzido pelas substâncias liberadas pelas células de defesa podendo ocorrer o reparo com a ativação da angiogênese e fibrose. Assim, a ativação da inflamação

crônica pode ser resultado de infecções persistentes por micro-organismos de difícil erradicação ou exposição prolongadas a agentes potencialmente tóxicos (PATEL *et al.*, 2014; PATIL, K. R.; PATIL, C. R., 2017).

Diferentes doenças são caracterizadas como inflamação crônica tais, como: artrite reumatoide, asma, esclerose múltipla, gastrite associada a *Helicobacter pylori*, doença inflamatória intestinal, aterosclerose, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, psoríase, dentre outras. A liberação e ativação de citocinas e quimiocinas são responsáveis por sinalizar células do sistema imunológico, e estas pela ativação da resposta inflamatória (BARNES; KARIN, 1997; HAN *et al.*, 1998; INGERSOLL *et al.*, 2011).

A interação de fatores genéticos e ambientais é um fator contribuinte para o aparecimento de doenças inflamatórias. Assim, sinais ambientais são responsáveis por ativar a expressão de genes que atuam na produção de RNA mensageiro e proteínas. Um dos principais fatores de transcrição que atua na regulação de doenças autoimune e inflamatórias é o fator nuclear κ B (NF- κ B). Este, uma vez ativado é responsável por estimular a produção e liberação de quimiocinas, citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) bem como a ativação das enzimas COX-2 e iNOS, com consequente liberação de mediadores químicos, prostaglandinas e óxido nítrico, respectivamente (TAK; FIRESTEIN, 2001; BARNES; KARIN, 1997; HAN *et al.*, 1998).

Outra célula que participa da resposta inflamatória crônica são os fibroblastos, os quais são responsáveis pela produção de quimiocinas que atuam na ativação do sistema imunológico inato e adquirido, e por isso são tidas como células determinantes da intensidade e do tipo de infiltrado inflamatório existente. Isto porque, uma resposta inflamatória pode ser desencadeada na presença ou ausência de um agente infeccioso. Micro-organismos patogênicos atuam liberando toxinas que ativam as células do sistema imune inato e adquirido de modo a isolar ou eliminar o agente lesivo como verificado em granulomas. Em contrapartida, uma inflamação crônica pode ser expressa sem presença de uma infecção ou pouca relação antígeno-anticorpo, sendo caracterizada apenas pela persistência de um infiltrado inflamatório (BUCKLEY, *et al.*, 2001; INGERSOLL *et al.*, 2011).

3.4.3 Mediadores químicos da inflamação

A ocorrência da resposta inflamatória é caracterizada por alterações fisiológicas que ocorrem graças a liberação de diferentes mediadores químicos e substâncias correlatas pertencente ao grupo dos autacoides. Estes são compostos por aminas vasoativas, citocinas,

cininas, eicosanoides, óxido nítrico, fator ativador de plaquetas, dentre outros. Assim uma vez produzido pelo organismo, os mediadores químicos podem atuar nas funções fisiológicas (homeostase) e patológicas, agindo de forma autócrina (atuação na mesma célula) ou parácrina (atuação em células adjacentes) (PATEL et al., 2014; CLAUDIANO et al., 2013).

3.4.3.1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas compreendem a histamina e serotonina. Formada partir da histidina, a histamina está presente nos mastócitos em grânulos na forma pré-formada podendo ser encontrada em maior concentração na pele, pulmão e mucosa intestinal. Está entre os primeiros mediadores da resposta inflamatória (WHITE, 1999). Além dos mastócitos, a histamina pode ser liberada por basófilos e plaquetas. O processo de degranulação que leva liberação das aminas vasoativas pode ser ativado por meio de injúria nos tecidos, quando ocorre a ativação sistema complemento, bem como dos neuropeptídios e citocinas (WHITE, 1999; PATIL, K. R.; PATIL, C. R., 2017). Desta forma, a liberação das aminas vasoativas é responsável pela dilatação das arteríolas e contração das células endoteliais, levando ao aumento da permeabilidade vascular (TING et al., 2007; SILVA, 2006).

A histamina endógena está envolvida em diversos processos fisiológicos responsáveis por conferir a homeostase, bem como, nas respostas alérgicas e agressão tecidual. No cérebro, ela atua como neurotransmissor desempenhando diferentes funções como no controle de neuroendócrino, termorregulação e vigília, bem como na regulação cardiovascular. No estômago, a histamina é responsável por estimular a produção do suco gástrico (TABAREAN et al., 2012; WHITE, 1999). Por ser um mediador vasoativo, a serotonina age de forma semelhante a histamina, está presente na forma pré-formada e pode ser encontrada em grânulos de corpos densos de plaquetas, sendo liberada junto com a histamina durante a agregação plaquetária ou na degranulação dos mastócitos e basófilos (WHITE, 1999; SILVA 2006).

3.4.3.2 Citocinas

As citocinas são polipeptídios pleiotrópicos liberados por diferentes células que atuam como mediadores químicos durante a resposta imune (ínata e adaptativa) e inflamatória. Diferentes citocinas participam da resposta inflamatória, as quais podem atuar como pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, tais como, as interleucinas (IL-1, IL-8, IL-6, IL-12), TNF-

α , interferon- γ e quimiocinas. Quimiocinas são um sub-grupo de citocinas consideradas quimioatrativa. As ações das citocinas no organismo podem se expressar de forma autócrina, parácrina e endócrina (CALIXTO et al., 2004; WHITE, 1999; LEE et al., 2009).

As principais citocinas envolvidas na inflamação aguda são TNF- α e IL-1 β , as quais são produzidas pelos macrófagos, mastócitos e células endoteliais. A liberação das citocinas pode ocorrer na presença de produtos oriundos dos linfócitos, durante a resposta do sistema imune, e de endotoxinas liberadas por micro-organismos. Assim, a principal função do TNF- α e da IL-1 β é promover a ativação das células endoteliais, favorecendo o recrutamento e adesão dos leucócitos, com subsequente ativação e liberação das quimiocinas (MCGETTRICK et al., 2012; CALIXTO et al., 2004).

Estas são pequenas proteínas que desempenham a função de quimioatrativas para diferentes tipos de células (neutrófilos, eosinófilo ou linfócitos), no processo inflamatório promove o recrutamento dos leucócitos. Os interferons são citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos linfócitos T CD⁴⁺ e CD⁸⁺ ativados pelas células *natural killer*. Além disso, as citocinas podem induzir outras enzimas que participa da inflamação como a COX-2 e iNOS (WHITE, 1999; MUHL; KAMPFER et al., 2003).

3.4.3.3 Eicosanoides

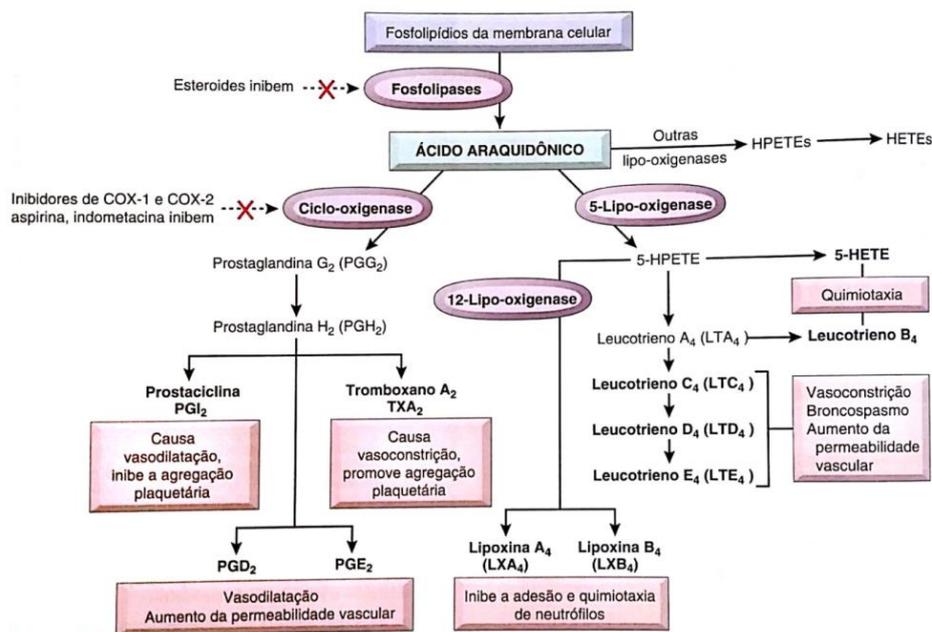
Os eicosanoides são representados por prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (FIGURA 7). Trata-se de mediadores que apresentam um importante papel na fisiologia do organismo e nos processos patológicos. A produção destes mediadores ocorre pela via do metabolismo do ácido araquidônico, um ácido graxo do tipo ômega 6, derivado dos fosfolípidios da membrana plasmática (SILVA, 2006). O acionamento da via para produção dos mediadores ocorre quando enzimas fosfolipase A₂ ou outras lipases são ativadas por estímulos fisiológicos (ex. angiotensina, noradrenalina) ou patológicos (ex. lesão tissular) em um determinado tecido (PATIL, K. R.; PATIL, C. R., 2017).

O ácido araquidônico quando metabolizado por ação da enzima cicloxigenase leva a produção das prostaglandinas (PGE₂, PGF_{2 α} , PGD₂, PGI₂) e tromboxanos (TX_a e TX_b). A enzima cicloxigenase pode ser do tipo constitutivo (COX-1), produzindo mediadores que participam da homeostase, ou do tipo indutiva e/ou constitutiva (COX-2), se expressando na maioria dos tecidos apenas no momento da inflamação (SILVA, 2006; NICOLAOU, 2013; BATLOUNI, 2010; SHAIKH; PUND; GACCHE, 2016). Outra classe de enzimas que pode participar do metabolismo do ácido araquidônico são as lipoxigenases (5-LOX, 12-LOX e 15-

LOX). Estas são responsáveis pela liberação dos leucotrienos (LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4), lipoxinas e substâncias correlatas. A inativação dos eicosanoides é realizada pela enzima 15-hidróxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH), dentre outras enzimas, através de uma ou duas passagens pela circulação sanguínea (SILVA, 2006; MURI et al., 2009).

Em processos patológicos, as prostaglandinas são responsáveis pela sensibilização das terminações nervosas, devido à ação sinérgica com agentes responsáveis pela dor, como histamina e bradicinina. Além disso, PGE_1 , PGE_2 e PGI_2 são potentes vasodilatadores e tem sua ação potencializada pelos LTD_4 , LTB_4 , bradicinina e histamina na indução do aumento da permeabilidade vascular e formação do edema. Os leucotrienos (LTA_4 , LTC_4) desempenham diferentes papéis, são responsáveis por atuar na broncodilatação, no aumento da secreção brônquica e na vasoconstrição. Além disso, o LTB_4 é um potente quimiotático, contribuindo com o recrutamento de leucócitos (SILVA, 2006).

Figura 7 – Formação dos metabólitos do ácido araquidônico e seus efeitos na inflamação.



Fonte: Kumar (2008, p. 58).

3.4.3.4 Outros mediadores

Outros mediadores químicos que atuam no processo inflamatório são fator ativador de plaquetas e o óxido nítrico. O fator ativador de plaquetas é um mediador oriundo do metabolismo dos fosfolípidos e é responsável por contribuir com a resposta inflamatória. Além dos efeitos na agregação plaquetária, ele atua como broncoconstritor, auxiliando na quimiotaxia e no processo de degranulação dos leucócitos, e na vasodilatação e aumento da

permeabilidade vascular. Outro mediador que participa da resposta inflamatória é o óxido nítrico. Este é formado por meio da oxidação de L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (SALVEMINI et al., 1996) O óxido nítrico desempenha importante papel na resposta inflamatória por atuar como vasodilatador e agir como antagonista da agregação plaquetária (SILVA, 2006).

3.5 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

Diferentes doenças de caráter sistêmico estão relacionadas à resposta inflamatória aguda e crônica, tais como: artrite reumatoide, asma, aterosclerose, psoríase, dermatite de contato, dentre outras.

Artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica cuja patogênese é multifatorial e de origem desconhecida. Trata-se de um quadro patológico cujos fatores genéticos, imunológicos e fisiopatológicos são pouco elucidados (JEFFERY, 2010; MAJITHIA; GERACI, 2007). A artrite é tipificada pelo desgaste da membrana sinovial e comprometimento das articulações, em virtude, da atividade desordenada do sistema imunológico. Alterações na membrana sinovial estão relacionadas com aumento de células do sistema imunológico (linfócitos T e B) em resposta a presença de um antígeno desconhecido. Este é responsável pela proliferação de linfócitos e migração de células inflamatórias para o local, com intensa liberação de mediadores químicos responsáveis pelos sinais clínicos de dor, edema, rigidez matinal com aparecimento de nódulos reumatoides persistentes ao longo da progressão da doença (PETROVI-RACKOV et al., 2004; JEFFERY, 2010; BLAND; PHILLIPS, 1972; MAJITHIA; GERACI, 2007).

A asma é uma doença crônica obstrutiva e inflamatória cuja causa pode estar relacionada a múltiplos mecanismos biológicos de diferentes intensidades. As vias respiratórias sofrem interferência dos fatores ambientais que contribuem para a obstrução do fluxo de ar, promovendo broncoconstrição e edema das vias respiratórias (HU, et al., 2012). Tais sinais clínicos ocorrem em virtude da ativação do sistema imune e células inflamatórias no local, com liberação de citocinas e quimiocinas, dentre outros mediadores químicos (LOUIS et al., 2000; DJUKANOVIĆ, et al., 1992).

A ativação de células do sistema imune, como mastócitos e eosinófilos, é responsável pela liberação de moléculas como histamina, serotonina e citocinas, além da ativação de enzimas proteolíticas. Estas enzimas atuam na cascata do ácido araquidônico, os quais, juntos

são responsáveis pela broncoconstrição, que acarreta falta de ar, aumento da secreção nos brônquios e aparecimento da tosse (LOUIS et al., 2000; HART, 2001).

Os mastócitos, localizados próximo aos vasos e nervos são estrategicamente uma das primeiras células a responderem a qualquer alteração no ambiente externo contra a ação de agentes químicos, físicos e biológicos. A ativação dessas células favorece a liberação de mediadores químicos responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células de defesa. Concomitantemente ocorre à liberação de citocinas e quimiocinas que sinalizam células do sistema imune, como os linfócitos (HART, 2001; OLMEZ, et al., 2009).

Assim como os mastócitos, os eosinófilos também estão presentes em grandes concentrações no infiltrado inflamatório. Por estarem presentes na corrente sanguínea, estas células migram facilmente para as vias respiratórias. No local da lesão, são responsáveis pela liberação de grânulos citotóxicos responsáveis por lesão tecidual, bem como citocinas e quimiocinas que auxiliam no recrutamento das células de defesa (PAYNE et al., 2001; PIZZICHINI et al., 1999; BOUSQUET et al., 1990).

A aterosclerose é tipificada como uma inflamação vascular crônica com intensa atividade imunológica, cuja causa está relacionada a lesão endotelial nas artérias. Quando não são absorvidas pelos tecidos, as lipoproteínas (LDL) migram para região íntima dos vasos sanguíneos ocasionando uma disfunção endotelial que leva ao aumento da permeabilidade vascular. As lipoproteínas sofrem oxidação produzindo substâncias reativas (aldeídos) e citocinas (ZERNECKE; WEBER, 2010). A presença de tais substâncias estimula a adesão e migração de monócitos, os quais são ativados em macrófagos. Os macrófagos, junto com as células musculares lisas fagocitárias, englobam os lipídeos oxidados formando o ateroma no vaso (HANSSON, LIBBY, 2006; TEPLYAKOV, 2004; KUIPER et al., 2007).

Todavia, a presença de macrófagos é responsável pela liberação de citocinas que estimulam a migração leucocitária, bem como, a produção de quimiocinas, substâncias quimioatrativas para as células inflamatórias mononucleadas, além da produção de espécies reativas de oxigênio, comprometendo o quadro inflamatório. Diferentes fatores podem contribuir para o comprometimento do quadro clínico de um paciente com aterosclerose como: obstrução do fluxo sanguíneo, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, isquemia, acidente vascular cerebral dentre outros (HANSSON, LIBBY, 2006; ZERNECKE; WEBER, 2010; RAJAVASHISTH et al., 1990; KUIPER et al., 2007).

A psoríase é uma doença caracterizada por um desequilíbrio de queratinização na pele. É considerada uma doença autoimune que envolve uma resposta inflamatória mediada por citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-17 e IL-23) liberadas e ativadas por macrófagos e

linfócitos. A liberação de mediadores químicos pelas células do sistema imunológico é responsável pela hiperproliferação de queratinócitos e hiperplasia epidérmica, ocasionando aparecimento de placas de células mortas com distribuição em diferentes áreas do corpo (BOS et al., 2005; TERUI; OZAWA; TAGAMI, 2000; ERIKSEN et al., 2005).

O eczema é uma doença inflamatória denominada também como dermatite de contato, a qual pode ser encontrada na forma aguda ou crônica. Essa é caracterizada pelo aparecimento de edema, eritema, descamação e na sua forma mais grave, liquefação da pele. Quando em contato com substâncias irritantes ou sensibilizadores, as células do sistema imunológico são ativadas, promovendo a liberação de mediadores químicos e citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelos sinais clínicos que caracterizam a doença (MARTINS; REIS, 2011; VOCANSON et al., 2009; LEE et al., 2013).

3.6 FÁRMACOS ANTI- INFLAMATÓRIOS

Fármacos com propriedades anti-inflamatórias são utilizados para o tratamento e cura de doenças inflamatórias agudas e crônicas e normalmente são divididos em anti-inflamatórios esteroides e não-esteroides. Fármacos não-esteroides são mais prescritos devido aos efeitos anti-inflamatório, antipirético e analgésico, sem efeitos colaterais mais graves (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006). Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) agem inibindo a ação da COX-1/2, atuando como inibidores competitivos e reversíveis (com exceção do ácido acetilsalicílico), evitando assim a síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (CROFF ORD, 2013; WALLACE et al., 1994; YOON; BAEK, 2005).

Por inibir a ação das prostaglandinas, um dos fatores que limita seu uso é o aparecimento de efeitos indesejáveis devido a capacidade de induzir úlceras. Tais fármacos inibem a agregação plaquetária em virtude da diminuição das prostaglandinas que atuam na homeostase regulando a função gastrointestinal, o tônus vascular e a resposta inflamatória. (WALLACE et al., 1994; WALLACE et al., 1994; CROFF ORD, 2013).

Diferente dos AINEs, os corticoides são drogas esteroidais que atuam como inibidores da resposta inflamatória e imunológica. Atuam como anti-inflamatórios por inibir a ação da enzima fosfolipase A₂ e bloquear a cascata de reação do ácido araquidônico inibindo a liberação de mediadores químicos produzido pelas enzimas cicloxigenase e lipoxigenase como a hidrocortisona, prednisolona, beclometasona e betametasona (SALES-CAMPOS et al., 2015; LEWIS; PIPER, 1975; HONG; LEVINE, 1976; KATZ, 2004).

Os corticoides desempenham papel como imunossupressor por inibirem a transcrição de genes responsáveis pela produção de citocinas responsáveis pela migração de neutrófilos, bem como, a ativação de células de defesa. Estes são muito utilizados para o tratamento de doença inflamatória aguda e crônica como asma, artrite reumatoide, gota, renite, alergias, doença de Crohn, dermatites, dentre outras (HUEBNER, SHRIVE; FRANK, 2013; KATZ, 2004; SALES-CAMPOS ET AL., 2015).

Outra classe de fármacos de interesse para a indústria farmacêutica com propriedades anti-inflamatórias são os fitoterápicos (GHASEMIAN; OWLIA, S.; OWLIA, M, 2016). Diferentes plantas medicinais tem sido fonte promissora de moléculas bioativas com propriedades farmacológicas para produção de novos fármacos (VEIGA JUNIOR et al., 2005). O ministério da saúde elaborou uma relação de plantas medicinais de interesse para o SUS (RENISUS) com potencial terapêutico e indicação para desenvolvimento e formulação de estudo que possam contribuir na produção de fitoterápicos. Diferentes espécies de plantas presentes na RENISUS apresentam indicações com propriedades anti-inflamatória tais como: *Uncaria tomentosa* (unha de gato), *Harpagophytum procumbens* (garra do diabo), *Aloe vera* (babosa), *Attalea. speciosa* (babaçu), dentre outras (BRASIL, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Os frutos de *A. speciosa* e *S. coronata* foram coletados no Parque Nacional da Serra do Catimbau, localizado no município de Buíque, entre o agreste e o sertão pernambucano, entre os meses de dezembro de 2015 e março de 2016, pelo botânico Alexandre Gomes da Silva (autorização SISBIO nº 26743-3, cadastro de acesso no SISGEN nº AFD8A80). Os frutos foram quebrados para obtenção das sementes, as quais foram utilizadas para extração dos óleos. Uma exsicata de cada espécie foi depositada para identificação no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob o nº 86.950 (*S. coronata*) e 90.472 (*A. speciosa*).

4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO FIXO DAS SEMENTES

O óleo fixo de *A. speciosa* e da *S. coronata* foram extraídos a frio. As sementes secas foram submetidas à prensagem por extrusão, empregando uma prensa manual de bancada, tipo *oil expeller* (Piteba[®], Holanda). Em seguida, o material foi centrifugado para remoção de partículas.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS ÓLEOS

Para a análise dos ácidos graxos foi realizada a hidrólise dos triglicerídeos com solução metanólica de hidróxido de potássio (0,5 M) para obtenção dos ésteres metílicos.

