



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ETHANIELDA DE LIMA COELHO

**NANOEMULSÕES À BASE DE CURCUMINOIDES E ÁCIDO OLEICO PARA
USO TÓPICO NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS**

FORTALEZA

2018

ETHANIELDA DE LIMA COELHO

NANOEMULSÕES À BASE DE CURCUMINOIDES E ÁCIDO OLEICO PARA
USO TÓPICO NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do Título de Doutora em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C615n Coelho, Ethanielda de Lima.
Nanoemulsões a base de curcuminoides e ácido oleico para uso tópico no tratamento de lesões cutâneas /
Ethanielda de Lima Coelho. – 2018.
111 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em
Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.
Coorientação: Prof. Dr. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.
1. Curcuminoides. 2. Ácido oleico. 3. Pluronic F127. 4. Lesões cutâneas. I. Título.

CDD 540

ETHANIELDA DE LIMA COELHO

NANOEMULSÕES À BASE DE CURCUMINOIDES E ÁCIDO OLEICO PARA
USO TÓPICO NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Sandra de Aguiar Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Célio Feitosa de França
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^a. Dr^a. Livia Paulia Dias Ribeiro
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof^a. Dr^a. Sâmeque do Nascimento Oliveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN)

A Deus.

A minha mãe, Aldeci, aos meus avós,
Albertina e Manoel (*in memoriam*) e ao
meu esposo Davi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me fez chegar tão longe, onde nunca achei que fosse capaz. Por ter me guiado quando não tive mais forças e por me amar incondicionalmente.

A toda a minha família, principalmente minha mãe, que sempre me incentivou e sonhou por mim, dizendo sempre: - Eu quero uma filha Doutora!

Ao meu amado esposo que me apóia, ajuda e incentiva sempre. Davi, sem você ao meu lado eu não teria conseguido, obrigada por fazer parte da minha vida, eu te amo muito.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, por quanto me ensinaram e me fizeram sorrir nos calorosos dias de trabalho: Carol Moura, Deyse, Luana, Raquel, Carol Barbosa, Arcelina, Kelly, Flávia, Tathilene, Eduardo, Lilian, Débora, David, Alessandro, Denise, Karen, Thays Nara, Ruth, Camila, Katarina, Jailson e Sarah. Em especial agradeço ao Rafael, Aieria, Celiane e prof. Célio, pelas inúmeras contribuições e amizade.

A professora Nágila, por todo apoio, confiança, amizade e incentivo. Cheguei até aqui porque acreditei em mim. Sou muito grata professora, muito, muito obrigada!

A professora Elenir, por todo apoio, confiança, amizade e incentivo. Obrigada pela paciência, compreensão e carinho. Muito, muito obrigada!

A professora Sandra pelas contribuições e atenção.

Ao Orlando pelo sempre pronto atendimento e principalmente pelos sorrisos diários e a Célia, pela atenção e paciência.

“Naquela hora, Jesus, exultando no Espírito Santo, disse: "Eu te louvo, Pai, Senhor do céu e da terra, porque escondeste estas coisas dos sábios e cultos e as revelaste aos pequeninos.”
(Lucas 10: 21-24)

