



SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO ANTICONVULSIVANTE DE NANOEMULSÃO CARREGADA COM AMIDAS GRAXAS DE *Olea europaea*

Calléu M. Freitas^{1,2}; Victor H. S. Marinho⁷; Alex B. L. Rodrigues³; Valéria C. Santos⁴; Isabelle A. R. Lacerda^{1,7}; Irlon F. Maciel⁷; José L. M. do Nascimento⁶; Fábio R. de Oliveira^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Universidade Federal do Amapá

²Laboratório de Controle de Qualidade e Bromatologia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá

³Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá

⁴Universidade do Estado do Amapá

⁶Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

⁷Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada. Universidade Federal do Amapá
callemourao@gmail.com

Palavras-Chave: Biocatálise, Epileptogênese, Endocanabinoides

Introdução

A epilepsia é uma condição neurológica crônica caracterizada por crises recorrentes, associadas à hiperexcitabilidade neuronal e a alterações transitórias do funcionamento cerebral. Sua expressão clínica e fisiopatológica é heterogênea, o que dificulta a padronização de respostas terapêuticas e reforça a necessidade de modelos experimentais capazes de reproduzir a progressão da epileptogênese e permitir a triagem de substâncias com potencial farmacológico (BEGHI, 2020). Nesse contexto, o modelo de abrasamento induzido por pentilenotetrazol (PTZ-kindling) constitui ferramenta relevante para investigar a evolução crônica das crises, uma vez que a administração repetida de doses subconvulsivantes de PTZ possibilita acompanhar a sensibilização epileptogênica e seus desfechos comportamentais (NGOUPAYE *et al.*, 2022; THAPLIYAL *et al.*, 2023).

O controle das crises epilépticas envolve, em grande parte, a modulação do equilíbrio entre neurotransmissão excitatória e inibitória, sendo que fármacos benzodiazepínicos atuam sobre o sistema GABAérgico e permanecem importantes no manejo das crises; entretanto, seu uso pode estar associado a efeitos adversos como sedação, prejuízo psicomotor, alterações cognitivas, tolerância e dependência, o que justifica a busca por novas estratégias terapêuticas (AGRAWAL; MULA, 2019; BELISÁRIO, 2023). Entre as vias investigadas, o sistema endocanabinoide tem se destacado por sua participação na modulação da excitabilidade neuronal, especialmente por meio de receptores CB1 e CB2, canais iônicos e controle da liberação de neurotransmissores (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020).



Amidas graxas bioativas, como oleiletanolamida (OEA) e palmitoiletanolamida (PEA), apresentam semelhança funcional com mediadores endocanabinoides e podem modular a neurotransmissão por mecanismos relacionados à redução do influxo de cálcio, regulação de canais de potássio e diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (KRISHNA KUMAR *et al.*, 2023; LAZARINI-LOPES; SILVA-CARDOSO, 2022). Assim, compostos lipídicos obtidos por amidação de ácidos graxos representam uma abordagem de interesse para a química medicinal, sobretudo quando associados à busca por moléculas com potencial anticonvulsivante.

O óleo de *Olea europaea* constitui matriz lipídica promissora para essa finalidade, pois apresenta composição rica em ácidos graxos, especialmente ácido oleico, palmítico e linoleico, favorecendo a obtenção de diferentes derivados etanolamídicos. A conversão desses constituintes em amidas graxas por biocatálise enzimática, empregando lipase de *Candida antarctica*-B e etanolamina, representa uma rota seletiva, conduzida em condições brandas e associada à menor formação de subprodutos, o que fortalece a interface do estudo com a biotecnologia e a química medicinal (LIMA, 2018; LIMA; ANJOS; PORTO, 2022).

A incorporação dessas amidas em sistemas nanoemulsionados amplia a relevância farmacotécnica da proposta, uma vez que compostos lipofílicos podem apresentar limitações de dispersão, estabilidade e biodisponibilidade. Nanoemulsões com tamanho nanométrico, potencial zeta adequado e baixa polidispersividade podem favorecer a solubilização, a estabilidade coloidal e a entrega de compostos bioativos em sistemas voltados ao sistema nervoso central (MALODE *et al.*, 2021; JUSRIL *et al.*, 2022; ZHOU, 2022; CHAVDA *et al.*, 2024).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo obter amidas graxas a partir do óleo de *Olea europaea*, caracterizar as amidas obtidas e sua formulação nanoemulsionada, bem como avaliar seu efeito anticonvulsivante em modelo animal crônico de epileptogênese induzida por PTZ.