As análises qualitativas e quantitativas dos óleos foram realizadas por cromatografia em fase gasosa (GC-MS e GC-FID), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste CETENE, conduzidas sob as condições rotineiras da Central Analítica do CETENE. A identificação dos constituintes individuais foi realizada por comparação dos Índices de Retenção (IR) obtidos por CG com dados da literatura (Adams, 2009) e por comparação dos padrões de fragmentação dos espectros de massas com os da Espectroteca Wiley. Os Índices de Retenção foram calculados utilizando comparação dos Tempos de Retenção com os de uma série homóloga de n-alcenos (C9 a C22) na equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963). As concentrações dos componentes foram calculadas usando a área dos picos individuais de cada substância no CG.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização físico-química dos óleos fixos foi realizada através da determinação da densidade e dos seguintes índices: acidez, peróxidos, saponificação, e refração a 40 °C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

4.4.1 Teor de acidez

O teor de acidez é definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos livres de 1 grama de amostra, o índice de acidez revela o estado de concentração do óleo. A decomposição dos glicérides é acelerada por aquecimento e pela luz, e a rancidez é quase sempre acompanhada pela formação de ácido graxo livre. Poderá ser expressa também em ml de solução normal por cento v/p ou em g de ácido oleico por cento p/p (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.4.2 Índice de peróxidos

Este método determina todas às substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste. Estas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares resultantes da oxidação da gordura. Foram pesados 5 g dos óleos em um frasco Erlenmeyer de 125 mL e adicionados 30 mL da solução de ácido acético-clorofórmio (3:2) e agitado até a dissolução completa da amostra. Após a dissolução, foi adicionada 0,5 mL de uma solução saturada de KI e deixado em repouso ao abrigo da luz por exatamente um minuto. Em seguida, foram acrescentados 30 mL de água e mistura titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N, sob constante agitação.

4.4.3 Índice de refração a 40 °C

A priori, o refratômetro de Abbé foi ajustado com água destilada a 40 °C. Após estabilização à temperatura adequada, foram colocadas gotas da amostra entre os prismas, os quais foram fechados e focalizados. A leitura foi realizada na escala que dará diretamente o índice de refração absoluto a 40 °C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.4.4 Reação de Kreiss (Rancidez)

Para verificar o teor de rancidez presente no óleo fez necessária uma reação com floroglucina na qual reage em meio ácido com os triglicerídeos oxidados, dando uma coloração rósea ou vermelha, cuja intensidade aumenta com a deterioração, devido, provavelmente, à presença de aldeído malônico ou de aldeído epidrínico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.5 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

4.5.1 Animais e aspectos éticos

Para os ensaios farmacológicos foram utilizados camundongos Swiss e BALB/c, machos e fêmeas, entre 8 e 12 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso a comida e água. Os procedimentos experimentais que foram realizados estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo nº 23076/039887/2014-51).

4.5.2 Atividade anti-inflamatória tópica

4.5.2.1 Desenho experimental

A atividade anti-inflamatória tópica do óleo de babaçu (BA) e do licuri (LI) nas doses de 1,3 e 10 µl e ácido láurico (LA) na dose de 4mg foram avaliadas pela capacidade de inibição do edema de orelha. O primeiro ensaio realizado foi o edema de orelha induzido com PMA, que serviu de triagem para a escolha da melhor dose dos óleos de BA, LI e LA para a realização dos demais ensaios com diferentes agentes flogísticos (ácido araquidônico, EPP, capsaicina, fenol e óleo de cróton), de acordo com o procedimento descrito por (GABOR, 2000). Para cada modelo foram utilizados seis grupos (n = 6), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais.

Grupos (n = 6)	Atividade anti-inflamatória tópica dos óleos de babaçu e licuri
G1	Grupo que recebeu o agente flogístico diluído em acetona (20 µL/orelha) + acetona (20 µL/orelha)
G2	Grupo que recebeu o agente flogístico diluído em acetona (20 µL/orelha) + 1 µL dos óleos diluídos em acetona (20 µL/orelha)
G3	Grupo que recebeu o agente flogístico diluído em acetona (20 µL/orelha) + 3 µL dos óleos diluídos em acetona (20 µL/orelha)
G4	Grupo que recebeu o agente flogístico diluído em acetona (20 µL/orelha) + 10 µL dos óleos diluídos em acetona (20 µL/orelha)
G5	Grupo que recebeu o agente flogístico diluído em acetona (20 µL/orelha) + fármaco padrão (dexametasona ou indometacina) diluídos em acetona (20 µL/orelha)
G6	Grupo que recebeu o agente flogístico diluído em acetona (20 µL/orelha) + 4mg de ácido láurico diluídos em acetona (20 µL/orelha)

4.5.2.2 Edema de orelha induzido por PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)

A indução por PMA foi primeiro experimento a ser realizado, pois permite a triagem que favorece na descoberta do mecanismo de ação. O modelo permite identificar os inibidores das enzimas COX e LOX. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Um grupo recebeu apenas 20 µL de PMA em acetona sendo aplicado na superfície interna e externa da orelha direita dos animais. Em seguida os demais grupos receberam o BA, LI, AL e o fármaco-padrão (dexametasona) diluídos no mesmo volume de acetona, além do óleo de cróton 2%, e aplicado na orelha direita. A orelha esquerda recebeu somente acetona que funciona como controle negativo. A resposta inflamatória foi avaliada após seis horas, depois os animais foram eutanasiados na câmara de gás e uma amostra de 6 mm de diâmetro foi retirada de cada orelha com auxílio de um *punch* de biópsia. As amostras foram pesadas e o edema calculado pela diferença do peso das amostras da orelha direita pela orelha esquerda (GARBO, 1990).

4.5.2.3 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico

No modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico, o AA é metabolizado por meio da ação das enzimas COX e LOX levando à formação de mediadores responsáveis pela formação do edema. Nesse experimento foram utilizados 4 grupos (camundongos

BALB/c). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) em seguida foi aplicado na superfície interna e externa da orelha direita dos animais uma solução de ácido araquidônico (2mg/orelha) diluído em 20 µL de acetona, funcionando como controle negativo. Os demais grupos receberam as respectivas doses do BA, LI, AL e a indometacina (0,5 mg/orelha) diluídos no mesmo volume. A orelha esquerda recebeu somente acetona que funciona como controle negativo. O pico da inflamação foi verificado após 1h. Depois os animais foram eutanasiados na câmara de gás e uma amostra de 6 mm de diâmetro foi retirada de cada orelha com auxílio de um *punch* de biópsia. As amostras foram pesadas e o edema calculado pela diferença do peso das amostras da orelha direita pela orelha esquerda (YOUNG *et al.*, 1984; CRUMMEY *et al.*, 1987).

4.5.2.4 Edema de orelha induzido por fenilpropiolato de etila (EPP)

No edema de orelha foi induzido fenilpropiolato de etila a 5% (EPP) é diluído em acetona. Uma vez preparada a solução, 20 µL são aplicados nas superfícies interna e externa orelha direita dos camundongos (n = 6) que funcionará como grupo controle negativo. No grupo tratados com o BA, LI e AL nas diferentes concentrações e o fármaco padrão dexametasona (0,1 mg/orelha) receberam um pré-tratamento 18 horas antes da indução do edema com o EPP. No controle negativo, todos os animais receberam o mesmo volume de acetona na orelha (OPAS; BONNEY; HUMES, 1985).

Após a indução com o agente flogístico cerca de 30 minutos, os animais foram eutanasiado na câmara de gás e um fragmento de 6 mm de diâmetro foi removido de cada uma das orelhas com o auxílio de um *punch* de biópsia e imediatamente pesados. A formação do edema foi avaliada através da diferença de peso entre os fragmentos das orelhas direita e esquerda.

4.5.2.5 Edema de orelha induzida por capsaicina

Para o modelo foi realizada a indução por capsaicina foram utilizados 4 grupos com n = 6. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Foi administrado uma solução de capsaicina (0,25 mg/orelha) diluídos em 20 µL de acetona na superfície junto com as respectivas doses testadas BA, LI e AL na parte interna e externa da orelha direita dos animais. A orelha esquerda recebeu somente acetona que funciona como controle negativo. O controle positivo recebeu um pré-tratamento com o fármaco padrão

(vermelho de rutênio) 30 min antes da administração da solução de capsaicina dissolvido em acetona. A resposta inflamatória foi verificada após 30 min, os animais foram eutanasiado e um fragmento de 6 mm de diâmetro foi removido de cada uma das orelhas com o auxílio de um *punch* de biópsia e imediatamente pesados. A formação do edema foi avaliada através da diferença de peso entre os fragmentos das orelhas direita e esquerda (GABOR, 2000; GABOR; RAZGA, 1992).

4.5.2.6 Edema de orelha induzido por fenol

No referido modelo 4 grupos $n = 6$ foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Uma solução de fenol a 10% (v/v) diluídos em 20 μ L de acetona foram aplicados na superfície interna e externa da orelha direita dos animais. A orelha esquerda recebeu somente acetona e funciona como controle negativo. O BA, LI e LA bem como o fármaco-padrão (dexametasona 1 mg/orelha) foram em seguida diluídos no mesmo volume de acetona e aplicados imediatamente na orelha direita. A formação do edema foi avaliada após uma hora, os animais foram eutanasiados e uma amostra de 6 mm de diâmetro foi retirada de cada orelha com auxílio de um *punch* de biópsia. As amostras foram pesadas e o edema calculado pela diferença do peso das amostras da orelha direita pela orelha esquerda (GÁBOR, 2000).

4.5.2.7 Edema de orelha crônico induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton

Para avaliar o efeito anti-inflamatório dos óleos em um processo inflamatório crônico já estabelecido, foi utilizado um modelo com a aplicação múltipla do óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação de 20 μ L de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona, em dias alternados, durante 9 dias, em camundongos Swiss ($n = 6$ /grupo). Os óleos de babaçu e licuri, ácido láurico e a dexametasona (1,0 mg/orelha, controle positivo) foram aplicados via tópica durante 5 dias (2 vezes ao dia) a partir de 5º dia de experimento. No 9º dia de experimento, os animais foram eutanasiados na câmara de gás e amostras de 6 mm de diâmetro das orelhas foram coletadas com auxílio de um *punch* de biópsia e pesadas para avaliação do edema (STANLEY et al., 1991). Em seguida, as amostras foram utilizadas para determinação da atividade da enzima mieloperoxidase, que é indicativa do infiltrado neutrofílico, e para análise histológica e histomorfométrica.

4.5.2.8 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase.

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e utilizada como marcador inflamatório, foi realizada pelo método descrito por Lima-Júnior et al. (2012). Uma amostra de orelha (6 mm de diâmetro) foi incubada com 1 mL de uma solução de 0,5% HTAB (brometo de haxadeciltrimetilamônio), homogeneizada e centrifugada (2.000 g, 15 min, a 4 °C). Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi transferida para microplacas de 96 poços e 200 µL da solução de leitura (5 mg *O*-dianisidina; 15 µL H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; e 27 mL de H₂O) foram adicionados a cada poço. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro em 460 nm ($t_0 = 0$ min e $t_1 = 1$ min) e os resultados expressos em DO/biópsia.

4.5.2.9 Análise histológica

Para análise histológica, as orelhas foram fixadas em formalina 3% tamponada (pH 7,4) por 24 h, desidratadas, diafanizadas e emblocadas em parafina. Foram realizados cortes perpendiculares de 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina e observadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E-200 e fotografadas para medição da espessura da epiderme e da derme utilizando o software Image J versão 1.52r. Para análise histomorfométrica, foram analisadas pelo menos 3 cortes de cada animal (10 medições/corte).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet. O limite de significância foi considerado como 5% (* $p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism[®] 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS FIXOS DE BABAÇU E LICURI

Das sementes do babaçu e do licuri são extraídos óleos fixos formados por diferentes compostos, tais como, triglicerídeos, fosfolipídios, ácidos graxos livres, esteroides, tocoferóis, além de outros compostos (LUZ et al., 2011). Para obtenção do óleo fixo, foram utilizados 365,4 g de sementes do babaçu e 372,1 g do licuri. As extrações apresentaram rendimento de 34,75 % e 37,12 %, para o babaçu e o licuri, respectivamente. Parte desse material foi utilizada nas análises físico-químicas e na determinação do perfil de ácidos graxos.

Nas análises por cromatografia gasosa foram identificados ácidos graxos de C8 a C18, saturados e insaturados, na forma de seus ésteres metílicos. Em ambos os óleos, o ácido láurico (C12, ácido dodecanóico) foi o componente majoritário, representando 48,86 % e 45,82% dos ácidos graxos presentes nos óleos de babaçu e licuri, respectivamente. O perfil completo de ácidos graxos dos óleos de babaçu e licuri, bem como a faixa de valores obtidos na literatura estão mostrados nas TABELAS 2 e 3, respectivamente. As diferenças no perfil de ácidos graxos dos óleos de babaçu e licuri observadas podem estar relacionadas a diversos fatores, como o período em que foi realizada a coleta da droga vegetal, o estado de maturação dos frutos, os métodos extrativos (principalmente em relação ao emprego de calor), além de fatores climáticos, já que a maioria dos trabalhos, principalmente com babaçu, é realizada com amostras da região Norte do Brasil. Nesta região, o tipo de solo, clima e a distribuição de chuvas são muito diferentes dos observados no semiárido nordestino (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos do óleo de babaçu do Parque Nacional do Catimbau, Brasil.

Estruturas	Ácidos graxos	Óleo de Babaçu (%)	Valores da Literatura
C8:0	Caprílico	0,48	3,5 - 5,0
C12:0	Láurico	40,86	40,0 - 48,5
C14:0	Mirístico	20,05	17,0 - 20,0

C16:0	Palmítico	12,23	8,0 - 11,0
C18:2n6c	Linoleico	2,31	1,8 - 2,0
C18:1n9c	Oleico	21,51	10,0 - 14,0
C18:0	Esteárico	2,53	3,5 - 4,0

Nota: LIMA et al., 2007; SALLES et al., 2010; ALENCAR; ALVES; CRAVEIRO, 1983; OLIVEIRA et al., 2012.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos do óleo de licuri do Parque Nacional do Catimbau, Brasil.

Estruturas	Ácidos graxos (%)	Óleo de Licuri	
		(%)	Valores da Literatura
C8:0	Caprílico	9,24	9,0 - 12,5
C12:0	Láurico	45,82	42,0 - 44,5
C14:0	Mirístico	14,41	13,5 - 16,0
C16:0	Palmítico	6,63	6,5 - 8,0
C18:2n6c	Linoleico	11,31	3,0 - 12,0
C18:1n9c	Oleico	2,61	3,0 - 10,6
C18:0	Esteárico	3,39	2,6 - 4,0

Nota: LIMA et al., 2007; SALLES et al., 2010; QUEIROGA et al., 2010

As análises físico-químicas em óleos e gorduras vegetais são realizadas para determinar o grau de conservação e a usabilidade destes nas indústrias alimentícia e cosmética. Para isso, são determinados parâmetros como: índice de refração a 40 °C, índice de peróxidos, índice de acidez (expresso em ácido oleico), além de reações características, como rancidez. Os valores obtidos para os óleos de *A. speciosa* e *S. coronata*, bem como os valores de referência para óleo refinados, estão mostrados na TABELA 4.

Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos dos óleos de babaçu e licuri do Parque Nacional da Serra do Catimbau, Brasil.

Parâmetros físico-químicos	Óleo de Babaçu	Óleo de Licuri	Valor de referência (ANVISA, 1999)
Índice de Refração a 40°	1,451	1,457	1,448 – 1,451
Índice de acidez (% em ácido oleico)	0,14	1,10	Até 0,30
Índice de peróxidos (mEq/kg)	0,00	7,94	Até 5
Rancidez	Ausente	Ausente	Ausente

Nota: Análises realizadas em triplicatas.

Os índices de acidez e de peróxidos são utilizados como parâmetros de referência quando se pretende avaliar a qualidade de conservação dos óleos. Já o índice de refração, é determinado pelo comprimento da cadeia, tipo e número de insaturações, servindo como parâmetro de pureza dos óleos (BRASIL, 2015). O índice de acidez é um método que contribui para avaliar o estado de conservação uma vez que identifica se nas amostras houve a degradação dos triglicerídeos, a qual resulta na alteração da concentração de íons de hidrogênio que são oriundos dos ácidos graxos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

A oxidação lipídica é um dos fatores que contribui com a degradação dos óleos, uma vez que, os ácidos graxos presentes são oxidados a hidroperóxidos e estes em aldeídos saturados e não saturados, cetonas, álcoois, dentre outros (VIDRIH; VIDA KOVIC; ABRAMOVIC, 2010). O produto da oxidação é responsável pela perda nutricional, alterando ainda sabor, cor e aroma. Outros fatores interferem na estabilidade como: a quantidade de antioxidantes naturais, ácidos graxos, oxigenação e armazenamento. Deste modo, a estabilidade oxidativa é um dos indicadores que garante a qualidade do óleo (BISWAS et al., 2002; WAGNER; ELMADFA, 2000).

As amostras analisadas foram comparadas com base nos parâmetros da ANVISA (1999) para óleo refinados. No entanto, os ensaios realizados com o licuri apresentaram valores diferentes quando comparado com os valores padrões, provavelmente por se tratar de um estudo realizado com óleo bruto (não refinado) (TABELA 4).

O óleo bruto apresenta valores de referência até dez vezes mais alto que um refinado devido a menor capacidade oxidativa e resistência. Além disso, o processo de refinamento do óleo vegetal quando utiliza altas temperaturas leva a alteração dos constituintes químicos presentes na amostra, dentre eles tocoferóis, esteroides e carotenoides, os quais apresentam

propriedades antioxidantes (VIDRIH; VIDA KOVIC; ABRAMOVIC, 2010; WAGNER; ELMADFA, 2000). Todavia, ambas as amostras de babaçu e licuri apresentaram bom estado de conservação, com ausência de rancidez, para realização dos ensaios farmacológicos.

5.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA AGUDA

5.2.1 Edema de orelha induzido por PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)

A pele é constituída por duas camadas a epiderme e a derme, sendo considerado o maior órgão do corpo humano. Esta desempenha diferentes funções pois atua como uma barreira protetora contra ação de micro-organismos e lesão tecidual, além de regular a temperatura e manter a hidratação corporal. Qualquer alteração na barreira cutânea como injúria no tecido, infecções ou resposta descontrolada do sistema imunológico resulta em uma resposta inflamatória (VAUGHN, et al., 2017; MARINO, 2006; LEBLANC et al., 2012).

A epiderme é formada por camada basal, granulosa, lúcida e córnea. O estrato córneo é a primeira camada da pele que atua protegendo o organismo contra entrada de micro-organismos, substâncias irritantes e alérgicas, evitando também a perda de água. Por atuar como barreira seletiva, qualquer alteração no estrato córneo resulta em perda transdérmica de água, no aumento do pH e em alterações bioquímicas que são responsáveis pelo aparecimento de doenças inflamatórias como: dermatite de contato, psoríase, dermatites atópicas, dentre outras. O estrato córneo possui diferentes enzimas que atuam na queratinização e regeneração da barreira, qualquer alteração no pH compromete a função das hidrolases, interferindo no metabolismo e na proteção contra micro-organismos (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006; ELIAS; WAKEFIELD, 2010; MARINO, 2006).

Além disso, melanócitos, células dendríticas, linfócitos e terminações nervosas são ativados quando há alteração no estrato córneo e participam de forma cooperativa na proteção do organismo e na homeostase, sinalizando por meio da liberação de citocinas e substâncias quimioatrativas e levando a ativação do sistema imunológico (KUMAR, et al., 2010; NYLANDER-LUNDQVIST; BÄCK; EGELRUD, 1996).

Fármacos utilizados para tratamento de distúrbios cutâneos são de fundamental interesse da indústria farmacêutica para tratamento e cura de pacientes que sofrem de inflamações agudas e crônicas (LODEN, 2003). Os óleos vegetais são frequentemente utilizados para tratamentos de doenças dermatológicas no Brasil e no mundo, devido à acessibilidade e o baixo custo. Além de atuar na pele como barreira protetora, na manutenção

da hidratação, podem apresentar propriedades farmacológicas como antioxidante (DHAVAMANI; RAO; LOKESH, 2014; FERREIRA et al. 2011), anti-inflamatória (OLIVEIRA, et al 2010), antimicrobiana (COSTA, et al., 2011; FERREIRA et al., 2011), dentre outras.

Ensaio pré-clínicos utilizando edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos (PMA; AA; EPP; capsaicina e fenol) em camundongos para avaliação da atividade anti-inflamatória e elucidação dos possíveis mecanismos de ação de fármacos ou plantas medicinais com indicações terapêuticas têm sido amplamente relatados na literatura (GÁBOR, 2000).

O primeiro modelo utilizado para analisar a atividade anti-inflamatória tópica foi o edema de orelha induzido por PMA (FIGURA 8). O PMA é uma substância isolada do óleo de cróton com propriedades irritantes, capaz de ativar a proteína quinase C (PKC). Este, quando em contato com a pele, é responsável por desencadear uma resposta inflamatória em virtude de suas propriedades irritantes levando ao aumento da permeabilidade vascular e formação do edema (GABOR, 2000).