RESUMO

Os curcuminoides têm atraído o interesse dos cientistas porque exibem várias atividades farmacológicas, incluindo antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antimutagênicas, anticoagulantes, anti-infecciosas e antibacterianas. Porém, para que estes princípios ativos possam ser utilizados em produtos farmacêuticos é necessário associá-los a excipientes que potencializem sua ação, aumentando sua solubilidade e biodisponibilidade. O objetivo deste estudo é encapsular os curcuminoides em nanoemulsões, contendo ácido oleico como fase oleosa e Pluronic F127 como estabilizante, com o objetivo de utilizar esta formulação no tratamento de lesões cutâneas. Estudos de compatibilidade e estabilidade preliminar foram realizados para verificar a viabilidade da formulação proposta. Os resultados obtidos no estudo de compatibilidade, utilizando as técnicas de FTIR, TG (DTG) e HPLC, são comparáveis e conclusivos quanto a não existência de interação física ou química na mistura (1:1:1) dos princípios ativos e seus excipientes. O estudo de estabilidade caracterizou as nanoemulsões como estáveis, com pH ácido e indicativo de prazo de validade provisório de 12 meses. Através do planejamento factorial realizado, tendo o diâmetro hidrodinâmico (D_h) e potencial zeta como variáveis resposta, as nanoemulsões mais estáveis foram selecionadas, E3, E6 e E9 (contendo aproximadamente 5 % de Pluronic® F127 em cada e 5, 10 e 15 % de ácido oleico, respectivamente.). Seus valores de D_h encontram-se na faixa de 198-265 nm e potencial zeta entre -30,4 e -34,8 mV. Os dados de índice de polidispersão (0,150-0,226) caracterizaram as nanoemulsões com distribuição do tamanho de partícula moderadamente polidispersa. As nanoemulsões mais estáveis indicaram, nas análises reológicas, que não se comportam como gel, sendo caracterizadas como fluidos não newtonianos e classificadas como plásticos de Bingham. As emulsões E3, E6 e E9 obtiveram Eficiência de Encapsulação (EE) acima de 99 % e no estudo de liberação *in vitro* apresentaram até 13,7 % de liberação dos curcuminóides em até 24 horas, com perfil de liberação controlada. As nanoemulsões selecionadas apresentaram, no ensaio antioxidante pela captura do radical livre DPPH, valores de IC_{50} ($\approx 0,3$ mg/mL) bem próximos ao padrão utilizado, BHT (0,29 mg/mL), indicando que as nanoemulsões propostas apresentaram resultados satisfatórios e que devem agir nas lesões por pressão como fontes contínuas de antioxidante e antiinflamatório.

Palavras-chave: Curcuminoides. ácido oleico. Pluronic F127. Nanoemulsão. lesões cutâneas.

ABSTRACT

Curcuminoids have attracted the interest of scientists because they exhibit various pharmacological activities, including antioxidants, anticancer, anti-inflammatory, antimutagenic, anticoagulant, anti-infectious and antibacterial. However, for these active ingredients to be used in pharmaceuticals, it is necessary to associate them with excipients that potentiate their action, increasing their solubility and bioavailability. The objective of this study is to encapsulate the curcuminoids in nanoemulsions, containing oleic acid as oily phase and Pluronic[®] F127 as stabilizer, in order to use this formulation in the treatment of Pressure Injury. Compatibility and preliminary stability studies were performed to verify the feasibility of the proposed formulation. The results obtained in the compatibility study, using the techniques of FTIR, TG (DTG) and HPLC, are comparable and conclusive as to absence of physical or chemical interaction in the mixture (1:1:1) of the active principles and their excipients. The stability study characterized the nanoemulsions as stable, with acidic pH and indicative of the expiration date of 12 months. Through the factorial planning performed, having the hydrodynamic diameter (D_h) and zeta potential as response variables, the most stable nanoemulsions were selected, E3, E6 and E9. Their D_h values are in the range of 198-265 nm and zeta potential between -30.4 and -34.8 mV. The polydispersity index data (0.150-0.226) characterized the nanoemulsions with moderately polydisperse particle size distribution. The most stable nanoemulsions indicated in the rheological analyzes that they do not behave as a gel and are characterized as non-Newtonian fluids and classified as Bingham plastics. The Emulsions E3, E6 and E9 obtained Encapsulation Efficiency (EE) above the 99% and in the in vitro release study showed up to 13.7% release of the curcuminoids within 24 hours, with a controlled release profile. The selected nanoemulsions presented values of IC_{50} (≈ 0.3 mg/mL), in the antioxidant assay by DPPH free radical capture, very close to the standard used, BHT (0.29 mg / mL), indicating that the proposed nanoemulsions presented results satisfactory and should act on pressure lesions as continuous sources of antioxidant and anti-inflammatory.