Material e Métodos

O azeite de oliva extravirgem Andorinha Portugal® (lote L0206423) foi utilizado como matriz lipídica para obtenção das amidas graxas. A mistura de amidas foi obtida por biocatálise enzimática, conforme Araújo *et al.* (2018), utilizando 1 mL de azeite, 10 mg de lipase de *Candida antarctica*-B (CAL-B) e 3 mL de etanolamina, sob agitação magnética (300 rpm, 27 ± 2 °C) por 24 h. Após a reação, o biocatalisador foi removido por filtração e lavagem com acetona; o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e purificado por cromatografia em coluna com sílica gel e hexano:acetato de etila (9:1). As amidas foram caracterizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em GCMS-QP2010 (Shimadzu), com auto-amostrador AOC-20i, ionização por impacto eletrônico a 70 eV, coluna RTX-5MS e hélio como gás de arraste.

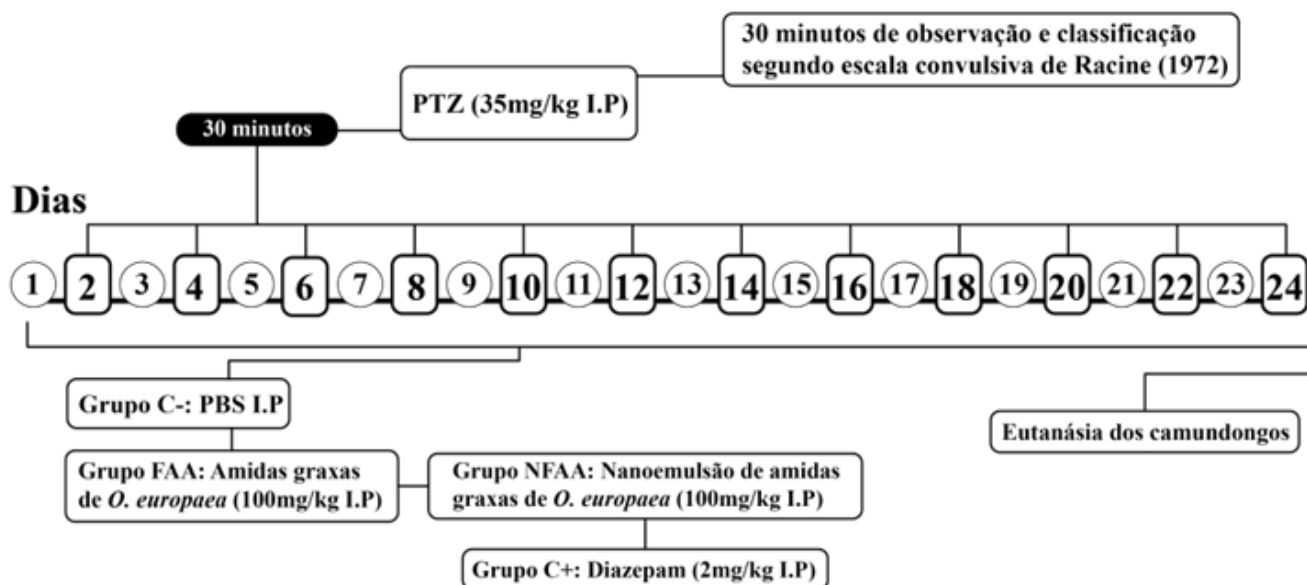


As nanoemulsões foram preparadas por inversão de fase com baixo aporte energético. O sistema emulsificante foi composto por Span 80 (10,51 mg) e Tween 80 (64,48 mg), correspondendo a HLB 13,5. A fase orgânica foi formada pela incorporação de 75 mg de amidas graxas ao blend de surfactantes, seguida de agitação em vórtex por 30 min a 750 rpm. Em seguida, 2850 mg de água destilada foram adicionados gota a gota sob agitação de 720 rpm por 1 h, obtendo-se formulação com $25000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e razão surfactante/óleo de 1:1. A caracterização físico-química foi realizada por espalhamento de luz eletroforético em Zetasizer Nano Series, avaliando diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (ζ). As amostras foram diluídas em água deionizada na proporção de 1:25 (v/v) e analisadas em triplicata.

O estudo *in vivo* foi aprovado pelo CEUA-UFPA sob protocolo nº 4335290521, respeitando a Lei nº 11.794/2008 e normas do CONCEA (BRASIL, 2008). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos adultos (20–40 g), mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h, temperatura controlada, água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em grupos controle positivo (diazepam 2 mg kg^{-1}), controle negativo (solução salina 0,9%), amidas graxas livres (FAA) e nanoemulsão de amidas graxas (NFAA). FAA e NFAA foram administradas por via intraperitoneal na dose de 100 mg kg^{-1} , respeitando volume máximo de $200 \mu\text{L}$.

