



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CALLÉU MOURÃO DE FREITAS**

---

---

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE**  
**DA NANOEMULSÃO DE AMIDAS GRAXAS SEMI-**  
**SINTETIZADAS A PARTIR DOS TRIGLICERÍDEOS DE**  
*Olea europaea*

---

---

**Macapá - AP**  
2025

**CALLÉU MOURÃO DE FREITAS**

---

---

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE  
DA NANOEMULSÃO DE AMIDAS GRAXAS SEMI-  
SINTETIZADAS A PARTIR DOS TRIGLICERÍDEOS DE**  
*Olea europaea*

---

---

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigues de Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

**Macapá - AP**  
2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP  
Elaborado por Cristina Fernandes – CRB-2 / 1569

---

F866a Freitas, Calléu Mourão de.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DA NANOEMULSÃO DE AMIDAS GRAXAS SEMI-SINTETIZADAS A PARTIR DOS TRIGLICERÍDEOS DE *Olea europaea*  
/ Calléu Mourão de Freitas. - Macapá, 2025.

1 recurso eletrônico. 63 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Macapá, 2025. Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigues de Oliveira.  
Coorientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. *Olea europaea*. 2. Convulsão. 3. Amidas graxas. I. Oliveira, Fábio Rodrigues de, orientador. II. Nascimento, José Luiz Martins do, coorientador. III. Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

CDD 23. ed. – 370

---

FREITAS, Calléu Mourão de. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DA NANOEMULSÃO DE AMIDAS GRAXAS SEMI-SINTETIZADAS A PARTIR DOS TRIGLICERÍDEOS DE *Olea europaea***. Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigues de Oliveira. Coorientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento. 2025. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2025.

**CALLÉU MOURÃO DE FREITAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DA  
NANOEMULSÃO DE AMIDAS GRAXAS SEMI-SINTETIZADAS A  
PARTIR DOS TRIGLICERÍDEOS DE *Olea europaea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data de Aprovação: 21/02/2025

---

**Orientador**

Prof. Dr. Fábio Rodrigues de Oliveira - UNIFAP

---

**Avaliador 1**

Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira - UNIFAP

---

**Avaliador 2**

Prof. Dr. Moisés Hamoy -UFPA

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a Deus pela saúde, por sua infinita piedade e sabedoria, por abrir com maestria os caminhos da minha vida e nunca deixar faltar nada. Ao Senhor, dedico tudo, inclusive as conquistas.

À minha mãe, Veruza Mourão de Lima, agradeço o cuidado e amor incondicional, pelas vigílias de orações feitas, como mantenedora e provedora do nosso lar.

Agradeço aos meus tios, Verônica Mourão de Lima e Juan Jaz Andrade por todo o apoio e atenção demonstrados nos mais adversos momentos.

Agradeço ao meu pai, Wiama de Jesus Freitas Lopes, por contribuir com minha formação humana.

Agradeço ao meu irmão, Aramis Mourão de Freitas, aos familiares Regina da Silva Costa e Joaquim Cezário de Lima, pela presença constante e reconforto em momentos de crise.

À minha esposa, Valéria Cabral dos Santos, agradeço por acreditar em mim sem julgamentos, por receber meus sonhos sem preconceitos, por ouvir minhas ideias como se fossem boas-novas, minhas preocupações mais profundas e o meu amor mais desregrado.

Agradeço aos mestres de ofício, que me receberam e me acompanharam durante minha jornada acadêmica, que me ensinaram, na profissão, tudo o que sei e que ensinarei, em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Rodrigues de Oliveira, pelo excepcional apoio acadêmico e pelas orientações valiosas em momentos de turvas perspectivas. Também agradeço ao Prof. Dr. Irlon Maciel, cuja colaboração tornou possível imensa parcela deste trabalho, além de sua generosa disponibilidade. Ao Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento e ao Prof. Dr. Moisés Hamoy agradeço pelas indispensáveis oportunidades e contribuições críticas feitas para a qualificação deste trabalho, enriquecendo-o. Agradeço ao Prof. Dr. Alex Bruno Lobato Rodrigues pelas insubstituíveis colaborações no preparo das nanoemulsões bem como na confecção dos seus protocolos de estabilidade e qualidade, sem o qual seria inviável o presente trabalho.

Agradeço à minha amiga de laboratório, Luanne Christinne França Cancela, que me auxiliou de forma valiosa em diversas situações com os experimentos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) e à Universidade Federal do Pará (UFPA) pelos recursos disponibilizados para elaboração dos estudos e obtenção dos resultados deste trabalho.

A epilepsia se caracteriza como uma condição crônica, clinicamente manifestada por meio de convulsões espontâneas recorrentes, que produzem descargas excessivas nos neurônios cerebrais na zona sináptica, sendo considerada uma alteração temporária e reversível do funcionamento do cérebro. Mesmo com a administração de benzodiazepínicos, substâncias eficazes no controle das crises, seus efeitos adversos tornam imprescindível a elaboração de novas opções terapêuticas contínuas como necessidade, visto que estes medicamentos podem causar esses sintomas indesejáveis. A instrumentalização de princípios ativos que possam tratar o quadro epileptogênico crônico em organismos vivos é vital para a construção de um modelo experimental que possibilite estudar esse fenômeno químico, simulando o quadro clínico de pacientes que convivam com essa condição clínica e, assim, desenvolver tratamentos que melhorem a qualidade de vida desses indivíduos. O sistema endocanabinoide e os sistemas nanoestruturados surgem como alternativas promissoras nesse cenário, oferecendo um potencial terapêutico inovador por meio dos receptores CB1 e CB2, que estão diretamente envolvidos na regulação da excitabilidade neuronal e na modulação da neurotransmissão, enquanto os sistemas nanoestruturados, como as nanoemulsões, favorecem entrega dirigida e a biodisponibilidade dos compostos ativos, aumentando sua eficácia. O objetivo do presente estudo é a avaliação do potencial anticonvulsivante em modelo de convulsão química induzida por pentilenotetrazol (PTZ) das amidas graxas (AG) obtidas a partir do óleo de *Olea europaea*, bem como a utilização de um sistema nano emulsionado capaz de carregá-las. A obtenção das AG se deu por catálise enzimática, utilizando-se lipases de *Candida antarctica*-B (CAL-B) e etanolamina. A nanoemulsão foi obtida por técnica de baixo aporte energético e, posteriormente, caracterizada. Para o teste *in vivo* empregou-se a metodologia de abrasamento e sensibilização com pentilenotetrazol em dosagens subterapêuticas para indução da epilepsia em camundongos. A eficácia do tratamento foi avaliada por meio da escala comportamental de Racine (1972). Os resultados obtidos demonstraram que a oleiletanolamida (OEA) e a palmitoiletanolamida (PEA) eram as amidas majoritárias na mistura. A caracterização físico-química da nanoemulsão revelou um sistema estável, com potencial zeta altamente negativo e baixa polidispersividade, favorecendo sua biodisponibilidade. No modelo experimental, a administração da nanoemulsão de amidas graxas reduziu significativamente a severidade das crises convulsivas, apresentando um efeito neuroprotetor superior em comparação às AG. O grupo tratado com Diazepam não apresentou convulsões, assim como o grupo que recebeu as nanoemulsões de amidas graxas (NFAA), sugerindo um efeito anticonvulsivante robusto. Por outro lado, o grupo tratado com amidas graxas livres (FAA) apresentou tempo médio de latência convulsiva de  $1.144 \pm 0.702$  minutos no ápice das crises convulsivas. Em comparação a esses, o grupo controle negativo (PBS) apresentou uma latência convulsiva média de  $2.148 \pm 1.473$  minutos no mesmo período. Estes dados sugerem que a combinação entre AG análogas aos endocanabinoides aos sistemas nanoestruturados pode representar estratégia promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a epilepsia, reforçando o potencial das AG como candidatas a novos fármacos anticonvulsivantes, abrindo caminho para o desenvolvimento de terapias inovadoras que possam oferecer alternativas mais eficazes e seguras para pacientes epiléticos.

**Palavras-Chave:** *Olea europaea*; Convulsão; Epilepsia; Amidas graxas; Nanoemulsão; Abrasamento químico; Potencial anticonvulsivante.

**Agradecimentos:** CNPq, CAPES, UFPA, UNIFAP.

## ABSTRACT

---

Epilepsy is characterized as a chronic condition, clinically manifested through recurrent spontaneous seizures that produce excessive discharges in brain neurons at the synaptic zone, being considered a temporary and reversible alteration in brain function. Despite the administration of benzodiazepines—effective substances in controlling seizures—their adverse effects make the continuous development of new therapeutic options essential, as these drugs can cause undesirable symptoms. The application of active compounds capable of treating chronic epileptogenic conditions in living organisms is crucial for building an experimental model that enables the study of this chemical phenomenon, simulating the clinical picture of patients living with this condition and, thus, developing treatments that improve their quality of life. The endocannabinoid system and nanostructured systems emerge as promising alternatives in this context, offering innovative therapeutic potential through CB1 and CB2 receptors, which are directly involved in regulating neuronal excitability and neurotransmission modulation. Meanwhile, nanostructured systems, such as nanoemulsions, enhance targeted delivery and the bioavailability of active compounds, increasing their efficacy. This study aims to evaluate the anticonvulsant potential of fatty acid amides (FAAs) derived from *Olea europaea* oil in a chemical seizure model induced by pentylenetetrazol (PTZ), as well as the use of a nanoemulsion system capable of carrying these compounds. The FAAs were obtained through enzymatic catalysis using *Candida antarctica*-B lipase (CAL-B) and ethanolamine. The nanoemulsion was produced using a low-energy input technique and subsequently characterized. For the in vivo test, the kindling method with subtherapeutic doses of pentylenetetrazol was employed to induce epilepsy in mice. Treatment efficacy was assessed using Racine's behavioral scale (1972). The results showed that oleoylethanolamide (OEA) and palmitoylethanolamide (PEA) were the major amides in the mixture. The physicochemical characterization of the nanoemulsion revealed a stable system with a highly negative zeta potential and low polydispersity, enhancing its bioavailability. In the experimental model, the administration of the fatty acid amide nanoemulsion significantly reduced seizure severity, demonstrating a superior neuroprotective effect compared to free FAAs. The diazepam-treated group did not experience seizures, similar to the group that received the nanoemulsions of fatty acid amides (NFAA), suggesting a robust anticonvulsant effect. Conversely, the group treated with free fatty acid amides (FAA) showed an average convulsive latency time of  $1,144 \pm 0.702$  minutes at the peak of the seizures. In comparison, the negative control group (PBS) exhibited a mean convulsive latency of  $2,148 \pm 1.473$  minutes during the same period. These findings suggest that combining endocannabinoid-analogous FAAs with nanostructured systems may represent a promising strategy for developing new therapeutic approaches for epilepsy. This reinforces the potential of FAAs as candidates for novel anticonvulsant drugs, paving the way for innovative therapies that offer more effective and safer alternatives for epileptic patients..

**Keywords:** *Olea europaea*; Seizure; Epilepsy; Fatty amides; Nanoemulsion; Chemical Kindling; Anticonvulsant potential.

**Acknowledgments:** CNPq, CAPES, UFPA, UNIFAP.

## LISTA DE FIGURAS

---

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Mecanismo intracelular da resposta GPCRs endocanabinoide.....            | 16 |
| <b>Figura 2</b> - Estrutura química da AEA e 2-AG.....                                     | 17 |
| <b>Figura 3</b> - Delineamento experimental do protocolo abrasivo.....                     | 30 |
| <b>Figura 4</b> - Cromatograma do conjunto de amidas graxas obtidas.....                   | 33 |
| <b>Figura 5</b> - Espectro de massa dos compostos oleato de etila e oleoiletanolamida..... | 34 |
| <b>Figura 6</b> - Distribuição do Potencial Zeta das nanos via Zetasizer.....              | 36 |
| <b>Figura 7</b> - Distribuição de tamanho de partícula das nanos.....                      | 37 |
| <b>Figura 8</b> - Evolução epileptogênica dos grupos observados.....                       | 39 |
| <b>Figura 9</b> - Duração das crises convulsivas dos animais.....                          | 42 |
| <b>Figura 10</b> – Latência das crises convulsivas dos animais.....                        | 43 |



## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Limite de tolerância para composição de ácidos graxos em azeites de oliva..... | 21 |
| <b>Tabela 2</b> - Escala de Racine.....                                                          | 31 |
| <b>Tabela 3</b> - Composição dos ácidos graxos do óleo de <i>Olea europaea</i> .....             | 32 |

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                           | <b>7</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                           | <b>9</b>  |
| 2.1 Objetivo geral .....                                                            | 9         |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                                      | 9         |
| <b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>                                                  | <b>10</b> |
| 3.1 A epilepsia como problema de saúde pública.....                                 | 10        |
| 3.2 Tratamento da epilepsia e suas desvantagens.....                                | 11        |
| 3.3 O sistema endocanabinoide e sua relevância no manejo da epilepsia.....          | 15        |
| 3.4 <i>Olea europaea</i> como fonte de ácidos graxos.....                           | 20        |
| 3.5 Uso de sistemas nanoemulsionados para fármacos com ação no SNC.....             | 22        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                  | <b>27</b> |
| 4.1 Obtenção do azeite de oliva.....                                                | 27        |
| 4.2 Obtenção e caracterização das amidas graxas.....                                | 27        |
| 4.3 Preparo e caracterização das nanoemulsões.....                                  | 28        |
| 4.4 Procedimentos éticos.....                                                       | 28        |
| 4.5 Animais.....                                                                    | 29        |
| 4.6 Delineamento experimental.....                                                  | 29        |
| 4.7 Avaliação da atividade anticonvulsivante.....                                   | 30        |
| 4.8 Análise estatística.....                                                        | 31        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                               | <b>32</b> |
| 5.1 Caracterização do conjunto de ácidos graxos e das amidas graxas produzidas..... | 32        |
| 5.2 Caracterização da nanoemulsão carregadas com as amidas graxas.....              | 35        |
| 5.2.1 Avaliação do Potencial Zeta.....                                              | 35        |
| 5.2.2 Distribuição de Diâmetro de Partícula.....                                    | 37        |
| 5.2.3 Índice de Polidispersividade.....                                             | 38        |
| 5.3 Avaliação da Atividade Anticonvulsivante.....                                   | 39        |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>                                                            | <b>49</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                             | <b>50</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

---

A epilepsia se caracteriza como uma condição clínica crônica, manifestada através de convulsões espontâneas recorrentes, advindas de descargas excessivas de neurônios cerebrais nas suas fendas sinápticas, sendo considerada uma alteração temporária e reversível do funcionamento do cérebro (NAZAROV, 2022).

O mecanismo epilético não apresenta uma epistemologia bem definida e que segue o padrão em todos os indivíduos que a possuem. Desse modo, entende-se que seja necessário propor metodologias que permitam estudá-lo, reproduzindo um quadro crônico deste fenômeno bioquímico e, assim, desenvolver tratamentos que possibilitem melhorar a qualidade e a expectativa de vida de todos os pacientes que convivem com essa condição clínica (BEGHI, 2020).

A instrumentalização de princípios ativos que possam tratar o quadro epileptogênico crônico em organismos vivos é vital para a construção de um modelo experimental que permita estudar esse fenômeno químico, simulando o quadro clínico de pacientes acometidos por tal condição, onde a atribuição do pentilenotetrazol (PTZ), em camundongos, sirva como ferramenta para explorar novas abordagens no tratamento da epilepsia (NGOUPAYE, 2022).

Considerando a necessidade de controle das crises epiléticas, é preconizado – como tratamento padrão – a administração de doses diárias de antiepiléticos benzodiazepínicos, os quais auxiliam na manutenção dos níveis do neurotransmissor GABA (Ácido Gama Aminobutírico), inserido na membrana pós-sináptica, que é responsável por realizar a inibição do sistema nervoso central (BELISÁRIO, 2023).

O uso de benzodiazepínicos mantém as convulsões epiléticas sob controle, embora também apresente efeitos adversos indesejáveis, manifestados clinicamente como: perda de memória; diminuição da atividade psicomotora; letargia na capacidade de raciocínio; reação paradoxal; bem como o desenvolvimento de tolerância e de dependência desses fármacos, tornando imprescindível a proposição de novos medicamentos capazes de apresentar os mesmos benefícios dos benzodiazepínicos e, em contrapartida, evitar ou, se apresentar, minimamente os seus efeitos colaterais (AGRAWAL & MULA, 2019).

Desta forma, as amidas graxas, como a oleoiletanolamida (OEA) e a palmitoiletanolamida (PEA) apresentam-se como boas candidatas, pois são moléculas bioativas análogas aos endocanabinoides, que exercem efeitos neuromoduladores através de mecanismos

semelhantes aos da anandamida e do 2-AG, interagindo com os receptores canabinóides CB1 e CB2, atuando de maneira indireta no sistema endocanabinoide, modulando a excitabilidade neuronal por meio da regulação de canais iônicos e da liberação de neurotransmissores (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020). Quando se ligam aos receptores CB1, localizados predominantemente em terminações pré-sinápticas, essas amidas graxas inibem a liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato. Ao interferirem nos canais de cálcio voltagem-dependentes, diminuem o influxo de cálcio nas terminações nervosas. Essa redução no cálcio impede a exocitose das vesículas sinápticas contendo neurotransmissores, o que diminui a transmissão sináptica e, conseqüentemente, a excitabilidade dos neurônios (KUMAR *et al.*, 2023).

Configurado como excelentes candidatos à atividade neuroprotetora com potencial antiepilético, os ácidos graxos que passaram por processo de amidação para a obtenção de amidas graxas (oriundas do azeite de oliva), destacam-se por desempenharem papel análogo aos receptores endocanabinoides CB1, localizados principalmente no Sistema Nervoso Central, os quais estão diretamente relacionados à excitabilidade neuronal, através da modulação da atividade do canal de potássio e de cálcio (influxo de íons), o que reduz a entrada sináptica recebida por neurotransmissores, mecanismo esse chamado como inibidor pré-sináptico, por regular a liberação desses neurotransmissores (LAZARINI-LOPES & SILVA-CARDOSO, 2022).