Keywords: Curcuminoids. oleic acid. Pluronic F127. Nanoemulsion. cutaneous lesions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.....	18
Figura 2 -	Emulsão óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).....	21
Figura 3 -	Mecanismos de instabilidade que podem ocorrer em emulsões.....	22
Figura 4 -	Diagrama esquemático de nanoemulsões fabricadas a partir de óleo, água e surfactante.....	23
Figura 5 -	Três principais curcuminoides.....	24
Figura 6 -	Ácido oleico.....	25
Figura 7 -	Pluronic® F127.....	26
Figura 8 -	Classificação do comportamento reológico de diferentes tipos de suspensões.....	27
Figura 9 -	Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por diferentes métodos: liberação controlada (A) e terapia convencional (B).....	30
Figura 10 -	Extração dos curcuminoides.....	34
Figura 11 -	Preparo das nanoemulsões.....	36
Figura 12 -	Determinação do pH das nanoemulsões.....	38
Figura 13 -	Determinação da quantidade de fármaco na nanonanoemulsão.....	39
Figura 14 -	Reômetro AR 2000.....	40
Figura 15 -	Filtro de centrifugação, com massa molar de corte de 10.000 g/mol, Millipore.....	40
Figura 16 -	Sistema de difusão utilizado no experimento de liberação <i>in</i> <i>vitro</i>	41
Figura 17 -	Identificação dos hidrogênios e carbonos dos curcuminóides.....	43
Figura 18 -	Espectro de FTIR dos curcuminoides.....	46
Figura 19 -	Cromatograma dos curcuminoides.....	47
Figura 20 -	Interações físicas predominantes entre os curcuminóides e a mistura física de ácido oleico, curcuminóides e Pluronic® F127...	49
Figura 21 -	Espectro de FTIR do ácido oleico, curcuminoides, F127 e suas misturas (1:1:1).....	50
Figura 22 -	Curvas de TG/DTG do ácido oleico, curcuminoides, Pluronic® F127 e mistura (1:1:1), em ar sintético.....	53
Figura 23 -	Cromatogramas dos curcuminoides e mistura física do ácido oleico, curcuminoides e Pluronic® F127 na proporção de 1:1:1....	56

Figura 24 - Associação molecular (na forma de gota) das nanoemulsões à base de curcuminoides, ácido oleico e Pluronic® F127.....	61
Figura 25 - Figura representativa do fator concentração do ácido oleico em função da variável resposta tamanho de partícula.....	63
Figura 26 - Figura representativa do fator concentração da solução de Pluronic® F127 adicionado na nanoemulsão em função da variável resposta tamanho de partícula.....	63
Figura 27 - Figura representativa do fator concentração do ácido oleico presente na nanoemulsão em função da variável resposta potencial zeta.....	64
Figura 28 - Figura representativa do fator concentração da solução de Pluronic® F127 adicionado na nanoemulsão em função da variável resposta potencial zeta.....	65
Figura 29 - Indicadores de estabilizadade das nanoemulsões.....	67
Figura 30 - Desenho representativo das possíveis associações moleculares em uma nanoemulsão.....	72
Figura 31 - Espectros mecânicos que mostram o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') em função da frequência em tensão = 0,1 % para as emulsões E3.....	73
Figura 32 - Espectros mecânicos que mostram o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') em função da frequência em tensão = 0,1 % para as emulsões E6.....	74
Figura 33 - Espectros mecânicos que mostram o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') em função da frequência em tensão = 0,1 % para as emulsões E9.....	74
Figura 34 - Espectros mecânicos que mostram o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') em função da frequência em tensão = 0,1 % para o ácido oleico puro.....	75
Figura 35 - Curvas de fluxo que representam a dependência da taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento para as emulsões E3, E6, E9 e para o ácido oléico (AO) puro.....	76
Figura 36 - Padrão de aparência dos filtros de centrifugação após a centrifugação das emulsões E3, E6 e E9.....	79
Figura 37 - Perfil de liberação dos curcuminóides nas emulsões E3, E6 e	