A epileptogênese foi induzida pelo modelo PTZ-kindling, conforme Thapliyal *et al.* (2023). A partir do 2º dia, durante 24 dias, os grupos receberam pentilenotetrazol (35 mg kg^{-1} , i.p.) 30 min após os tratamentos, em dias alternados, e foram observados por 30 min sobre o desenvolvimento de sinais comportamentais de acordo com a escala de Racine (1972), além da latência e duração das crises convulsivas (Figura 1), com ensaios cegos. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM e analisados no GraphPad Prism 8.0 por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey, após Kolmogorov-Smirnov e Levene, adotando-se $p < 0,05$.

Figura 1: PTZ-kindling crônico





Fonte: Autoria Própria

Resultados e Discussão

A análise por CG-EM evidenciou que o óleo de *Olea europaea* utilizado como matriz apresentou predomínio de ácido oleico (70,80%), seguido de ácido palmítico (22,07%), linoleico (6,57%) e vacênico (0,56%), como apresentado pela Tabela 1. A elevada fração de ácidos graxos insaturados, especialmente oleico, reforça a adequação do azeite de oliva como substrato para obtenção de derivados etanolamídicos, uma vez que a biocatálise enzimática com lipases permite converter constituintes lipídicos em amidas graxas de interesse farmacológico (LIMA; ANJOS; PORTO, 2022).

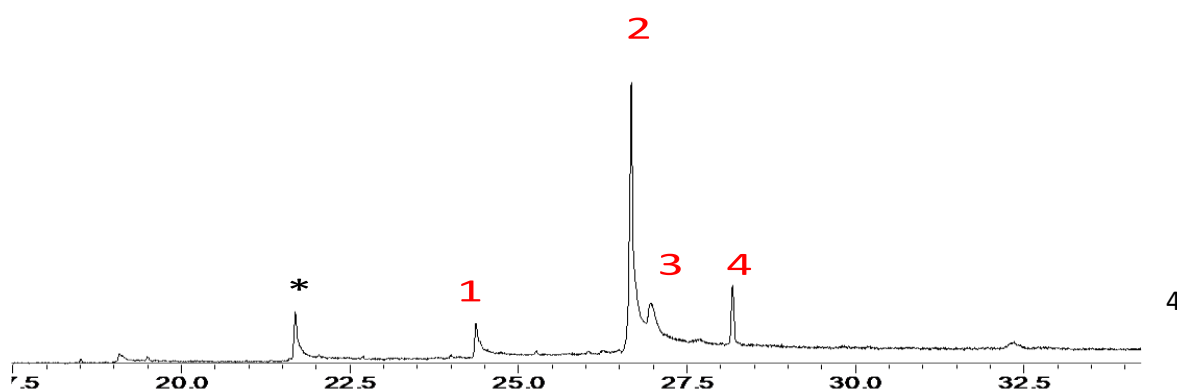
Tabela 1: Composição dos ácidos graxos do óleo de *Olea europaea*, por análise CG-EM^a

Ácidos Graxos ^b	Pico	Concentração Relativa ^b (%)
Palmítico	1	22,07
Oleico	2	70,80
Linoleico	3	6,57
Vacênico	4	0,56
Σ Saturado	—	22,07
Σ Insaturado	—	71,36
Σ Polinsaturado	—	6,57

^aBanco de dados do EM (NIST 5.0); ^b% do ácido graxo correspondente pela integração da área dos picos

Após a amidação, observaram-se picos compatíveis com palmitoiletanolamida (22,5 min), oleiletanolamida (26,5 min), linoleiletanolamida (27,8 min) e vacenoiletanolamida (29,4 min) (Figura 2). A predominância da oleiletanolamida acompanha o maior teor de ácido oleico da matriz, sustentando a conversão dos principais ácidos graxos de *Olea europaea* em derivados etanolamídicos (ARAÚJO *et al.*, 2018; LIMA; ANJOS; PORTO, 2022).