Espera-se, com este trabalho, desenvolver amidas graxas associadas a uma nanoemulsão potencialmente similar aos benzodiazepínicos mais comumente utilizados no tratamento de epiléticos crônicos e ainda minimizar os efeitos colaterais produzidos por estes. Ao mesmo tempo em que é mantido seu potencial farmacoterapêutico no controle da doença, trazendo maior estabilidade clínica ao paciente, melhorando a qualidade e expectativa de vida deste.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito anticonvulsivante de amidas graxas análogas a endocanabinoides e suas nanoformulações em um modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Semi-sintetizar amidas graxas análogas a endocanabinoides a partir dos triglicerídeos do óleo de *Olea europaea*;
- Preparar uma nanoemulsão a partir das amidas graxas semi-sintetizadas;
- Caracterizar as amidas graxas e as nanoemulsões produzidas;
- Investigar o potencial anticonvulsivante das amidas graxas e do seu produto nanoemulsionado em camundongos epiléticos, sensibilizados com pentilenotetrazol (PTZ).

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

---

#### 3.1 A epilepsia como problema de saúde pública

Anualmente, o dia 26 de março é lembrado como o Dia Mundial de Conscientização sobre a Epilepsia. Essa iniciativa global pretende, por meio desta data, reduzir o estigma associado à epilepsia, sensibilizando profissionais da saúde e da sociedade em geral sobre os diferentes aspectos da epilepsia, suas causas, tratamentos e a importância do apoio àqueles que convivem com essa condição clínica, além de destacar os problemas que esse distúrbio neurológico pode causar. A epilepsia, ainda sem cura, não apresenta uma epistemologia definida e que siga um padrão em todos os indivíduos acometidos por essa doença. Dentre as causas mais comuns relacionadas ao surgimento desta, podem estar: lesões cerebrais; infecções oriundas de doenças como meningite ou neurocisticercose; acidentes vasculares cerebrais e doenças neurodegenerativas (Alzheimer), além de outros fatores como histórico familiar, apontado como gatilho, para o desenvolvimento desse caso clínico (MILLOGO *et al.*, 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia, essa situação se apresenta como um problema urgente de saúde pública, que exige atenção e implementação de ações econômicas, sociais e políticas por parte dos órgãos reguladores da garantia dos direitos constitucionais à saúde, como o Sistema Único de Saúde (SUS), no Brasil (DA PAZ, 2021).

Somente na América Latina, segundo dados da OMS, mais de 8 milhões de pessoas sofrem com essa condição. E é alarmante saber que mais da metade desses pacientes não recebem o devido tratamento, como mostra a Organização Pan-Americana da Saúde (ALVA-DÍAZ *et al.*, 2021).

Assim, entende-se que é dever do Estado promover o tratamento da epilepsia para assegurar uma melhoria significativa na qualidade e expectativa de vida daqueles que enfrentam esse inimigo velado (SANTOS; CHACÓN; ROMANIDY, 2019).

A manifestação e desenvolvimento da síndrome epilética e convulsiva, conceitua-se como uma alteração temporária e reversível do funcionamento do cérebro. Suas manifestações clínicas não estão relacionadas diretamente a fatores como febre, abusos em geral, uso de drogas e distúrbios metabólicos. Em uma crise epilética (durante segundos ou minutos) porções neurais emitem pulsos nervosos errôneos, desnecessários e sem sinalização química ou fisiológica, podendo manifestar-se de maneira restritiva a esse local de atividade ou espalhar-

se ao redor de outras zonas neurais, atingindo regiões como córtex e o hipocampo (NOLASCO; FERREIRA; RIVERO, 2020).

A epilepsia, como disfunção fisiológica nervosa, pode ocorrer de maneira localizada, considerada como crise parcial simples, levando o paciente a apresentar quadros de sensações estranhas, como interpretação incorreta da percepção de seus movimentos ou movimentos descontrolados e repetitivos em uma parte do corpo, com casos na literatura em que o paciente pode apresentar um medo repentino ou condição fisiológica desconfortável, motivos esses não atribuídos a algo em específico, como, por exemplo, um desconforto no estômago, seguido de aumento de motilidade intestinal (THIJS *et al.*, 2021).

A evolução desse quadro pode causar uma “crise de ausência”, na qual o indivíduo entra em estado de suspensão de suas funções motoras e neurológicas voluntárias; podendo, num curto período, retomar a consciência e recobrar suas atividades motoras normais, bem como as neurológicas (SEN, 2020). Ao progredir para uma crise parcial complexa, o indivíduo experimenta uma perda total da consciência, acompanhada pela incapacidade de se manter ereto ou em pé, resultando em queda ao solo. Esse episódio tem uma duração breve e, após o retorno da consciência, o paciente pode experimentar confusão e déficit de memória em relação ao que ocorreu durante a crise epilética, assim como em relação aos momentos que a precederam (KAROLY *et al.*, 2021).

A progressão e a falta de controle da condição epilética podem levar a uma crise tônico-clônica. Esta condição, na sua fase inicial, manifesta-se como crise clônica, apresentando perda de consciência, seguida de queda ao solo e rigidez do corpo e de suas extremidades, apresentando movimentos rítmicos dos membros e tremores intensos, nos quais o paciente pode vir a se debater. Essas crises podem variar em duração, algumas sendo breves, outras mais prolongadas, onde crises com duração superior a 30 minutos, com ou sem recuperação da consciência, são consideradas altamente perigosas, podendo afetar funções cerebrais vitais e, dependendo da intensidade dos tremores e dos movimentos de se debater, o paciente pode vir a sofrer lesões ou ir à óbito. (LÖSCHER *et al.*, 2020).

### **3.2 Aspectos gerais do tratamento das epilepsias**

O tratamento padrão para controlar a sintomatologia dos quadros epiléticos e/ou atenuá-los não se concentra diretamente no momento das crises, mas na prerrogativa de preveni-los. Isso é alcançado mediante a administração de medicamentos que impedem descargas elétricas anormais, capazes de desencadear um descompasso neurológico. Medicamentos como o Diazepam, pertencente à família dos benzodiazepínicos (BDZ), por exemplo, são utilizados

para controlar esses quadros epiléticos. (PATHAK; GUPTA; GILHOTRA, 2021).

Outras abordagens farmacológicas também estão disponíveis, além da administração ou da associação concomitante dos benzodiazepínicos para o manejo da epilepsia, como é o caso dos antiepiléticos, estando inclusos nessa classe terapêutica, a Carbamazepina, o Ácido valpróico, o Topiramato e a Lamotrigina (DE CASTRO, 2021).

Esses medicamentos buscam a modulação da resposta pró-epiléptica através do manejo dos canais de sódio dependentes de voltagem, prolongando sua inativação, reduzindo a excitabilidade neuronal e a propagação das descargas epileptiformes. Esses medicamentos também podem realizar a inibição dos canais de cálcio do tipo T, reduzindo assim a liberação de neurotransmissores excitatórios e diminuindo a excitabilidade neuronal, além efetuarem a modulação dos canais de potássio, aumentando sua condutância hiperpolarizando as células neuronais e reduzindo a excitabilidade (LÖSCHER *et al.*, 2020). Os efeitos adversos dessa classe terapêutica são tão presentes quanto seus efeitos farmacológicos de interesse, apresentando efeitos indesejáveis como: tontura, letargia, tremor, ganho de peso, sonolência, irritabilidade e dificuldade de concentração (MAGALHÃES *et al.*, 2024).

Mais uma classe menos presente, mas que também é de grande importância para o manejo da epilepsia e suas consequências para a saúde do indivíduo são os barbitúricos, sendo o Fenobarbital um dos principais representantes. O mecanismo de ação deste está principalmente relacionado ao aumento da atividade do GABA no cérebro, ou ainda, ao aumento da sua disponibilidade, através da modulação dos receptores GABA-A. Este mecanismo é muito semelhante ao dos benzodiazepínicos, entretanto se ligam a um ponto diferente, aumentando a duração da abertura do canal de cloro quando o GABA se liga ao receptor (MADADZADEH, 2021). Um mecanismo de ação secundário também está registrado na literatura, onde os barbitúricos executam também a inibição da transmissão excitatória, antagonizando os receptores de glutamato, contribuindo ainda mais para seu efeito anticonvulsivante (BELÉM, 2024). Os efeitos adversos causados pela administração desta classe terapêutica estão relacionados principalmente aos efeitos de sedação excessiva que leva à sonolência durante longos períodos, confusão e, consequente, diminuição da coordenação motora. Os efeitos crônicos vão além destes efeitos iniciais, também sendo registradas a depressão respiratória, dependência e a síndrome de abstinência e tolerância.

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Epilepsia (PCDTE) (2019) e a Portaria Conjunta nº 17, de 21 de junho de 2018, é possível afirmar que o objetivo principal do tratamento da epilepsia é melhorar a qualidade de vida do paciente, ao mesmo tempo em que são propostas recomendações farmacológicas (ou não) fundamentadas em evidências de eficácia



e efetividade para o manejo dessa condição clínica.

Este mesmo protocolo caracteriza o tratamento da epilepsia como: *“Propiciar a melhor qualidade de vida possível para o paciente, pelo alcance de um adequado controle de crises, com um mínimo de efeitos adversos, buscando, idealmente, uma remissão total das crises”*. Importante frisar que, para o ponto alto de remissão a ser alcançado, um tratamento medicamentoso é essencial; entretanto, também está disposto no PCDTE outras abordagens que não se munem apenas de maneira farmacologicamente terapêutica e sim de um tratamento conjunto com outras linhas não farmacológicas.

Nas abordagens não terapêuticas, existem opções como a intervenção cirúrgica, estando principalmente relacionada a pacientes que apresentam resistência aos principais medicamentos preconizados para o tratamento, onde é realizada a estimulação do nervo vago, permitindo a ativação das fibras que se projetam ao núcleo do trato solitário, conectando-se ao córtex e a outras estruturas do tronco cerebral (ROSAL, 2024), possivelmente modulando estímulos excitatórios sobre o sistema nervoso simpático.

Outra abordagem conhecida e que pode ser adotada é a utilização da dieta cetogênica, na qual se busca mimetizar, através da ingestão de alimentos ricos em gorduras e proteínas, com baixos teores de carboidratos, os efeitos bioquímicos do jejum, mantendo um estado de anabolismo cetolítico constante (D'ASCANIO; FERREIRA; JORGE, 2021), onde o/ corpo, em vez de utilizar a glicose (proveniente de carboidratos) como principal fonte de energia, passa a utilizar os corpos cetônicos derivados da quebra de gorduras, quando a ingestão de carboidratos é drasticamente reduzida, os níveis de glicose no sangue diminuem, e o corpo precisa buscar fontes alternativas de energia para manter as funções metabólicas (ANDRADE, 2022). O fígado, nesse cenário, começa a quebrar os ácidos graxos em corpos cetônicos, como o beta-hidroxibutirato (BHB), acetoacetato e acetona, que podem atravessar a barreira hematoencefálica e servir como uma fonte de energia eficiente para o cérebro. Este ponto é particularmente relevante porque, normalmente, o cérebro depende quase exclusivamente da glicose para suas necessidades energéticas, sendo incapaz de utilizar ácidos graxos diretamente (D'ASCANIO; FERREIRA; JORGE, 2021).

Na epilepsia, acredita-se que esse estado de cetose afeta diversos processos neuroquímicos que contribuem para a redução da excitabilidade neuronal, onde os corpos cetônicos têm a capacidade de modular a neurotransmissão ao aumentar a produção de GABA (ácido gama-aminobutírico) (ROSAL *et al.*, 2024), o principal neurotransmissor inibitório do cérebro, ao mesmo tempo em que diminuem a excitação mediada pelo glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório. Esse efeito pode reduzir a hiperexcitabilidade neuronal,

que é característica das crises epiléticas.

Ao se considerar as diretrizes terapêuticas para adultos com epilepsia focal, por exemplo, nota-se a recomendação de fármacos que incluem Carbamazepina, Fenitoína e Ácido Valpróico como sugestões medicamentosas. Para o tratamento de crianças diagnosticadas com este tipo de epilepsia, é indicada a administração de Carbamazepina. Já no tratamento de idosos com o mesmo diagnóstico, a recomendação é o uso de Lamotrigina e a Gabapentina (DE FARIAS, *et al.*, 2024).

A administração do Diazepam, assim como seus respectivos análogos farmacêuticos (Clonazepam, Lorazepam, Alprazolam, Oxazepam, Nitrazepam, Bromazepam, Flunitrazepam) representam vias iniciais e tradicionais de tratamento para pacientes que já manifestaram as primeiras crises epiléticas e estão sob avaliação clínica para diagnóstico. Esses pacientes estão designados a grupos medicamentosos específicos para controle de doenças conforme a Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde - CID 10.

É importante frisar que esses fármacos podem induzir à depressão do sistema nervoso central, sendo utilizados como tranquilizantes, resultando em um estado de sedação, seguido de sonolência. São medicamentos classificados como sedativo-hipnóticos, prescritos para o tratamento de quadros epiléticos convulsivos, além de serem prescritos, frequentemente, para o tratamento de quadros clínicos de ansiedade crônica, insônia e agressividade persistentes em pacientes com esquizofrenia. São medicamentos de uso versátil, sendo administrados em diferentes condições clínicas para além da epilepsia. (LOMBROSO, 2020).

Para as consequências da administração de benzodiazepínicos no quadro da epilepsia, o seu funcionamento visa evitar descontrole da liberação de neurotransmissores nas fendas sinápticas que desempenham resposta nervosa, seja na forma de aumento de sensibilidade e recrutamento de agentes sensibilizantes (via proteína G), seja pelo aumento das vias de sinalização neuronal da intensificação de atividade intestinal (que causa aumento na defecação) e sinalização para as vias nervosas do estado de “luta ou fuga” (FERNANDO, 2021).

Apesar dos possíveis benefícios associados ao seu uso no tratamento de condições médicas específicas, medicamentos sempre carregam consigo o potencial de causar efeitos colaterais indesejados ao organismo humano. Os benzodiazepínicos não fogem a essa realidade e podem afetar negativamente a função cognitiva e gerar lapsos de memória, bem como impactar significativamente o desempenho no ambiente profissional devido à propensão dessa classe de medicamentos causar sonolência excessiva em pacientes.

Outro ponto importante apontado pelas autoridades de saúde e relatados na literatura

clínica é a dependência causada pela administração de benzodiazepínicos (em especial o Diazepam), devido aos seus efeitos colaterais, que acabam comprometendo a qualidade de vida de seus usuários, especialmente daqueles que sofrem com doença respiratória obstrutiva; não indicados a pacientes com doença hepática e renal (BRIGO & LATTANZI, 2020). Desta forma, outras vias têm sido investigadas como possíveis alvos no controle das convulsões, a exemplo do sistema endocanabinoide, podendo ser uma importante vertente de estudo de novos agentes terapêuticos.

### **3.3 O sistema endocanabinoide no manejo da epilepsia**

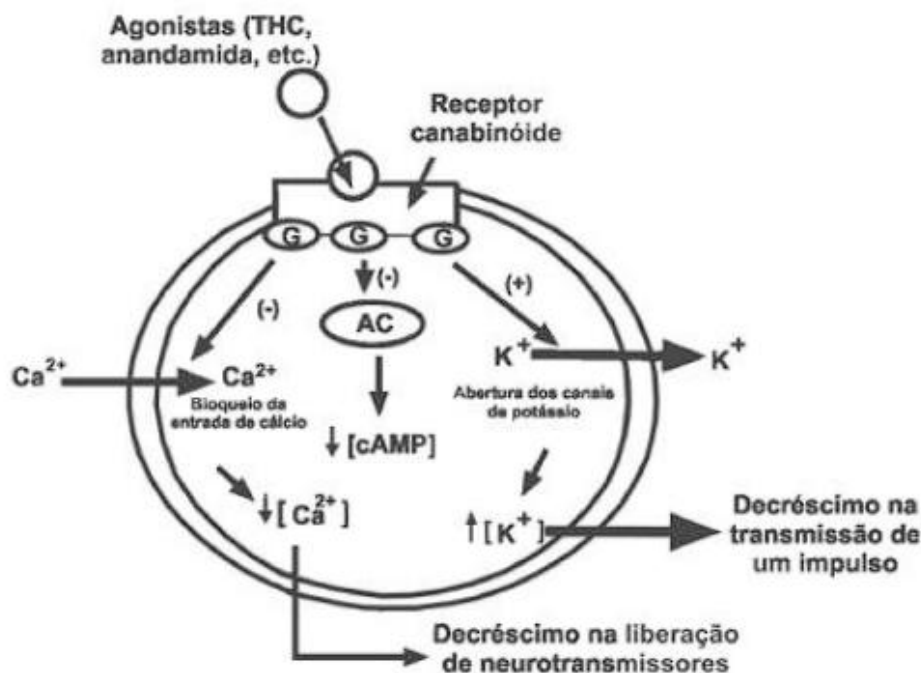
O sistema endocanabinoide é uma via de ativação do sistema nervoso central (SNC), coordenada por neurotransmissores que agem como um regulador de vastos processos fisiológicos do corpo humano como a inflamação, excitação neuronal, apetite e metabolismo (KWAN CHEUNG *et al.*, 2019). Esses neurotransmissores baseiam-se em lipídios, ligando-se a uma série de receptores presentes nas membranas celulares, sendo estes os receptores canabinoides, divididos em CB1 e CB2 (MORANO *et al.*, 2020).

Os receptores endocanabinoides do tipo CB1 são, majoritariamente, encontrados no SNC, que controlam os níveis e a atividade de expressão de outros neurotransmissores, permitindo a regulação de qualquer atividade de sistema que precise de um trato metódico, seja por meio da sinalização da temperatura corporal para a manifestação de febre ou necessidade de alimentação, através da fome (ROCHA *et al.*, 2020). Para os receptores CB2, é possível encontrá-los no sistema nervoso periférico e presentes em células do sistema imune, controlando e servindo como moduladores da expressão imunológica, inflamatória e da dor (LI *et al.*, 2020).