E9.....	81
Figura 38 - Influência da concentração da fase orgânica na liberação dos curcuminóides presentes nas emulsões E3, E6 e E9.....	82
Figura 39 - Linearização do perfil de liberação para emulsão E3.....	84
Figura 40 - Linearização do perfil de liberação para emulsão E6.....	84
Figura 41 - Linearização do perfil de liberação para emulsão E9.....	85
Figura 42 - Curvas de zero e primeira ordem para a emulsão E3.....	86
Figura 43 - Curvas de zero e primeira ordem para a emulsão E6.....	86
Figura 44 - Curvas de zero e primeira ordem para a emulsão E9.....	87
Figura 45 - Função polinomial obtida da inibição da concentração de DPPH (%) em função da concentração de curcuminóides nas nanoemulsões E3, E6 e E9.....	93
Figura 46 - Porcentagem de inibição de DPPH para as nanoemulsões E3, E6 e E9, na concentração de 1,7 mg/mL de curcuminóides, em função do tempo.....	95
Figura 47 - Porcentagem de inibição de DPPH para as nanoemulsões E3, E6 e E9, na concentração de 0,85 mg/mL de curcuminóides em função do tempo.....	96
Figura 48 - Porcentagem de inibição de DPPH para as nanoemulsões E3, E6 e E9, na concentração de 0,42 mg/mL de curcuminóides em função do tempo.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista dos reagentes e marcas utilizados nos procedimentos experimentais.....	33
Tabela 2 -	Nanoemulsões preparadas contendo 20 mg de curcumina.....	37
Tabela 3 -	Dados do espectro de ¹ H NMR dos curcuminoides.....	44
Tabela 4 -	Dados espectrais de ¹³ C NMR dos curcuminoides.....	45
Tabela 5 -	Atribuições das principais bandas de absorção no infravermelho para os curcuminoides.....	46
Tabela 6 -	Atribuições das principais bandas de absorção no infravermelho para o ácido oleico.....	50
Tabela 7 -	Atribuições das principais bandas de absorção no infravermelho para os Pluronic [®] F127.....	51
Tabela 8 -	Atribuições das principais bandas de absorção no infravermelho para a mistura (1:1:1).....	51
Tabela 9 -	Valores de perda de massa dos materiais e mistura (1:1:1) usados na formulação proposta.....	53
Tabela 10 -	Resultados obtidos a partir dos cromatogramas dos curcuminoides e da mistura física (1:1:1).....	56
Tabela 11 -	Valores de diâmetro hidrodinâmico (Dh), índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta das nanoemulsões.....	57
Tabela 12 -	Faixa de diâmetro de partículas intituladas de nanoemulsões relatados na literatura atual.....	58
Tabela 13 -	Condições utilizadas no planejamento fatorial para avaliação do tamanho de partícula e potencial zeta.....	62
Tabela 14 -	Conclusões obtidas através da análise das Figuras 25, 26, 27 e 28.....	66
Tabela 15 -	Tabela 15- Registro fotográfico das nanoemulsões após .centrifugação.....	69
Tabela 16 -	Variação de pH das nanoemulsões E3, E6 e E9 durante 45 dias na estufa a 45 °C.....	70
Tabela 17 -	Valores de porcentagem em massa de curcuminoides presentes nas nanoemulsões durante 45 dias na estufa a 45 °C.....	71
Tabela 18 -	Equação linear e dados obtidos das curvas de fluxo.....	77
Tabela 19 -	Resultados de eficiência de encapsulação da curcumina em	

outros estudos.....	80
Tabela 20 - Valores de R^2 , K_0 e K_1 para as curvas apresentadas nas Figuras 42, 43 e 44.....	87
Tabela 21 - Cinética de inibição da concentração de DPPH (%) em função da concentração da nanoemulsão E3 (5% F127/5% A.O.).....	89
Tabela 22 - Cinética inibição da concentração de DPPH (%) em função da concentração da nanoemulsão E6 (5% F127/10% A.O.).....	90
Tabela 23 - Cinética de inibição da concentração de DPPH (%) em função da concentração da nanoemulsão E9 (5% F127/15% A.O.).....	90
Tabela 24 - Cinética de inibição da concentração de DPPH (%) em função da concentração de curcuminóides.....	91
Tabela 25 - Cinética de inibição da concentração de DPPH (%) em função da concentração % (m/m) dos excipientes utilizados na formulação das nanoemulsões.....	91
Tabela 26 - Valores de IC_{50} (mg/L) após 30 minutos de reação para as nanoemulsões E3 (5% F127-5% A.O), E6 (5% F127-10% A.O) e E9 (5% F127-15% A.O) e curcuminóides na concentração aproximada usada nas nanoemulsões (1,7 mg/mL).....	94