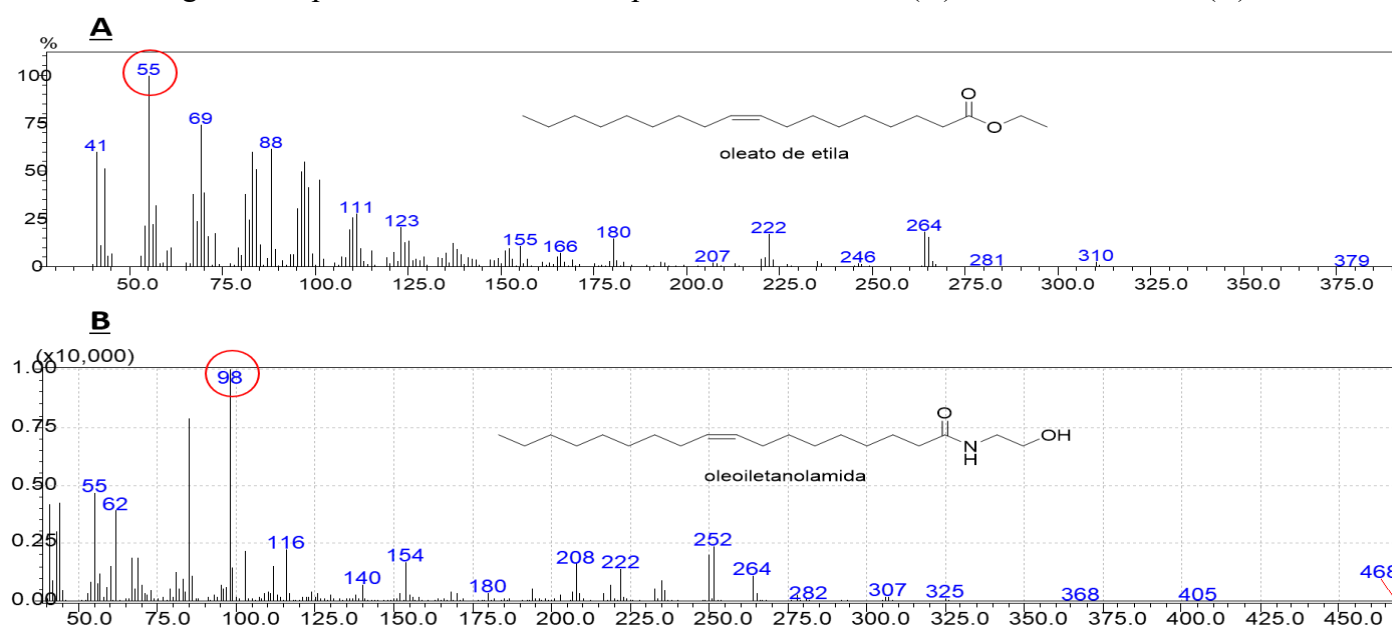
Figura 2: Cromatograma do conjunto de amidas graxas obtidas a partir da reação de amidação direta do azeite de oliva. * impureza.



Fonte: Autoria Própria

A comparação dos espectros de massa reforçou a conversão química dos precursores lipídicos. O oleato de etila apresentou pico base em m/z 55, padrão associado a ésteres etílicos, enquanto a oleiletanolamida apresentou íon base em m/z 98, compatível com fragmentação característica de etanolamidas graxas. A distinção entre os perfis de fragmentação permite diferenciar ésteres residuais de amidas formadas, fortalecendo a identificação da oleiletanolamida como um dos compostos majoritários obtidos.

Figura 3: Espectro de massa dos compostos oleato de etila (A) e oleiletanolamida (B).