No tocante à dinâmica intracelular intrincada que desempenha as respostas biológicas oriundas das vias dos receptores endocanabinoides, seu papel é desempenhado pela sinalização associada a receptores acoplados à proteína G (GPCRs), podendo ser eles G<sub>0</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>q</sub> e G<sub>k</sub>, desempenhando papel crucial na transmissão de sinais a partir do receptor até o interior da célula, desencadeando uma série de respostas celulares externas às células, nesse caso, inibidoras do SNC (SILVA *et al.*, 2021). As proteínas G<sub>0</sub> e G<sub>i</sub> são, em especial, as mais acionadas pela via dos endocanabinoides, sendo uma subclasse de proteínas G heterotriméricas inibitórias que, quando ativadas, inibem a atividade da adenilato ciclase, reduzindo assim a produção de AMP cíclico (cAMP) dentro da célula, mediando respostas celulares específicas através da modulação de vias de sinalização intracelular, como um prolongamento da abertura dos canais de cloro e um aumento da modulação dos receptores GABA-A inibitórios

(GONÇALVES, 2022), como demonstrado pela Figura 1. Na ativação das proteínas G<sub>0</sub> e G<sub>i</sub>, pela via dos endocanabinoides, não apenas ocorre a sinalização para os receptores GABA-A, como mencionado, como também ocorre concomitantemente um efeito crucial sobre os receptores de glutamato, particularmente os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (LIMA *et al.*, 2022), sendo o glutamato o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, com regulação ideal para o equilíbrio entre excitação e inibição neuronal. Quando as proteínas G inibitórias são ativadas, elas desencadeiam uma série de eventos intracelulares que, entre outras coisas, resultam na inibição da liberação de glutamato dos terminais pré-sinápticos. Esse mecanismo se dá pela supressão da atividade da adenilato ciclase e pela redução dos níveis de AMP cíclico (cAMP) (GUEDES *et al.*, 2020) que, por sua vez, diminui a ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem, com menos cálcio entrando na célula, a exocitose de vesículas contendo glutamato é atenuada, resultando em uma menor excitação sináptica.

Figura 1: Mecanismo intracelular da resposta GPCRs endocanabinoide



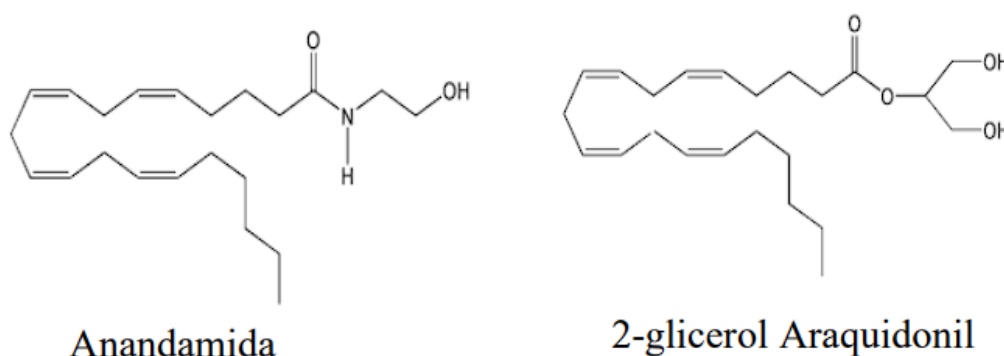
Fonte: GUNTER; ALEXANDER; KUBRUSLY, 2018.

Nas características farmacológicas desta via, temos que a sinalização endógena ou exógena de caráter análoga por agentes farmacologicamente ativos, interagem de maneira vigorosa com sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos e, também, glutamatérgico-gabaérgicos, influenciando funções como humor, ansiedade e percepção da dor,

desempenhando atividades analgésicas e anti-inflamatórias, bem como no tratamento de epilepsias refratárias e outros distúrbios neurológicos devido às suas propriedades anticonvulsivantes e neuroprotetoras (AQUINO, 2021).

Os endocanabinoides, como a anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG), como listados na Figura 2, são neurotransmissores lipídicos produzidos sob demanda pelas células do sistema nervoso central (SNC), em resposta aos estímulos fisiológicos mais diversos, como, por exemplo: estresse, lesões, necessidade de se alimentar, sono e fadiga. Entretanto, diferentemente dos neurotransmissores convencionais que são armazenados em vesículas sinápticas, os endocanabinoides são sintetizados a partir de precursores lipídicos das membranas celulares, como os fosfolípidios, e liberados imediatamente após sua produção, atuando principalmente através da ativação dos receptores canabinoides CB1 e CB2, sendo os receptores CB1, concentrados em áreas envolvidas na modulação da memória, dor, apetite, controle motor e excitabilidade neuronal (SANTOS *et al.*, 2023). Quando os endocanabinoides se ligam a esses receptores, inibem a liberação de neurotransmissores excitatórios e modulam os inibitórios, como glutamato e GABA, respectivamente, promovendo um efeito de modulação sináptica retrógrada, efetuando a manutenção da homeostase sináptica e exercendo efeitos neuroprotetores, sendo um alvo importante na neurofarmacologia para o tratamento de distúrbios neurológicos, como epilepsias e desordens associadas a possíveis citotoxicidades e patologias associadas a estímulos nervosos (RAMOS *et al.*, 2022).

Figura 2: Estrutura química da AEA e 2-AG



Fonte: SILVA, 2020.

O sistema endocanabinoide exerce seu mecanismo de ação através da depressão do SNC (receptores CB1). Já há pesquisas sendo desenvolvidas para realizar a sua aplicação no campo da neurofarmacologia, na forma de fármacos e candidatos a fármacos que possam servir como

moduladores no funcionamento da sinalização neuroquímica que ocorre entre neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos (MARTÍNEZ-AGUIRRE; CINAR; ROCHA, 2021).

Esse fenômeno ocorre através da sinalização do sistema endocanabinoide na polarização e despolarização da membrana dos neurônios sinápticos, reduzindo o influxo de cálcio e bloqueando a atividade dos canais de cálcio dependentes de voltagem; concomitante a isso, as proteínas G, que estão acompanhadas nos receptores canabinoides, também modulam a atividade do canal de potássio, favorecendo uma atividade de depressão das vesículas que liberam os neurotransmissores para as fendas sinápticas. Dessa forma, reduz-se o número de estímulos que essas fendas poderiam gerar (SENN; CANNAZZA; BIAGINI, 2020).

Vale ressaltar que o mecanismo de ação da atividade depressora do SNC, via endocanabinoides, é muito similar à neuromodulação realizada pela via GABA, podendo se inferir que sua expressão farmacologicamente induzida pode contribuir para a qualidade de vida dos indivíduos portadores de síndrome epilética convulsiva (COLANGELI *et al.*, 2022). Enquanto os benzodiazepínicos são utilizados como agonistas dos receptores GABA-R, agonistas dos endocanabinoides que também podem ser fortes candidatos ao desenvolvimento de fármacos que modulam a atividade neural.

Os endocanabinoides (como a anandamida e o 2 - aracdonilglicerol) podem realizar modulação muito similar a dos benzodiazepínicos e não apresentarem grande parte das desvantagens que esta classe de medicamentos apresenta (ZAMBERLETTI; RUBINO; PAROLARO, 2021).

Além dos próprios endocanabinoides, que já demonstram efeito modulador relevante no sistema nervoso central, é disposto na literatura uma ampla gama de produtos naturais que podem ser beneficiados ou biocatalisados que representam enorme potencial fisiológico ao serem tidos como análogos sintéticos e naturais desses compostos. Estes análogos buscam mimetizar as ações dos endocanabinoides, interagindo com os mesmos receptores (CB1 e CB2), com o objetivo de ampliar ou reproduzir seus efeitos no controle de convulsões e epilepsias, oferecendo uma via promissora para intervenções terapêuticas, ampliando o espectro de atuação sem as limitações observadas em tratamentos convencionais (SOUSA; SLULLITEL; SERRA, 2023).

À luz desse nexos causal, produtos análogos a endocanabinoides apresentam efeitos terapêuticos desejáveis quando considerada a relação entre endocanabinoides e a sua deficiência no processo da epileptogênese (MECCARIELLO, 2020), elencando como ótimo exemplo a oleiletanolamida, uma amida graxa obtida através de amidação com o ácido oleico como seu precursor, desempenhando forte papel neuroprotetor (MAYA-LÓPEZ *et al.*, 2020).

Este processo de amidação trata-se de uma biocatálise, processo químico importante onde uma amina (oriunda de uma etalonamina presente no meio reacional) reage com um ácido carboxílico ou derivado de ácido carboxílico (oriundo dos ácidos graxos presentes no meio reacional) para formar uma amida graxa. Na biocatálise, enzimas são utilizadas para facilitar essa reação em condições suaves, específicas e ambientalmente amigáveis, enzimas essas de microrganismos como a *Candida antarctica*-B (CAL-B), uma das enzimas mais utilizadas em reações de amidação devido à sua estabilidade e à versatilidade, ou ainda, ao fato de enzimas terem alta especificidade para seus substratos, o que minimiza a formação de subprodutos indesejáveis (LIMA, 2018).

O processo de amidação compreende uma série de etapas. Quando se utiliza lipases de CAL-B, a preparação dos reagentes se inicia escolhendo o ácido graxo que servirá de substrato de interesse, juntamente com a etalonamina, sendo que a adição de solventes anidros, como hexano, isooctano ou solventes eutéticos profundos, podem ser utilizados para melhorar a solubilidade dos reagentes (e não interferem na atividade enzimática). Após esta etapa, ocorre a ligação ao substrato, a CAL-B se liga ao ácido graxo e à etanolamina no seu sítio ativo, formando um intermediário acil-enzima, ocorrendo então a transferência do grupo acila, com a etanolamina atacando o intermediário acil-enzima, resultando na formação da amida e liberação da enzima (LIMA; ANJOS; PORTO, 2022).

Quando esse processo biocatalítico é utilizado com ácidos graxos que podem originar análogos a endocanabinoides, é possível sugerir novos candidatos a fármacos como uma alternativa promissora para a síntese de compostos bioativos com aplicações terapêuticas significativas (SILVA *et al.*, 2024).

Em ensaio proposto por Krishna Kumar *et al* (2023), foi demonstrado que os análogos a endocanabinoides efetuam a ativação do sistema CB1, o qual desempenha papel crítico na manutenção da homeostase e com envolvimento na regulação da neurotransmissão e da plasticidade sináptica. Este resultado demonstra que análogos a endocanabinoides oriundos de ácidos graxos podem ser uma excelente matriz ao desenvolvimento de novos fármacos já que apresentam resposta fisiológica quando associados à biocatálise resultante em amidas graxas.

Outros estudos ligados a este grupo de pesquisa também já identificaram atividade anticonvulsivante de amidas graxas (AG), produzidas através de lipases bacterianas, eficazes na melhoria dos parâmetros comportamentais da convulsão quimicamente induzida em camundongos e com mecanismo de ação atuando no receptor GABA-A (Oliveira *et al.* 2020). Este estudo, em especial, demonstrou que o uso de óleos vegetais podem ser excelentes fontes de componentes que, ao passarem por uma biocatálise, possam ser utilizados para o tratamento

de convulsões no SNC.

A utilização de óleos vegetais para a produção de análogos de endocanabinoides através da biocatálise tem ganhado destaque devido ao potencial terapêutico desses compostos no SNC. Em particular, as amidas graxas (AG) têm mostrado efeitos promissores, como atividades anticonvulsivantes e moduladoras de neurotransmissores.

Uma matriz vegetal de grande importância tanto econômica quanto medicinal é o azeite de oliva obtido da oliveira, a *Olea europaea*, onde seus constituintes são majoritariamente compostos por ácidos graxos em abundância, apresentando um *pool* riquíssimo para o desenvolvimento de pesquisas em busca de novos candidatos a fármacos.

### **3.4 *Olea europaea* como fonte de ácidos graxos**

A oliveira, conhecida como uma das mais antigas espécies frutíferas utilizadas pelo homem, é classificada como uma angiosperma dicotiledônea, incluída na família botânica das *Oleaceae*, com distribuição ao longo de regiões tropicais, mediterrâneas e de climas temperados ao redor de todo o mundo (FARAONE *et al.*, 2021), suas árvores são perenes e de produção contínua, com as espécimes mais jovens possuindo tronco cilíndrico, liso e áspero, e com o avançar dos anos, vão tomando característica esburacada, alcançando altura média de 5 a 20 metros (ACAR-TEK & AĞAGÜNDÜZ, 2020).

Importante economicamente, a azeitona também é notável por seu fruto ser cultivado ao longo do sul da Europa, como: Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia, cujo clima é propício para o crescimento dessa espécie vegetal (ZHU *et al.*, 2019). Também é na Europa onde se encontram os maiores produtores globais de azeitonas, alcançando a marca de 19 milhões de toneladas, em 2018. São mais de dez milhões de hectares ocupados com pomares de oliveiras. Quase toda a produção mundial das azeitonas (90%) destina-se à produção de azeites, uma fonte saudável e de baixo custo de gorduras, ácidos oleicos, antioxidantes e com propriedades terapêuticas ativas (ROMANI *et al.*, 2019).

O azeite de oliva é um dos principais produtos oriundos da azeitona, sendo obtido a partir do esmagamento e prensagem a frio das azeitonas maduras, passando por diferentes estágios de maturação, impactando diretamente no aroma, acidez e sabor desses óleos (ROUSSEAU *et al.*, 2020). Esse azeite é basicamente constituído por ácidos graxos monoinsaturados, ácido oleico, de maior proporção (conhecido como ômega 9). A redução da fração LDL do colesterol consiste em uma das principais funções desse ácido graxo (EL QARNIFA; EL ANTARI; HAFIDI, 2019).

A Tabela 1 apresenta a composição química e o perfil dos ácidos graxos que compõem



o azeite de oliva (DIAS, 2022):

Tabela 1: Limite de tolerância para composição de ácidos graxos em azeites de oliva

| COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) |                        |
|---------------------------------|------------------------|
| <b>GRUPO</b>                    | Azeite de oliva virgem |
| <b>TIPO</b>                     | Virgem/extravirgem     |
| <b>C14:0</b>                    | Menor ou igual a 0,05  |
| <b>C16:0</b>                    | 7,5 - 20,0             |
| <b>C16:1</b>                    | 0,3 - 3,5              |
| <b>C17:0</b>                    | Menor ou igual a 0,3   |
| <b>C17:1</b>                    | Menor ou igual a 0,3   |
| <b>C18:0</b>                    | 0,5 - 5,0              |
| <b>C18: 1N-9C</b>               | 55,0 - 83,0            |
| <b>C18: 2N-6C</b>               | 3,5 - 21,0             |
| <b>C18: 3N-3 (LNA)</b>          | Menor ou igual a 1,0   |
| <b>C18: 1N-7</b>                | Menor ou igual a 0,5   |
| <b>C22:0</b>                    | Menor ou igual a 0,3   |
| <b>C24:0</b>                    | Menor ou igual a 0,2   |

Fonte: SANTOS, 2020

O efeito antioxidante do azeite de oliva é uma de suas características mais relevantes, sendo ainda apreciado pelos consumidores por também conter vitamina A, E e K, além de compostos fenólicos e flavonoides (RIZWAN *et al.*, 2019). Esses óleos podem ser encontrados na natureza na espécie de triglicéridos, havendo na sua formação a ligação de três grupos de hidroxila do glicerol em três ácidos graxos, através de um processo chamado esterificação; determinando, assim, o índice de qualidade desses óleos, tomando como base a concentração do conteúdo de ácidos graxos livres (ROUSSEAUX *et al.*, 2020).

De acordo com Sánchez-Rodríguez (2019), há uma correlação entre os tipos de lipídios encontrados nos óleos utilizados para alimentação, classificados como saturados e insaturados. Os lipídios insaturados são reconhecidos por proporcionar benefícios à alimentação e, por conseguinte, à saúde daqueles que os consomem, enquanto os saturados são associados a efeitos opostos, sendo maléficos para a saúde, em especial quando considerados lipídios oriundos de

frituras, onde o processo pode gerar espécies reativas de oxigênio, que atacam as estruturas celulares do organismo (CHAUDHARY *et al.*, 2023).

Os óleos vegetais são alimentos altamente calóricos e, por isso, devem ser consumidos com moderação, o teor de ácidos graxos monoinsaturados nesses óleos está diretamente relacionado ao seu valor nutricional e econômico. Assim, à medida que a disponibilidade para o consumo aumenta, também ocorre um aumento proporcional no custo de obtenção desses produtos, considerando-se o fato de que os óleos vegetais com maiores teores de ácidos graxos monoinsaturados não apenas apresentam sabores e características organolépticas mais agradáveis, mas também oferecem benefícios nutricionais superiores. (SAKAR *et al.*, 2022).

As gorduras naturais encontradas no azeite de oliva oferecem benefícios significativos para a saúde devido ao seu potencial antioxidante, melhorando a saúde daqueles que o consomem. Esse potencial antioxidante é atribuído à presença de compostos fenólicos e flavonoides que atuam como sequestradores de agentes eletronicamente carregados como as espécies reativas de oxigênio (oxidantes). O mecanismo proposto para essa ação antioxidante se relaciona às duplas ligações feitas ao longo dos seus esqueletos carbônicos que servem como locais favoráveis para a entrada das espécies com cargas reativas, as quais interagem com esses grupos de agentes oxidantes; alcançando, então, a estabilidade do produto, deixando de representar um risco ao meio onde estavam presentes; contribuindo, assim, para neutralizar sua atividade oxidante, tornando o azeite uma opção saudável na dieta (NAVAJAS-PORRAS *et al.*, 2020).

### **3.5 Uso de sistemas nanoemulsionados para fármacos com ação no SNC**

A integração de tecnologias farmacêuticas no processo de desenvolvimento de novos candidatos a fármacos é crucial para sua formulação e aprimoramento. Atualmente, no mercado, existe uma ampla variedade de produtos biologicamente ativos que desempenham funções diversas em uma extensa gama de protocolos de tratamento clínico. Essa diversidade de opções destaca a importância de incorporar avanços tecnológicos para otimizar a eficácia e segurança dos medicamentos em desenvolvimento. (WELBER & DA ROSA, 2021).

Aplicações de sistemas nanoemulsionados, enquanto tecnologia em produtos farmacêuticos, oferecem significativos benefícios na eficácia de preservação e melhoria da estabilidade dos fármacos, proporcionando um melhor controle na liberação do medicamento no momento de sua administração aliado ao aumento da solubilidade deste em diferentes meios

biológicos, protegendo-o da degradação enzimática, o que possibilita uma maior resistência nas variações de temperatura e pH. Essas características destacam a eficácia e a versatilidade dos sistemas nanoemulsionados na formulação de produtos farmacêuticos, exemplificando que esse fármaco, durante seu armazenamento em ambiente fisiológico produz nanoemulsões que operaram com partículas na escala de tamanho entre 20 e 200 nanômetros, estabelecendo uma maior superfície de contato com o ambiente biológico, permitindo ter uma área de superfície expandida, facilitando a execução de sua atividade terapêutica (KARAMI; ZANJANI; HAMIDI, 2019).