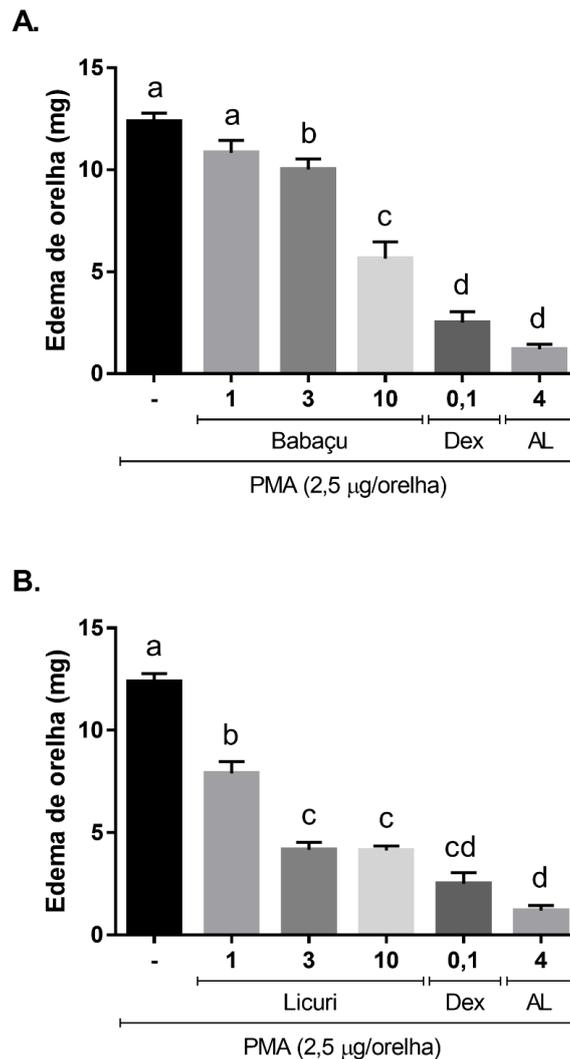
O óleo de babaçu reduziu o edema nas doses de 3 e 10 μL /orelha quando comparado com o controle negativo (FIGURA 8A). No ensaio realizado com o óleo de licuri, todas as doses foram capazes de reduzir o edema (FIGURA 8B). Com base no resultado obtido, ao estudar o efeito anti-inflamatório do óleo de babaçu e licuri, foi possível analisar também a atividade anti-inflamatória do componente majoritário (ácido láurico) de ambas as amostras, no intuito de elucidar o possível composto responsável pela ação farmacológica. O ácido láurico apresentou atividade anti-inflamatória com redução da formação do edema, quando comparado com o controle negativo como observado nas FIGURAS 8A e B.

Outros estudos foram realizados como o descrito por Huang e colaboradores (2014) em inflamações dérmicas com ácido láurico ao verificar a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória tópica frente à *Propionibacterium acnes* mostrando resultados promissores. Assim, possivelmente o efeito anti-inflamatório verificado no óleo de babaçu e licuri podem estar associados a alta concentração de ácido láurico nas amostras dos óleos.

Desta forma, o modelo de edema de orelha induzido por PMA por apresentar sensibilidade a diferentes classes de anti-inflamatórios permite realizar uma triagem da atividade anti-inflamatória tópica dos óleos de *Attalea speciosa* e *Syagrus coronata*, além do ácido láurico. Uma vez constatada a atividade farmacológica, para a elucidação do mecanismo de ação, faz-se necessária a avaliação da atividade com diferentes agentes

flogísticos (ácido araquidônico, EPP, capsaicina e fenol) utilizando a melhor dose dos dois óleos (10 μ L) e o ácido láurico.

Figura 8 – Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato). (-) acetona; óleo de babaçu ou licuri (1, 3 e 10 μ L/orelha); Dex - dexametasona (0,1 mg/orelha); AL – ácido láurico (4 mg/orelha). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Bonferroni, considerando significativos valores de $p < 0,05$. Diferença entre os grupos está indicada por letras diferentes.



5.2.2 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico

O ensaio do edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (Figura 9) apresenta sensibilidade aos inibidores de COX, LOX ou da ação das PGs. Diante disso, foi possível verificar que a dose de 10 μ L do óleo de *Attalea speciosa*, *Syagrus coronata* e o ácido láurico apresentaram atividade anti-inflamatória, uma vez, que houve redução na formação do edema

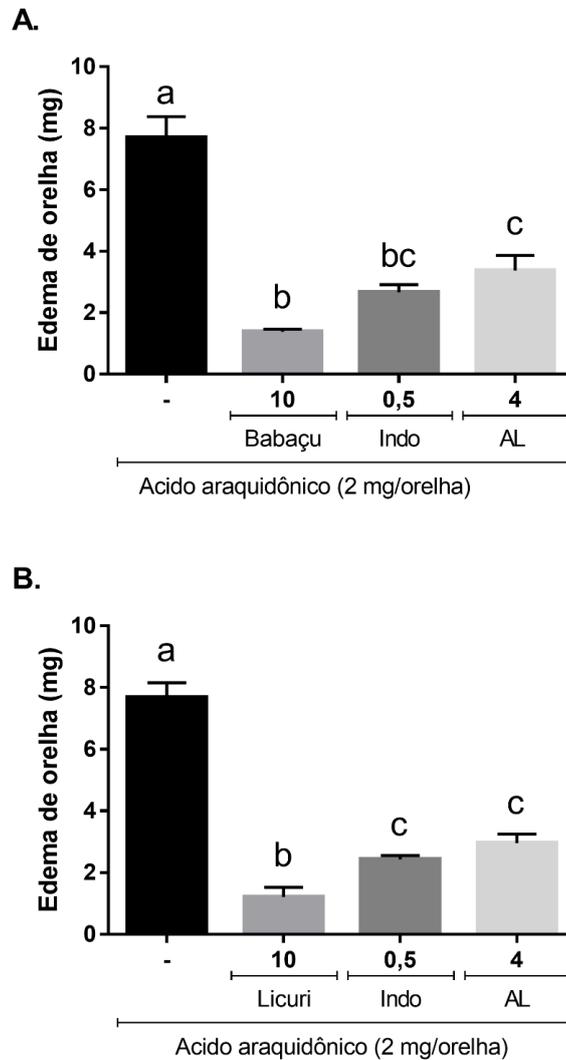
quando comparado com o controle negativo. Todavia, apesar do óleo de *A. speciosa*, *S. coronata* serem iguais, estes diferem do ácido láurico na redução da formação do edema como mostra a FIGURA 9.

Uma resposta inflamatória pode ser mediada pela via oriunda do metabolismo do ácido araquidônico ou não. No modelo de edema de orelha induzido por esta via, o AA é metabolizado por meio da ação das enzimas COX e LOX levando à formação de mediadores químicos, tais como: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, e estes em sinergismo são responsáveis pela resposta inflamatória, uma vez que atuam estimulando o aparecimento da dor, hiperemia, bem como, aumentando a permeabilidade vascular, migração celular, levando a formação do edema (CRUMMEY et al., 1987; SILVA, 2006; LEWIS; AUSTEN, 1981; ISSEKUTZ; MOVAT, 1982).

Diferentes anti-inflamatórios podem ser utilizados no tratamento de doenças inflamatórias, na qual age inibindo a expressão da enzima fosfolipase A₂ com liberação do AA, bem como os anti-inflamatórios que bloqueiam apenas a ação das COX, como a indometacina (SILVA, 2006; SARAIVA, et al. 2011).

Assim, pode se observar que possivelmente a ação anti-inflamatória atribuída ao óleo de babaçu, licuri e ao ácido láurico esteja relacionada com o bloqueio das enzimas COX, como verificado na FIGURA 9.

Figura 9 – Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico. (-) acetona; óleo de babaçu ou licuri (10 μ l/orelha); Dex - dexametasona (0,1 mg/orelha); AL – ácido láurico (4 mg/orelha). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Bonferroni, considerando significativos valores de $p < 0,05$. Diferença entre os grupos está indicada por letras diferentes.



5.2.3 Edema de orelha induzido por fenilproprilato de etila

Uma resposta inflamatória quando induzida por ação de um agente flogístico pode desencadear a ativação da via do AA e liberar substâncias como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Além dessa via, outras substâncias podem ser liberadas com ação semelhantes às prostaglandinas em virtude da ativação da resposta inflamatória. Logo, o processo de degranulação dos mastócitos quando ativado leva a liberação de histamina, serotonina e bradicinina. Estes mediadores podem desempenhar ação vasodilatadora e

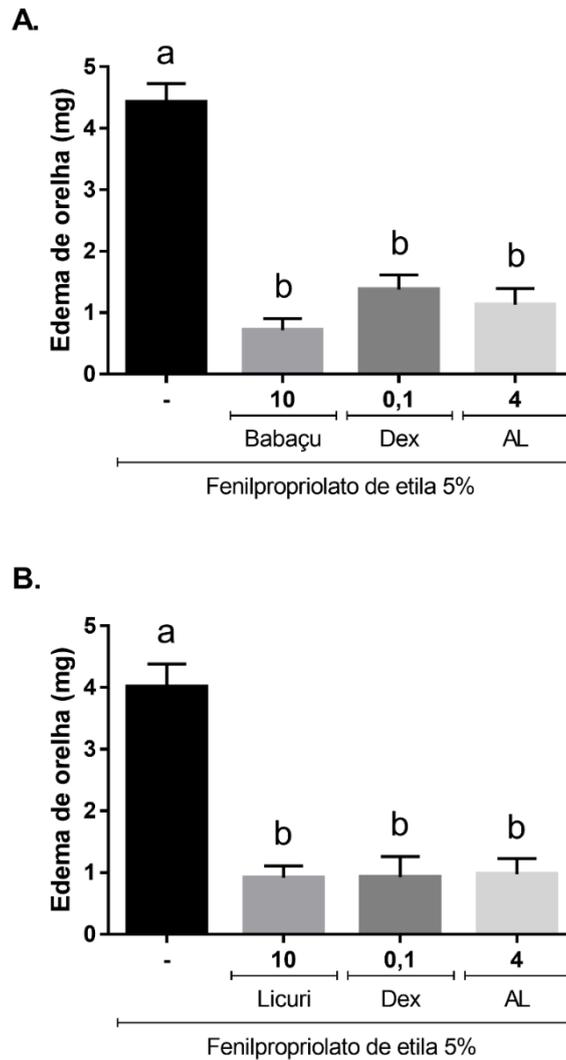
promover o aumento da permeabilidade vascular induzindo a formação do edema (YOUNG et al., 1984; SARAIVA, et al. 2011; CRUMMEY et al., 1987).

O fenilpropiolato de etila (EPP) quando em contato com a pele promove alterações metabólicas instantâneas exibindo uma variedade de modificações cutâneas em virtude da ativação das enzimas e degranulação de mastócitos. A ativação dessas enzimas dá início a cascata de reação devida ativação e liberação de outros mediadores, como histamina e serotonina. Assim, a aplicação tópica de EPP estimula a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular devido à liberação de histamina e serotonina (PANTHONG et al., 2004; BRATTSAND et al., 1982; CARLSON, et al., 1985).

Ao analisar o edema de orelha induzido por EPP como verificado na FIGURA 10, foi possível observar que houve uma redução na formação do edema nos grupos tratados com o óleo do babaçu, licuri, ácido láurico e o fármaco padrão quando comparado com o controle negativo. As doses testadas, o ácido láurico e o fármaco padrão foram iguais ao reduzir a formação do edema.

Diante disso, foi observado que possivelmente o óleo de babaçu, licuri e ácido láurico agem como anti-inflamatórios inibindo a ação da histamina e/ou serotonina, as quais são responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular observados.

Figura 10 – Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por fenilproprilato de etila. (-) acetona; óleo de babaçu ou licuri (10 μ L/orelha); Dex - dexametasona (0,1 mg/orelha); AL – ácido láurico (4 mg/orelha). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Bonferroni, considerando significativos valores de $p < 0,05$. Diferença entre os grupos está indicada por letras diferentes.



5.2.4 Edema de orelha induzido por capsaicina

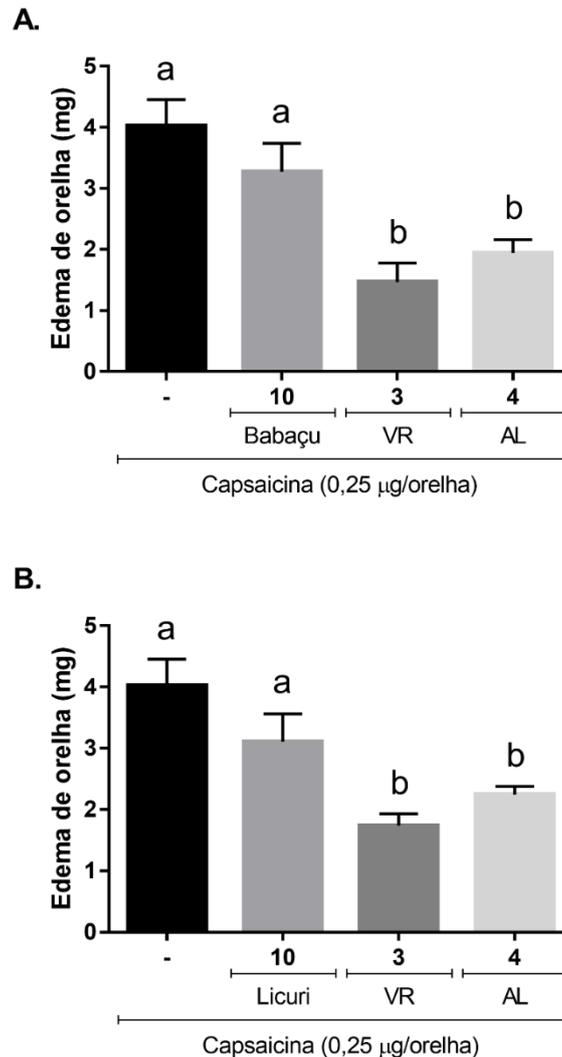
As células presentes na pele, bem como, as do sistema imunológico agem de forma sinérgica com as fibras nervosas cutâneas sinalizando qualquer alteração no meio externo (calor; frio; agentes químicos, físico) ou interno (micro-organismo, substâncias endógenas). Assim, qualquer alteração sinalizada por um desses fatores é responsável por desencadear uma resposta inflamatória cutânea do tipo neurogênica. Esta é caracterizada pela vasodilatação com extravasamento do plasma ocasionada pela ativação das fibras nervosas

locais do tipo C, as quais são responsáveis pela liberação de neuropeptídeos responsáveis pelas alterações vasculares com formação do edema e eritema (GASPAR, 2003; BIRO et al., 1997).

Um dos princípios ativos extraído da pimenta, a capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é uma substância irritante que quando em contato com pele é responsável por desencadear a ativação do receptor vaniloide 1 (TRPV-1). Este, quando ativado promove alterações nos canais iônicos com influxo de cálcio nas fibras nervosas, ativando assim a liberação de diferentes neuropeptídeos, dentre eles a substância P. Além de considerados potentes vasodilatadores, por aumentarem a permeabilidade vascular com formação de edema, esses neuropeptídeos também estimulam a degranulação de macrófagos, com liberação de mediadores químicos como histamina e serotonina, as quais potencializam o seu efeito (INOUE; NAGATA; KOSHIARA, 1993; GASPAR, 2003; MAGGI et al., 1988).

No referido modelo edema de orelha induzido por capsaicina foi possível observar que os animais tratados com as doses do óleo de babaçu e licuri não apresentaram redução na formação do edema, como visualizado na FIGURA 9. No entanto, o ácido láurico e o vermelho de rutênio, utilizado como controle positivo, apresentaram atividade antiedematogênica (FIGURA 11). O vermelho de rutênio bloqueia a ação da capsaicina, inibindo o influxo de Ca^{+2} nas fibras nervosas e evitando a liberação de neuropeptídeos (MAGGI et al., 1988). Com base neste resultado, é sugerido que o ácido láurico, quando isolado, possa atuar, semelhante ao vermelho de rutênio, inibindo a ação da capsaicina. No entanto, quando esterificado em triglicérides, como no óleo de BA e LI, não apresenta atividade antiedematogênica (FIGURA 11).

Figura 11 – Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por capsaicina. (-) acetona; óleo de babaçu ou licuri (10 μ l/orelha); VR – vermelho de rutênio (3 mg/kg, intraperitoneal); AL – ácido láurico (4 mg/orelha). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Bonferroni, considerando significativos valores de $p < 0,05$. A diferença entre os grupos está indicada por letras diferentes.



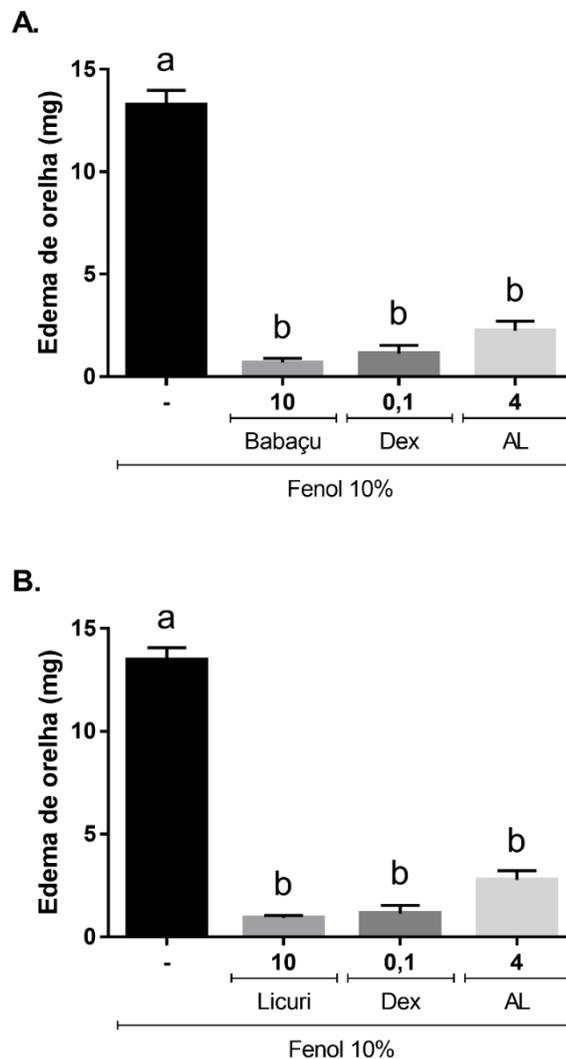
5.2.5 Edema de orelha induzido por fenol

Em contato com a pele, o fenol promove irritações cutâneas imediatas como queimaduras, erupções na epiderme, inflamações dérmicas e necrose (MURRAY *et al.*, 2007; PACHECO, *et al.*, 2014). Assim, a presença do fenol no tecido leva ao rompimento das membranas dos queratinócitos, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF- α , além de espécies reativas de oxigênio e mediadores oriundo do metabolismo do AA (MURRAY *et al.*, 2007. WILMER *et al.*, 1994).

No ensaio do edema de orelha induzido por fenol, como observado na FIGURA 12, foi possível analisar que houve uma redução do edema na dose de 10 μ L/orelha do BA, LI e na dose de 4 mg/orelha do ácido láurico quando comparadas com o controle negativo. Além disso, é plausível verificar que os grupos tratados não diferiram do fármaco padrão, dexametasona como mostra a FIGURA 12.

Deste modo, possivelmente a ação anti-inflamatória verificada no referido modelo para o óleo do BA, LI e ácido láurico provavelmente esteja relacionada com a estabilização da membrana dos queratinócitos, bem como, a inibição enzimas COX e LOX, responsáveis pela ativação da resposta inflamatória e oxidação do fenol a radicais livres.

Figura 12 – Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por fenol. (-) acetona; óleo de babaçu ou licuri (10 μ L/orelha); Dex - dexametasona (0,1 mg/orelha); AL – ácido láurico (4 mg/orelha). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Bonferroni, considerando significativos valores de $p < 0,05$. A diferença entre os grupos está indicada por letras diferentes.



5.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA CRÔNICA

5.3.1 Edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton

A resposta inflamatória pode ser desencadeada por ação de diferentes agentes (químico, físico, biológico, mecânico), os quais são responsáveis pela liberação de mediadores pró-inflamatórios por diferentes vias, sejam em nível vascular ou celular. A permanência dos mediadores ao longo do tempo (dias, meses, ano), bem como o tipo de células presentes no local, é que vão caracterizar a inflamação como aguda ou crônica (SARAIVA et al., 2011).

Assim, a prolongamento do agente lesivo no local resulta em uma inflamação crônica que é caracterizada por apresentar infiltração de células mononucleares (linfócitos e macrófagos), destruição tecidual ocasionada pela permanência por longo tempo de mediadores químicos, e reparo tecidual com ativação da fibrose e angiogênese. Diferente da inflamação aguda, a inflamação crônica tem sua origem por meio de exposição por longo tempo a agentes tóxicos, a hipersensibilidade e infecções persistentes (KUMAR et al., 2010).

No modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton foi possível analisar o efeito dos óleos de babaçu, licuri e do ácido láurico em um processo inflamatório já estabelecido. Isso é possível devido a exposição da pele ao óleo de cróton por um tempo determinado. O óleo de cróton tem como componente principal em sua composição o (PMA), o qual atua como agente tóxico com exposição prolongada e ativação de PKC.