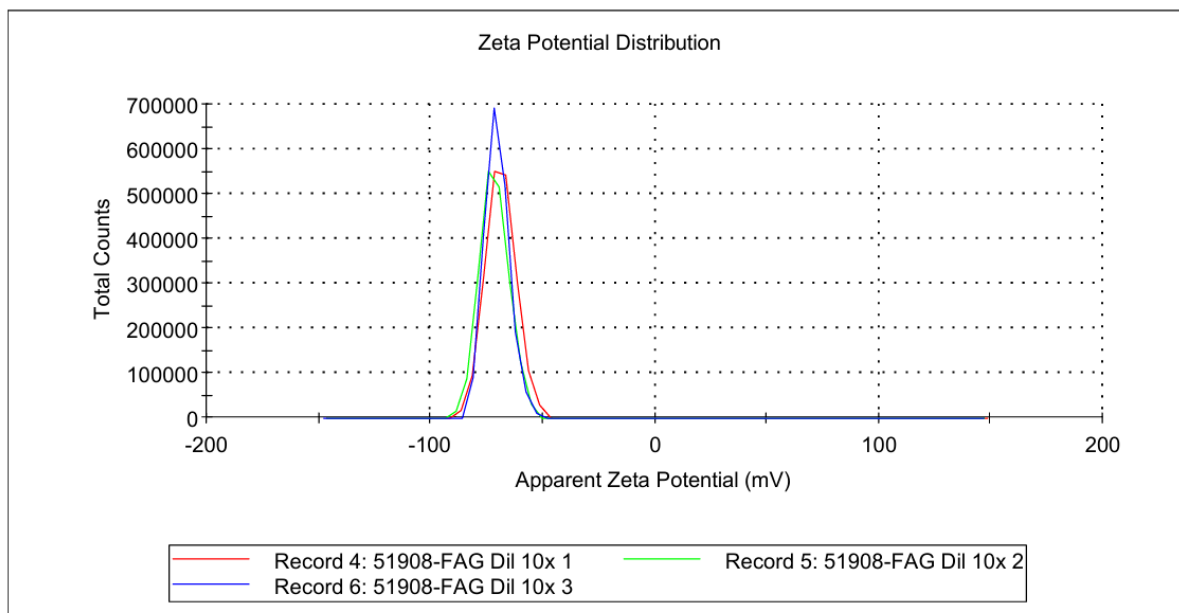


Fonte: Autoria Própria

A NFAA apresentou potencial zeta de $-68,7 \pm 6,68$ mV (Figura 4), indicando repulsão eletrostática e menor tendência à agregação, conforme descrito para sistemas nanoestruturados estáveis (FAN *et al.*, 2020). O diâmetro hidrodinâmico médio foi de 325,8 nm e o PDI de 0,216 (Figura 5), perfil compatível com nanoemulsões farmacêuticas, nas quais gotículas nanométricas e PDI < 0,3 favorecem dispersão, estabilidade física e reprodutibilidade da formulação (MALODE *et al.*, 2021; JUSRIL *et al.*, 2022; ZHOU, 2022; ALGAHTANI; AHMAD; AHMAD, 2022).

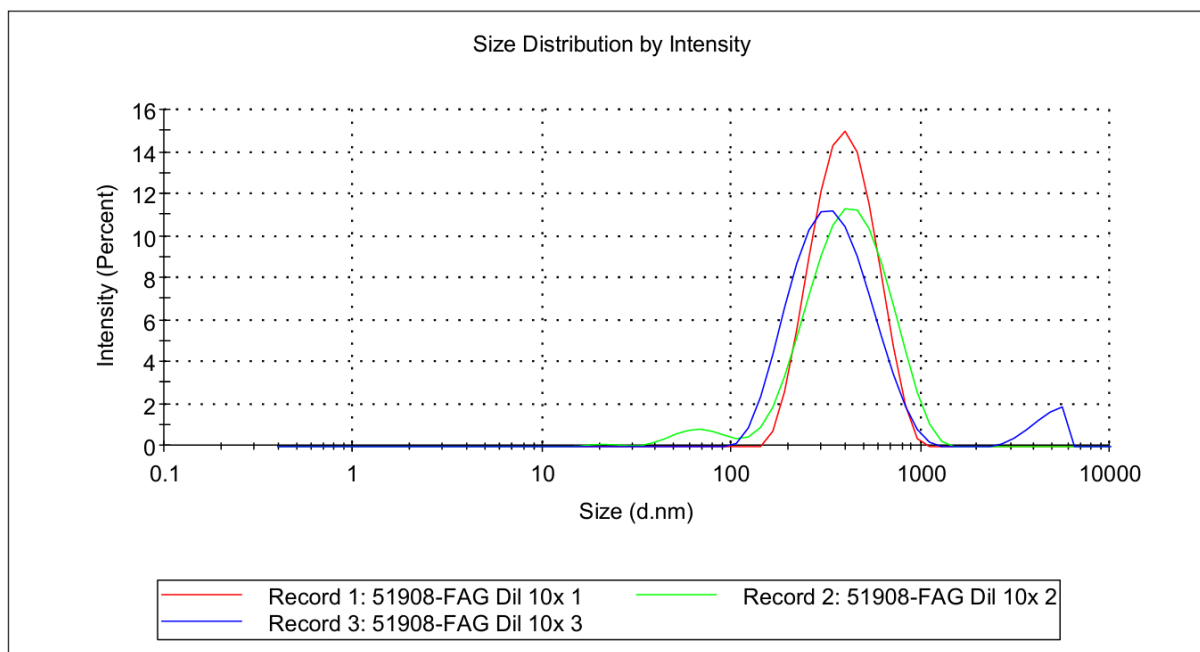


Figura 4: Distribuição do potencial zeta da nanoemulsão de amidas graxas



Fonte: Autoria Própria

Figura 5: Distribuição de tamanho de partícula, por intensidade, da nanoemulsão carregada de amidas graxas produzidas a partir dos ácidos graxos de *Olea europaea*