Para a obtenção dessas nanoemulsões, as técnicas de produção podem ser divididas em dois grandes grupos: métodos de alto e baixo aporte de energia. Na produção de nanoemulsões com baixo aporte de energia, como as utilizadas em nossos estudos, recorre-se a processos que aproveitam a energia interna do sistema, como a emulsificação espontânea, inversão de fase e o método PIT (inversão de fase provocada pela temperatura). Esses métodos, ao contrário dos que envolvem alta energia, como a sonicação ou homogeneização de alta pressão, evitam a degradação de componentes sensíveis ao mesmo tempo que são menos agressivos ao princípio ativo (WANG *et al.*, 2023).

Essa qualidade das nanoemulsões produzidas por métodos de baixo aporte de energia está diretamente relacionada à homogeneidade das gotículas formadas e à estabilidade do sistema, que depende de parâmetros como temperatura, pH e a natureza dos surfactantes utilizados. Dentro do amplo espectro de caracterização desses sistemas, estão técnicas como espalhamento de luz dinâmico (DLS), que permite medir o tamanho das partículas e sua distribuição, além de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), usadas para avaliar a morfologia das nanoemulsões formadas. Ambas as análises são necessárias para demonstrar que as partículas formadas na escala de nanômetros, apresentam distribuição homogênea e estabilidade prolongada, oferecendo maior biodisponibilidade e controle da liberação do fármaco (REN, *et al.*, 2021).

Ao utilizar nanoemulsões estáveis com gotículas de tamanho reduzido, a área superficial de interação com o meio biológico aumenta significativamente, o que melhora a absorção do medicamento e, por conseguinte, sua eficácia terapêutica. Assim, o método de produção de baixo aporte de energia desempenha um papel crucial na otimização da qualidade da nanoemulsão e nas suas capacidades terapêuticas no SNC (MALODE *et al.*, 2021).

Quando se menciona o desenvolvimento de fármacos, cuja atividade biológica se dá no SNC, o primeiro desafio pensado é da superação da principal barreira de proteção do próprio organismo, a barreira hematoencefálica (SILVA *et al.*, 2022). É sabido que essa camada

protetora fornece ao SNC certa robustez à presença de substâncias tóxicas, bactérias, toxinas e produtos químicos (bem como fármacos), impedindo que elementos exógenos ao organismo entrem em contato com as estruturas celulares do cérebro (FONSECA-SANTOS, 2019).

A presença de células especializadas (chamadas de astrócitos) formam uma barreira física entre os vasos sanguíneos e o tecido cerebral, sendo marcadas pela existência de junções apertadas entre as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, limitando a difusão de substâncias entre o sangue e o tecido cerebral; servindo, inclusive, como transportadores de efluxo (principais relacionados à retenção de fármacos da corrente sanguínea antes que elas adentrem nos epitélios celulares). Essas características são as que representam desafios no tratamento de doenças do sistema nervoso central (BIANCO, 2019).

Muitos excelentes candidatos a fármacos que são aprovados pelas análises preliminares *in silico* encontram o seu algoz no momento da administração frente à transpassagem da barreira hematoencefálica. Nesse ínterim, muitos dos fármacos que não apresentam os devidos níveis de solubilidade, ou ainda a devida afinidade e incorporação com proteínas de passagem, têm o seu desenvolvimento interrompido ou retornado para estágios iniciais de otimização de estrutura carbônica, visto que esse é um pré-requisito básico para o avanço do fármaco até a chegada no seu sítio em quantidade suficiente, desempenhando assim a atividade biológica adequada e desejada (LOPES, 2022). Este é um dos principais problemas que afligem o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com atividade no SNC, além da presença de outros efeitos indesejáveis que acabam sendo consequência da própria presença desses princípios ativos em contato com as membranas cerebrais, a citotoxicidade do próprio fármaco (PEREZ *et al.*, 2021).

Uma tecnologia farmacêutica que concilia vantagens e amplo espectro de aplicação é o uso de nanoemulsões carreadoras de fármacos nas mais diversas vias biológicas. Por se tratar de dispersões coloidais constituídas por dois líquidos imiscíveis, estabilizados por agentes tensoativos. Esse veículo pode alçar agentes terapêuticos hidrofóbicos por rotas paracelulares ou transcelulares de maneira que seja possível evitar que essas substâncias possam ser aprisionadas, posteriormente, sofrendo hidrólise e degradação enzimática, sendo verdadeiro também o inverso.

Uma importante característica para ação farmacológica é a solubilidade de um fármaco, em sua matriz ou nos meios e tecidos que o antecedem para o efeito desejado, há uma baixa concentração disponível do princípio ativo (SALATA & LOPES, 2022), acarretando na incapacidade de cumprir sua atividade terapêutica e necessitando de doses maiores para atingir uma atividade farmacológica adequada, enquanto se evita o aparecimento da condição tóxica

do medicamento (KARAMI; ZANJANI; HAMIDI, 2019).

O melhoramento nas interações de membrana também é imperioso para elucidar quais serão as estruturas e zonas farmacofóricas que terão afinidade com as estruturas celulares (CUNHA, 2021). Com a modulação dos transportadores de efluxo de fármacos (RAWAL; PATEL; PATEL, 2022), as nanoemulsões se mostraram poderosas e aliadas a essas atividades (KARAMI; ZANJANI; HAMIDI, 2019).

Os sistemas nanoemulsionados têm sido amplamente explorados como veículos promissores para o aprimoramento da biodisponibilidade e eficácia de fármacos naturais e sintéticos com ação no sistema nervoso central (SNC). Produtos naturais, como alcaloides, flavonoides e terpenos, apresentam grande potencial terapêutico devido às suas propriedades neuroprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo amplamente estudados para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, além da epilepsia e distúrbios de ansiedade, como por exemplo, como na literatura proposta por Panzarini (2020), em que as nanoemulsões de curcumina melhoram a penetração na barreira hematoencefálica e aumentam a concentração da substância ativa nas áreas cerebrais afetadas, proporcionando efeitos neuroprotetores mais eficazes quando comparado com a utilização apenas da curcumina ao longo dos protocolos avaliados, assim, corroborando para que o uso de sistemas nanoemulsionados não só prolongue a ação da curcumina, como também reduza os efeitos adversos, favorecendo uma liberação controlada e sustentada da substância. No grupo avaliado, sem o emprego das técnicas de produtos nanoelaborados, foi identificada baixa solubilidade e a instabilidade em meios biológicos, o que, provavelmente, limitou a eficácia desses compostos. Com o exposto, a incorporação de produtos naturais em sistemas nanoemulsionados oferece uma solução eficiente para superar essas barreiras biológicas, em especial a hematoencefálica, melhorando a solubilidade do fármaco proposto, protegendo esses compostos da degradação metabólica precoce, promovendo liberação controlada e sustentada no SNC, o que maximiza seu efeito terapêutico.

Os progressos alcançados por meio de sistemas nanoemulsionados, seja para substâncias naturais ou sintéticas, propõe questões de suma importância acerca das perspectivas da elaboração de novos medicamentos para o tratamento de doenças do sistema nervoso central (VANTI 2021). A capacidade dessas nanoemulsões de melhorar a estabilidade, aumentar a biodisponibilidade e garantir a liberação controlada dos princípios ativos coloca essa tecnologia em um patamar de referência no campo da neurofarmacologia, trazendo para o desenvolvimento de fármacos a possibilidade de individualização de características farmacocinéticas e farmacodinâmicas que estejam relacionadas ao seu potencial terapêutico,

melhorando atributos de metabolização e excreção, contribuindo para a criação de terapias mais eficazes e seguras com menos efeitos adversos (JUSRIL *et al.*, 2022).

Modelos crônicos de instrumentalização permitem explorar a eficácia prolongada e a durabilidade dos efeitos desses compostos, permitindo avaliar possíveis adaptações que o SNC possa desenvolver ao tratamento contínuo, com resultados preliminares do grupo de pesquisa apontando para uma continuidade dos efeitos anticonvulsivantes quando associados a outras tecnologias farmacêuticas, sugerindo que as amidas graxas, modulam o sistema endocanabinoide, sinalizando para o sistema GABAérgico, oferecendo uma resposta terapêutica consistente em cenários crônicos.

Portanto, o uso de tecnologias baseadas na incorporação de sistemas nanoemulsionados para fármacos com alvo no sistema nervoso central não só colabora com a resolução de problemas oriundos da distribuição e transpassagem das principais barreiras biológicas para o cérebro; como otimiza, em especial, opções terapêuticas para condições clínicas de difícil manejo como a epilepsia.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. Reagentes e solventes químicos

### 4.2. Obtenção do azeite de oliva

O azeite de oliva, enquanto objeto deste estudo, foi obtido de maneira comercial no ano de 2023. O material é descrito como azeite extravirgem (250ml), da marca Andorinha Portugal, lote nº L0206423. Este azeite extravirgem foi escolhido pelo fato de ter uma acidez menor que apresentada pelo azeite comum, o que facilitaria as reações no processo de síntese da amida graxa.

### 4.3. Obtenção e caracterização das amidas graxas

A obtenção da mistura das amidas graxas se deu através da metodologia proposta por Araújo *et al.*(2018), por uso de lipases de *Candida antarctica*-B (CAL-B), o que permitiu executar o processo de transesterificação aos ácidos graxos presentes no azeite de oliva selecionado, o qual foi feito por meio do processo de aminólise

Foi adicionado 1mL de azeite de oliva, 10% (10mg) da lipase de *Candida antarctica*-B (CAL- B) e 3ml de etanol em um balão de fundo redondo de 5 mL. Todo o sistema permaneceu sob agitação magnética (300 rpm,  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24h.

Após a conclusão do processo de agitação, o biocatalisador foi submetido à filtração e à lavagem com acetona (3x com 1mL). O filtrado resultante foi evaporado sob pressão reduzida. A seguir, o produto da reação passou por um processo de purificação por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel e uma mistura de solventes (hexano:acetato de etila) nas proporções de 9:1 como eluente.

Finalizadas essas etapas, os produtos intermediários, Ésteres Etilícos de Ácidos Graxos (FAEE) serão conduzidos para uma reação de amidação, associado ao emprego de isopropilamina ou anandamida (ambas a 3ml - 2,166g), FAEE (1ml) e 10% de CAL-B como catalisador. Todo o sistema será mantido sob agitação magnética (300 rpm,  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24h, passando, posteriormente, por filtragem e lavagem com acetona (3x com 1ml) a fim de remover as enzimas utilizadas.

Após o processo de filtragem, o filtrado é evaporado novamente sob pressão reduzida através de uma bomba a vácuo. Em seguida, o material passa por um novo processo de purificação por cromatografia em coluna sobre sílica gel com hexano: acetato de etila nas proporções de 9:1 como eluente. Ao término desse processo, as amidas graxas estarão prontas e aptas para a posterior caracterização. Este procedimento detalhado visa garantir a pureza e a qualidade das amidas graxas. Posteriormente as amidas graxas foram caracterizadas por análise

cromatográfica gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG- MS).

#### **4.4. Preparo e caracterização das nanoemulsões**

As nanoemulsões foram preparadas através do método de inversão de fase com aporte de baixa energia, de acordo com a metodologia de Rodrigues *et al.* (2021). O HLB 13,5 (10,51 mg de Span 80 e 64,48mg de Tween 80) selecionado de acordo com os estudos de Ghiasi *et al.* (2019).

O emulsificante foi formado pela adição de 10,51mg de Span 80 e 64,48mg de Tween 80. A fase orgânica foi formada pela adição de 75mg de amidas de ácido graxo ao blend de emulsificantes. A fase orgânica foi agitada por 30 minutos em aparelho vórtex a 750rpm. Em seguida, 2.850mg de água destilada foi titulada gota a gota na fase orgânica com agitação constante de 720rpm por 1 hora. A concentração final de amida de ácido graxo foi de 25.000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e a relação surfactante/óleo (SOR) foi de 1:1 na nanoformulação.

Para as análises de estabilidade e caracterização da nanoemulsão obtida, foram considerados os parâmetros de controle de qualidade como o diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade, e Potencial Zeta ( $\zeta$ ) das nanoemulsões, sendo estas realizadas por meio da técnica espalhamento de luz eletroforético, utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series, além de um laser incidido nas amostras para aferir o deslocamento doppler na luz espalhada pelas partículas. Em todas as análises, as nanoemulsões serão diluídas na proporção de 1:25 v/v em água deionizada e transferidas para cubetas específicas com dois eletrodos, sendo analisadas em triplicatas imediatamente após o preparo.

#### **4.5. Procedimentos éticos**

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA-UFPA), sendo avaliado, aprovado e registrado sob o protocolo nº 4335290521. Foram respeitados todos os requisitos da Lei nº 11.794/2008, capítulo IV, art. 14, § 4º (BRASIL, 2008), e o Decreto nº 6.899/2009, em concomitância com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados por comitês de ética em pesquisa, em conformidade com as normas éticas estabelecidas, seguindo os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Assim, foram tomadas as medidas necessárias para proporcionar um ambiente adequado aos camundongos (*Mus musculus*), monitorando-os durante os procedimentos



laboratoriais deste projeto.

#### **4.6. Animais**

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizados 43 camundongos (*Mus musculus*) machos, adultos, da linhagem Swiss, adquiridos através da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com peso dos indivíduos entre 20g e 40g. Os animais foram divididos em 5 grupos de 10 animais cada, mantidos em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, em condições controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12h/12h) e temperatura ambiente de 25°C, sendo monitorados diariamente para acompanhamento e garantia dos parâmetros ambientais estipulados para o estudo.

Os grupos foram distribuídos em controle positivo, controle negativo, amidas graxas livres, nanoemulsão de amidas graxas e apenas o grupo para avaliação do estresse comportamental (SHAM) possuiu 3 animais.

Os animais pertencentes ao grupo de controle positivo foram submetidos a tratamento com a droga padrão para controle do potencial convulsivante, Diazepam (BDZ), o grupo de controle negativo foi tratado somente com solução salina (SL) a 0,9%, além dos grupos de amidas graxas livres (FAA) e com a incorporação do seu sistema nanoemulsionado (NFAA), além do grupo controle de estresse ambiental e de manipulação animal (SHAM). A abordagem escolhida permitiu uma análise abrangente do impacto dos fármacos nos grupos supracitados, além de avaliação comparativa dos efeitos dos diferentes tratamentos utilizados.

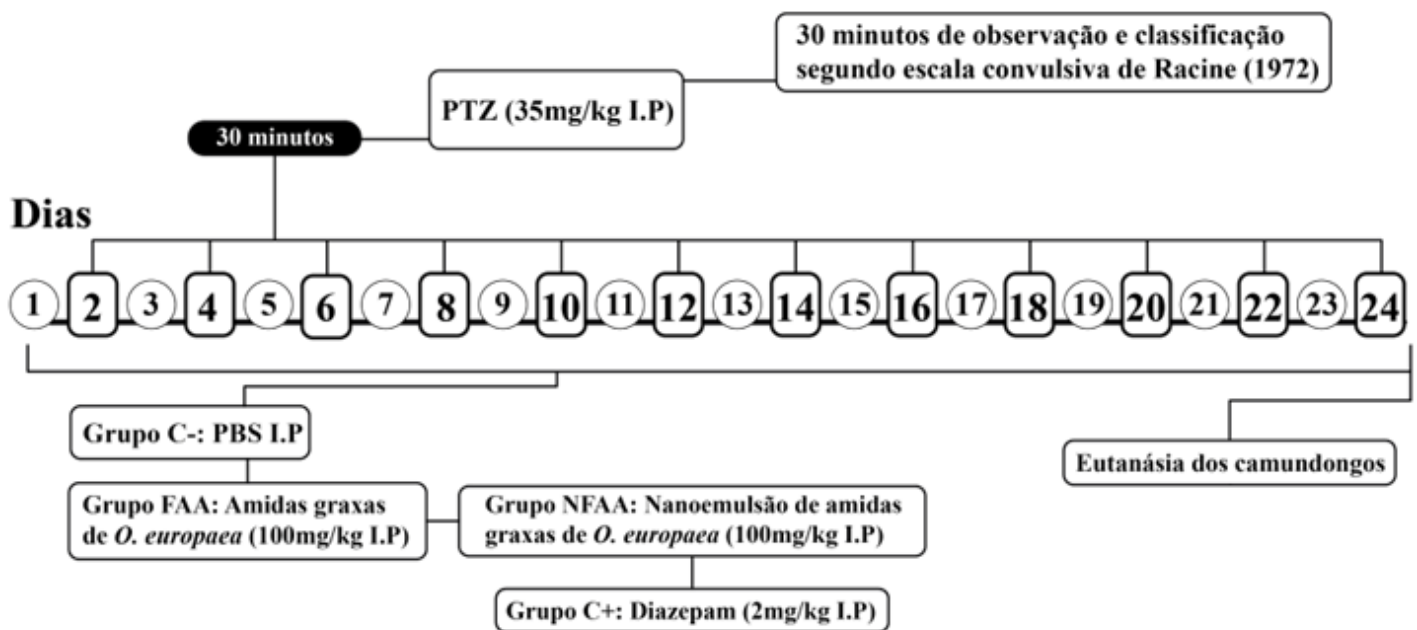
#### **4.7. Delineamento experimental**

Os animais utilizados foram monitorados diariamente ao longo de um período de 24 dias, durante os quais receberam os tratamentos respectivos de cada fármaco ou solução salina, no caso do grupo de controle negativo, desde o primeiro até o último dia. Esse acompanhamento contínuo ao longo do experimento foi necessário para que se fizesse uma análise mais aprofundada dos efeitos dos fármacos nos animais e seus respectivos resultados, além de prospectar possíveis manifestações crônicas oriundas dos tratamentos utilizados.

Para o grupo controle positivo foram administradas doses de Diazepam (DZP) na concentração de 2mg/kg, para o controle negativo, solução salina 0,9%. Para os grupos de ensaio: FAA 100 mg/kg e NFAA 100 mg/kg, todos em um volume de 200µl foram aplicados por via intraperitoneal (ip). O grupo SHAM não recebeu nenhum tipo de administração, apenas sendo manipulado fisicamente para se induzir uma resposta de estresse que mimetizasse a dos demais grupos.

Durante o estudo, em dias alternados, a contar do segundo dia até o vigésimo quarto, todos os grupos (com exceção do SHAM) receberam o agente pró-convulsivante Pentilenotetrazol (PTZ) na dose de 35mg/kg. Essa dosagem é considerada subterapêutica e é utilizada para se reduzir o limiar convulsivo dos indivíduos testados. Assim, os animais eram sensibilizados à epileptogênese desencadeada, evoluindo ao longo do processo químico de abrasão neurológica (THAPLIYAL *et al.*, 2023), como descrito na Figura 3.