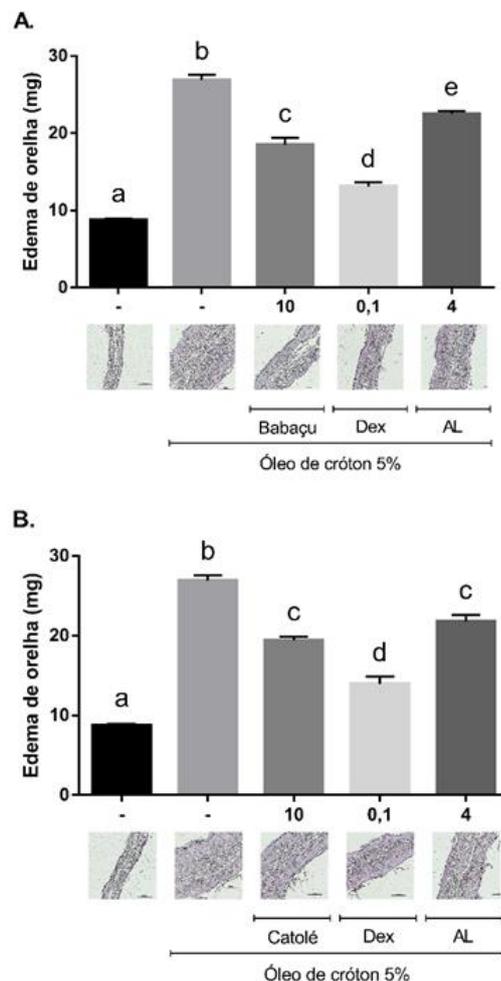
O PMA atua ativando a PKC, e esta, as citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-1 β , TNF- α e IL-6. Simultaneamente ocorre a ativação do fator ativador de plaquetas (PAF) e fosfolipase A₂, iniciando o metabolismo do ácido araquidônico, o qual é convertido em diferentes mediadores químicos como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos por ação das enzimas lipoxigenase e cicloxigenase. Além disso, a presença de substâncias pró-inflamatórias é responsável por estimular a degranulação dos mastócitos com liberação de histamina e serotonina. As alterações celulares e vasculares são responsáveis pelas modificações visualizadas com o aumento da espessura da epiderme e derme (FERRÁNDIZ, et al. 1996; PINTO, et al. 2015; SARAIVA, et al. 2011; CRUMMEY et al 1987).

No referido modelo foi possível verificar que as doses de babaçu e licuri reduziram a formação do edema (FIGURA 13) e a hiperplasia da epiderme (TABELA 5), quando comparados com o grupo de animais que recebeu apenas o veículo e o agente flogístico. O

grupo de animais que recebeu o ácido láurico também reduziu a inflamação quando comparado com o controle negativo.

A diferença estatística entre as doses do óleo fixo do babaçu e licuri quando comparado com o ácido láurico pode estar relacionado ao sinergismo existente entre os diferentes ácidos graxos com concentrações variadas presente nas amostras (caprílico, mirístico, palmítico, linoleico, oleico) quando verificado na sua forma isolada como o ácido láurico. Assim, foi possível verificar que o óleo do babaçu e licuri apresentaram atividade anti-inflamatória aguda e crônica bem como o seu composto majoritário, o ácido láurico. Contudo, a ação anti-inflamatória não pode ser atribuída apenas ao ácido láurico.

Figura 13 – Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre o edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton. (-) acetona; óleo de babaçu ou licuri (10 μ L/orelha); Dex - dexametasona (0,1 mg/orelha); AL – ácido láurico (4 mg/orelha). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Bonferroni, considerando significativos valores de $p < 0,05$. Diferença entre os grupos está indicada por letras diferentes.



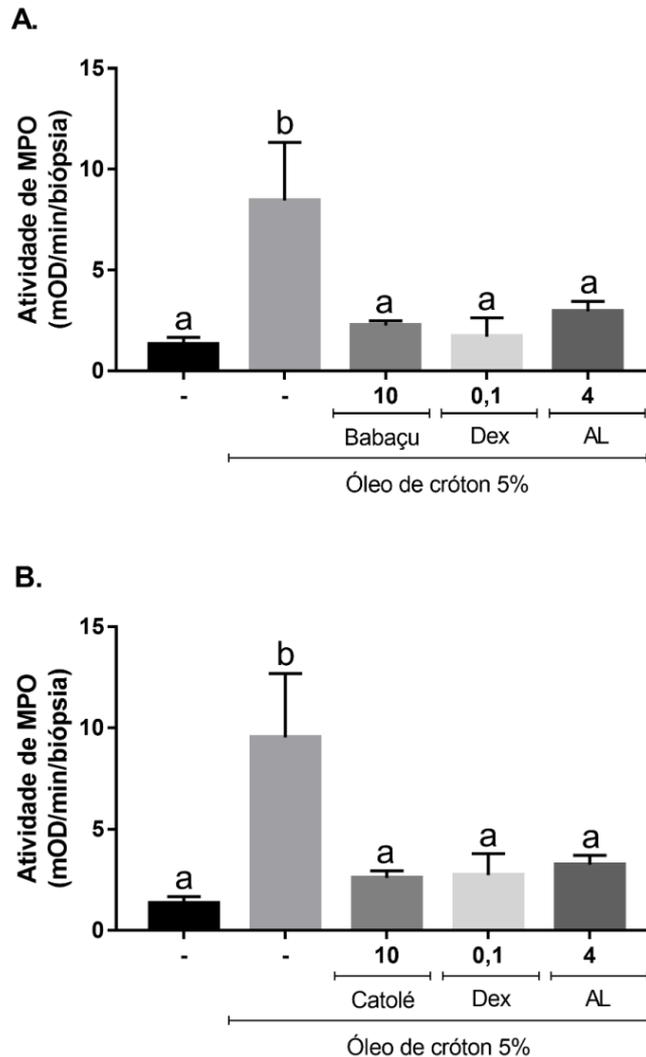
Um dos fatores que tipifica a inflamação como aguda ou crônica é a composição do infiltrado inflamatório. Isso porque a inflamação crônica é caracterizada por infiltração de células mononucleadas, como linfócitos, macrófagos e plasmócitos, seguida de destruição do tecido lesado, devido à grande concentração de mediadores químicos liberados no local com reparo tecidual por meio da angiogênese e fibrose.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada dentro de células como neutrófilos (em maior concentração) e em mastócitos e basófilos (em menor concentração). Trata-se de uma proteína que é liberada no momento da fagocitose, as enzimas lisossômicas presentes nos grânulos apresentam propriedades catalíticas sendo responsáveis pela oxidação do peróxido de hidrogênio levando a formação de compostos oxidantes, como ácido hipocloroso (HOCl), e espécies reativas com propriedades citotóxicas, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (KLEBANOFF, 1980; NICHOLLS, HAZEN, 2008; HAZEN; CROWLEY; HEINECKE, 1996; ÖZÇAKA et al., 2010; LAU; BALDUS, 2006).

Além disso, os neutrófilos têm ação protetora por atuar na proteção do organismo contra infecções bacterianas, uma vez fagocitadas, ocorre a liberação dessas substâncias cujo efeito tóxico, destruindo o microorganismo e estimulando a ativação do sistema imunológico com recrutamento de células de defesa. No entanto, mesmo apresentando ação protetora, em excesso os compostos reativos promove o dano tecidual por favorecer a resposta inflamatória com o aumento da migração celular e liberação de mediadores químicos (NICHOLLS, HAZEN, 2008; HAZEN; CROWLEY; HEINECKE, 1996; LAU; BALDUS, 2006).

Com base nisso, foi possível avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase nas amostras obtidas no edema de orelha crônico induzido por múltiplas aplicações do óleo de cróton como mostra na FIGURA 14 A e B. Assim, foi perceptível que o grupo de animais que recebeu apenas o agente lesivo apresentou maior atividade enzimática, o que indica um maior número de células inflamatórias no tecido, principalmente neutrófilos, quando comparado aos animais dos grupos tratados. Os animais que receberam o tratamento com 10 µL/orelha de BA (FIGURA 14 A) e LI (FIGURA 14 B), o AL e o fármaco padrão (dexametasona) foram iguais entre si, apresentando menor atividade enzimática quando comparado ao controle negativo. Assim, possivelmente o óleo de BA e LI, bem como, ácido láurico, podem agir inibindo a migração de neutrófilos, estabilizando membrana, diminuindo a síntese de MPO ou inibindo a enzima em si.

Figura 14 – Efeito da administração tópica do óleo fixo de babaçu (A) e licuri (B), além de ácido láurico sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton. (-) acetona; óleo de babaçu ou licuri (10 µl/orelha); Dex - dexametasona (0,1 mg/orelha); AL – ácido láurico (4 mg/orelha). Os resultados foram expressos como média ± SEM e analisados por ANOVA com pós-teste Bonferroni, considerando significativos valores de $p < 0,05$. Diferença entre os grupos está indicada por letras diferentes.



A pele protege o organismo contra ação de micro-organismos, agentes lesivos como substâncias tóxicas, patógenos, células lesionadas. O equilíbrio estabelecido entre eventos celulares e moléculas reguladoras, bem como as interações estabelecidas com ambiente externas confere a homeostase (WANG, et al., 2013).

A ocorrência de uma injúria no tecido ocasionado por fatores externos ou internos pode levar a alterações na derme e epiderme, comprometendo a sua função. Tais estímulos inflamatórios sinalizam diferentes vias intracelulares celulares responsáveis pela produção de mediadores pró-inflamatórios (CHEN et al., 2018; CALDER, 2006). No intuito de avaliar o

dano tecidual e o efeito terapêutico das drogas testadas, foi realizada a análise histomorfométrica e histológica das orelhas no modelo de inflamação crônica. Como verificado na TABELA 5, as doses de 10 µL/orelha de BA, LI e 4 mg/orelha de AL, além do fármaco padrão, apresentaram menor espessura total e da epiderme quando comparado com o controle negativo.

O óleo de cróton promove a irritação cutânea ocasionado em quadro inflamatório. Tais alterações são perceptíveis ao analisar histomorfometria (TABELA 5) e a histologia (FIGURA 12 B1 e B2), com o grupo de animais que recebeu apenas o agente flogístico na qual apresentaram alterações vasculares e aumento do número de células polimorfonucleadas (macrófagos, plasmócitos, linfócitos e células dendríticas) no local e ampliação na espessura da epiderme (TABELA 5). A presença do agente flogístico é responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo levando ao aumento da permeabilidade vascular favorecendo a migração de proteínas, citocinas e células do sistema imune dos vasos para o tecido promovendo o aumento no volume tecidual (CALDER, 2006).

Os grupos que foram tratados com as doses de 10 µL BA, LI e LA e o fármaco padrão apresentaram menor volume tecidual (TABELA 5), uma vez que, houve redução das alterações vasculares e recrutamento de células polimorfonucleadas quando comparado ao controle negativo como verificado na Figura 12 – C, D, E e F.

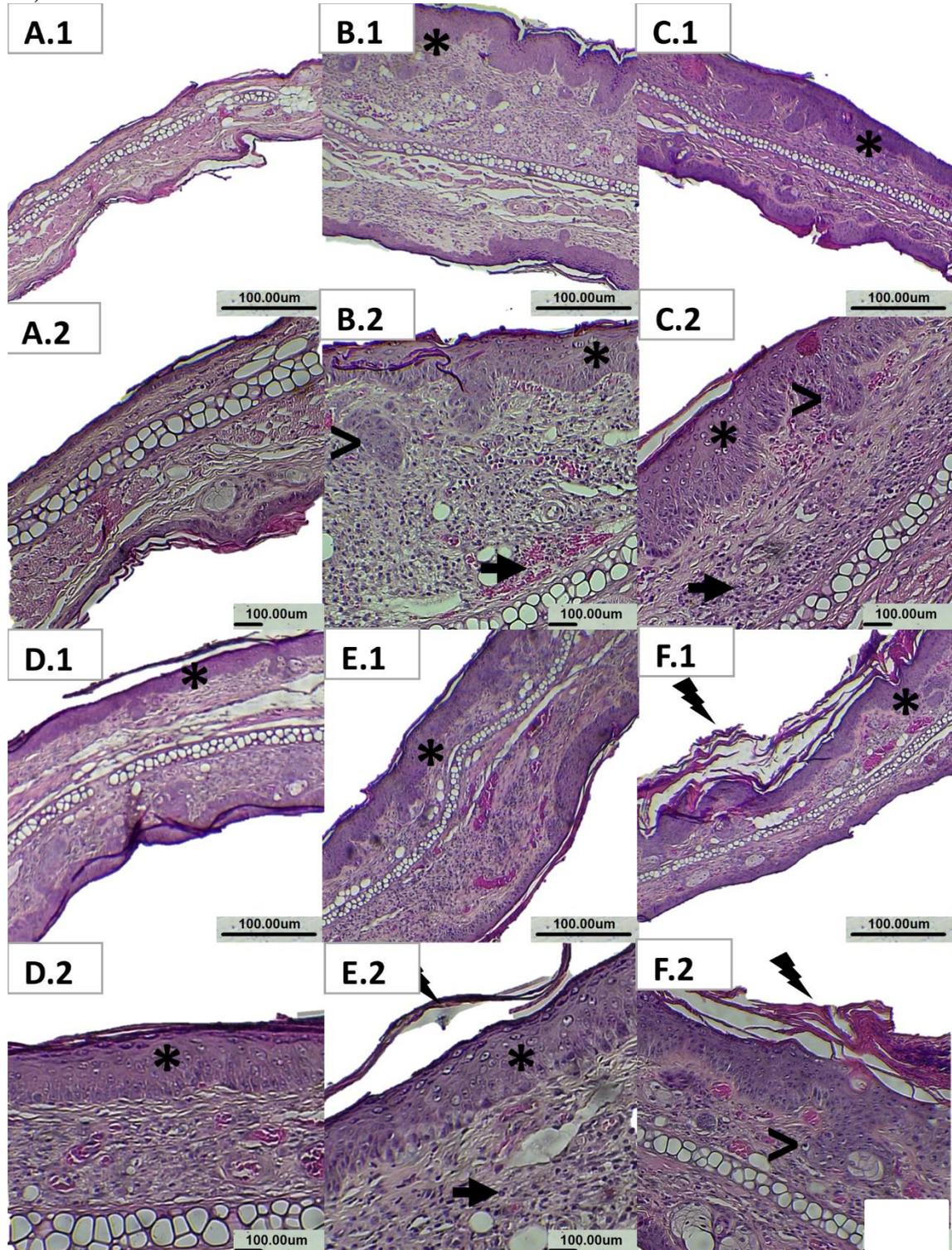
Tabela 5 – Análise histomorfométrica das orelhas no modelo de inflamação crônica.

Parâmetros	Grupos experimentais					
	Acetona (20 µL/orelha)			Óleo de cróton 5% (20 µL/orelha)		
	Sham (acetona, 20 µL/orelha)	Controle negativo (acetona, 20 µL/orelha)	Babaçu (10 µL/orelha)	Licuri (10 µL/orelha)	Dexametasona (0,1 mg/orelha)	Ácido láurico (4 mg/orelha)
Número de animais	5	9	8	8	7	8
Espessura da epiderme (µm)	6,0 ± 0,33	48,6 ± 2,44	24,7 ± 1,67*	26,8 ± 1,17*	29,4 ± 2,31*	30,2 ± 2,44*
Espessura total (µm)	103,6 ± 5,07	356,3 ± 8,98	217,2 ± 7,00*	212,0 ± 6,09*	227,3 ± 13,86*	267,3 ± 10,66*

Dados apresentados como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando significantes valores de *p < 0,05.

O bloqueio na cascata de reação pelas vias oriundas ou não do ácido araquidônico favorece o não aparecimento de mediadores químicos e moléculas quimioatraentes bem como alterações vasculares e celulares evitando assim o dano tecidual. Diante disso, é possível verificar (TABELA 5 e FIGURA 12) que possivelmente o óleo de BA e LI, assim como, o AL apresentam propriedades anti-inflamatória por atuar inibindo a liberação dos metabólitos oriunda ou não do metabolismo do ácido araquidônico atuando de forma protetora.

Figura 15 – Alterações histológicas no edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton. (A) Sham; (B) acetona (20 μ L/orelha), (C) dexametasona (0,1 mg/orelha); (D) óleo de babaçu (10 μ l/orelha); (E) óleo de licuri (10 μ l/orelha); (F) ácido láurico (4 mg/orelha). Aumentos: 1(40x) e 2 (100x).



Nota: * Hiperplasia epitélio; > acantose; → infiltrado inflamatório e edema; raio – hiperqueratose.

6 CONCLUSÃO

- A caracterização química identificou o ácido láurico como composto majoritário nos dois óleos analisados, bem como confirmou a qualidade dos óleos obtidos para os ensaios farmacológicos.
- Ambos os óleos e o ácido láurico, apresentaram atividade anti-inflamatória tópica no modelo de edema de orelha induzido por PMA.
- Ao avaliar o mecanismo de ação nos modelos de edema de orelha induzido por ácido araquidônico, fenilpropiolato de etila e fenol foi observado a redução na formação do edema nos grupos tratados com BA, LI e AL. Diante disso, é plausível que o BA, LI e AL atuem na cascata do ácido araquidônico, possivelmente bloqueando as enzimas COX e/ou LOX, e na degranulação dos mastócitos e queratinócitos, inibindo a liberação de aminas e citocinas.
- No ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina, não houve redução do edema nos grupos tratados com BA e LI. No entanto, o ácido láurico mostrou ação antiedematogênica, possivelmente agindo no bloqueio dos receptores TRPV-1.
- No modelo de atividade anti-inflamatória crônica, o BA e o LI reduziram o edema. Os três tratamentos reduziram a atividade da enzima mieloperoxidase, e a hiperplasia da epiderme.
- O tratamento com ácido láurico livre demonstrou potencial tóxico para pele, o que ficou evidente pela indução de hiperqueratose.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. S. et al. First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) - a promising plant for biodiesel production. **Australian Journal of Botany**, v.59, n. 2, p. 149, 2011.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 1, 2006
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.
- ALENCAR, J. W.; ALVES, P. B.; CRAVEIRO, A. A. Pyrolysis of tropical vegetable oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 6, 1983.
- AMANI, M. A. et al. Biodiesel production from *Phoenix dactylifera* as a new feedstock. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 40–43, 2013.
- ANYANJI, V. U; MOHAMED, S.; BEJO, H. B. Acute toxicity and safety assessment of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf extract in rats. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, n.16, p. 1022-1029, 2013.
- ARAÚJO, F. R.; LOPES, M. A. Diversity of use and local knowledge of palms (Arecaceae) in eastern Amazonia. **Biodiversity and Conservation**, v.21, n.2, p.487–501, 2011.
- AZEEM, M. W. et al. Production of biodiesel from low priced, renewable and abundant date seed oil. **Renewable Energy**, v. 86, p. 124–132, 2016.
- AZEVEDO, A. P. S. et al. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 155–159, 2007.
- BABU, N. P.; PANDIKUMAR, P.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebbek* Benth., an ethnomedicinal plant, in acute and chronic animal models of inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 2, p.356–360, 2009.
- BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 15, p. 1066–1071, 1997.

- BATLOUNI, M. Anti-Inflamatorios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cerebro-Vasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.
- BAUER, L. C. et al. Chemical characterization of pressed and refined licuri (*Syagrus coronata*) oils. **Acta Scientiarum Technology**, v. 35, n. 4, p. 771-776, 2013.
- BELVISO, S. et al. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 39–45, 2013.
- BESSA, C. M. A. S. et al. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n.23, p. 310–317, 2016.
- BELVISO, S. et al. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. **Food Research International**, v.51, n.1, p.39–45, 2013.
- BIRO, T. et al. Recent Advances in Understanding of Vanilloid Receptors: A Therapeutic Target for Treatment of Pain and Inflammation in Skin. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 56–60, 1997.
- BISWAS, S. et al. Differentiation of vegetable oils and determination of sunflower oil oxidation using a surface acoustic wave sensing device. **Food Control**, v. 15, p. 19–26, 2002.
- BLAND, J. H.; PHILLIPS, C. A. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis and related multisystem diseases. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 1, n. 4, p. 339–359, 1972.
- BOS, J. D. et al. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 6, p. 1098–1107, 2005.
- BOUSQUET, J. et al. Eosinophilic inflammation in asthma. **The New England Journal of Medicine**. v.323, n.13, 1990.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste**, especialmente do Ceará. 3ed. Mossoró, Coleção Morossoense, 1976.
- BRATTSAND, R. et al. Influence of 16,17-acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 16, p. 779–786, 1982.
- BUCKLEY, C. D. et al. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends in Immunology**, v.22, n.4, p.199–204, 2001.
- CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **American Society for Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1505S-1519S, 2006.

CALIXTO, J. B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CARLSON, R. P. et al. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacological agents. **Agents Actions**, v. 17, p. 197 – 204, 1985.

CARVALHO, A. J. A. et al. O licuri (*Syagrus coronata*, Arecaceae): lavoura xerófila e agricultura familiar camponesa no semiárido do centro-norte baiano. **Bahia Análise de dados**. v. 24, n. 3, p.557-569, 2014.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v.9, n. 6, p. 7204-7218, 2018.

CLAUDIANO, G. S. et al. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p. 1057 - 1062, 2013.

COLLINGTON, S. J.; WILLIAMS, T. J.; WELLER, C. L. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 478–485, 2011.

COSTA, J. G. M. et al. Antibacterial Properties of Pequi Pulp Oil (*Caryocar coriaceum* – WITTM.). **International Journal of Food Properties**, v. 14, p. 411–416, 2011.

CROFFORD. L. J. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.15, Suppl 3, 2013.

CRUMMEY, A. et al. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, 1987.

DHAVAMANI, S.; RAO, P C. Y.; LOKESH, B. R. Total antioxidant activity of selected vegetable oils and their influence on total antioxidant values in vivo: A photochemiluminescence based analysis. **Food Chemistry**, v.164, p.551–555, 2014.

DE YOUNG, L. M. et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DJUKANOVIĆ, R. et al. Effect of an Inhaled Corticosteroid on Airway Inflammation and Symptoms in Asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 145, n. 3, p. 669–674, 1992.

EISERHARDT, W. L. et al. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scales. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1391– 1416, 2011.

EL-DEMERDASH, E. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 3, p. 238-244, 2011.

ELIAS, P. M.; WAKEFIELD, J. S. Therapeutic Implications of a Barrier-Based Pathogenesis of Atopic Dermatitis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 41, n. 3, p. 282–295, 2010.