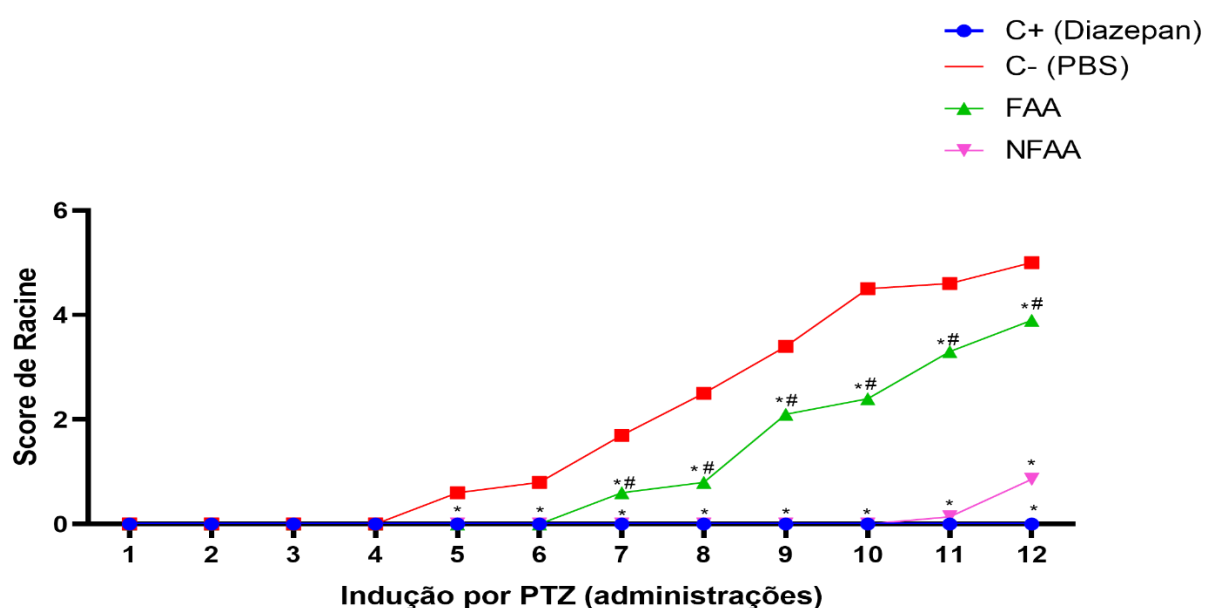


Fonte: Autoria Própria

No modelo crônico induzido por PTZ, o grupo PBS apresentou progressão evidente dos scores de Racine, atingindo estágios compatíveis com crises generalizadas, enquanto o

diazepam manteve scores próximos de zero durante todo o protocolo. Esse padrão confirma a efetividade do PTZ-kindling e valida os controles experimentais, sendo a escala de Racine adequada para classificar a severidade comportamental das crises (RACINE, 1972).

Figura 6: Evolução epileptogênica dos grupos no modelo PTZ-kindling. *p < 0,05 vs PBS; #p < 0,05 vs DZP/NFAA

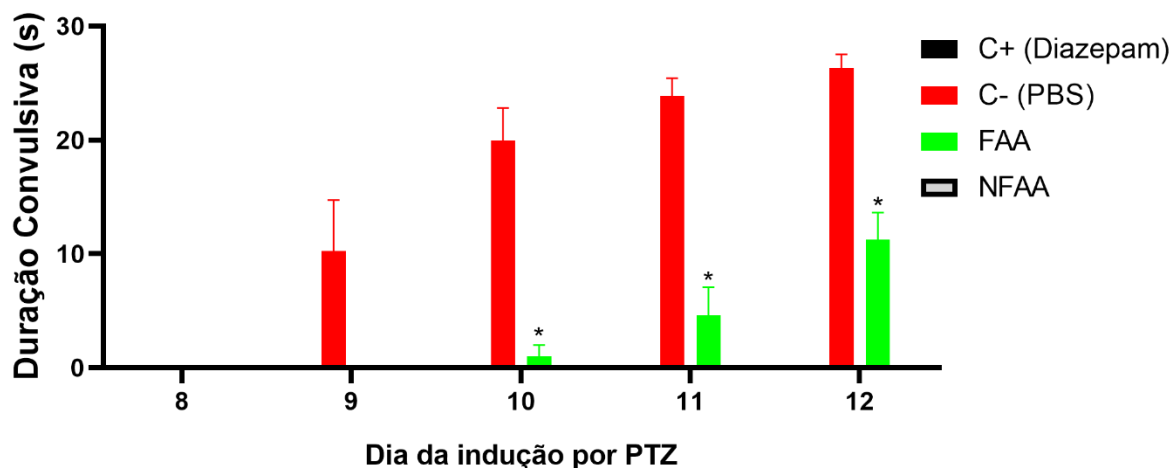


Fonte: Autoria Própria

O grupo FAA atrasou a progressão epileptogênica em relação ao PBS, mas não impediu a evolução dos sinais convulsivos nas administrações finais. Em contraste, a NFAA manteve scores baixos durante o protocolo, sem progressão para estágios avançados. Na 12ª administração de PTZ, a NFAA apresentou média de $0,857 \pm 1,215$, com diferença significativa em relação a PBS e FAA, mas sem diferença em relação ao diazepam, indicando maior eficiência da formulação nanoemulsionada.