Figura 3: Delineamento experimental do protocolo abrasivo



Fonte: Autoria própria

O número de animais utilizados nesse estudo está justificado na garantia de confiabilidade estatística e reprodutibilidade analítica dos resultados obtidos, já que a metodologia se baseia na observação comportamental dos camundongos e no grau epileptogênico por eles apresentado.

#### 4.7. Avaliação da atividade anticonvulsivante

Após a administração do agente pró-convulsivante, os grupos foram observados durante 30min para verificar quaisquer alterações em suas condições comportamentais. Esse período de observação possibilitou acompanhar a evolução epiléptica, caso ocorresse, a depender do grupo, sendo avaliada de acordo com a escala de Racine (1972) e apresentada conforme a Tabela 2.

Essa abordagem padronizada foi essencial para a análise sistemática e objetiva dos efeitos provocados pelo agente pró-convulsivante nos animais de cada grupo.

Tabela 2: Escala de Racine

| <b>ESTÁGIO</b> | <b>ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL</b>                                             |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>0</b>       | Normal, sem anormalidade                                                    |
| <b>1</b>       | Imobilidade, movimentos orais e faciais (mild)                              |
| <b>2</b>       | Movimentos na cabeça, mioclonia parcial                                     |
| <b>3</b>       | Mioclonia contínua do corpo inteiro, cauda erguida rigidamente              |
| <b>4</b>       | Efeito clônico das patas dianteiras, convulsão tônica, cair de lado         |
| <b>5</b>       | Convulsão tônico-clônica, cair de costas, correr e pular descontroladamente |
| <b>6</b>       | Óbito                                                                       |

Fonte: RACINE, 1972.

No contexto de indução de crises convulsivas, como por pentilenotetrazol (PTZ), os animais podem ser considerados epiléticos quando apresentarem crises persistentes e recorrentes, a partir do estágio 3 ao 4 da escala de Racine. Nesse estágio, os animais apresentam crises clônicas bilaterais nas patas anteriores, que são seguidas por crises tônico-clônicas generalizadas no estágio 5 (AKYÜZ, 2020).

#### **4.8. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A normalidade e a homogeneidade das variações foram verificadas por meio do uso dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. As comparações entre grupo controle negativo e outros grupos nas análises comportamentais das crises foram realizadas usando ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. O nível mínimo de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$  em todos os casos. O software GraphPad® Prism 8.0 foi utilizado para todas as análises.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização do conjunto de ácidos graxos e das amidas graxas produzidas

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) revelou que os três principais componentes do conjunto de ácidos graxos foram o ácido oleico (70,80%), ácido palmítico (22,07%) e ácido linoleico (6,57%) (Tabela 3).

Tabela 3: Composição das ácidos graxos do óleo de *Olea europaea*, por análise CG-EM<sup>a</sup>.

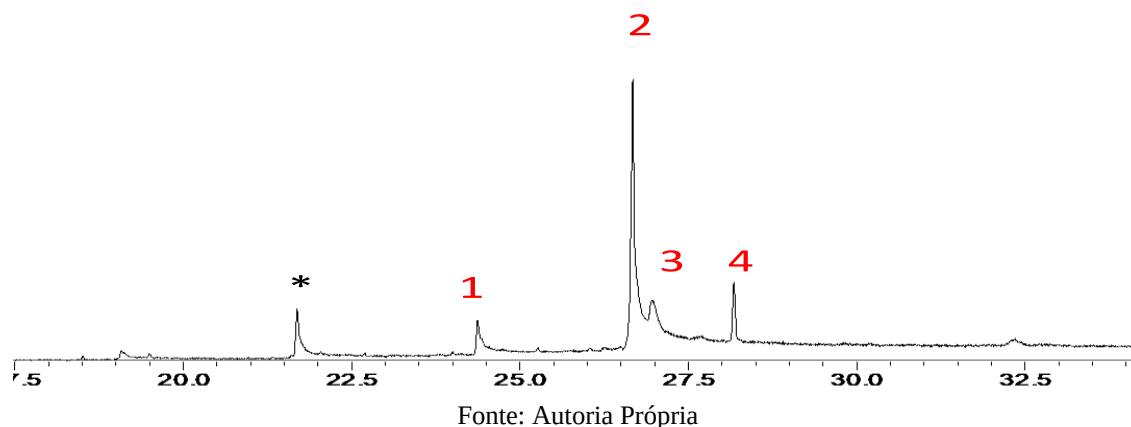
| Amida Graxa <sup>b</sup> | Pico | Concentração Relativa <sup>b</sup> (%) |
|--------------------------|------|----------------------------------------|
| Palmítico                | 1    | 22,07                                  |
| Oleico                   | 2    | 70,80                                  |
| Linoleico                | 3    | 6,57                                   |
| Vacênico                 | 4    | 0,56                                   |
| Σ Saturado               | —    | 22,07                                  |
| Σ Insaturado             | —    | 71,36                                  |
| Σ Polinsaturado          | —    | 6,57                                   |

<sup>a</sup>Banco de dados do EM (NIST 5.0); <sup>b</sup>% do ácido graxo correspondente pela integração da área dos picos

A cadeia alquílica dos desses ácidos graxos constituíram na elaboração das amidas graxas, resultando em proporções semelhantes na composição final das amidas produzidas. Diversas amidas graxas como a oleiletanolamida oriunda da cadeia graxa do ácido oleico têm ganhado destaque por apresentar potenciais características neuroprotetoras (MURRU *et al.*, 2021)(FAHEEM *et al.*, 2022).

A Figura 4 corresponde ao cromatograma das amidas graxas obtidas a partir da reação de amidação direta dos ácidos graxos presentes no óleo (ácidos oleico, palmítico e linoleico), onde no Pico nº 2 (t.r. 26,5min) corresponde a oleiletanolamida, uma vez que a presença de seu ácido precursor, o ácido oleico, no azeite de oliva, é de 70,80%, inferindo que a porção majoritária do produto final de amidação é derivada deste ácido graxo saturado, com o seu tempo de retenção sendo compatível com compostos de cadeia longa saturados (VIAU & MEYNIER, 2024).

Figura 4: Cromatograma do conjunto de amidas graxas obtidas a partir da reação de amidação direta do azeite de oliva. \* impureza.



O ácido oleico, representando 70,80% das amidas graxas biossintetizadas, é um ácido graxo monoinsaturado conhecido por suas propriedades neuroprotetoras, com registros na literatura, a qual tem demonstrado que o ácido oleico desempenha um papel singular na modulação da plasticidade sináptica e na proteção neuronal contra estresses oxidativos, sendo estes, fatores críticos na progressão da epileptogênese (VESGA-JIMÉNEZ *et al.*, 2022).

Como segundo constituinte em maior concentração no conjunto de ácidos graxos que elaboram as amidas graxas, o Pico nº 1 (22,5min) possibilita identificar a palmitoiletanolamida, oriunda do ácido palmítico, uma vez que sua presença no azeite de oliva é de 22,07%, o que sugere que uma porção significativa do produto de amidação é derivada deste ácido graxo saturado, com o seu tempo de retenção (22,5min) compatível com compostos de cadeia longa saturados (KATSUWON; ARYUSUK; KRISNANGKURA, 2006).

O ácido palmítico (C16:0), em específico, é um ácido graxo saturado que, quando amidado forma a palmitoiletanolamida (PEA), amplamente estudada por suas propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras (DA SILVA *et al.*, 2021).

Já o Pico nº 3 (27,8min) corresponde ade isômeros ou subprodutos menores que surgem durante o processo de amidação, ou uma forma de amida intermediária, que possivelmente se refere a linoleiletanolamida, oriunda do ácido linoleico, representando 6,57% do *pool* original de ácidos graxos. Como o ácido linoleico é um ácido graxo poli-insaturado, sua presença em menores quantidades e seu comportamento diferenciado podem explicar a localização e a intensidade relativa do pico, como descrito por Christie *et al.* (2001).

Embora presente em menor proporção, o ácido linoleico é um ácido graxo poli-insaturado, que desempenha um papel crítico na modulação de vias neuroprotetoras, principalmente devido à sua capacidade de formar derivados oxigenados bioativos, como os

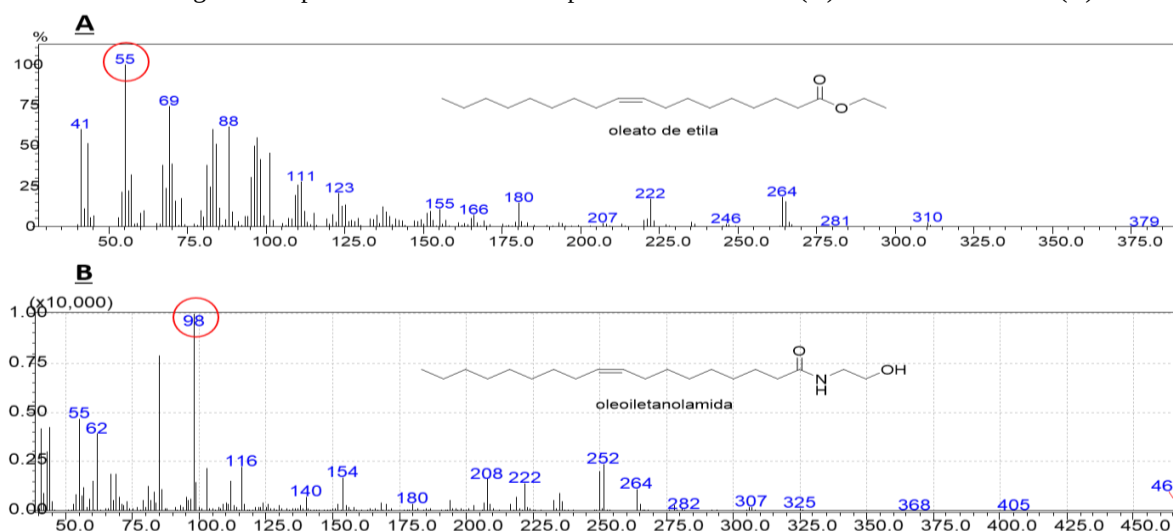
endocanabinoides, metabólitos estes que têm mostrado potencial para reduzir a excitotoxicidade e a inflamação (KOMARNYTSKY *et al.*, 2021), exibindo também propriedades neuroprotetoras (OKORONKWO; OGUKWE; OKEREKE, 2023).

No tocante à formação de subprodutos, o Pico nº 4 (29,4min) pode indicar um subproduto ou amida de menor significância em termos de proporção, representando talvez outros ácidos graxos de menor expressão que estão constituídos no azeite de oliva, como o ácido Vacênico, servindo como substrato para a formação da vacenoiletanolamida, a menor intensidade deste pico pode estar associada a ácidos graxos de cadeias menores ou intermediários formados no processo de reação (YOO *et al.*, 2024).

A reação de amidação direta, catalisada pela lipase de *Candida antartica*, converte predominantemente os ácidos graxos presentes nos triglicerídeos do azeite de oliva em suas respectivas amidas graxas, esse processo enzimático é favorecido pela alta especificidade da enzima, permitindo uma eficiente conversão de ácidos graxos como o oleico, palmítico e linoleico (LIMA; ANJOS; PORTO, 2022).

A estrutura química das amidas resultantes, é embasada por espectrometria de massa, onde o íon base de 98m/z, atribuído ao rearranjo de McLafferty, destaca-se como um marcador distintivo, particularmente observado nos espectros (70eV) para a oleoiletanolamida. Esse comportamento é notavelmente diferente quando comparado aos espectros de massa de ésteres etílicos, nos quais o pico base corresponde a 55m/z, associado à perda da porção etóxido, com íons menos abundantes ao redor de 264m/z, típicos de sua estrutura etílica (ARAÚJO *et al.*, 2018), como apresentando pela Figura 5.

Figura 5: Espectro de massa dos compostos oleato de etila (A) e oleoiletanolamida (B).



Fonte: Autoria Própria

Esse resultado confirma a precisão da biocatálise, evidenciada pela seletividade da

lipase no processo de amidação dos ácidos graxos, e como isso difere das reações com ésteres, cujos espectros de fragmentação refletem a influência da porção alcoólica na estabilidade dos fragmentos formados. A comparação com a oleoiletanolamida destaca não apenas a eficiência da biocatálise, mas também o potencial farmacêutico das amidas graxas, que possuem propriedades biológicas distintas em comparação com os ésteres.

## **5.2. Caracterização da nanoemulsão carregada com as amidas graxas**

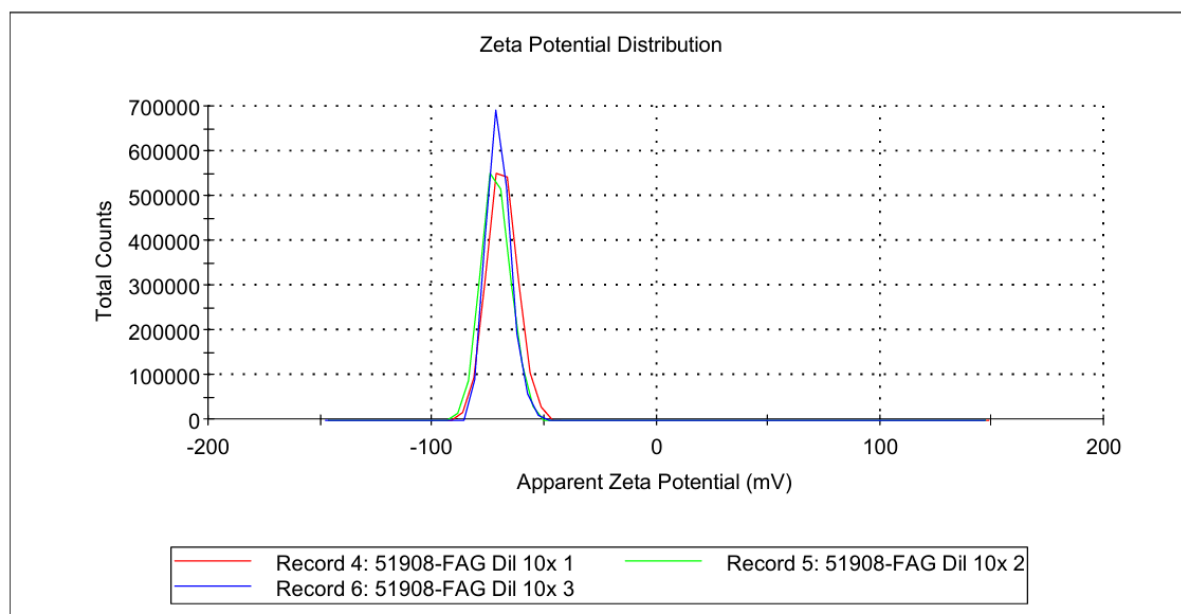
A caracterização das nanoemulsões obtidas é essencial para assegurar a eficácia e garantia de suas atividades farmacológicas, devido à sua natureza submicrométrica e alta área superficial dessa técnica de encapsulamento, as nanoemulsões apresentam propriedades únicas como melhor solubilidade de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos, biodisponibilidade aprimorada em meios biológicos diversos e estabilidade prolongada (LIU *et al.*, 2022).

Em parâmetros de controle de qualidade como o potencial zeta, a distribuição do diâmetro de partícula e o índice de polidispersividade influenciam de maneira ativa no comportamento dessas nanoestruturas no organismo humano, de maneira que a sua interação com os mais diversos produtos celulares, tais como proteínas e enzimas podem anular o efeito de incorporação dessa técnica (RAI; SHARMA; THAKUR, 2021), tornando-se imperioso o controle desses parâmetros com fim de garantir que as nanoemulsões não apenas alcancem o local-alvo de forma eficiente, como mantenham a estabilidade e a liberação controlada dos compostos ativos, minimizando potenciais efeitos adversos e maximizando os benefícios terapêuticos.

### **5.2.1 Avaliação do potencial Zeta**

O valor do potencial zeta é um parâmetro crucial para avaliar a estabilidade das nanoemulsões. No caso da nanoemulsão produzida, o potencial zeta obtido foi de  $-68,7\text{mV} \pm 6,68\text{mV}$ , como apresentado pela Figura 6 (Pag. 34), sugerindo boa estabilidade coloidal devido à forte repulsão eletrostática entre as partículas, prevenindo sua agregação (FAN *et al.*, 2020), o que implica dizer que a nanoemulsão de amidas graxas possui boa estabilidade, reduzindo significativamente a probabilidade de floculação ou coalescência ao longo do tempo.

Figura 6: Distribuição do potencial Zeta via equipamento Zetasizer



Fonte: Autoria Própria

Guldorum *et al.* (2024) investigaram o uso de nanopartículas de ferrita de bismuto carregadas com ethosuximida como um sistema de liberação controlado de fármacos para o tratamento da epilepsia, haja vista que sistemas nanoemulsionados têm ganhado destaque devido à sua capacidade de encapsular e liberar medicamentos de forma eficiente, além de possibilitar a administração, seja por via intranasal, quanto por vias alternativas como intraperitoneal, permitindo a passagem de maneira otimizada dos fármacos pela barreira hematoencefálica (BHE). Neste trabalho, foi obtido um potencial zeta de -34,5mV dessas nanopartículas, onde ensaios indicaram que esse potencial as mantiveram estáveis devido à repulsão eletrostática, sendo que valores de potencial zeta negativos são indicativos de boa estabilidade coloidal, o que é essencial para evitar a agregação das partículas e garantir a eficácia do tratamento durante o tempo de administração, com o valor dentro dos padrões típicos para sistemas de nanopartículas, que geralmente apresentam estabilidade dentro de um intervalo ideal entre -15 a -31mV de potencial zeta (BONI, 2022).