ERIKSEN, K. W. et al. Increased Sensitivity to Interferon- α in Psoriatic T Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 5, p. 936–944, 2005.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, M. T. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 12-26, 1997.

FERRÁNDIZ, M. L. et al. Effect of Bakuchiol on Leukocyte Functions and Some Inflammatory Responses in Mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, n. 9, p. 975–980, 1996.

FERREIRA M. R. A. et al. Development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1383-1390, 2010.

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

GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Akadémiai Kiadó, Budapest, 2000.

GABOR, M.; RAZGA, Z. “Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin.” **Agents and Actions**, v. 36, n. 1-2, p. 83–86. 1992.

GASPAR, K. Neuropeptides in the skin. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 483-498, 2003.

GERTSCH, J. How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 177-183, 2009.

GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M. B. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. **Advances in Pharmacological Sciences**, p. 1–11, 2016.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversity and Conservation of Plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 632–639, 2005.

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

GONZÁLEZ-PÉREZ, S. E. et al. Conhecimento e usos do babaçu (*Attalea speciosa* Mart. e *Attalea eichleri* (Drude) A. J. Hend.) entre os Mebêngôkre-Kayapó da Terra Indígena Las Casas, estado do Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 295-308, 2012.

HAN, Z. et al. AP-1 and NF- κ B Regulation in Rheumatoid Arthritis and Murine Collagen-Induced Arthritis. **Autoimmunity**, v. 28, n. 4, p. 197–208, 1998.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 508–519, 2006.

HART, P. H. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. **Immunology and Cell Biology**, v.79, n.2, p.149–153, 2001.

HAZEN S. L et al. W.Human Neutrophils Use Chlorine Gas as an Oxidant During Phagocytosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 6, p. 1283-1289, 1996.

HEINRICH, M. Ethnobotany and ethnopharmacology – Interdisciplinary links with the historical sciences. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 157-160, 2006.

HERCH, W.; KALLEL, H.; BOUKHCHINA, S. Physicochemical properties and antioxidant activity of Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) oil as affected by different extraction methods. **Food Science and Technology**, v. 34, v.3, p. 464–470, 2014.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, 2006.

HONG, S. L.; LEVINE, L. Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 5, p. 1730–1734, 1976.

HONORIO-FRANÇA, A. et al. Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function. Drug Design, **Development and Therapy**, v.21, 2014.

HORADAGODA, N. U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p. 437–441, 1999.

HUANG, W. C. et al. Anti-bacterial and anti-inflammatory properties of capric acid against *Propionibacterium acnes*: A comparative study with lauric acid. **Journal of Dermatological Science**, v. 73, n. 3, p. 232–240, 2014.

HUEBNER, K. D.; SHRIVE, N. G.; FRANK, C. B. Dexamethasone inhibits inflammation and cartilage damage in a new model of post-traumatic osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 32, n. 4, p. 566–572, 2013.

HUGHES, A. F. S. et al. Antimicrobial activity of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269–274, 2013.

IHAA, O. K. et al. Physicochemical properties of *Syagrus coronata* and *Acrocomia aculeata* oils for biofuel production. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 318–322, 2014.

INGERSOLL, M. A. et al. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. **Trends in Immunology**, v.32, n.10, p.470–477, 2011

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear edema. **British Journal Pharmacology**. v.110, p. 1614-1620. 1993

IMANIFOOLADI, A. A., YAZDANI, S., NOURANI, M. R. The role of nuclear factor-kappaB in inflammatory lung disease. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 197–205, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos físico – químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo, 2005.

ISSEKUTZ, A.C.; MOVAT, H. Z. The effect of vasodilator prostaglandins on polymorphonuclear leukocyte infiltration and vascular injury. **American Journal of Pathology**, v. 107, p. 300–309, 1982.

JAFFRI, J. M. et al. Antihypertensive and Cardiovascular Effects of Catechin-Rich Oil Palm (*Elaeis guineensis*) Leaf Extract in Nitric Oxide–Deficient Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 775–783. 2011.

JEFFERY, R. C. Clinical features of rheumatoid arthritis. **Medicine**, v. 38, n. 4, p. 167–171, 2010.

KATZ, J. A. Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 171–189, 2004.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen Metabolism and the Toxic Properties of Phagocytes. **Annals of Internal Medicine**, v. 93, n. 3, p. 480-489, 1980.

KUIPER, J. et al. Immunomodulation of the inflammatory response in atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 18, n. 5, p. 521–526, 2007.

KUMAR, V. et al. **Robbins Patologia Básica**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 33-61p.

KUSHNER, I. Regulation of the Acute Phase Response by Cytokines. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 36, n. 4, p. 611–622, 1993.

KUSS, V. V. et al. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1013–1020, 2015.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 1, p. 16–26, 2006.

LEAL, L. B. et al Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 167–173, 2013.

LEBLANC, S. Interactions of Metabolism, Inflammation, and Reproductive Tract Health in the Postpartum Period in Dairy Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.18–30, 2012.

LEE, D. Y. et al. Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 1, p. 149–154, 2009.

LEE, H. Y; MARCO STIEGER, M.; YAWALKAR, N. Cytokines and Chemokines in Irritant Contact Dermatitis. **Mediators of Inflammation**, artigo nº 916497, 2013.

- LESCANO, C. H. et al. L. Diuretic and Anti-Inflammatory Activities of the Microencapsulated *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) Oil on Wistar Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 6, p. 656–662, 2015.
- LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F. Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. **Nature**, v. 293, p. 103–108, 1981.
- LIMA, J.R.O. et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, p. 600–603, 2007.
- LINS, U. et al. Structure, morphology, and composition of silicon biocomposites in the palm tree *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. **Protoplasma**, v. 220, p. 89–96, 2002.
- LOPES, D. C.; STEIDLE NETO, A. J.; MENDES, A. A. Viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de Macauba no Brasil. **Energy Economics**, v. 40, p. 819-824, 2013.
- LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F. **Flora Brasileira** - Arecaceae (Palmeiras). Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2010.
- LOUIS, R. et al. The Relationship between Airways Inflammation and Asthma Severity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 1, p. 9–16, 2000.
- LUZ, D. A. et al. Estudo físico-químicos do óleo de babaçu bruto (*Orbignya phalerata* Mart.) e de um subproduto da etapa de degomagem do processo de refino. **Caderno Pesquisa**. v. 18, n. 3, 2011.
- MACEDO, J. G. F. et al. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, artigo nº 6769193, 2018.
- MACÍA, M. J. Multiplicity in palm uses by the Huaorani of Amazonian Ecuador. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 144, p.149–159, 2004.
- MAGGI, C. A. et al. The antagonism induced by Ruthenium Red of the actions of capsaicin on the peripheral terminals of sensory neurons: further studies. **European Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 1, p. 1–10, 1988.
- MAJITHIA, V.; GERACI, S. A. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n. 11, p. 936–939, 2007.
- MARINO C. Skin physiology, irritants, dry skin and moisturizers. Washington State Department of Labor and Industries, 2006.
- MARTINS, L. E. A. M.; REIS, V. M. S. Immunopathology of allergic contact dermatitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 419-33, 2011.
- MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais**: Guia de Seleção e Emprego de Plantas Usadas em Fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3 ed. Fortaleza: UFC Edições, 2007.

- MAY, P. H. et al. Subsistence benefits from the babassu palm (*Orbignya martiana*). **Economic Botany**, v. 39, n.2, p.113–129,1985).
- MCGETTRICK, H. M.; BUTLER, L. M.; BUCKLEY, C. D. Tissue stroma as a regulator of leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 3, p. 385-400, 2012.
- MELNICOFF, M. J.; HORAN, P. K.; MORAHAN, P. S. Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation. **Cellular Immunology**, v. 118, n. 1, p. 178–191, 1989.
- MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67, n. 4, p. 399–407, 2010.
- MÜHL, H.; PFEILSCHIFTER, J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gama. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1247 – 1255, 2003.
- MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Anti-inflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiátrica**, v. 16, n. 4, p. 186-190, 2009.
- MURRAY, A. R. et al. A. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research Toxicology**, v. 20. P. 77- 1769, 2007.
- NASCIMENTO, F. R. F.; BARROQUEIRO, E. S. B.; AZEVEDO, A. P. S. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 53–58, 2006.
- NEHDI, I. et al. Characteristics and chemical composition of date palm (*Phoenix canariensis*) seeds and seed oil. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 360–365, 2010.
- NICHOLLS, S. J.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 346–351, 2008.
- NICOLAOU, A. Eicosanoids in skin inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 88, p.131–138, 2013.
- NOBRE, C. B. et al. Antioxidative effect and phytochemical profile of natural products from the fruits of “babaçu” (*Orbignya speciosa*) and “buriti” (*Mauritia flexuosa*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 423-429, 2018.
- NYLANDER-LUNDQVIST, E; BÄCK, O.; EGELRUD, T. IL-1 beta activation in human epidermis. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 4, p. 1699-1704, 1996.
- OKE, S. L.; TRACEY, K. J. From CNI-1493 to the immunological homunculus: physiology of the inflammatory reflex. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 8, n. 3, p. 512–517, 2007.

OLIVEIRA, L. E. et al. Kinetic and thermodynamic parameters of volatilization of biodiesel from babassu, palm oil and mineral diesel by thermogravimetric analysis (TG). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 1, p. 155–160, 2012.

OLIVEIRA, M. L. 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, 2010.

OLMEZ, D. et al. Histopathologic Changes in Two Mouse Models of Asthma. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, n. 2, p. 132-138, 2009.

OPAS, E. E.; BONNEY, R. J.; HUMES, J. L. Prostaglandin and Leukotriene Synthesis in Mouse Ears Inflamed by Arachidonic Acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 84, p. 253–256, 1985.

ÖZÇAKA, Ö. et al. Smoking and matrix metalloproteinases, neutrophil elastase and myeloperoxidase in chronic periodontitis. **Oral Diseases**, v.17, n., p. 68–76, 2010.

PACHECO, N. R. et al. *Cecropia pachystachya*: a species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. **BioMed Research International**, v. 2014, 10 pages, 2014.

PANTHONG, P. A. et al. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from *Ventilago harmandiana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 237–242, 2004.

PATEL, R. R. et al. Stroma: Fertile soil for inflammation. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. v. 28, p. 565-576. 2014.

PATIL, K. R.; PATIL, C. R. Anti-inflammatory activity of bartogenic acid containing fraction of fruits of *Barringtonia racemosa* Roxb. in acute and chronic animal models of inflammation. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 1, p. 86–93, 2017.

PAYNE, D. N. R. et al. Relationship between Exhaled Nitric Oxide and Mucosal Eosinophilic Inflammation in Children with Difficult Asthma, after Treatment with Oral Prednisolone. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 1, n. 164, p. 1376–1381, 2001.

PETROVI-RACKOV, L. et al. Inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Jugoslav Med Biochem**, v. 23, p. 375 – 380, 2004.

PINHEIRO, M. M. G.; BOYLAN, F.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: Evidence for the involvement of apigenin. **Life Sciences**, v. 91, p. 293–300, 2012.

PINTO, N. DE C. C. et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330–337, 2015.

PIZZICHINI, E. et al. Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial. **European Respiratory Journal**, v. 14, n. 1, p. 12, 1999.

PLOTKIN, M. J.; BALICK, M. Medicinal uses of south american palms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, n. 2, p. 157-179, 1984.

QUEIROGA, R. C. R. E. et al. Production and chemical composition of the milk from crossbred Moxotó goats supplemented with licuri or castor oil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n.1, 2010.

RAJAVASHISTH, T. B. et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. **Nature**, v. 344, n. 6263, p. 254–257, 1990.

RAHMAN, M. A. et al. Medicinal plant diversity in the fl ora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families. **Fitoterapia**.v. 75, p. 149-161, 2004.

REDMAN, C. W. G.; SACKS, G. P.; SARGENT, I. L. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.180, n.2, p.499–506, 1999.

RODRIGUES, E. C. R. et al. Development of Babassu Oil Based Nanoemulsions. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 2, p. 338-43, 2015.

RUFINO, M. U. L. et al. Conhecimento e uso do ouricuri (*Syagrus coronata*) e do babaçu (*Orbignya phalerata*) em Buíque, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1141-1149, 2008.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v.32, n.10, p. 452–460, 2011.

SALES-CAMPOS, H. et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 96-107, 2015.

SALLES, K. T. S. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 4, p. 829-838, 1996.

SANTOS, B. S. et al. Anti-staphylococcal activity of *Syagrus coronate* essential oil: Biofilm eradication and in vivo action on *Galleria mellonella* infection model. **Microbial Pathogenesis**, v. 131, p. 150-157, 2019.

SANTOS, L. M. M. et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.100, p. 35-40, 2017.

SANTOS, M. R. A; LIMA, M. R; FERREIRA, M. G. R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 244-250, 2008.

SANTOS, R. S.; FERREIRA, M. Estudo etnobotânico de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) em comunidades ribeirinhas do Município de Abaetetuba, Pará, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 1, p 1 – 10, 2012.

SARAIVA, R. A. et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504–510, 2011.

SCHMID-WENDTNER, M.-H.; KORTING, H. C. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.19, n.6, p.296–302, 2006

SCHEIBE, C. L. et al. S. *Schinus terebinthifolius raddi* (Aroeira) and *Orbignya phalerata* mart. (Babassu) effect in cecorrahphy healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.31, p.402-410, 2016.

REDMAN, C. W. G.; SACKS, G. P.; SARGENT, I. L. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.180, n.2, p.499–506, 1999.

SHAIKH, R. U.; PUND, M. M.; GACCHE, R. N. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 4, p. 355-361, 2016.

SHARMA, A. et al. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 208, p. 264–329, 2017.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 553-566 p.

SILVA, A. O. et al. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia ongiflora* (Desf.) Müll.Arg. **Journal of Ethnopharmacology**, v.154, p.319–329. 2014.

SOUZA A, M. H. S. L. et al. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 1–5, 2011.

SOUZA, M. H. S. L. et al. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 1-5, 2011.

SOLETTI, J. I. Characterization of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. oil and properties of methyl esters for use as biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 518–521, 2010.

SOSNOWSKA, J.; BALSLEV, H. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 43, 2009.

STANLEY, P. L. et al. Mouse Skin Inflammation Induced by Multiple Topical Applications of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.4, n.4,p. 262, (1991).

SYAHMI, A. R. M. et al. Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (Oil Palm Leaf) Methanol Extract. **Molecules**, v. 15, n.11, p. 8111-8121, 2010.

TABAREAN, V. I.; ALAVEZ, M. S.; SETHI, J. Mechanism of H2 histamine receptor dependent modulation of body temperature and neuronal activity in the medial preoptic nucleus. **Neuropharmacology**, v. 63, p.171-180. 2012.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v.107, n. 1, p.7-11, 2001.

TAN, K. T. et al. Palm oil: Addressing issues and towards sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 2, p. 420–427, 2009.

TEIXEIRA, M. A. Babassu - A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 9, p. 857–864, 2008.

TEPLYAKOV, A. I. Endothelin-1 Involved in Systemic Cytokine Network Inflammatory Response at Atherosclerosis. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 44, Supplement 1, p. 274–275, 2004.

TERUI, T.; OZAWA, M.; TAGAMI, H. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: A neutrophil-associated inflammation-boosting loop. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2000.

TING, E. et al. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sciences**, v. 81. p. 765–771. 2007.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: la busca instrumental para el acto de la practica de la fitoterapia., 2006.

VANDEBROEK, I. et al. Local knowledge: Who cares? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 7, p. 35, 2011.

VAUGHN, A. R. et al. Natural Oils for Skin-Barrier Repair: Ancient Compounds Now Backed by Modern Science. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 103–117, 2017.

VIDRIH, R.; VIDAKOVIČO, S.; ABRAMOVIČ, A. Biochemical Parameters and Oxidative Resistance to Thermal Treatment of Refined and Unrefined Vegetable Edible Oils. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 5, p. 376–384, 2010.

VINHAL, J. O.; LIMA, C. F.; BARBOSA, L. C. A. Analytical pyrolysis of the kernel and oil of babassu palm (*Orbignya phalerata*). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 107, p. 73–81, 2014.

VOCANSON, M. et al. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. **Allergy**, v. 64, p. 1699–1714, 2009.

WAGNER, K.-H.; ELMADFA, I. Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 10, p. 624–629, 2000.

WALLACE, J. L. et al. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. **Gastroenterology**, v. 107, n. 1, p. 173–179, 1994.

WANG, Y. et al. Hyperelastic Material Properties of Mouse Skin under Compression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

WHITE, M. J. Mediators of inflammation and inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, p. 378–381, 1999.

WILMER, J. L. et al. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 915-922, 1994.

YIN, N. S.; ABDULLAH, S.; PHIN, C. K. Phytochemical constituents from leaves of *Elaeis guineensis* and their antioxidant and antimicrobial activities. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 975-1491, 2013.

YOON, J. H.; BAEK, J. S. Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 585 - 596, 2005.

YRLID, U.; JENKINS, C. D.; MACPHERSON; G. G. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. **Journal Immunology**. v.176, p.4155–4162, 2006.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.81, n.3, p.584–592, 2006.

ZERNECKE, A.; WEBER1, C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, v. 86, p. 192–201, 2010.

APÊNDICE A – ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE BABAÇU

Hindawi
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2017, Article ID 3647801, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/3647801>

Research Article

Anti-Inflammatory Activity of Babassu Oil and Development of a Microemulsion System for Topical Delivery

Mysrayn Y. F. A. Reis,¹ Simone M. dos Santos,² Danielle R. Silva,² Márcia V. Silva,³ Maria Tereza S. Correia,³ Daniela M. A. Ferraz Navarro,⁴ Geanne K. N. Santos,⁴ Fernando Hallwass,⁴ Otávio Bianchi,⁵ Alexandre G. Silva,⁶ Janaina V. Melo,⁷ Alessandra B. Mattos,⁸ Rafael M. Ximenes,⁶ Giovanna Machado,⁸ and Karina L. A. Saraiva⁹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Rua Juvêncio Arruda S/N, Bairro Universitário, 58429-600 Campina Grande, PB, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, No. 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, No. 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁴Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, No. 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁵Programas de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais e Ciências da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, No. 1130, Petrópolis, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

⁶Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, No. 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁷Faculdade Boa Viagem, DeVry, Av. Jean Emile Favre, No. 422, Imbiribeira, 61200-060 Recife, PE, Brazil

⁸Laboratório de Microscopia e Microanálise, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Av. Prof. Luís Freire, No. 1, Cidade Universitária, 50740-540 Recife, PE, Brazil

⁹Núcleo de Plataformas Tecnológicas, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50740-465 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to Rafael M. Ximenes; rafael.ximenes@ufpe.br

Received 18 September 2017; Revised 20 November 2017; Accepted 29 November 2017; Published 21 December 2017

Academic Editor: Rocío De la Puerta

Copyright © 2017 Mysrayn Y. F. A. Reis et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Babassu oil extraction is the main income source in nut breakers communities in northeast of Brazil. Among these communities, babassu oil is used for cooking but also medically to treat skin wounds and inflammation, and vulvovaginitis. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory activity of babassu oil and develop a microemulsion system with babassu oil for topical delivery. Topical anti-inflammatory activity was evaluated in mice ear edema using PMA, arachidonic acid, ethyl phenylpropionate, phenol, and capsaicin as phlogistic agents. A microemulsion system was successfully developed using a Span® 80/Kolliphor® EL ratio of 6 : 4 as the surfactant system (S), propylene glycol and water (3 : 1) as the aqueous phase (A), and babassu oil as the oil phase (O), and analyzed through conductivity, SAXS, DSC, TEM, and rheological assays. Babassu oil and lauric acid showed anti-inflammatory activity in mice ear edema, through inhibition of eicosanoid pathway and bioactive amines. The developed formulation (39% A, 12.2% O, and 48.8% S) was classified as a bicontinuous to o/w transition microemulsion that showed a Newtonian profile. The topical anti-inflammatory activity of microemulsified babassu oil was markedly increased. A new delivery system of babassu microemulsion droplet clusters was designed to enhance the therapeutic efficacy of vegetable oil.

1. Introduction

Babassu palm tree (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng, Arecaceae) is commonly found in North and Northeast regions

of Brazil, mainly in the phytogeographic domain of “*Mata dos Cocais*” (Port. Lit. Palm trees forest). In its areas of occurrence, it represents the main income source for about 300.000 people in nut breakers communities in northeast

region of Brazil, most of them in state of Maranhão, but also in Piauí and in Chapada do Araripe/CE. Gathering of fruits to produce oil or to sell the nuts is activities predominantly made by women, who are called “*quebradeiras de coco babaçu*” (Por. Lit. Babassu nut breaker women) [1–3]. These communities developed autochthonous knowledge about babassu uses as source of human and animal food, utensils and tools, fuel, construction, and soil fertilizers and as cosmetic and medicines [3–6].

Among the parts used for medicinal purposes, leaves, roots, and fruits should be highlighted. Leaves and roots are used as tea for pain and wound healing, while fruits are used in a much bigger scale: mesocarp flour and milk are used for the treatment of gastritis, hepatitis, osteoporosis, skin wounds, and leukorrhea; liquid albumen is used as eyedrops to treat conjunctivitis; and the seed oil is used as laxative, vermifuge, and anti-inflammatory and for the treatment of myiasis, mycosis, skin wounds, hemorrhoids, leukorrhea and female genital inflammation, and spider bites [3–5, 7].

Vegetable oils such as olive, palm, and coconut oils are well known for their anti-inflammatory properties. Olive oil is rich in anti-inflammatory phenolics like oleocanthal and oleuropein glycosides [8, 9], while the effect of palm oil is attributed to its high tocotrienol content [10]. Like babassu oil, coconut oil is poor in phenolics and tocopherols. Its anti-inflammatory effect is assigned to the presence of lauric acid and glyceryl laurates [11].