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.	A pele.....	18
2.1.1	<i>Lesão por pressão.....</i>	18
2.1.2	<i>Radiodermite.....</i>	20
2.1.3	<i>Queimaduras.....</i>	20
2.2	Emulsões.....	21
2.2.1	<i>Nanoemulsões.....</i>	22
2.3	Considerações sobre os componentes da formulação.....	24
2.3.1	<i>Curcuminoides.....</i>	24
2.3.2	<i>Ácido oleico.....</i>	25
2.3.3	<i>Pluronic® F127.....</i>	25
2.4	Terapia tópica.....	26
2.5	Reologia.....	26
2.5.1	<i>Fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.....</i>	26
2.6	Liberação <i>in vitro</i>.....	28
2.7	O estado da arte.....	30
3.	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivos gerais.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4.1	Materiais.....	33
4.2	Extração dos curcuminoides.....	33
4.3	Caracterização dos curcuminoides.....	34
4.3.1.	<i>Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) e de ^{13}C</i>	

	<i>(RMN ¹³C)</i>	34
4.3.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	35
4.3.3	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	35
4.4	Estudo de compatibilidade	35
4.4.1	<i>Preparo da mistura física (1:1:1)</i>	35
4.4.2	<i>Análise termogravimétrica (TG)</i>	35
4.5	Preparo das nanoemulsões	35
4.6	Caracterização das nanoemulsões	37
4.6.1	<i>Planejamento fatorial</i>	37
4.6.2	<i>Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta</i>	37
4.7	Estudo de estabilidade preliminar	38
4.7.1	<i>Resistência física</i>	38
4.7.2	<i>pH</i>	38
4.7.3	<i>Determinação da quantidade de fármaco na nanoemulsão</i>	39
4.8	Reologia	39
4.9	Eficiência de Encapsulação	40
5.1	Liberação <i>in vitro</i>	41
5.2	Ensaio antioxidante pela captura do radical livre DPPH	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Caracterização dos curcuminoides	43
5.1.1	<i>Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN ¹H) e ¹³C (RMN ¹³C)</i>	43
5.1.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	45

5.1.3	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	47
5.2	Estudo de compatibilidade	48
5.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	49
5.2.2	<i>Análise termogravimétrica (TG/DTG)</i>	52
5.2.3	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	55
5.3	Estabilidade das nanoemulsões	57
5.3.1	<i>Tamanho de partícula</i>	57
5.3.2	<i>Potencial zeta</i>	59
5.3.3	<i>Índice de polidispersividade (IPD)</i>	61
5.4	Planejamento experimental	62
5.4.1	<i>Variável resposta: Tamanho de partícula</i>	62
5.4.2	<i>Variável resposta: potencial zeta</i>	64
5.4.3	<i>Seleção das nanoemulsões mais estáveis</i>	64
5.5	Estudo de estabilidade preliminar	68
5.5.1	<i>Resistência física</i>	68
5.5.2	<i>pH</i>	70
5.5.3	<i>Quantificação do fármaco na nanoemulsão</i>	71
5.6	Reologia	72
5.7	Eficiência de encapsulação	78
5.8	Liberação <i>in vitro</i>	80
5.8.1	<i>Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> dos curcuminóides</i>	80
5.8.2	<i>Análise do mecanismo de liberação <i>in vitro</i> dos curcuminóides</i>	83
5.8.3	<i>Sistemas similares de Liberação <i>in vitro</i></i>	87
5.9	Ensaio antioxidante pela captura do radical livre DPPH	88
6.	CONCLUSÃO	97

7.	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	98
	REFERÊNCIAS.....	100