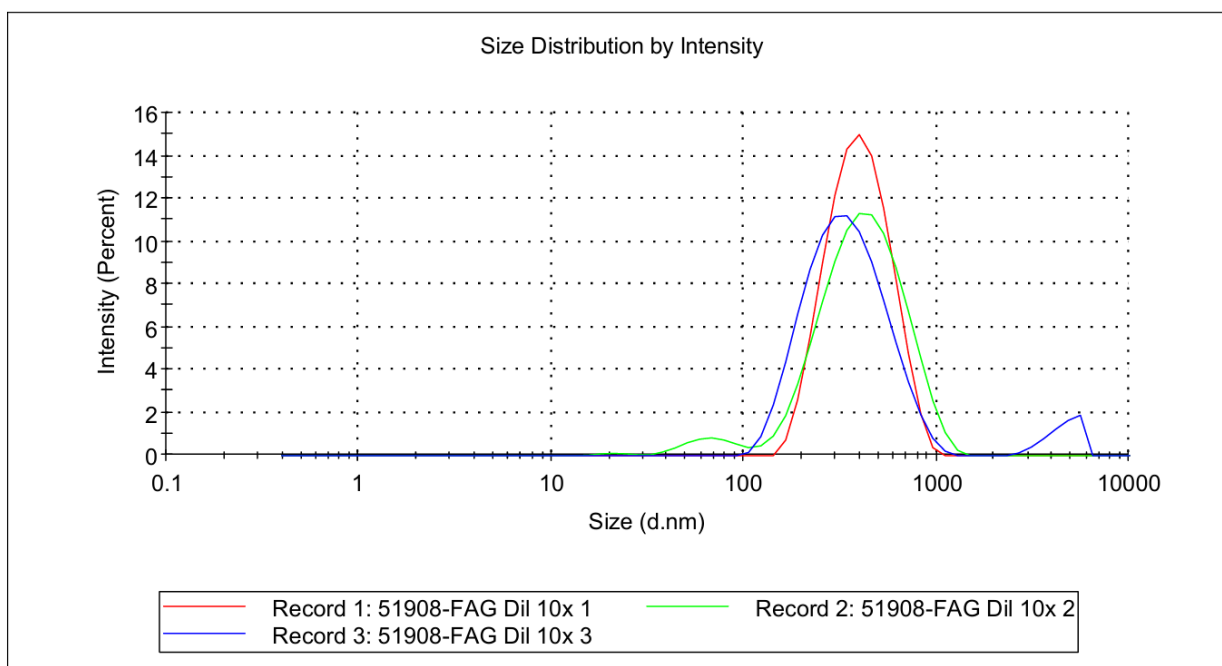
Comparando com o potencial zeta de -68,7mV da nanoemulsão de amidas graxas, esse parâmetro permite assumir que a nanoemulsão tem uma estabilidade eletrostática confiável, o que é benéfico para evitar floculação e garantir que as partículas permaneçam dispersas durante o processo de entrega e liberação do fármaco, sendo uma vantagem em caso de uso a longo prazo, já que sistemas mais estáveis reduzem o risco de formação de agregados e perda das propriedades farmacológicas e farmacocinéticas.



### 5.2.2 Distribuição de Diâmetro de Partícula

De acordo com a Figura 7, o tamanho médio de partícula (Z-Average) da nanoemulsão foi de 325,8nm. Para a concepção de sistemas nanoestruturados é relevante avaliar este parâmetro, pois infere diretamente acerca de sua capacidade de penetração e biodisponibilidade no SNC (MALODE *et al.*, 2021).

Figura 7: 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

Nanoemulsões com tamanhos de gotículas abaixo de 500nm são amplamente utilizadas em formulações farmacêuticas devido à sua capacidade de aumentar a área de superfície para interação com células, melhorar a solubilidade de compostos lipofílicos e favorecer uma absorção mais eficiente em tecidos biológicos (ZHOU, 2022).

O tamanho médio de 325,8nm, obtido nas aferições, é apropriado para garantir boa dispersão ao longo dos meios biológicos, particularmente em aplicações tópicas ou intravenosas, onde a penetração em barreiras biológicas como a pele ou a barreira hematoencefálica pode ser facilitada (JUSRIL *et al.*, 2022). Esse tamanho permite um comportamento dinâmico em circulação sistêmica, possibilitando que as partículas permaneçam em suspensão por mais tempo, aumentando a possibilidade de entrega controlada dos compostos ativos.

Nos ensaios de Laurindo *et al.* (2023), observou-se que as nanoemulsões carregadas com

curcumina no intervalo de tamanhos de partícula entre 200 e 300nm otimizou a biodisponibilidade de compostos terapêuticos em tecidos biológicos, especialmente para tratamentos neurológicos, permitindo uma liberação eficiente das substâncias ativas através das barreiras biológicas, como evidenciado pelos autores, a barreira hematoencefálica, um fator essencial para o tratamento de patologias que comprometem o SNC como a epilepsia, sendo que a pesquisa também elucidou que o tamanho das partículas afetou diretamente a permeabilidade e a biodisponibilidade do princípio ativo.

### 5.2.3 Índice de polidispersividade

A polidispersividade (PDI) é um índice crucial para analisar a variação dos tamanhos das partículas distribuídas em uma nanoemulsão, o que desempenha papel significativo na estabilidade do produto elaborado. Durante as análises realizadas, foi obtido um índice de polidispersão (PDI) de 0.216 para as nanoemulsões utilizadas no estudo, sugerindo que o sistema apresenta distribuição bastante uniforme de tamanhos, uma característica desejável em formulações farmacêuticas (ALGAHTANI *et al.*, 2022). Um PDI inferior a 0,3 é considerado indicativo de uma nanoemulsão monodispersa, ou seja, com partículas de tamanho uniformemente padronizado. Esse parâmetro classifica um ponto altamente sensível e positivo de estabilidade e confiabilidade das nanoemulsões produzidas.

A distribuição de tamanho homogêneo minimiza o risco de instabilidade física, como a coalescência de partículas menores ou maiores, e pode assegurar uma liberação mais controlada dos princípios ativos das amidas graxas, a homogeneidade da formulação também é crucial para garantir a reprodutibilidade do efeito terapêutico, uma vez que tamanhos uniformes permitem uma melhor absorção e biodisponibilidade dos compostos ativos em comparação a sistemas com alta polidispersão, principalmente quando considerados parâmetros de “grandes filtros biológicos”, como é o caso da barreira hematoencefálica (LEE & MINKO, 2021).

Sistemas lipídicos e vesiculares, incluindo lipossomas e nanopartículas sólidas lipídicas, também apresentam PDIs semelhantes aos obtidos de 0.216 que, como discutidos por Atre & Rizvi (2024), são valores ideais (já que são abaixo de 0.3) para garantir a estabilidade das partículas em suspensão, evitando agregação ou sedimentação, além de proporcionar uma liberação controlada e uma absorção eficiente dos compostos ativos, sendo essencial para aplicações em doenças neurológicas, onde a precisão na entrega de fármacos pode melhorar significativamente os resultados terapêuticos esperados.

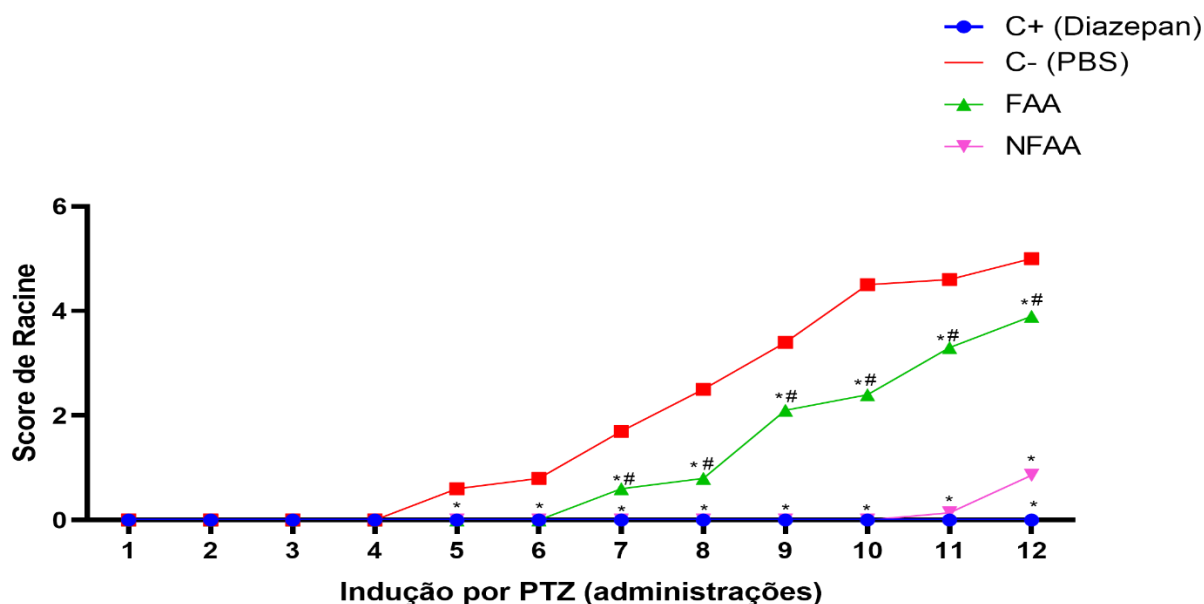
As nanoemulsões de amidas graxas utilizadas neste trabalho apresentaram PDI homogêneo, indicando que o sistema também possui propriedades altamente favoráveis para

aplicações no SNC, a uniformidade no tamanho das partículas é particularmente relevante para a entrega controlada e sustentada de fármacos, potencializando seu uso em abordagens terapêuticas como o controle de crises epilépticas.

### 5.3 Avaliação da atividade anticonvulsivante

Os resultados da avaliação anticonvulsivante demonstraram que tanto as amidas graxas em sua forma livre, quanto sua nanoemulsão apresentaram resultados satisfatórios em relação a diminuição da evolução das crises convulsivas dos grupos experimentais (Figura 8).

Figura 8: Evolução epileptogênica dos grupos observados, após o tratamento com as amidas graxas livres produzidas a partir do óleo de *Olea europaea* e sua nanoemulsão. \* = representa diferença significativa com o PBS; # = representa diferença significativa com DZP e NFAA



Fonte: Autoria Própria

O grupo PBS demonstrou início do quadro epileptogênico no 5º dia de aplicações, com diferença estatística em relação aos demais grupos, apresentando valores médios de  $0,6 \pm 0,16$  pontos na escala de Racine (1972), sendo o grupo que apresentou e evoluiu o quadro epiléptico geral de maneira mais rápida, com média de scores de 5 no 12º dia de aplicação, apresentando todos os sintomas da epileptogênese.

Esse grupo estabeleceu o modelo convulsivo de abasamento animal ao permitir – no estágio 5 da escala de Racine, alcançado na décima aplicação de pentilenotetrazol – o método proposto para o estudo das propriedades anticonvulsivante dos tratamentos testados, por se

aproximar ao máximo possível de uma crise convulsiva completa, passando desde as crises iniciais de ausência até a “*Convulsão tônico-clônica, cair de costas, correr e pular descontroladamente*”, e após a crise, retornar à consciência.

Já o grupo FAA apresentou os sinais comportamentais do início epileptogênico apenas no sétimo dia de aplicações com PTZ no protocolo abrasivo, com média de escores de  $0,6 \pm 0,16$  e diferença significativa em relação aos grupos PBS ( $1,7 \pm 0,15$ ), NFAA e Diazepam (ambos ainda sem nenhuma manifestação de convulsão até esta aplicação; logo, estando os mesmos na escala 0 de Racine), com o aparecimento das primeiras crises convulsivas menos intensas, somente no décimo dia de administração do agente pró-convulsivante, diferentemente do grupo PBS, apresentando evolução mais rápida e agressiva do quadro epileptogênico.

A oleiletanolamida, que representa 70,8% da composição do conjunto de ácidos graxos utilizados, exerce efeitos neuroprotetores por interagir com o sistema endocanabinoide, em especial os receptores canabinoides (CB1), regulando funções neurológicas que incluem o controle de convulsões, agindo concomitantemente como modulador dos receptores GABAérgicos (KRISHNA KUMAR *et al.*, 2023), reduzindo a excitabilidade neuronal, um fator crítico na prevenção de crises epiléticas (FAHEEM *et al.*, 2022), propondo por esse meio a capacidade do grupo FAA de retardar o início epileptogênico e reduzir a gravidade das crises convulsivas obtidas pelo modelo de abrasamento químico animal.

Em condições de estresse neurológico, como em epilepsias, a PEA atua promovendo a regulação dos mastócitos e da micróglia, células do sistema imune que desempenham um papel importante na neuroinflamação, também interagindo com o receptor nuclear PPAR- $\alpha$  (receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa), que está envolvido na regulação de processos inflamatórios e neurodegenerativos, sendo que na ativação, o PPAR- $\alpha$ , a PEA diminui a inflamação no tecido nervoso, protegendo contra o dano neuronal e contribuindo para a neuroproteção em quadros epiléticos (MELIK-KASUMOV *et al.*, 2022).

Estudos sugerem que os FAA derivados do ácido linoleico (correspondendo a 6,57% dos FAA obtidos) podem influenciar na atividade oriunda das vias de sinalização celular associadas à neuroinflamação e à citotoxicidade. Esses dois processos estão constantemente presentes durante a exacerbação das crises epiléticas, além de que o ácido linoleico é um precursor de mediadores anti-inflamatórios conhecidos como prostaglandinas, que podem ajudar a controlar a inflamação no SNC (DONG *et al.*, 2023).

Embora os mecanismos de ação da linoleamida ainda não estejam completamente elucidados, há indícios de que ela interage com o sistema endocanabinoide de maneira semelhante à oleiletanolamida, embora em menor grau, a presença de duplas ligações no ácido

linoleico possam influenciar sua interação com enzimas de metabolização, o que poderia conferir a essa amida propriedades únicas em termos de modulação do SNC.

O efeito neuroprotetor do grupo tratado com as amidas graxas (FAA) não apresentou uma sustentação ideal dos efeitos neuroprotetores, com a rápida evolução clínica epilética após a nona indução com pentilenotetrazol, alcançando o ponto mais alto após os 24 dias de tratamento no nível 5 do score de Racine (1972).

A maior diferença significativa observada nos grupos amostrais foi dos indivíduos tratados com a nanoemulsão das amidas graxas (NFAA) utilizadas. Ao ser comparado com os indivíduos tratados somente com as amidas, apresentaram um tempo de tolerância muito maior até o aparecimento dos primeiros sintomas da epileptogênese, dentro do período de 24 dias de protocolo abrasivo, não evoluindo além do primeiro estágio da escala de Racine.

No 12º dia de aplicação, o grupo NFAA apresentou média de scores de  $0.857 \pm 1.215$ , apresentando diferenças significativas tanto em relação ao grupo PBS quanto ao grupo FAA, porém, sem diferenças significativas ao grupo tratado com BDZ (controle positivo), sendo o único grupo não-controle a manter os animais estáveis ao longo de todo o período estudado.

Os resultados apresentados evidenciam que as nanoemulsões de amidas graxas (NFAA) mostraram-se mais eficazes no controle da evolução do processo epileptogênico em comparação com os tratamentos controle negativo (PBS) e com o uso de FAA. Essa superioridade pode ser atribuída às características físico-químicas da formulação nanoemulsionada, como o menor tamanho de partícula (Z-Average: 325,8d.nm), baixa polidispersidade (PDI: 0,216) e elevado potencial zeta negativo (-68,7mV), que contribuem para maior estabilidade coloidal, homogeneidade e maior eficiência na penetração das barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica, retardando significativamente o aparecimento dos sintomas e mantendo os animais em estágio inicial na escala de Racine.

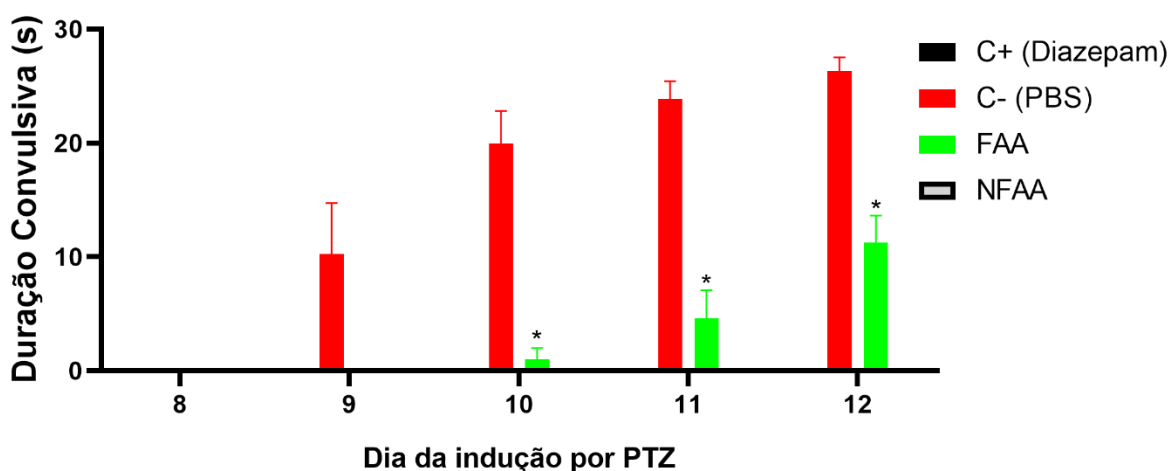
Essas propriedades favorecem a liberação controlada e sustentada das amidas graxas no sistema nervoso central, potencializando os efeitos neuroprotetores ao passo que a modulam vias bioquímicas estimuladas pelas amidas graxas.

Dessa forma, os animais tratados com as nanoemulsões mantiveram a estabilidade comportamental semelhante ao grupo controle positivo, tratado com o fármaco de referência para o controle das crises convulsivas, o Diazepam, demonstrando que a estratégia nanoemulsionada se traduz em uma abordagem promissora para o manejo de condições relacionadas à epileptogênese.

O grupo PBS foi o que apresentou maior duração convulsiva ao longo dos períodos observados, com tempo médio, em segundos, de  $26,34 \pm 3,821$  em estado convulsivo total no

12º dia de aplicação, demonstrado através da Figura 9, permitindo aferir que o não tratamento dos indivíduos culminou em maiores danos ao SNC.

Figura 9: Duração das crises convulsivas dos animais tratados com as amidas graxas oriundas dos triglicerídeos de *Olea europaea* e sua nanoemulsão frente à epilepsia induzida por abrasamento químico com pentilenotetrazol. \* = representa diferença significativa com o PBS



Fonte: Autoria Própria

Em comparação ao grupo de controle negativo, o grupo FAA apresentou a menor duração convulsiva total ao longo dos períodos observados, com média de  $11.231 \pm 7.570$  segundos de crises convulsiva total no 12º dia de aplicação.

A latência convulsiva, induzida por pentilenotetrazol (PTZ), representa o período entre a administração do agente pró-convulsivante e o início da primeira manifestação comportamental de atividade epilética em modelo animal, sendo esse parâmetro um dos principais indicadores da eficácia de substâncias com potencial anticonvulsivante, pois um prolongamento na latência sugere uma maior resistência neuronal ao desencadeamento da crise em questão (CHEN *et al.*, 2023).