The availability of babassu oil and its easy handling have enabled development of several types of formulations to enhance the therapeutic efficacy of the biologically active components. Targeted delivery can be achieved by applying pharmaceutical nanotechnology, which is based on the synthesis, application, and characterization of nanoscale therapeutic systems to provide a more controlled drug release. In this context, nanostructured systems, for example, microemulsions containing babassu oil, may act as new and potentially efficient therapies for benign prostatic hyperplasia due to their antiproliferative and apoptotic effects [12] and improve human immune system function by increasing superoxide anion release, phagocytosis of mononuclear phagocytes, and antimicrobial activities [13].

Microemulsion is a system of two immiscible fluids that is stabilized by an interfacial film of surfactants. It offers the advantages of spontaneous formation, thermodynamic stability, manufacturing simplicity, solubilization capacity of lipophilic and/or hydrophilic solutes, a large area per volume ratio for mass transfer, and the potential for permeation enhancement [14–17]. Thus, the aim of this work was to evaluate the topical anti-inflammatory activity of babassu oil obtained from Chapada do Araripe in Ceará (Brazil) and synthesize and characterize a microemulsion system aiming to enhance babassu oil topical anti-inflammatory activity.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), arachidonic acid (AA), ethyl phenylpropionate (EPP), phenol, and capsaicin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The surfactants, Span 80 (sorbitan

mono-oleate) and Tween® 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate), ethanol, 99.9% deuterated CDCl₃, and Supelco® 37 Component FAME Mix were also obtained from Sigma Chemical Co. Kolliphor EL (polyoxyl castor oil) was from BASF SE (Ludwigshafen, Germany) and propylene glycol PA was purchased from Neon Comercial Ltda (São Paulo, Brazil).

2.2. Plant Material and Oil Extraction. Babassu fruits were collected from one palm tree in Araripe, located in the State of Ceará (Brazil), in July 2013. Botanical authentication was conducted by Olívia O. Cano, and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco under number 90.472.

The oil was extracted by a well-established method that is practiced by farmers in forested areas. After harvesting, the seeds were ground with a stone grinder, and the obtained paste was mixed well and allowed to stand overnight. On the next day, cold water was added to the paste, and the upper part was collected and placed on a fire to heat it until it started boiling. Subsequently, the liquid phase was separated from the oil meal using a tissue and heated until the water completely evaporated. Finally, the oil was filtered and used [18].

2.3. Physicochemical Characterization and Fatty Acid Profile. Traditionally extracted babassu oil was immediately analysed for some physicochemical properties as described by Adolfo Lutz Institute [19] as follows: relative density was determined in a 10 mL glass hydrometer (pycnometer) at 25°C; refractive index at 40°C was performed using a Abbé refractometer; peroxide values were calculated from the iodine release from potassium iodide and expressed as milliequivalents of active oxygen/kg of oil; rancidity (lipid oxidation) was determined by Kreis reaction using phloroglucinol in acid medium; acid values were expressed as milligrams of KOH required to neutralize the free acids of 1 g of oil, which was determined by titration in methanolic solution.

The transesterification procedure of the oil was realized in accord with Metcalfe et al. [20]. The oil (150 mg) was mixed with 4.0 mL of NaOH in 0.50 M methanol and incubated at 100°C for 5 minutes. Next, 5.0 mL solution of BF₃ (12%) in methanol was added in the mixture and was heated for 2 minutes. After cooling to room temperature, 5.0 mL of a saturated sodium chloride solution was added. The mixture was transferred to a separation funnel containing 20.0 mL of petroleum ether and vigorously stirred. After a period of rest, the aqueous phase was discarded and the ether phase was filtered. The solvent was evaporated in a rotary evaporator at 60°C and the residual solvent was removed with nitrogen flow. Methyl esters were solubilized in n-heptane before injection into the gas chromatographer [21].

The samples were analyzed using an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 5975C single quadrupole GC-MS equipped with a nonpolar HP-5MS (Agilent) fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.; film thickness 0.25 mm). The oven was initially held at 150°C for 2 min, increased to 230°C by 5°C/min (held for 7 min), and finally increased to 260°C by 4°C/min. The final temperature was

maintained for 75 min. The carrier gas was helium supplied at a constant flow of 1 mL/min and the split/splitless injector was maintained at 230°C. The applied ionization potential was 70 eV; the scan range was from 35 to 450 m/z with scan rate of 0.5 scans/s. A standard fatty acid methyl ester mixture (Supelco 37 Component FAME Mix, USA) was used to identify the fatty acid methyl esters. Fatty acid data were expressed as percentage of total peak area.

2.4. NMR Analysis. The extracted oil (approximately 50 mg) was dissolved in 0.6 mL of $CDCl_3$ and placed in a 5 mm NMR tube. The NMR analyses were performed on a Varian 400-VNMRS (Agilent Technologies, CA, USA) at 26°C, operating at the frequencies of 399.74 and 100.51 MHz for 1H and ^{13}C , respectively. 1H NMR spectra were recorded with 2.5 s acquisition times, sweep widths of 6.4 kHz, 45° pulse angles, and 1 s delay times. $^{13}C\{^1H\}$ NMR spectra were recorded with 3.04 s acquisition times, sweep widths of 21.5 kHz, 45° pulse angles, and 1 s delay times. For processing ^{13}C spectra, zero filling and line broadening of 1 Hz were applied prior to Fourier transformation. The chemical shift scale was indirectly referred to tetramethylsilane (TMS) by the residual $CHCl_3$ signal at 7.26 ppm for 1H spectra and the signal at 77.0 ppm for ^{13}C spectra.

2.5. Topical Anti-Inflammatory Activity

2.5.1. Animals. Male Swiss and BALB/c mice (25–30 g, $n = 6$) were provided by the Animal Facility of Federal University of Pernambuco. The animals were housed and kept in a room with controlled temperature ($23 \pm 2^\circ C$) under a 12/12 h light/dark cycle with food and water ad libitum. Experiments were conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the US Department of Health and Human Services. The project had been previously approved by the Animal's Ethics Committee of Federal University of Pernambuco (number 23076.039887/2014-51).

2.5.2. Ear Edema Measurement. For evaluation of ear weight, mice were euthanized and 6 mm diameter samples were taken from both ears using a biopsy punch (Richter®, Brazil). Each biopsy was weighed on a semi-micro analytical balance (AUW-D 220, Shimadzu, Japan). Ear edema (EE) was expressed as the increase in ear sample weight, using the following formula:

$$EE \text{ (mg)} = wRE - wLE, \quad (1)$$

where wRE is the weight obtained from the right ear sample (inflamed ear) and wLE is the weight obtained from the left ear sample (noninflamed ear).

For all treatments, animals were anesthetized with 1% halothane. Right ears were then challenged with different phlogistic agents diluted in acetone (20 μL). Babassu oil (1, 3, and 10 $\mu L/ear$) was applied topically in 20 μL acetone, while microemulsion was applied with no dilution. Dexamethasone or indomethacin (0.1 and 0.5 mg/ear, resp.) was used topically as a positive control. Ruthenium red (3 mg/kg, s.c.) was used as a positive control for capsaicin-induced ear edema.

2.5.3. PMA-Induced Ear Edema. Ear edema was induced by topical application of 20 μL of PMA (2.5 $\mu g/ear$) in acetone on both sides of the right ear. Left ears received only acetone as a control. After 15 min, 10 μL of babassu oil (100 and 12.2%), babassu microemulsion, microemulsion vehicle (48.8% surfactants, 39% aqueous phase, and 12.2% water), 0.5% dexamethasone, or acetone were applied to both sides of the right and left ears. Six hours after PMA administration, mice were euthanized for ear edema measurement [22, 23]. To avoid misinterpretation of the results due to a possible barrier effect of babassu oil on ear surfaces, an oral treatment with babassu oil was also evaluated against PMA-induced ear edema. Shortly, mice were treated with babassu oil (100, 300, and 1000 mg/kg) or indomethacin (10 mg/kg, p.o.) 60 min before PMA administration [23].

2.5.4. Investigation of Babassu Oil Mode of Action on Ear Edema. For elucidation of the mechanisms underlying the topical anti-inflammatory activity of babassu oil on PMA-induced mice ear edema, different phlogistic agents were used to induce ear edema: arachidonic acid (2 mg/ear), ethyl phenylpropionate 5% (20 $\mu L/ear$), phenol 10% (20 $\mu L/ear$), and capsaicin (0.25 mg/ear). Immediately after acetone evaporation, babassu oil (10 $\mu L/ear$) or indomethacin (0.5 mg/ear)/dexamethasone (0.1 mg/ear) were topically applied on both sides of the right ear, while the left ear received 20 μL of the vehicle. Ruthenium red (3 mg/kg, s.c.) was used as positive control for capsaicin-induced ear edema and it was administered 30 min before capsaicin.

After 1 h, mice were euthanized for ear edema measurement. Mice challenged with capsaicin were euthanized after 30 min of exposure. AA-induced ear edema was performed in BALB/c mice [23–25].

2.6. Preparation of Emulsions. A series of oil-in-water emulsions with HLB values ranging from 4.5 to 15 was prepared with the surfactants Span 80 and Tween 80 at a 2% total blend concentration w/v, 93% water, and 5% babassu oil using the Griffin equation [26]. The aqueous phase (water plus Tween 80) and the oil phase (oil plus Span 80) were heated to $70 \pm 5^\circ C$ separately. Both phases were mixed by the inversion method with mechanical stirring (9,000 rpm) for 5 min in ULTRA-TURRAX homogenizer equipment (Unique/DES500, São Paulo, Brazil). The samples were characterized 24 h after preparation.

2.7. Droplet Size Analysis by Dynamic Light Scattering (DLS). The droplet size distribution of the dispersed phase of the emulsions was determined by DLS using the Nanotrak Wave equipment (Microtrac Inc., Montgomeryville, PA, USA) with measurement capability from 0.8 to 6500 nanometers. The data were calculated using the manufacturer's software. Each emulsion was diluted with aqueous propylene glycol (1:100) and analyzed in triplicate.

2.8. Turbidimetric Method. The emulsions were diluted 1:25 with aqueous propylene glycol, and the percentage of transmission (% T) was measured at 600 nm using a spectrophotometer (UV-mini 1240, Shimadzu, Japan). With the blank

control set at 100% transmission, the turbidity of the diluted emulsion was calculated as follows: turbidity = $100 - \%T$ [27]. The reported results were the average of three determinations.

2.9. Construction of the Pseudo-Ternary Phase Diagram. Babassu oil, Span 80, and Kolliphor EL were selected as the oil phase and surfactants, respectively. Surfactant mixtures were tested at a ratio of 6 : 4 (w/w), as defined by the Griffin equation. The pseudo-ternary phase diagrams were constructed using the water titration method at room temperature, and the results were plotted using Software Origin® Pro 8.0. For each phase diagram, mixtures of surfactants and oil were prepared at weight ratios of 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, and 9:1 (%_{w/w}). These mixtures were titrated dropwise with water-propylene glycol (1:3) under mechanic stirring. After equilibration, the systems were visually characterized. Single-phase, transparent mixtures were designated as microemulsions [28].

After data analyses of the pseudo-ternary phase diagrams, the microemulsion system was prepared by mixing babassu oil (12.2%) with the surfactants (48.8%) before adding the aqueous phase (39%) under magnetic stirring. After two days, the system was evaluated by complementary techniques, as described below.

2.10. Characterization of the Microemulsion

2.10.1. Electrical Conductivity (EC). EC was evaluated using a digital conductivity meter (mCA 150P, Tecnocon, São Paulo, Brazil) previously calibrated with a calibration solution (146.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$). The electrode was inserted directly into 10 mL of the formulation. The analysis was performed in triplicate at a temperature of $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

2.10.2. TEM. The sample was dropped onto a 300 mesh carbon-coated copper grid and negatively stained with 2% phosphotungstic acid. The grid was analyzed in an FEI Tecnai Spirit Biotwin G² microscope (Hillsboro, Oregon, USA) operated with 80 KV of accelerating voltage.

2.10.3. SAXS. SAXS experiments were performed on the SAXSI beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS, São Paulo, Brazil), monitored with a photomultiplier, and detected on a Pilatus detector (300k Dectris) positioned at 836 mm that generated scattering wave vectors (q) from 0.13 to 2.5 nm^{-1} . The wavelength of the incident X-ray beam (λ) was 0.155 nm^{-1} . Background and parasitic scattering were determined by separate measurements on an empty holder and subtracted from the scattering data of the sample. The X-ray scattering was experimentally determined as a function of the scattering vector, q , whose modulus is given as follows:

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}, \quad (2)$$

where θ is half of the scattering angle (2θ).

TABLE 1: Physicochemical parameters of babassu oil from Chapada do Araripe, Brazil.

Physicochemical parameters	Babassu oil (unrefined)	Reference value (refined oil)
Relative density (g/mL)	0.9210	0.9140–0.9170
Refractive index at 40°C	1.458	1.448–1.451
Acid value (mgKOH/g)	0.13	Max. 4
Peroxide value (meq/kg)	nd	Max. 15
Rancidity	Absent	Absent

nd: not detected.

2.10.4. DSC. DSC analysis was performed using a Shimadzu DSC 50 (Kyoto, Japan) with 9–10 mg of sample under a nitrogen atmosphere with a flow rate of 50 mL/min. The melting temperature and enthalpy were calibrated with indium and zinc standards. The samples were analyzed from -50 to 60°C with a heating rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

2.10.5. Rheological Analysis. The rheological behavior of the formulation was investigated on an Anton Paar Physica MCR502 oscillatory rheometer (Ashland, VA, USA) with cone and plate geometry (50 mm diameter). The gap between the cone and plate was set at 0.05 mm. The measurements were taken at 25°C over a shear rate ($\dot{\gamma}$) range from 0.1 to 1000/s.

2.11. Statistical Analysis. Results were expressed as mean \pm SEM and normal distributions were checked by Shapiro-Wilk test. Then, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test using GraphPad Prism® 5.0 with significance set at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Physicochemical Characterization, GC-MS, and NMR Analyses of Babassu Oil. Physicochemical parameters of babassu oil and reference values are placed in Table 1, while fatty acid composition obtained by GC-MS is showed in Table 2. The main fatty acids found were dodecanoic acid (lauric acid) (40.78%), 9-octadecenoic acid (oleic acid) (21.35%), tetradecanoic acid (myristic acid) (20.05%), and hexadecanoic acid (palmitic acid) (12.26%) (see SM Figure 2). These data are in accordance with previous published data and with reference standards of Brazilian regulatory agencies [29–31]. Differences in relative density and refractive index from reference values can be explained since reference values are derived from refined oils. Nevertheless, those parameters indicative of oil degradation, as acidity, rancidity, and peroxide value, are well below the established limits of quality.

¹H NMR and ¹³C NMR analyses were performed to characterize the components of the sample and determine the distribution of fatty acids in the glycerol backbone of babassu

TABLE 2: Fatty acid composition of babassu oil from Chapada do Araripe, Brazil.

Skeleton	Compound	Area (%) \pm St Dev
C12:0	Dodecanoic acid	40.78 \pm 1.56
C13:0	Tridecanoic acid	0.03 \pm 0.01
C14:0	Tetradecanoic acid	20.05 \pm 0.27
C16:0	Hexadecanoic acid	12.26 \pm 0.59
C18:2n6c	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	2.39 \pm 0.29
C18:1n9c	(Z)-9-Octadecenoic acid	21.35 \pm 0.36
C18:0	Octadecanoic acid	2.64 \pm 0.09

TABLE 3: ^1H and ^{13}C NMR chemical shift (δ) data of babassu oil in CDCl_3 .

Hydrogen	δ (ppm)	Carbon	δ (ppm)
$\text{CH}=\text{CH}$	5.33	$\text{C}=\text{O}$	173.2 and 172.8
$\text{CH}-\text{O}$	5.22	$\text{CH}=\text{CH}$	129.9 and 129.6
CH_2-O	4.29	CH_2-O	62.1
CH_2-O	4.15	$\text{CH}-\text{O}$	68.8
$\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$	2.74	$\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$	27.2
$\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$	2.30	$\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$	34.1
$\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$	2.01	$\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$	31.8
$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$	1.61	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$	24.8
$(\text{CH}_2)_n$	1.28	CH_2-CH_3	22.6
CH_3	0.87	$(\text{CH}_2)_n$	29.7–28.8
		CH_3	14.0

oil (Table 3) (see SM Figures 3 and 4). NMR signals were assigned according to the literature [31–35]. There are some advantages to using NMR spectroscopy to study fatty acid compositions: (a) the ability to directly operate on the oil sample without any chemical manipulation, and (b) NMR is the only direct instrumental method by which the positional distribution of fatty acids on glycerol can be specifically identified [36].

The signals at 5.33, 2.01, and 2.74 ppm were assigned to the olefinic hydrogens, the protons attached to the allylic carbons, and the protons attached to the *bis*-allylic carbons, respectively (Table 3). These signals revealed the presence of unsaturated fatty acids, such as oleic acid in the oil mixture. Moreover, the last signal indicated that a small amount of linoleic acid was present. Linolenic acid was not detected in this mixture because no signal was observed at 0.98 ppm, which corresponds to the terminal methyl group of the fatty acid [32]. These results agree with those obtained in the GC-MS spectra (Table 2). The full identification of every fatty acid component was not possible due to signal overlap in the spectra.

^{13}C NMR spectra provide information regarding the positional isomerism of fatty acids in the glycerol backbones of triacylglycerols (TAG), diacylglycerols (DAG), and monoacylglycerols (MAG) [35]. When analyzing the spectral region of the carbonyl group, only two signals at 173.2 and 172.8 ppm were observed (Table 3). This pattern indicated that the oil mixture includes only TAG, a fatty acid distributed

at the *sn*-1,3 and *sn*-2 positions. Moreover, the spectral region of the acyl carbons between 60 and 73 ppm shows only two peaks (68.85 and 62.07 ppm) (Table 3), supporting that the sample only contains TAG isomers. The presence of unsaturated fatty acids that was observed in the ^1H spectrum was confirmed in the ^{13}C spectrum by the signals between 128.00 and 130.00 ppm. This region is characteristic of ethylenic carbons. The chemical shifts at 129.66 and 129.99 ppm indicated that the unsaturated fatty acids in the oil mixture were majority oleic acid, in agreement with the GC-MS results.

3.2. Topical Anti-Inflammatory Activity. PMA-induced ear edema is a useful model for screening topical anti-inflammatory compounds and/or plant extracts that act at a variety of levels. Skin inflammation induced by topical PMA administration is mediated through protein kinase C (PKC) activation of NF- κ B, with production of tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2), and prostaglandin E2 (PGE2) [37–39]. PMA given to mouse ears induces mast cell infiltration with release of mediators that increase vascular permeability and promote neutrophil influx [40, 41]. Anti-inflammatory efficacy of evaluated compounds implies mainly interference of arachidonic acid metabolism, since phospholipase A2 (PLA2), COX, and lipoxygenase (LOX) inhibitors have been shown to inhibit PMA-induced inflammation [23, 42].

Babassu oil (3 and 10 $\mu\text{L}/\text{ear}$) was able to inhibit PMA-induced ear edema in 19.1 ($p < 0.05$) and 54.1% ($p < 0.001$), respectively. Lauric acid (4 mg/ear), the major fatty acid of babassu oil, showed 90.3% of inhibition ($p < 0.001$), while dexamethasone inhibited the ear edema in 79.7% ($p < 0.001$) (Figure 1(a)). To avoid misinterpretation of the results due to a possible barrier effect of babassu oil on ear surfaces, an oral treatment with babassu oil was also evaluated against PMA-induced ear edema. When given orally, babassu oil (100, 300, and 1000 mg/kg) showed 23.5 ($p < 0.05$), 39.7, and 51.9% of edema inhibition ($p < 0.001$), while indomethacin (10 mg/kg) inhibited the edema in 62.0% ($p < 0.001$) (Figure 1(b)).

It is worth to comment that the high content of lauric acid in babassu oil defines the importance of this study, since its antibacterial and anti-inflammatory activities are described in the literature [43–45], through inhibition of MAPK pathway and subsequent NF- κ B activation, which are prominent contributors to the production of proinflammatory cytokines and chronic inflammatory responses [46], including in PMA-induced ear edema model. After topical administration, lauric acid penetrates the skin and accumulates in the dermis [47].