A duração das crises reforçou esse comportamento. O grupo PBS apresentou aumento progressivo da duração dos episódios nos dias finais de indução, evidenciando agravamento do quadro convulsivo. O grupo FAA apresentou duração inferior à do controle negativo, sugerindo redução parcial da severidade. Já os grupos NFAA e diazepam não apresentaram crises mensuráveis, indicando maior controle da manifestação convulsiva. Esses achados dialogam com resultados anteriores de amidas graxas obtidas de óleos vegetais, que demonstraram ação anticonvulsivante em modelos induzidos por PTZ e possível envolvimento de vias GABAérgicas e endocanabinoides (RODRIGUES DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; KRISHNA KUMAR *et al.*, 2023).

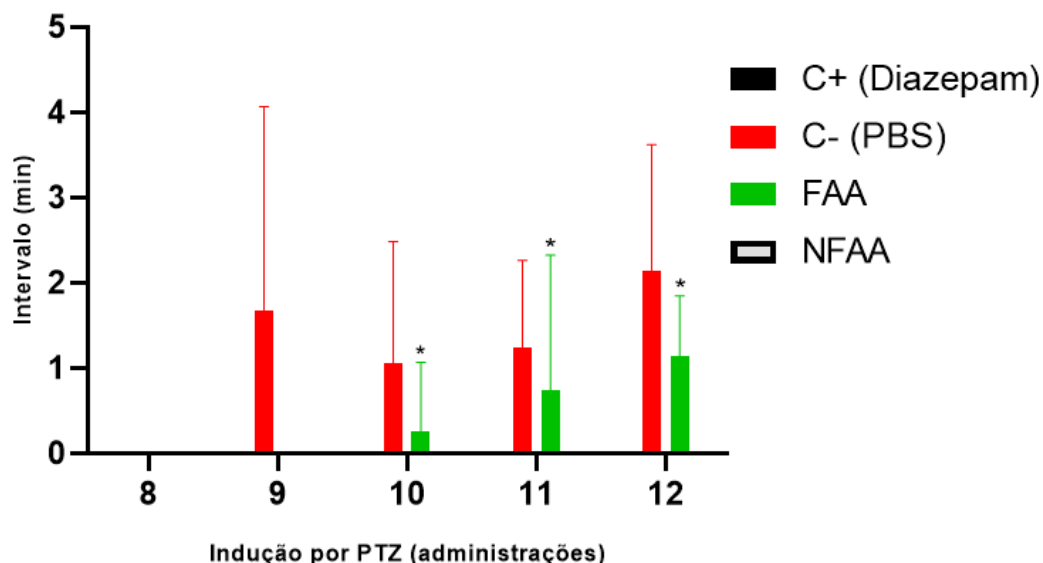
Figura 7: Duração das crises convulsivas no modelo PTZ-kindling. * $p < 0,05$ vs PBS



Fonte: Autoria Própria

Quanto à latência convulsiva, o grupo FAA apresentou tempo médio de $1,144 \pm 0,702$ min no ápice das crises, enquanto o grupo PBS apresentou média de $2,148 \pm 1,473$ min no mesmo período. Embora esse parâmetro isolado não demonstre superioridade das amidas livres em relação ao controle negativo, sua interpretação conjunta com os scores de Racine e a duração das crises sugere atenuação parcial da severidade convulsiva. Para os grupos NFAA e diazepam, a ausência de crises mensuráveis limita a comparação direta da latência, mas reforça o efeito protetor observado nos demais parâmetros comportamentais.

Figura 8: Latência das crises convulsivas no modelo PTZ-kindling. * $p < 0,05$ vs PBS





Fonte: Autoria Própria

A superioridade da NFAA pode estar associada ao tamanho nanométrico, ao PDI reduzido e ao potencial zeta altamente negativo, parâmetros que favorecem estabilidade e possível maior disponibilidade das amidas no meio biológico. Em conjunto, os resultados indicam que a biocatálise permitiu obter amidas compatíveis com a matriz de *Olea europaea*, enquanto a nanoemulsão apresentou estabilidade coloidal e melhor desempenho anticonvulsivante no modelo PTZ-kindling.