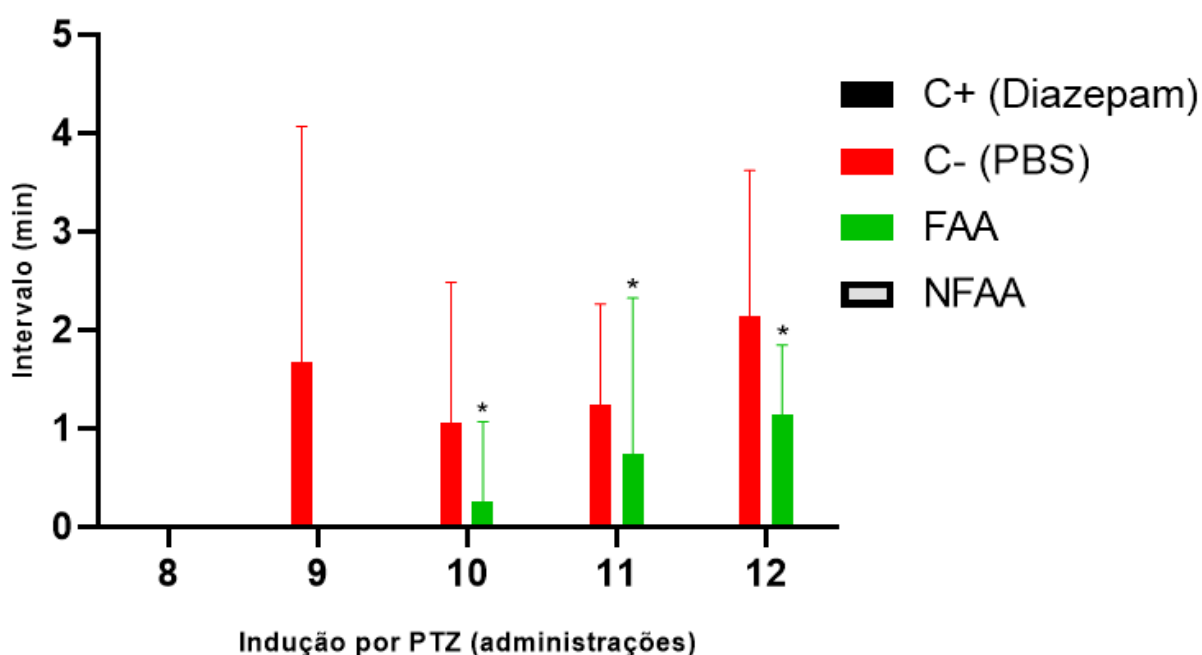
O PTZ pertence a classe farmacológica de antagonistas não competitivos dos receptores GABA-A, operando na redução da inibição neuronal, favorecendo a excitabilidade sináptica e a indução de convulsões. Assim, substâncias capazes de modular a neurotransmissão inibitória, seja por meio da potencialização de atividades GABAérgicas ou da redução da liberação de neurotransmissores excitatórios, podem aumentar significativamente a latência convulsiva, demonstrando seu potencial neuroprotetor (LI *et al.*, 2020). Esse parâmetro é frequentemente avaliado em conjunto com a severidade das crises, permitindo uma análise mais robusta do efeito terapêutico das moléculas estudadas.

Considerando o parâmetro de latência convulsiva, os grupos de tratamento foram avaliados do intervalo até o início das primeiras convulsões, com o objetivo de analisar a capacidade das formulações em retardar o estabelecimento da atividade epilética (PUTRA *et al.*, 2020).

O grupo tratado com Diazepam não apresentou convulsões, como esperado, assim como o grupo que recebeu as nanoemulsões de amidas graxas (NFAA), sugerindo um efeito anticonvulsivante robusto. Por outro lado, o grupo tratado com amidas graxas livres (FAA) apresentou um tempo médio de latência convulsiva de  $1.144 \pm 0.702$  minutos no ápice das crises convulsivas, registradas no 12º dia de aplicações com PTZ, como visto na Figura 10. Em comparação a esses, o grupo controle negativo (PBS) apresentou uma latência convulsiva média de  $2.148 \pm 1.473$  minutos no mesmo período. Esses dados indicam que embora as amidas graxas livres (FAA) tenham conferido certo grau de neuroproteção, retardando o início das convulsões, sua eficácia foi inferior à da formulação nanoemulsionada, evidenciando, assim, a importância da nanoestruturação para otimizar a biodisponibilidade e o efeito terapêutico desses compostos na modulação da epileptogênese.

Figura 10: Latência das crises convulsivas dos animais tratados com as amidas graxas oriundas dos triglicerídeos de *Olea europaea* e sua nanoemulsão frente à epilepsia induzida por abrasamento químico com pentilenotetrazol.

\* = representa diferença significativa com o PBS



Fonte: Autoria Própria

Os ensaios propostos por Melin *et al.*, (2019) demonstraram a atividade neuroprotetora

de uma terapia gênica baseada na superexpressão do neuropeptídeo Y (NPY) e do receptor Y2 cerebrais, os quais demonstram ser eficazes em aumentar o limiar convulsivo ao reduzir a excitabilidade sináptica, com o NPY, ao ativar os receptores Y2, inibindo a liberação excessiva de glutamato e diminuindo a excitabilidade neuronal, tornando os circuitos do hipocampo mais resistentes à indução de crises.

Tanto o estudo das amidas graxas nanoestruturadas quanto à pesquisa sobre terapia gênica NPY/Y2 compartilham um objetivo central: aumentar o limiar convulsivo e prolongar a latência convulsiva como estratégia terapêutica para epilepsia. Ambas as abordagens exploram mecanismos distintos, mas convergentes, para modular a excitabilidade neuronal e reduzir a frequência e a severidade das crises epiléticas, onde a modulação dos receptores CB1 e CB2, envolvidos na redução da atividade excitatória e no aumento da neurotransmissão inibitória GABAérgica, influenciam diretamente na menor excitabilidade neuronal e no aumento da resistência do cérebro à indução de crises epiléticas.

O aumento da latência convulsiva e a redução da frequência das crises não apenas representam um controle sintomático da epilepsia, mas também desempenham um papel fundamental na proteção e manutenção da integridade neuronal a longo prazo, a hiperatividade neuronal típica da epilepsia, por exemplo, leva a uma liberação excessiva de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC, este, quando em excesso, hiperativa os receptores ionotrópicos NMDA e AMPA, resultando em entrada excessiva de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nas células neurais, ativação de cascatas de morte celular e produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ROS) (POSTNIKOVA *et al.*, 2022).

Cada episódio convulsivo induz à neuroinflamação ao estimular a ativação de células da micróglia e astrócitos reativos, os quais liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Essas moléculas aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), contribuindo para a excitabilidade neuronal excessiva e promovendo neurotoxicidade através da morte celular exacerbada (JAVOID *et al.*, 2023). Ao aumentar a latência convulsiva e reduzir a frequência das crises, o ciclo inflamatório é interrompido, resultando em uma menor ativação de microgliócitos e astrócitos, o que, por sua vez, reduz a inflamação crônica e melhora a integridade da BHE.

A epilepsia pode induzir uma reorganização patológica da circuitaria neural, promovendo o brotamento aberrante de axônios (sprouting), como visto no circuito hipocampal de Mossy Fibers, perda de interneurônios inibitórios, especialmente os que liberam GABA e a redução da densidade sináptica em regiões afetadas (DENG *et al.*, 2020). Com o aumento da latência convulsiva e a redução das crises, a plasticidade sináptica passa a ocorrer de forma



menos destrutiva, favorecendo um ambiente mais equilibrado para a reorganização neuronal.

Tanto os parâmetros de latência, quanto de duração das crises não constituem apenas experimentalmente, mas também representam indicadores fisiológicos críticos da proteção neuronal, de forma que, quando as crises são menos frequentes e mais espaçadas têm-se menos neurônios perdidos por excitotoxicidade, diminuição da neuroinflamação decorrente das crises, havendo melhora da plasticidade sináptica de forma mais ordenada e benéfica, bem como a neurotransmissão inibitória é preservada e a homeostase neuronal é restaurada (MENG & YAO, 2020). Esses fatores combinados interrompem a progressão da epileptogênese, protegendo o cérebro a longo prazo, o que reforça o potencial de abordagens inovadoras por meio da modulação de neurotransmissores inibitórios através de vias que os sinalize.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi avaliado o potencial neuroprotetor deste mesmo conjunto de amidas graxas (AG) na modulação das convulsões graves com pentilenotetrazol (PTZ). Neste contexto, demonstraram potencial para aumentar a latência das crises mioclônicas e tônico-clônicas e reduzir a duração destas crises, sugerindo uma eficácia significativa no controle de convulsões refratárias (SMOLYAKOVA *et al.*, 2020).

Neste mesmo sentido, AG produzidas a partir do óleo de Andiroba, também apresentaram resultados positivos na prevenção das crises convulsivas, aumentando o tempo de latência para as convulsões e reduzindo significativamente a duração total das crises tônico-clônicas, com alterações eletrocorticais, reduzindo a amplitude e a energia das ondas no ritmo Beta nos camundongos com efeito relacionado à sua ação direta aos receptores GABA-A (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020), sugerindo que as AG produzidas a partir de ácidos graxos de óleos vegetais análogas a endocanabinoides são boas candidatas a fármacos anticonvulsivantes.

Para avaliar os efeitos anticonvulsivantes dos endocanabinoides ou dos seus compostos análogos, estudos têm empregado modelos de indução de convulsão tanto agudos quanto crônicos. Nos ensaios agudos, como o protocolo de indução por pentilenotetrazol (PTZ), utilizado pelo grupo de pesquisa, buscava-se avaliar o efeito imediato de compostos sobre as convulsões induzidas, pois este agente convulsivante que age como um antagonista do GABA, gera convulsões através da inibição da neurotransmissão mediada pelo GABA (LU & MACKIE, 2021).

Em paralelo, o modelo de epilepsia crônica, utilizado no presente estudo, permite avaliar os efeitos a longo prazo e a manutenção da ação neuroprotetora dos compostos endocanabinoides ao longo do tempo, pois é o que simula melhor as condições de epilepsia resistente e refratária encontrada em pacientes humanos, uma vez que a exposição prolongada a agentes convulsivantes leva a alterações duradouras na excitabilidade neuronal e na

organização sináptica, implicando em um nível de neuroadaptação que torna o controle das crises mais complexo.

Em ensaio para o desenvolvimento e caracterização de um sistema carreador e de entrega de fármacos por sistemas nanoemulsionados em modelo *in vivo*, proposto por Abdelmonem *et al.* (2020), foi comprovado que o uso destes agentes de entrega se soma positivamente como alternativa para o tratamento de doenças no SNC.

Foi analisado neste estudo que a apresentação com o uso do sistema nanoemulsionado exprimiou os melhores resultados de liberação e biodisponibilidade quando comparado com as outras elaborações utilizadas, além de melhor estabilidade a longo prazo da formulação e diminuição da toxicidade.

Estudos recentes demonstram, como por Misra & Pathak (2023), que as nanoemulsões produzidas com técnicas de baixa energia têm se mostrado promissoras no tratamento de doenças do sistema nervoso central, incluindo a epilepsia, sendo especialmente eficientes para sistemas de liberação controlada, permitindo que os fármacos atravessem a barreira hematoencefálica com eficácia, por sua estrutura e tamanho nanométrico conseguindo promover uma maior biodistribuição e permeação no sistema nervoso central, otimizando a entrega de fármacos anticonvulsivantes, ocorrendo isto devido à capacidade dessas nanoestruturas de proteger os ativos de uma degradação enzimática, além de melhorar a solubilidade de compostos lipofílicos, como os utilizados no tratamento da epilepsia, além de auxiliarem na passagem pela barreira hematoencefálica pela sua facilidade de promover um melhor perfil de solubilidade nos mais diferentes meios biológicos.

Ao comparar com sistemas não nanoemulsionados, a combinação de tamanho reduzido, carga superficial adequada e capacidade de modulação da liberação tornam as nanoemulsões uma plataforma promissora para o tratamento de doenças neurológicas, como apresentado por Chavda *et al.* (2024), a interação com receptores celulares pelo diminuto tamanho das gotículas de nanoemulsão (dentro do intervalo de 200 a 350nm) permite uma maior área superficial de contato com as membranas celulares, aliando características como o potencial zeta negativo (criando uma interação mais favorável com os receptores celulares e facilitando a internalização dos fármacos) e o grau de polidispersividade, influenciando positivamente na biodistribuição e na captação preferencial em tecidos específicos como o cérebro, ao reduzir a agregação e prolongar a estabilidade do sistema em circulação.

A integração dos parâmetros de controle de qualidade da nanoemulsão — potencial zeta ( $-68,7\text{mV} \pm 6,68\text{mV}$ ), distribuição de tamanho de partícula (325,8 nm) e índice de polidispersividade (0,216) — demonstra uma formulação otimizada para a entrega eficaz das

amidas graxas ao sistema nervoso central (SNC). A elevada estabilidade coloidal conferida pelo potencial zeta permite uma maior tolerância à passagem por tecidos biológicos complexos, como a barreira hematoencefálica; reduzindo, assim, o risco de degradação ou agregação prematura. Já o tamanho médio das partículas, proporciona um aumento significativo da área de interação com os tecidos biológicos e melhora a penetração em barreiras biológicas, maximizando a biodisponibilidade das amidas graxas; além disso, a homogeneidade do sistema evidenciada pelo baixo PDI assegura uma liberação controlada e reproduzível, otimizando a integração com os receptores-alvo no SNC. Esses fatores convergem para potencializar as capacidades farmacológicas das amidas graxas, garantindo uma melhor modulação da resposta anticonvulsivante e ampliando a eficácia terapêutica no manejo da epilepsia.

Quando observada a Figura 8, é possível compreender que a utilização de uma nanoemulsão contendo os análogos a endocanabinoides obteve melhores resultados de potencial neuroprotetor do que apenas os análogos utilizados no ensaio, isto se justifica pelo uso do sistema de entrega de fármacos, que permite a suspensão das amidas graxas em gotículas que aumentam a sua dispersão no sistema ao passo que melhora sua atividade farmacológica, potencializando sua função anticonvulsivante, diminuindo sua toxicidade.

Os animais do grupo Diazepam além de não apresentarem evolução epileptogênica, também não apresentaram evolução do score de Racine (1972), tendo então como média deste grupo o ponto 0 da escala em todos os períodos observados.

Através do protocolo abrasamento químico (*kindling*), foi possível obter excelentes resultados advindos das induções realizadas pela metodologia de abrasamento. Os camundongos tratados não apresentaram evoluções perceptíveis durante as observações feitas durante o período de 11 aplicações com o agente pró-convulsivante.

Este protocolo é registrado na literatura como método de ótima confiabilidade e reprodução, como visto em ensaios de Zhao *et al.* (2024), onde foi explorado o potencial antiepilético do oridonin, um alcaloide neuroprotetor com propriedades anti-inflamatórias, em modelo de epilepsia crônica induzida por PTZ em camundongos, com o oridonin (1 e 5mg/kg) reduziu danos neuronais, aumentando a latência das convulsões e diminuindo a duração das crises, alcançando a epileptogênese máxima, entre as administrações 12º e 15º.

Ao longo dos 24 dias em que se transcorreram a administração dos tratamentos e induções no modelo de abrasamento animal, o grupo de animais submetido ao benzodiazepínico padrão, Diazepam, não apresentou evolução no score de Racine como também nas convulsões em nenhum nível de grandeza ou intensidade, demonstrando que o fármaco escolhido para compor o controle positivo manteve os animais dentro das condições epiléticas esperadas, não

demonstrando avanço da piora do quadro nervoso, oriundo dos abrasamentos com pentilenotetrazol.

A mistura complexa de ácidos graxos que compõe o *pool* utilizado para a biossíntese das amidas graxas caracteriza-se como uma matriz lipídica rica, na qual diferentes ácidos graxos, como o ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoleico e traços de outros interagem sinergicamente para promover efeitos biológicos amplificados (LIU *et al.*, 2022), estudos evidenciam que sistemas compostos por misturas de ácidos graxos frequentemente exibem propriedades terapêuticas mais robustas quando comparados aos respectivos compostos isolados. A utilização dessas amidas oriundas dos ácidos de um *pool* complexo submetido ao processo de amidação, permite a modulação simultânea de múltiplas vias de interesse, maximizando o alcance dos efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios (BHAT *et al.*, 2021) presentes nas respectivas vias para o tratamento da epilepsia.

Essa complexidade é fundamental para justificar o uso do *pool* integral em vez de componentes isolados, o ácido oleico, por exemplo, apresenta propriedades moduladoras de receptores endocanabinoides e GABAérgicos (KUMARI *et al.*, 2020), enquanto o ácido linoleico contribui com a geração de mediadores anti-inflamatórios, o ácido palmítico reforça a estabilidade estrutural e funcional das membranas celulares. A interação entre esses ácidos graxos (e seus derivados obtidos via processo biocatalítico de amidação) cria um ambiente bioquímico em que os efeitos complementares e sinérgicos podem atenuar mais efetivamente os processos de excitotoxicidade e inflamação exacerbados no sistema nervoso central durante a epileptogênese (KOLLIPARA, 2023).

A preservação do *pool* completo de constituintes lipídicos nas formulações, como a nanoemulsão utilizada (NFAA), potencializa a eficácia terapêutica, permitindo uma distribuição mais eficiente pelo organismo e uma interação mais ampla com alvos moleculares no SNC (ELISABETSKY & NUNES, 2020). Este efeito sinérgico também pode ser relevante para melhorar a estabilidade das nanoemulsões e otimizar a entrega no tecido cerebral, aumentando a biodisponibilidade e a eficácia clínica, como observado nos resultados obtidos no modelo experimental (PAREDES-RUIZ *et al.*, 2021). Essa característica ressalta a importância de considerar misturas lipídicas completas em estratégias terapêuticas para o manejo da epilepsia e outros distúrbios neurológicos.

## 6. CONCLUSÃO

---

O presente estudo demonstrou que as amidas graxas obtidas a partir do azeite de oliva, bem como a sua incorporação em sistemas nanoemulsionados, apresentam significativo efeito anticonvulsivante em modelo de epilepsia química, induzida por pentilenotetrazol (PTZ). A biocatálise enzimática permitiu a obtenção de oleiletanolamida (OEA) e palmitoiletanolamida (PEA) em proporções majoritárias em relação as outras amidas graxas obtidas.