To further elucidate the topical anti-inflammatory activity of babassu oil, different phlogistic agents-induced ear edema was performed. Arachidonic acid-induced ear edema is a useful tool to identify compounds that interfere in eicosanoid pathway, such as COX and LOX inhibitors. However, this model is not sensitive to PLA2 inhibitors such as glucocorticoids [23, 48–50]. Here, both babassu oil (10 $\mu\text{L}/\text{ear}$) and lauric acid (4 mg/ear) inhibited AA-induced ear edema

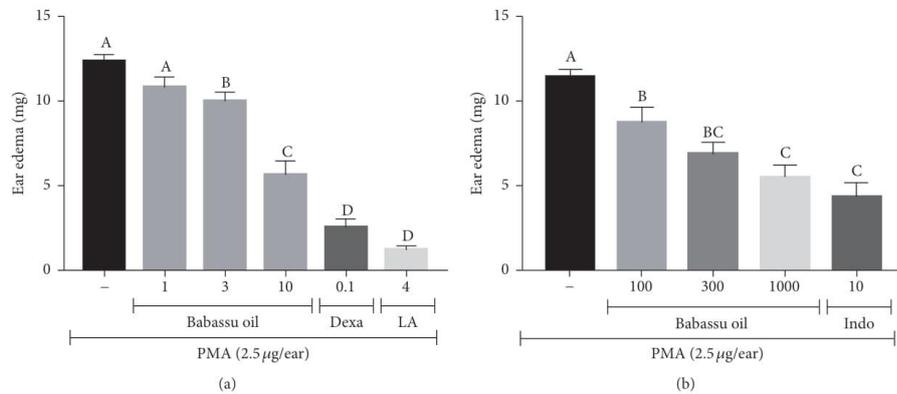


FIGURE 1: (a) Topical and (b) systemic anti-inflammatory activity of babassu oil in PMA-induced ear edema. Results are expressed as the mean \pm SEM and analyzed by ANOVA followed by Tukey's test with p set at 0.05. Different letters show statistical differences between groups ($p < 0.05$). (–) Negative control (acetone); babassu oil ($\mu\text{L}/\text{ear}$ in (a)) and (mg/kg, p.o. in (b)); (LA) lauric acid (mg/ear); (Dexa) dexamethasone (mg/ear), and (Indo) indomethacin (mg/kg, p.o.).

by 78.5 and 61.6%, respectively ($p < 0.001$). Indomethacin (0.5 mg/ear), a nonselective inhibitor of COX-1/2, decreased the ear edema by 65.4% ($p < 0.001$) (Figure 2(a)). Short-chain fatty acids (C10–C12), which include lauric acid, are reported as mid-range inhibitors of COX-1 (about 50–60% of inhibition) and COX-2 (about 25–30% inhibition) in vitro [51].

Barbosa et al. [52] demonstrated that babassu oil decreased ischemia-induced macromolecular leakage in post-capillary venules and inhibited histamine-induced microvascular permeability increase in hamster cheek pouch. To verify if the same occurs in skin, instead of mucosa, ethyl phenylpropionate-induced ear edema was performed. EPP administration immediately increases vascular permeability, with blood flow increasing somewhat slowly. Histamine, serotonin (5-HT), kinins, and prostaglandins combined actions on vascular permeability seemed to be involved in early EPP response [53]. Babassu oil (10 $\mu\text{L}/\text{ear}$) and lauric acid (4 mg/ear) inhibited EPP-induced ear edema by 82.0 and 71.8% ($p < 0.001$), respectively, in accordance with the results of Barbosa et al. [52]. Dexamethasone (0.1 mg/ear), used as positive control, inhibited edema formation by 65.6% ($p < 0.001$) (Figure 2(b)).

Phenol-induced skin inflammation is very like human contact dermatitis processes [54]. Phenol disrupts the plasma membranes of keratinocytes in the skin, resulting in release of preformed cytokines (IL-1 α , IL-8, and TNF- α). These cytokines stimulate the production of reactive oxygen species (ROS) and AA metabolites amplifying the inflammatory process [54–56]. Herein, babassu oil (10 $\mu\text{L}/\text{ear}$) and lauric acid (4 mg/ear) inhibited phenol-induced ear edema by 89.8 and 90.0% ($p < 0.001$), respectively. Dexamethasone (0.1 mg/ear), used as positive control due to its membrane stabilizing effect, inhibited edema formation by 91.0% ($p < 0.001$) (Figure 2(c)).

Topical administration of capsaicin releases proinflammatory mediators such as substance P and histamine, due to TRPV-1 activation, which result in an immediate vasodilation and erythema followed by edema. Maximum edema is achieved within 30 minutes after capsaicin administration [57, 58]. Neither babassu oil (10 $\mu\text{L}/\text{ear}$) nor lauric acid (4 mg/ear) was able to inhibit capsaicin-induced ear edema. Ruthenium red (3 mg/kg, s.c.), given 30 min before capsaicin administration, reduced the ear edema by 75.3% ($p < 0.01$) (data not shown).

3.3. HLB Value and Microemulsion Formulation. The HLB number is a semiempirical scale for selecting surfactants [26]. The corrected HLB of the selected surfactant or blend of surfactants that match the HLB of the selected oil provides the lowest interface tension between the oil and water phases and gives the system stability [28]. In this context, the most stable emulsion is obtained in system with the smallest droplet size. Analysis by DLS showed the smallest mean droplet diameters in babassu oil emulsions at an HLB of 8.0 (2.3882 μm).

The maximum turbidity values are the same HLB value at which the mean droplet diameter is minimal [27]. Here, we found that the highest mean turbidity values for babassu oil emulsions were obtained at HLB values from 8.0 to 10.0 (0.8–1.06). The correlation coefficient (Pearson r) between the turbidity values and the mean droplet size for the emulsion with an HLB value of 8.0 was 0.275 ($r^2 = 0.075624$), showing a positive correlation ($p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test).

Using the HLB value required for the babassu oil (HLB 8.0), Span 80 and Kolliphor EL were selected as the surfactants at a ratio of 6 : 4, respectively, because this blend had an HLB value equal to that determined for the oil. The aqueous phase was composed of water and propylene glycol (1 : 3) and the oil phase was babassu oil. In most cases, single-chain

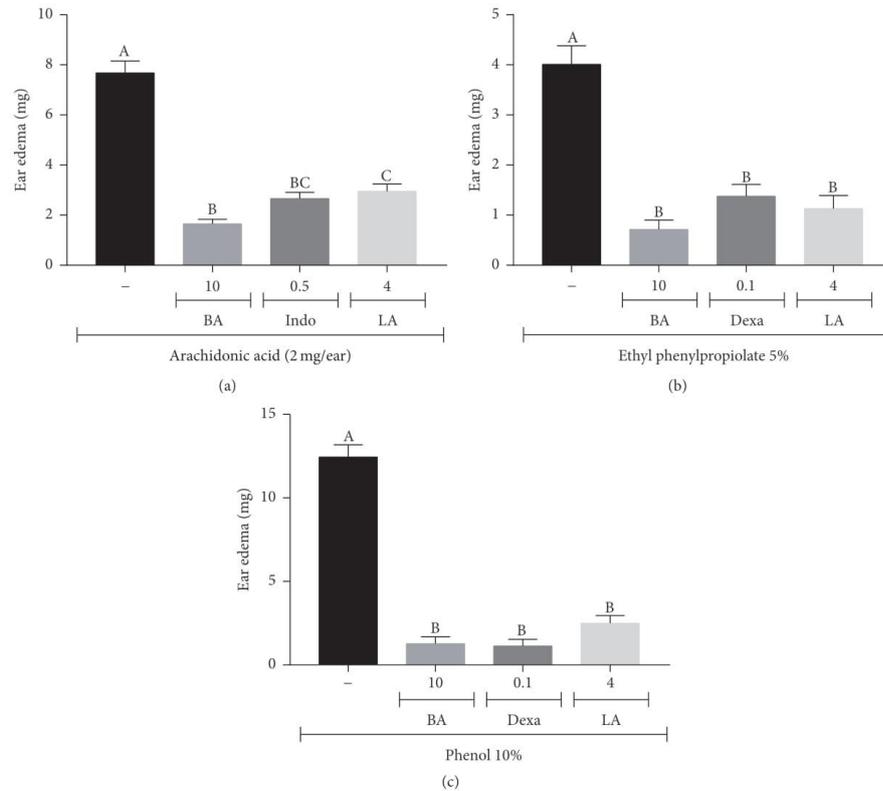


FIGURE 2: Topical anti-inflammatory activity of babassu oil and lauric acid in (a) arachidonic acid; (b) ethyl phenylpropionate; and (c) phenol-induced ear edema. Results are expressed as the mean \pm SEM and analyzed by ANOVA followed by Tukey's test with p set at 0.05. Different letters show statistical differences between groups ($p < 0.05$). (-) Negative control (acetone); (BA) babassu oil ($\mu\text{L}/\text{ear}$); (LA) lauric acid (mg/ear); (Indo) indomethacin (mg/ear); and (Dexa) dexamethasone (mg/ear).

surfactants alone are unable to reduce the interfacial tension sufficiently to form a microemulsion. Propylene glycol was added as a cosurfactant to decrease the interfacial tension and increase the fluidity of the interface. In this case, part of the propylene glycol content was incorporated into the surfactant layer, and the other part decreased the polarity of the water by dissolving in the water. However, a higher amount of propylene glycol molecules favors formation of a bicontinuous microemulsion and avoids rigid structures, such as gels and liquid-crystals [59].

The transparent liquid systems formed by the pseudo-ternary phase diagram can be used to obtain concentration ranges of babassu oil, emulsifiers, and the aqueous phase for microemulsion formulations. A system composed of 39% aqueous phase, 12.2% oil phase, and 48.8% surfactants (Figure 3, white dot) was selected for physical and morphological characterization. The selected system exhibited the

typical characteristics of a microemulsion system, such as slight viscosity, transparency, and stability. In the diagram, this formulation is found near the borderline of o/w and bicontinuous microemulsions, which may indicate a transitional phase structure. In addition, the ratio of system components favors the formation of oil droplets surrounded by water, suitable for biological applications.

3.4. Electrical Conductivity. Electrical conductivity is commonly used to characterize the microstructure transitions that occur in microemulsions, that is, transformation from water-entrapped systems to intermediate structures and then to water continuous microstructures. Conductivity is low for reverse structures in nonconducting oil media that have little interactions with each other. When more water is added to the system, the conductive droplets begin to contact one another and form other structures, resulting in increased

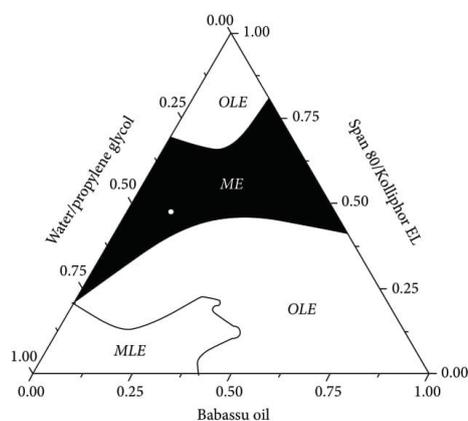


FIGURE 3: Pseudo-ternary phase diagram (8:2) of the babassu oil microemulsion. The black region includes the microemulsion systems (ME) and the selected formulation (white dot). OLE, opaque liquid emulsions; MLE, milk liquid emulsions.

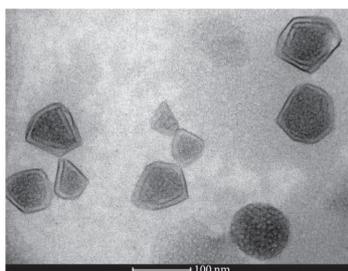


FIGURE 4: The ultrastructure of the babassu microemulsion that shows clusters of nanodroplets filled with oil, some of which have merged with one another and are surrounded by the surfactant interface and aqueous phase.

EC [60]. This phenomenon may have occurred in the babassu microemulsion because its conductivity value was $20.96 \mu\text{S}/\text{cm}$.

3.5. Morphological Analysis. The ultrastructure of the babassu microemulsion was investigated using transmission electron microscopy (Figure 4). We observed clusters of nanodroplets filled with oil that were surrounded by an electron dense material composed of the surfactant interface bonded to the aqueous phase. Most of the oil droplets were connected side by side, but some of them were merging, indicating a transition to an *o/w* microemulsion. In addition, thick peripheral layers surrounding the nanodroplet network were sometimes observed, which could be related to displacement of the water and emulsifiers from the inner phase during system transformation.

The microemulsion composition and individual characteristics of components define the phase morphology of the system. As the concentration of water increases, the droplets increase in size and eventually form a cluster that is considered infinite. At this stage, the microemulsion possesses a bicontinuous structure. Further addition of the water phase transforms the bicontinuous system into an *o/w* microemulsion, where the droplets of the organic phase are surrounded by the water bath, and the interface is composed of surfactant species. During each of these transition steps, morphological phases in intermediate regions may be formed, and the stability of the system depends on thermodynamic conditions [60–62].

3.6. SAXS Measurements. SAXS is a well-established technique used to investigate the morphology, shape, and size of a multiphase sample, namely, aggregates dispersed in liquids, to obtain structural information regarding inhomogeneities based on the difference of electron density in the samples. This technique provides them with a characteristic length on the order of tens to hundreds of Angstroms (\AA) [63, 64].

Figure 5(a) shows the experimental data simulated according to (3) (see SM). The proposed model fits the experimental data, which present droplets sizes from 5 to 15 nm with the majority size of approximately 8.7 nm.

The scattering length density difference between the shell and matrix ($\Delta\rho$) for the microemulsion was $8.5 \pm 0.03 \text{ nm}^{-3}$, and the ν value was 0.4 ± 0.01 . The SAXS results showed that the structure had a thin transition layer between the oil and aqueous phases. In this case, the surfactant hydrophobic chains interacted with babassu oil, which was observed as a small transition region that surrounded the oil droplets in the TEM micrograph (see Figure 4). $S(q)$ is the Fourier transform of the pair correlation function, which in turn depends on the pair potential between micelles. However, the Percus-Yevick approximation provides an analytical expression for $S(q)$ for monodisperse particles acting as hard spheres [65]. The structure factor was estimated using the monodisperse approach. This method only multiplies the size averaged form factor with the structure factor. The interaction potentials between the particles are assumed to be spherical, symmetric, and independent of the particle size [66, 67]. Figure 5(b) shows the average structure factor for the microemulsion sample. The peak at approximately $q \sim 0.25 \text{ nm}^{-1}$ in the $S(q)$ curve indicates the correlation distance between the oil droplets. Besides, the other peaks at around $q \sim 0.50$ and 0.78 nm^{-1} show that the average interaction potential distance between the oil droplets was approximately $12 \pm 0.01 \text{ nm}$.

3.7. DSC Analysis. The thermal behaviors of water in the microemulsion system were investigated by DSC and compared with that of pure water (Figure 6). Initially, the samples were cooled to -50°C and then heated to 60°C at a rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$. The thermal transition for the propylene glycol sample was not observed in the temperature range. Pure water showed an endothermic transition near 0°C and enthalpy of fusion of approximately 330 J/g [68]. Pure babassu

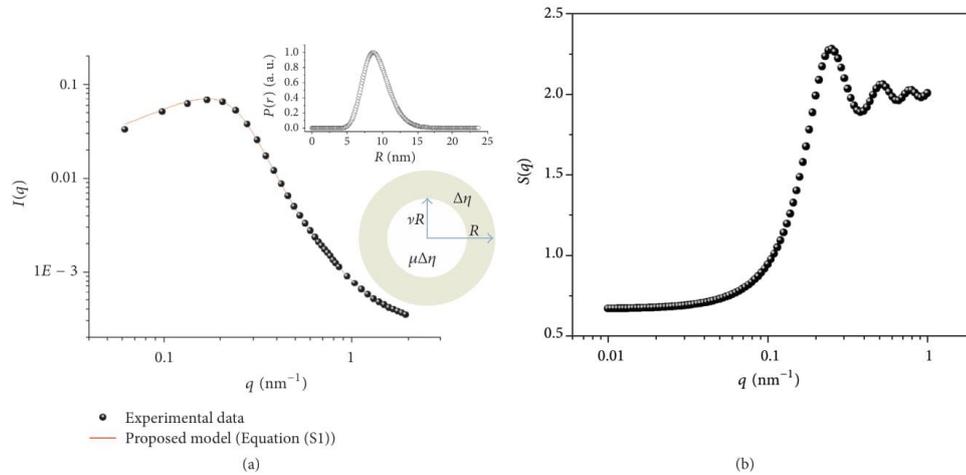


FIGURE 5: (a) Scattering intensity I of the SAXS measurements as a function of the scattering vector q for the babassu oil microemulsion. The solid line is the fit according to supplementary file procedure (Equation (S1)). The spherical shell had an average outer radius of $R = 8.7$ nm and inner radius of $\nu R = 3.48 \pm 0.02$ nm. The normalized size distribution $P(R)$ as a function of the overall radius (R) is also shown. (b) Structure factor $S(q)$ for a hard sphere interaction potential of the babassu microemulsion with an average correlation distance (R_{HS}) of 12 ± 0.01 nm and a volume fraction of 0.14 ± 0.001 .

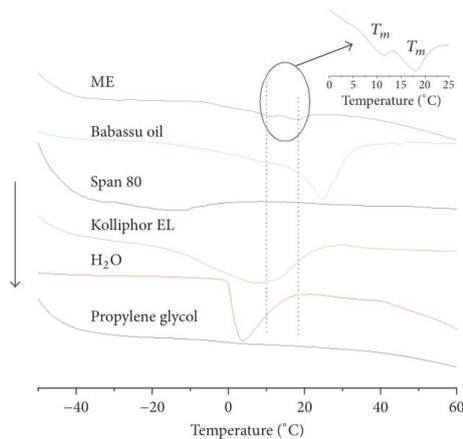


FIGURE 6: DSC thermographs for the babassu microemulsion, showing a broad endothermic melt transition in two temperature regions (inset).

oil showed two endothermic peaks at 7 and 25°C that were related to the melting temperatures of fatty acid components [69]. The multiple peaks that were observed for the oil sample are due to the polymorphism of different fatty acid. Most vegetable oils can be found in at least three crystalline forms, designated as α , β' , and β [70, 71]. The enthalpy of fusion

of pure oil is approximately 100 ± 0.02 J/g, whereas the microemulsion sample showed a broad endothermic melt (fusion) transition in two temperature regions at 11 and 18°C (Figure 6, inset). It is essential to note that the presence of a nearby surface alters the thermodynamic properties, such as freezing point, melting point, and enthalpy [72, 73]. The endothermic transition was not observed at the same position as pure water. This effect is related to the partial miscibility of the surfactants and propylene glycol with water [74]. The literature has shown that the melting temperature deviation in relation to pure water depends on the nature of the interaction between the surfactant and water [72, 73, 75]. When the surfactant concentration is low, the transition of pure water is observed at approximately 0°C. Therefore, when we are dealing with systems in which the interactions depend on the concentrations, the surfactant properties can strongly contribute to the melting temperature and fusion enthalpy. For this reason, the microemulsion enthalpy decreased by 9.5 ± 0.2 J/g when compared with water and pure oil.

The presence of two melting peaks is a characteristic behavior of a bicontinuous microemulsion in situations where the oil phase is composed of a single fatty acid [60, 76–78]. However, when the oil phase consists of a triglyceride molecule, which is composed of various fatty acids, this behavior depends on the interactions of each fatty acid with the surfactants species. The first peak in the DSC thermogram of the microemulsion ($\sim 11^\circ\text{C}$) is related to the amount of free water. The second peak ($\sim 18^\circ\text{C}$) refers to the fusion of the oil phase in microemulsion. This thermal transition is shifted to lower temperatures because the fatty acids interact with the surfactant through the nonpolar head.

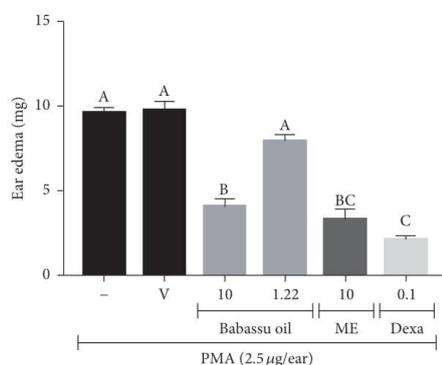


FIGURE 7: Topical anti-inflammatory activity of babassu oil and microemulsion in PMA-induced ear edema. Results are expressed as the mean \pm SEM and analyzed by ANOVA followed by Tukey's test with p set at 0.05. Different letters show statistical differences between groups ($p < 0.05$). (-) Negative control (acetone); (V) microemulsion vehicle (48.8% surfactants, 39% aqueous phase, and 12.2% water); babassu oil ($\mu\text{L}/\text{ear}$); (ME) babassu microemulsion ($\mu\text{L}/\text{ear}$); and (Dexa) dexamethasone (mg/ear).

3.8. Rheological Behavior of the System. The rheological behavior of the babassu microemulsion is demonstrated in SM (Figure S5). The shear stress is proportional to increased shear rate, which is characteristic of Newtonian behavior. The profile of shear stress versus shear rate for Newtonian liquids yields a straight line, which is the expected behavior of microemulsions [79–81]. The average viscosity value for the babassu microemulsion was approximately 0.29 ± 0.1 Pas.

3.9. Topical Anti-Inflammatory Activity of Babassu Microemulsion. The topical anti-inflammatory activity of the babassu microemulsion compared with pure babassu oil is shown in Figure 7. Pure babassu oil and 12.2% babassu oil diluted in acetone inhibited the PMA-induced ear edema by 58.0% ($p < 0.001$) and 17.5% (not significant), respectively. The babassu microemulsion inhibited ear edema by 66.2% ($p < 0.001$), showing an enhanced activity promoted by the microemulsification of babassu oil, since babassu oil at 12.2% (final concentration in the microemulsion) did not have a significant effect on this experimental model. Dexamethasone (0.1 mg/ear) inhibited PMA-induced ear edema by 78.4% ($p < 0.001$).

Skin permeation enhancement by microemulsions has been widely studied for several anti-inflammatory drugs, for example, indomethacin, aspirin, and rofecoxib [82–84]. Microemulsification of babassu oil seems to enhance skin permeation of anti-inflammatory active compounds found in the oil, reaching the same percentages of edema inhibition as pure babassu oil with a much lower oil concentration.

4. Conclusions

In this work, we determined the chemical composition of the main fatty acids of babassu oil using GC-MS and the results

were confirmed by ^1H and ^{13}C NMR spectra. Moreover, ^{13}C NMR provided additional information, showing that triacylglycerol was the only positional fatty acid isomer in the glycerol backbone.

Babassu oil and lauric showed topical anti-inflammatory activity in different phlogistic agents-induced ear edema in mice, probably due to inhibition of AA metabolism and prostaglandin biosynthesis and/or action, release of histamine and serotonin, and inhibition of preformed cytokine release.