Conclusões

Os resultados demonstram que a biocatálise enzimática permitiu a obtenção de amidas graxas a partir do óleo de *Olea europaea*, com perfil compatível com a composição lipídica da matriz, especialmente pela presença de oleiletanolamida e palmitoiletanolamida. A caracterização por CG-EM confirmou a formação dos derivados etanolamídicos, enquanto a nanoemulsão apresentou parâmetros físico-químicos favoráveis à estabilidade do sistema, com tamanho médio em escala nanométrica, baixa polidispersividade e potencial zeta altamente negativo. No modelo crônico de epileptogênese induzida por PTZ, a formulação nanoemulsionada apresentou melhor desempenho que as amidas graxas livres, reduzindo a evolução dos scores de Racine e impedindo crises convulsivas mensuráveis. Assim, a associação entre amidas graxas bioativas e sistema nanoemulsionado mostrou-se uma estratégia promissora para modular a progressão epileptogênica em modelo animal crônico, reforçando a integração entre biocatálise, caracterização físico-química e avaliação farmacológica na prospecção de bioprodutos com potencial anticonvulsivante.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, com apoio de bolsa de mestrado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- AGRAWAL, Niruj; MULA, Marco. Treatment of psychoses in patients with epilepsy: an update. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, v. 9, p. 2045125319862968, 2019.
- ALGAHTANI, Mohammed S.; AHMAD, Mohammad Zaki; AHMAD, Javed. Investigation of factors influencing formation of nanoemulsion by spontaneous emulsification: impact on droplet size, polydispersity index, and stability. *Bioengineering*, v. 9, n. 8, p. 384, 2022.
- ARAÚJO, Pedro HF et al. Direct and solvent-free aminolysis of triglyceride from *Oenocarpus bataua* (Patawa) oil catalyzed by Al₂O₃. *Catalysis Letters*, v. 148, p. 843-851, 2018.
- BEGHI, Ettore. The epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology*, v. 54, n. 2, p. 185-191, 2020.
- BELISÁRIO, Eduarda de Souza. *Kefir e antiepilepticos: neuroproteção em modelo experimental de crises convulsivas*. 2023. Tese de Doutorado. Brasil.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm. Acesso em: 10 jul. 2026.



CHAVDA, Vivek P. et al. Nanoemulsions: summary of a decade of research and recent advances. *Nanomedicine*, v. 19, n. 6, p. 519-536, 2024.

CRISTINO, Luigia; BISOGNO, Tiziana; DI MARZO, Vincenzo. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, v. 16, n. 1, p. 9-29, 2020.

FAN, Wufa et al. Effect of particle size on the pharmacokinetics and biodistribution of parenteral nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 586, p. 119551, 2020.

JUSRIL, Nor Atiqah et al. Development and Optimization of Nanoemulsion from Ethanolic Extract of *Centella asiatica* (NanoSECA) Using D-Optimal Mixture Design to Improve Blood-Brain Barrier Permeability. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2022, n. 1, p. 3483511, 2022.

KRISHNA KUMAR, Kaavya et al. Structural basis for activation of CB1 by an endocannabinoid analog. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 2672, 2023.

LAZARINI-LOPES, Willian; SILVA-CARDOSO, Gleice Kelli. Neuroplastic alterations in cannabinoid receptors type 1 (CB1) in animal models of epileptic seizures. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, p. 104675, 2022.

LIMA, Rafaely N.; ANJOS, Charlene S.; PORTO, Andre LM. Biocatalytic synthesis of lipophilic amides by the lipase of *Candida antarctica* type B. *Molecular Catalysis*, v. 530, p. 112635, 2022.

LIMA, Rafaely Nascimento. *Síntese de amidas e amidas-graxas utilizando metodologias aplicadas ao princípios da química verde*. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MALODE, Mrs Gunjan Pranav et al. A critical review on nanoemulsion: Advantages, techniques and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 4, n. 3, p. 6-12, 2021.

NGOUPAYE, Gwladys Temkou et al. Pentylentetrazole kindling-induced epilepsy rat models: Insight on the severity state, a comparative study. *IBRO Neuroscience Reports*, v. 13, p. 164-176, 2022.

RACINE, Ronald J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, v. 32, n. 3, p. 281-294, 1972.

RODRIGUES DE OLIVEIRA, Fábio et al. Fatty acid amides synthesized from andiroba oil (*Carapa guianensis* Aublet.) exhibit anticonvulsant action with modulation on GABA-A receptor in mice: a putative therapeutic option. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 3, p. 43, 2020.

THAPLIYAL, Surabhi et al. Pentylentetrazole Induced Kindling Model of Refractory Epilepsy: A Proof-of-concept Study to Explore Dose and Time Range of Phenobarbital in Rats. *Basic and Clinical Neuroscience*, v. 14, n. 5, p. 701, 2023.

ZHOU, Yue. Research progress in preparation, stability and application of nanoemulsion. In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 2022. p. 012044.