The developed babassu nanosystem was characterized as a phase transition microemulsion, which can be considered similarly bicontinuous as an o/w phase in contrast with classical microemulsion systems. Addition of more aqueous phase should form a well-defined o/w microemulsion.

The babassu oil microemulsion obtained here displayed advantages due to the combined features of bicontinuous and o/w microemulsions, including very low interfacial tension, high fluctuating interface, and high solubilizing properties. This system may have the ability to incorporate hydrophilic and/or lipophilic drugs that could be released faster than globular microemulsions with superior stability against the aqueous biological environment.

Topical anti-inflammatory activity of babassu oil was enhanced by microemulsification, reaching the same ear edema inhibition as pure babassu oil at a much lower concentration. This synthesized nanocarrier represents a new promising strategy for diseases treatment because babassu oil contains fatty acids with important biological properties, such as antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, and antimicrobial.

Abbreviations

AA:	Arachidonic acid
BA:	Babassu oil
COX:	Cyclooxygenase
DAG:	Diacylglycerols
Dexa:	Dexamethasone
DLS:	Dynamic light scattering
DSC:	Differential scanning calorimetry
EC:	Electrical conductivity
EPP:	Ethyl phenylpropionate
GC-MS:	Gas chromatography-mass spectrometry
HLB:	Hydrophilic-lipophilic balance
IL:	Interleukin
Indo:	Indomethacin
LA:	Lauric acid
LNLS:	Brazilian synchrotron light laboratory
MAG:	Monoacylglycerols
ME:	Microemulsion
NMR:	Nuclear magnetic resonance
O/W:	Oil-in-water
PG:	Prostaglandin
PLA2:	Phospholipase A2
PMA:	Phorbol 12-myristate 13-acetate
ROS:	Reactive oxygen species
SAXS:	Small-angle X-ray scattering
TAG:	Triacylglycerols

TEM: Transmission electron microscopy
 TMS: Tetramethylsilane
 TNF: Tumor necrosis factor
 W/O: Water-in-oil.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Authors' Contributions

Mysrayn Y. F. A. Reis, Simone M. dos Santos, Rafael M. Ximenes, Giovanna Machado, and Karina L. A. Saraiva designed the research. Mysrayn Y. F. A. Reis, Simone M. dos Santos, Danielle R. Silva, Márcia V. Silva, Maria Tereza S. Correia, Daniela M. A. Ferraz Navarro, Geanne K. N. Santos, Fernando Hallwass, Otávio Bianchi, Alexandre G. Silva, Janaína V. Melo, and Alessandra B. Mattos performed the research. Mysrayn Y. F. A. Reis, Simone M. dos Santos, Daniela M. A. Ferraz Navarro, Fernando Hallwass, Otávio Bianchi, Rafael M. Ximenes, Giovanna Machado, and Karina L. A. Saraiva analyzed the data. Mysrayn Y. F. A. Reis, Simone M. dos Santos, Rafael M. Ximenes, Giovanna Machado, and Karina L. A. Saraiva wrote the manuscript. All authors reviewed and edited the manuscript. Mysrayn Y. F. A. Reis and Simone M. dos Santos contributed equally to this work. Rafael M. Ximenes, Giovanna Machado, and Karina L. A. Saraiva also contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work was supported by FACEPE (Grant no. APQ-1067-4.03/15), CAPES, and CNPq. Maria Tereza S. Correia, Daniela M. A. Ferraz Navarro, Otávio Bianchi, and Giovanna Machado are grateful for CNPq Productivity Research Fellowships. The authors also thank the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) for the use of scientific installations (SAXS1 beamline).

Supplementary Materials

As supplementary material one can find the GC-MS chromatogram and also H1 and C13 MNR spectra of babassu oil. Data regarding droplet size distribution, shear stress, and stability studies can also be found. SAXS equations used in the measurement of babassu microemulsion are described in detail in this file. Fig. S1: droplet size and turbidity as a function of HLB. The values from 8 to 10 showed the smallest droplet size and the highest turbidity, which is indicative of more stable emulsions. Fig. S2: GC-MS chromatogram of the babassu oil fatty acids. Fig. S3: ¹H NMR spectrum of the babassu oil sample in CDCl₃. Fig. S4: ¹³C NMR spectrum of the babassu oil sample in CDCl₃. Fig. S5: microemulsion rheological curve showing Newtonian behavior. Table S1: centrifugation study to investigate the stability of Babassu microemulsion. Table S2: heating stress applied to babassu microemulsion to check stability in the temperature range 40–80°C. Table S3: heating-cooling cycles

to check the effect of temperature variations on the stability of babassu microemulsion. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] G. M. A. de Almeida, M. A. Ramos, E. L. Araújo, C. Baldauf, and U. P. Albuquerque, "Human perceptions of landscape change: The case of a monodominant forest of *Attalea speciosa* Mart ex. Spreng (Northeast Brazil)," *AMBIO*, vol. 45, no. 4, pp. 458–467, 2016.
- [2] N. Porro, I. Veiga, and D. Mota, "Traditional communities in the Brazilian Amazon and the emergence of new political identities: The struggle of the quebradeiras de coco babaçu-babassu breaker women," *Journal of Cultural Geography*, vol. 28, no. 1, pp. 123–146, 2011.
- [3] M. H. S. L. Souza, C. A. Monteiro, P. M. S. Figueredo, F. R. F. Nascimento, and R. N. M. Guerra, "Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, no. 1, pp. 1–5, 2011.
- [4] F. R. Araújo, S. E. González-Pérez, M. A. Lopes, and I. D. J. M. Viégas, "Ethnobotany of babassu palm (*Attalea speciosa* Mart.) in the Tucuruí Lake Protected Areas Mosaic - Eastern Amazon," *Acta Botanica Brasilica*, vol. 30, no. 2, pp. 193–204, 2016.
- [5] J. L. Almeida Campos, T. L. L. da Silva, U. P. Albuquerque, N. Peroni, and E. Lima Araújo, "Knowledge, Use, and Management of the Babassu Palm (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) in the Araripe Region (Northeastern Brazil)," *Economic Botany*, vol. 69, no. 3, pp. 240–250, 2015.
- [6] W. Mors, C. T. Rizzini, and N. A. Pereira, *Medicinal Plants of Brazil*, Mich, USA, 1st edition, 2000.
- [7] I. G. C. Bieski, M. Leonti, J. T. Arnason et al., "Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 173, pp. 383–423, 2015.
- [8] E. A. Miles, P. Zoubouli, and P. C. Calder, "Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures," *Nutrition Journal*, vol. 21, no. 3, pp. 389–394, 2005.
- [9] S. Cicerale, L. J. Lucas, and R. S. J. Keast, "Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2, pp. 129–135, 2012.
- [10] S.-J. Wu, P.-L. Liu, and L.-T. Ng, "Tocotrienol-rich fraction of palm oil exhibits anti-inflammatory property by suppressing the expression of inflammatory mediators in human monocytic cells," *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 52, no. 8, pp. 921–929, 2008.
- [11] S. Intahphuak, P. Khonsung, and A. Panthong, "Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil," *Pharmaceutical Biology*, vol. 48, no. 2, pp. 151–157, 2010.
- [12] V. P. de Sousa, J. Crean, V. R. D. A. Borges et al., "Nanostructured systems containing babassu (*Orbignya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3129–3139, 2013.
- [13] R. S. Pessoa, E. L. França, E. B. Ribeiro et al., "Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function," *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 9, pp. 21–31, 2014.

- [14] M. J. Lawrence and G. D. Rees, "Microemulsion-based media as novel drug delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 175–193, 2012.
- [15] M. Fanun, "Microemulsions as delivery systems," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 17, no. 5, pp. 306–313, 2012.
- [16] W. Naoui, M.-A. Bolzinger, B. Fenet et al., "Microemulsion microstructure influences the skin delivery of a hydrophilic drug," *Pharmaceutical Research*, vol. 28, no. 7, pp. 1683–1695, 2011.
- [17] F. H. Xavier-Junior, C. Vauthier, A. R. V. Morais, E. N. Alencar, and E. S. T. Egitto, "Microemulsion systems containing bioactive natural oils: an overview on the state of the art," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 43, no. 5, pp. 700–714, 2017.
- [18] F. Mezni, A. Maaroufi, M. Msallem, and et al., "Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of Pistacia lentiscus L. fruit oils," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6, no. 39, pp. 5266–5271, 2012.
- [19] American Oil Chemists' Society, *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists*, A.O.C.S., Champaign, Ill, USA, 4th edition, 1990.
- [20] L. D. Metcalfe, J. R. Pelka, and A. A. Schmitz, "Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis," *Analytical Chemistry*, vol. 38, no. 3, pp. 514–515, 1966.
- [21] M. C. Milinsk, M. Matsushita, J. V. Visentainer, C. C. De Oliveira, and N. E. De Souza, "Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME)," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 19, no. 8, pp. 1475–1483, 2008.
- [22] A. Tubaro, P. Dri, G. Delbello, C. Zilli, and R. D. Loggia, "The Croton oil ear test revisited," *Agents and Actions Supplements*, vol. 17, no. 3–4, pp. 347–349, 1986.
- [23] R. P. Carlson, L. O'Neill-Davis, J. Chang, and A. J. Lewis, "Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents," *Agents and Actions Supplements*, vol. 17, no. 2, pp. 197–204, 1985.
- [24] R. Brattsand, A. Thalén, K. Roempke, L. Källström, and E. Gruvstad, "Influence of 16 α ,17 α -acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 16, no. 6, pp. 779–786, 1982.
- [25] M. Gábor and Z. Rázga, "Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin," *Agents and Actions Supplements*, vol. 36, no. 1–2, pp. 83–86, 1992.
- [26] W. C. Griffin, "Classification of Surface Active Agents by HLB," *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, vol. 1, no. 5, pp. 311–326, 1949.
- [27] L. O. Orafiyidiya and F. A. Oladimeji, "Determination of the required HLB values of some essential oils," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 237, no. 1–2, pp. 241–249, 2002.
- [28] E. S. Mahdi, M. H. Sakeena, M. F. Abdulkarim, G. Z. Abdullah, M. A. Sattar, and A. M. Noor, "Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters," *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 5, pp. 311–323, 2011.
- [29] R. A. Ferrari and M. P. Soler, "Obtention and characterization of coconut babassu derivatives," *Scientia Agricola*, vol. 72, no. 4, pp. 291–296, 2015.
- [30] F. L. Jackson and H. E. Longenecker, "The fatty acids and glycerides of babassu oil," *Oil & Soap*, vol. 21, no. 3, pp. 73–75, 1944.
- [31] B. S. Ferreira, L. P. Faza, and M. Le Hyaric, "A comparison of the physicochemical properties and fatty acid composition of indaiá (*Attalea dubia*) and Babassu (*Orbignya phalerata*) oils," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 532374, 4 pages, 2012.
- [32] A. Barison, C. W. P. da Silva, F. R. Campos, F. Simonelli, C. A. Lenz, and A. G. Ferreira, "A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy," *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 48, no. 8, pp. 642–650, 2010.
- [33] F. D. Gunstone, *Advances in Lipid Methodology*, Oily Press, Dundee, Scotland, 2nd edition, 1993.
- [34] G. Knothe and J. A. Kenar, "Determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 106, no. 2, pp. 88–96, 2004.
- [35] A. Rosa, A. Rescigno, A. Piras et al., "Chemical composition and effect on intestinal Caco-2 cell viability and lipid profile of fixed oil from *Cynomorium coccineum* L.," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 10, pp. 3799–3807, 2012.
- [36] R. Sacchi, F. Addeo, I. Giudicianni et al., "Analysis of the positional distribution of fatty acids in olive oil triacylglycerols by high resolution ¹³C-NMR of the carnonyl region," *Italian Journal of Food Science*, vol. 4, pp. 117–123, 1992.
- [37] R. Medeiros, M. F. Otuki, M. C. W. Avellar, and J. B. Calixto, "Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyryn in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate," *European Journal of Pharmacology*, vol. 559, no. 2–3, pp. 227–235, 2007.
- [38] M. Murakawa, K. Yamaoka, Y. Tanaka, and Y. Fukuda, "Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice," *Biochemical Pharmacology*, vol. 71, no. 9, pp. 1331–1336, 2006.
- [39] Y. H. Shin, S.-H. Yoon, E.-Y. Choe et al., "PMA-induced up-regulation of MMP-9 is regulated by a PKCa-NF- κ B cascade in human lung epithelial cells," *Experimental Molecular Medicine*, vol. 39, no. 1, pp. 97–105, 2007.
- [40] I. A. B. S. Alves, S. M. Santos, R. F. V. Mendes et al., "Chemical composition, antioxidant and topical anti-inflammatory activities of Croton cordifolius Baill. (Euphorbiaceae)," *Journal of Medicinal Plant Research*, vol. 11, no. 2, pp. 22–33, 2017.
- [41] E. E. Bralley, P. Greenspan, J. L. Hargrove, L. Wicker, and D. K. Hartle, "Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation," *Journal of Inflammation*, vol. 5, article 1, 2008.
- [42] T. S. Rao, J. L. Currie, A. F. Shaffer, and P. C. Isakson, "Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation," *Inflammation*, vol. 17, no. 6, pp. 723–741, 1993.
- [43] C. L. Fischer, D. R. Blanchette, K. A. Brogden et al., "The roles of cutaneous lipids in host defense," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1841, no. 3, pp. 319–322, 2014.
- [44] T. Nakatsuji, M. C. Kao, J.-Y. Fang et al., "Antimicrobial property of lauric acid against propionibacterium acnes: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 129, no. 10, pp. 2480–2488, 2009.
- [45] D. Yang, D. Pornpattananangkul, T. Nakatsuji et al., "The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against Propionibacterium acnes," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 6035–6040, 2009.

- [46] W.-C. Huang, T.-H. Tsai, L.-T. Chuang, Y.-Y. Li, C. C. Zouboulis, and P.-J. Tsai, "Anti-bacterial and anti-inflammatory properties of capric acid against *Propionibacterium acnes*: A comparative study with lauric acid," *Journal of Dermatological Science*, vol. 73, no. 3, pp. 232–240, 2014.
- [47] T. Kezutyte, N. Desbenoit, A. Brunelle, and V. Briedis, "Studying the penetration of fatty acids into human skin by ex vivo TOF-SIMS imaging," *Biointerphases*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, 2013.
- [48] A. Crumme, G. P. Harper, E. A. Boyle, and F. R. Mangan, "Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds," *Agents and Actions Supplements*, vol. 20, no. 1-2, pp. 69–76, 1987.
- [49] E. E. Opas, R. J. Bonney, and J. L. Humes, "Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 84, no. 4, pp. 253–256, 1985.
- [50] J. L. Humes, E. E. Opas, M. Galavage, D. Soderman, and R. J. Bonney, "Regulation of macrophage eicosanoid production by hydroperoxy- and hydroxy-eicosatetraenoic acids," *Biochemical Journal*, vol. 233, no. 1, pp. 199–206, 1986.
- [51] G. E. Henry, R. A. Momin, M. G. Nair, and D. L. Dewitt, "Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 8, pp. 2231–2234, 2002.
- [52] M. D. C. L. Barbosa, E. Bouskela, F. Z. Cyrino et al., "Effects of babassu nut oil on ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion and macromolecular leakage in the microcirculation: Observation in the hamster cheek pouch," *Lipids in Health and Disease*, vol. 11, article no. 158, 2012.
- [53] E. Patrick, A. Burkhalter, and H. I. Maibach, "Recent Investigations of Mechanisms of Chemically Induced Skin Irritation in Laboratory Mice," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 88, no. s3, pp. 24s–31s, 1987.
- [54] H. Lim, H. Park, and H. P. Kim, "Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin," *Archives of Pharmacological Research*, vol. 27, no. 4, pp. 442–448, 2004.
- [55] A. R. Murray, E. Kisin, V. Castranova, C. Kommineni, M. R. Gunther, and A. A. Shvedova, "Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: Evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 20, no. 12, pp. 1769–1777, 2007.
- [56] J. L. Wilmer, F. G. Burleson, F. Kayama, J. Kanno, and M. I. Luster, "Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 102, no. 6, pp. 915–922, 1994.
- [57] M. Gábor, *Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications*, Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, 2000.
- [58] B. Zegarska, A. Lelińska, and T. Tyrakowski, "Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation," *Pharmacological Reports*, vol. 58, no. 1, pp. 13–21, 2006.
- [59] P. Szumala, "Structure of Microemulsion Formulated with Monoacylglycerols in the Presence of Polyols and Ethanol," *Journal of Surfactants and Detergents*, vol. 18, no. 1, pp. 97–106, 2015.
- [60] A. Kogan, D. E. Shalev, U. Raviv, A. Aserin, and N. Garti, "Formation and characterization of ordered bicontinuous microemulsions," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, no. 31, pp. 10669–10678, 2009.
- [61] A. E. Giannakas, T. C. Vaimakis, A. K. Ladavos, P. N. Trikalitis, and P. J. Pomonis, "Variation of surface properties and textural features of spinel ZnAl₂O₄ and perovskite LaMnO₃ nanoparticles prepared via CTAB-butanol-octane-nitrate salt microemulsions in the reverse and bicontinuous states," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 259, no. 2, pp. 244–253, 2003.
- [62] D. G. Hayes, J. A. Gomez Del Rio, R. Ye, V. S. Urban, S. V. Pingali, and H. M. O'Neill, "Effect of protein incorporation on the nanostructure of the bicontinuous microemulsion phase of Winsor-III systems: A small-angle neutron scattering study," *Langmuir*, vol. 31, no. 6, pp. 1901–1910, 2015.
- [63] O. Bianchi, L. G. Barbosa, G. MacHado, L. B. Canto, R. S. Mauler, and R. V. B. Oliveira, "Reactive melt blending of PS-POSS hybrid nanocomposites," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 128, no. 1, pp. 811–827, 2013.
- [64] A. A. R. Mota, C. C. Gatto, G. Machado et al., "Structural organization and supramolecular interactions of the task-specific ionic liquid 1-methyl-3-carboxymethylimidazolium chloride: Solid, solution, and gas phase structures," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 118, no. 31, pp. 17878–17889, 2014.
- [65] J. K. Percus and G. J. Yevick, "Analysis of Classical Statistical Mechanics by Means of Collective Coordinates," *Physical Review A: Atomic, Molecular and Optical Physics*, vol. 110, no. 1, pp. 1–13, 1958.
- [66] O. Glatter and O. Kratky, *Small Angle X-Ray Scattering*, first., Ed., Academic Press Inc., London, UK, 1982.
- [67] D. I. Svergun, *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*, Plenum Press, New York, NY, USA, 1st edition, 1987.
- [68] P. Atkins and J. Paula, *Elements of Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, UK, 6th edition, 2012.
- [69] R. T. Nassu and L. A. G. Gonçalves, "Determination of melting point of vegetable oils and fats by differential scanning calorimetry (DSC) technique," *Grasas y Aceites*, vol. 50, no. 1, pp. 16–22, 1999.
- [70] R. D. O'Brien, *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA, 3rd edition, 2008.
- [71] T. Wang and J. L. Briggs, "Rheological and thermal properties of soybean oils with modified FA compositions," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 79, no. 8, pp. 831–836, 2002.
- [72] N. Garti, A. Aserin, I. Tiunova, and M. Fanun, "A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 170, no. 1, pp. 1–18, 2000.
- [73] F. Podlogar, M. Gašperlin, M. Tomšič, A. Jamnik, and M. B. Rogač, "Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 276, no. 1-2, pp. 115–128, 2004.
- [74] F. Sardari and A. Jouyban, "Solubility of nifedipine in ethanol + water and propylene glycol + water mixtures at 293.2 to 313.2 K," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 52, no. 40, pp. 14353–14358, 2013.
- [75] P. Boonme, K. Krauel, A. Graf, T. Rades, and V. B. Junyaprasert, "Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol," *AAPS PharmSciTech*, vol. 7, no. 2, article E45, pp. 1–6, 2006.
- [76] S. Fisher, E. J. Wachtel, A. Aserin, and N. Garti, "Solubilization of simvastatin and phytosterols in a dilutable microemulsion system," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 107, pp. 35–42, 2013.

- [77] R. M. Hathout, T. J. Woodman, S. Mansour, N. D. Mortada, A. S. Geneidi, and R. H. Guy, "Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 40, no. 3, pp. 188–196, 2010.
- [78] C. Note, J. Koetz, and S. Kosmella, "Structural changes in poly(ethyleneimine) modified microemulsion," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 302, no. 2, pp. 662–668, 2006.
- [79] H. A. Barnes, J. F. Hutton, and K. Walters, *An Introduction to Rheology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, 1st edition, 1989.
- [80] C. W. Macosko, *Rheology: principles, measurements, and applications*, Wiley-VCH, New York, NY, USA, 1st edition, 1994.
- [81] A. Mouri, O. Diat, A. El Ghzaoui et al., "Phase behavior of reverse microemulsions based on Peceol®," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 416, pp. 139–146, 2014.
- [82] N. Barakat, E. Fouad, and A. Elmedany, "Enhancement of skin permeation and anti-inflammatory effect of indomethacin using microemulsion," *Asian Journal of Pharmaceutics*, vol. 5, no. 3, pp. 141–149, 2011.
- [83] K. G. H. Desai, "Enhanced skin permeation of rofecoxib using topical microemulsion gel," *Drug Development Research*, vol. 63, no. 1, pp. 33–40, 2004.
- [84] B. Subramanian, F. Kuo, E. Ada et al., "Enhancement of anti-inflammatory property of aspirin in mice by a nano-emulsion preparation," *International Immunopharmacology*, vol. 8, no. 11, pp. 1533–1539, 2008.