A caracterização físico-química da nanoemulsão revelou um sistema estável, com potencial zeta altamente negativo e baixa polidispersividade. Esses fatores favorecem sua estabilidade coloidal e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do produto nanoemulsionado elaborado. No modelo experimental, a administração das amidas graxas nanoemulsionadas reduziu significativamente a severidade das crises convulsivas, conforme demonstrado pela escala de Racine (1972), apresentando um efeito neuroprotetor superior às amidas graxas livres.

Os resultados obtidos reforçam o potencial das amidas graxas como candidatos a novos fármacos anticonvulsivantes e lhes apresenta como possíveis abordagens para o desenvolvimento eficaz e seguro de medicamentos para pacientes epiléticos, proporcionando-lhes maior qualidade de vida sem renunciar a seu potencial terapêutico, especialmente para pacientes que não respondem aos tratamentos farmacológicos convencionais, ou não farmacológicos.

## REFERÊNCIAS

---

- ABDELMONEM, Rehab et al. Development, characterization, and in-vivo pharmacokinetic study of lamotrigine solid self-nanoemulsifying drug delivery system. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 4343-4362, 2020.
- ACAR-TEK, Nilüfer; AĞAGÜNDÜZ, Duygu. Olive leaf (*Olea europaea* L. folium): potential effects on Glycemia and Lipidemia. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 76, n. 1, p. 10- 15, 2020.
- AGRAWAL, Niruj; MULA, Marco. Treatment of psychoses in patients with epilepsy: an update. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 9, p. 2045125319862968, 2019.
- AKYÜZ, Enes. A new view of the Racine scoring system in the pentylenetetrazol epilepsy model. **Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, v. 17, n. 2, p. 306-310, 2020.
- 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.
- ALVA-DÍAZ, Carlos et al. Prevalence and incidence of epilepsy in Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis of population-based studies. **Epilepsia**, v. 62, n. 4, p. 984-996, 2021.
- ANDRADE, Mariana Filipa Moreira. Dieta cetogénica-Abordagem terapêutica na epilepsia refratária ao tratamento farmacológico. 2022.
- AQUINO, Pedro Everson Alexandre de. Avaliação do efeito anticonvulsivante neuroprotetor de N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina isolada de *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. Ex Roem. & Schult.) TD Penn.: relação com o teor de L-prolina da molécula. 2021.
- ARAÚJO, Pedro HF et al. Direct and solvent-free aminolysis of triglyceride from *Oenocarpus bataua* (Patawa) oil catalyzed by Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **Catalysis Letters**, v. 148, p. 843-851, 2018.
- ATRE, Prachi; RIZVI, Syed AA. A brief overview of quality by design approach for developing pharmaceutical liposomes as nano-sized parenteral drug delivery systems. **RSC Pharmaceutics**, 2024.
- BASU, Debasis. Palmitoylethanolamide, an endogenous fatty acid amide, and its pleiotropic health benefits: A narrative review. **The Journal of Biomedical Research**, 2024.
- BEGHI, Ettore. The epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology*, v. 54, n. 2, p. 185-191, 2020.
- BELÉM, Francisco Anderson Dantas. Tratamento farmacológico do estado de mal epiléptico: uma revisão. **Caderno Pedagógico**, v. 21, n. 1, p. 1060-1075, 2024.
- BELISÁRIO, Eduarda de Souza. **Kefir e antiepilépticos: neuroproteção em modelo experimental de crises convulsivas**. 2023. Tese de Doutorado. Brasil.
- BHAT, Medha et al. Opportunities and challenges of fatty acid conjugated therapeutics. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 236, p. 105053, 2021.
- BIANCO, Arthur Filipini Rodrigues. **Desenvolvimento de nanocarreadores para entrega combinada de cisplatina e dexametasona para o tratamento de glioblastoma multiforme**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BONI, Fernanda Isadora. Multifunctional polymeric systems based on microparticles containing nanocarriers for colonic delivery of camptothecin. 2022.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIGO, Francesco; LATTANZI, Simona. Anticonvulsant 28gentes: benzodiazepines (clobazam, clonazepam, diazepam, lorazepam, midazolam). **NeuroPsychopharmacotherapy**, p. 1-8, 2020.

BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. 1. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1994. 124p.

CHAUDHARY, Priya et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. **Frontiers in chemistry**, v. 11, p. 1158198, 2023.

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

CHEN, Yu et al. Neuroinflammatory mediators in acquired epilepsy: an update. **Inflammation Research**, v. 72, n. 4, p. 683-701, 2023.

CHRISTIE, William W. et al. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **inform**, v. 12, p. 147-152, 2001.

COLANGELI, Roberto et al. 2-AG-mediated Control of GABAergic Signaling is Impaired in a Model of Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, 2022.

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.

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.

CUNHA, Sara et al. Improving drug delivery for Alzheimer's disease through nose-to-brain delivery using nanoemulsions, Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and in situ hydrogels. **International journal of nanomedicine**, p. 4373-4390, 2021.

DA PAZ, Erivânia Guedes et al. INTERNAÇÕES POR EPILEPSIA NO BRASIL: UM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DESCRITIVO. **ANAIS DA I MOSTRA DE PESQUISA E EXTENSÃO**, p. 533.

DA SILVA, Thamyres VN et al. Dietary Euterpe oleracea Mart. attenuates seizures and damage to lipids in the brain of Colossoma macropomum. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 1851-1864, 2021.

D'ASCANIO, F.; FERREIRA, Inês; JORGE, Rui. Dieta Cetogénica e epilepsia: uma revisão narrativa da literatura. **Acta Portuguesa de Nutrição**, p. 64-67, 2021.

DE CASTRO, Jheovanne Anjos et al. Aspectos Na Abordagem Terapêutica Do Paciente Com Epilepsia-Uma Revisão De Literatura. **Revista Científica do Tocantins**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2021.

DE FARIAS, Wanderson Santos et al. Terapia para convulsão resistente a medicamentos: epilepsia de lobo temporal mesial. **COGNITIONIS Scientific Journal**, v. 7, n. 2, p. e439-e439, 2024.

DENG, Jing et al. Sema7A, a brain immune regulator, regulates seizure activity in PTZ-kindled epileptic rats. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 101-116, 2020.

DIAS, Renan Kiister. **Avaliação da qualidade de azeites de oliva extra virgem**

**monovarietais produzidos no Brasil.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

DONG, Feng et al. Identification of the Novel Compounds with Potential Beneficial Functions in Olive Oil Based on Uplc-Hdms. **Available at SSRN 4592053.**

EL QARNIFA, Samira; EL ANTARI, Abderraouf; HAFIDI, Abdellatif. Effect of maturity and environmental conditions on chemical composition of olive oils of introduced cultivars in Morocco. **Journal of Food Quality**, v. 2019, 2019.

ELISABETSKY, Elaine; NUNES, Domingos S. Central Nervous System Effects of Essential Oil Compounds. **Handbook of Essential Oils**, p. 303-344, 2020.

Epidemiologia dos casos de internação hospitalar por epilepsia no estado do Tocantins em 2018. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 17268-17280, 2020.

ESSAFI RHOUMA, Hanen et al. Olea europaea L. Flowers as a new promising anticancer natural product: phenolic composition, antiproliferative activity and apoptosis induction. **Natural Product Research**, v. 35, n. 11, p. 1836-1839, 2021.

FAHEEM, Muhammad et al. A comprehensive review on antiepileptic properties of medicinal plants. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 103478, 2022.

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.

FARAONE, Immacolata et al. Focus on Olea europaea L. pruning by-products: extraction techniques, biological activity, and phytochemical profile. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 6, p. 1835-1849, 2021.

FERNANDO, Shaminda. Why convulsions and unconsciousness occur in non-epileptic seizures: a neuropsychological perspective. **British Journal of Neuroscience Nursing**, v. 17, n. 5, p. 187-191, 2021.

FONSECA-SANTOS, BRUNO. Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração intranasal de trans-resveratrol e avaliação biológica em modelo de Alzheimer induzido. 2019.

GONÇALVES, Francisca Maria Jorge. **Estudo da influência do agonista do recetor de estrogénio na reatividade do músculo liso vascular cerebral.** 2022. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior (Portugal).

GUEDES, Erika da Cruz et al. Ação do trans-anetol em modelos agudo e crônico de convulsão em camundongos. 2020.

GULDORUM, Yeliz et al. Ethosuximide-loaded bismuth ferrite nanoparticles as a potential drug delivery system for the treatment of epilepsy disease. **Plos one**, v. 19, n. 9, p. e0305335, 2024.

GUNTER, ALEXANDER; KUBRUSLY, R. C. Efeito do Sistema endocanabinoide no desenvolvimento de culturas de células de retina de galinha após exposição aguda e crônica ao Win 55, 212-2. **Monografia (Graduação em Biomedicina)–Instituto Biomédico. Universidade Federal Fluminense, Niterói**, v. 54, 2018.

HANNACHI, Hédia et al. Amino and fatty acids composition of olive stones for the discrimination of Olea europaea subsp. Europaea varieties. **Mediterranean Botany, [SI]**, v. 41, n. 2, p. 163-172, 2020.

HERNANDEZ, Ciria C.; MACDONALD, Robert L. A structural look at GABAA receptor mutations linked to epilepsy syndromes. **Brain research**, v. 1714, p. 234-247, 2019.

JAVAID, Sana et al. Tiagabine suppresses pentylenetetrazole-induced seizures in mice and



improves behavioral and cognitive parameters by modulating BDNF/TrkB expression and neuroinflammatory markers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 160, p. 114406, 2023.

JOHN, OKORONKWO Chibueze; EKWY, OGUKWE Cynthia; OBIOMA, OKEREKE Goodluck. RESEARCH ARTICLE CHARACTERIZATION AND FATTY ACID AMINATION OF TIGER NUT TUBER OIL. 2023.

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.

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.

KARAGIANNIS, Evangelos et al. Proteo-metabolomic journey across olive drupe development and maturation. **Food Chemistry**, v. 363, p. 130339, 2021.

KARAMI, Zahra; ZANJANI, Mohammad Reza Saghatchi; HAMIDI, Mehrdad. Nanoemulsions in CNS drug delivery: recent developments, impacts and challenges. **Drug discovery today**, v. 24, n. 5, p. 1104-1115, 2019.

KAROLY, Philippa J. et al. Cycles in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 5, p. 267-284, 2021.

KATSUWON, Karuna; ARYUSUK, Kornkanok; KRISNANGKURA, Kanit. Prediction of gas chromatographic retention times of esters of long chain alcohols and fatty acids. **Journal of chromatographic science**, v. 44, n. 3, p. 148-154, 2006.

KNOWLES, Richard G.; MONCADA, Salvador. Nitric oxide as a signal in blood vessels. **Trends in biochemical sciences**, v. 17, n. 10, p. 399-402, 1992.

KOLLIPARA, Roshni S. **Investigation of the Treatment of Epilepsy with Cannabinoids**. 2023. Tese de Doutorado. Memorial University of Newfoundland.

KOMARNYTSKY, Slavko et al. Endocannabinoid system and its regulation by polyunsaturated fatty acids and full spectrum hemp oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5479, 2021.

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

KUMAR, Praveen et al. Targeting Trauma-Induced Endocannabinoid System Dysfunction: A Novel Neuroprotective Approach For Traumatic Brain Injury. **Latin American Journal of Pharmacy: A Life Science Journal**, v. 42, n. 3, p. 1562-1578, 2023.

KUMARI, Shikha et al. Amide bond bioisosteres: Strategies, synthesis, and successes. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12290-12358, 2020.

KWAN CHEUNG, Keith A. et al. The interplay between the endocannabinoid system, epilepsy and cannabinoids. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 23, p. 6079, 2019.

LAURINDO, Lucas Fornari et al. Curcumin-based nanomedicines in the treatment of inflammatory and immunomodulated diseases: An evidence-based comprehensive review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 229, 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.
- LEE, David; MINKO, Tamara. Nanotherapeutics for nose-to-brain drug delivery: an approach to bypass the blood brain barrier. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2049, 2021.
- LI, Han et al. Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: Structures, biological activities, and neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 192, p. 112163, 2020.
- LI, Rong et al. HAP1 Modulates Epileptic Seizures by Regulating GABA AR Function in Patients with Temporal Lobe Epilepsy and in the PTZ-Induced Epileptic Model. **Neurochemical Research**, v. 45, p. 1997-2008, 2020.
- LIMA, Jaislânia Lucena de Figueiredo et al. Investigação da ação do trans-anetol em modelos comportamentais de convulsão em camundongos. 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 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.
- LIMA, Rafaely Nascimento; ANJOS, Charlene Souza dos; PORTO, André Luiz Meleiro. Síntese biocatalítica de amidase amidas-graxasderivadas do (S)-mandelato de etila: potencial para futuras aplicações cosmeticas. **Livro de Atas**, 2018.
- LIU, Li-Wei et al. Comprehensive metabolomics and lipidomics profiling uncovering neuroprotective effects of Ginkgo biloba L. leaf extract on Alzheimer's disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 1076960, 2022.
- LIU, Ting et al. Preparation, characterization, and antioxidant activity of nanoemulsions incorporating lemon essential oil. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 650, 2022.
- LIU, Xiaoxia et al. Integrated analysis of fatty acid metabolism and transcriptome involved in olive fruit development to improve oil composition. **Forests**, v. 12, n. 12, p. 1773, 2021.
- LOMBROSO, Cesare T. Intermittent home treatment of epileptic relapses with diazepam.In: **The Medical Treatment of Epilepsy**. CRC Press, 2020. P. 345-352.
- LÖSCHER, Wolfgang et al. Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. **Pharmacological reviews**, v. 72, n. 3, p. 606-638, 2020.
- LU, Hui-Chen; MACKIE, Ken. Review of the endocannabinoid system. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607-615, 2021.
- MADADZADEH, Mohammad et al. Phytohormone abscisic acid boosts pentobarbital-induced sleep through activation of GABA-A, PPAR $\beta$  and PPAR $\gamma$  receptor signaling. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 79, n. 03, p. 216-221, 2021.
- MAGALHÃES, Eni Maria et al. O uso de benzodiazepínicos na prática clínica: uma revisão integrativa. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 16, n. 2 Edição Especial, 2024.
- 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.

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.

MARTÍNEZ-AGUIRRE, Christopher; CINAR, Resat; ROCHA, Luisa. Targeting endocannabinoid system in epilepsy: for good or for bad. **Neuroscience**, 2021

MAYA-LÓPEZ, Marisol et al. A cannabinoid receptor-mediated mechanism participates in the neuroprotective effects of oleamide against excitotoxic damage in rat brain synaptosomes and cortical slices. **Neurotoxicity Research**, v. 37, p. 126-135, 2020.

MECCARIELLO, Rosaria. Endocannabinoid system in health and disease: Current situation and future perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3549, 2020.

MELIK-KASUMOV, T. B. et al. Neuroprotective Effect of Palmitoylethanolamide in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 58, n. 2, p. 448-456, 2022.

MELIN, Esbjörn et al. Disease modification by combinatorial single vector gene therapy: a preclinical translational study in epilepsy. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, v. 15, p. 179-193, 2019.

MENG, Fanwei; YAO, Lifan. The role of inflammation in epileptogenesis. **Acta Epileptologica**, v. 2, n. 1, p. 15, 2020.

MILLOGO, Athanase et al. Neurocysticercosis and epilepsy in sub-Saharan Africa. **Brain Research Bulletin**, v. 145, p. 30-38, 2019.

MISRA, Shashi Kiran; PATHAK, Kamla. Nose-to-brain targeting via nanoemulsion: significance and evidence. **Colloids and Interfaces**, v. 7, n. 1, p. 23, 2023.

MORANO, Alessandra et al. Cannabinoids in the treatment of epilepsy: current status and future prospects. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 16, p. 381, 2020.

MUNEKATA, Paulo ES et al. Phenolic compounds obtained from olea europaea by-products and their use to improve the quality and shelf life of meat and meat products—A review. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1061, 2020.

MURRU, Elisabetta et al. Conjugated linoleic acid and brain metabolism: a possible anti-neuroinflammatory role mediated by PPAR $\alpha$  activation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 587140, 2021.

NASCIMENTO, Pedro Henrique do Bomfim. **Novos derivados tiossemicarbazonas e tiazóis: síntese, elucidação estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

NAVAJAS-PORRAS, B. et al. Relationship of quality parameters, antioxidant capacity and total phenolic content of EVOO with ripening state and olive variety. **Food chemistry**, v. 325, p. 126926, 2020.

NAZAROV, A. I. CONSEQUENCES OF SEIZURES AND EPILEPSY IN CHILDREN. **Web NGROUPAYE**, Gwladys Temkou et al. Pentylenetetrazole kindling-induced epilepsy rat models: Insight on the severity state, a comparative study. **IBRO Neuroscience Reports**, v. 13, p. 164-176, 2022.

NOLASCO, Marianna Neves; FERREIRA, Winnie Marques; RIVERO, José Roberto

Lopez.

OANA, Shingo et al. Myoclonic seizures of inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency treated with diazepam and clonazepam: a case report. **Epilepsy & Seizure**, v. 14, n. 1, p. 78- 83, 2022.

**of Scientist: International Scientific Research Journal**, v. 3, n. 02, p. 483-489, 2022.

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, Fábio Rodrigues De 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. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 3, p. 43, 2020.

PANZARINI, Elisa et al. Novel therapeutic delivery of nanocurcumin in central nervous system related disorders. **Nanomaterials**, v. 11, n. 1, p. 2, 2020.

PAREDES-RUIZ, Karen Jaqueline et al. On the biomedical properties of endocannabinoid degradation and reuptake inhibitors: Pre-clinical and clinical evidence. **Neurotoxicity Research**, v. 39, n. 6, p. 2072-2097, 2021.

PATHAK, Sachchidanand; GUPTA, Gaurav; GILHOTRA, Ritu M. The Role of Diazepam in Epigenetics: From the Molecular Level to Clinical Implications. **Advances in mind-body medicine**, v. 35, n. 1, p. 25-33, 2021.

PEREZ, Carla Cristina et al. A versatilidade de derivados de silício na descoberta de novos fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 4, p. 981-992, 2021.

POOLCHANUAN, Prapassorn et al. An anticonvulsive drug, valproic acid (valproate), has effects on the biosynthesis of fatty acids and polyketides in microorganisms. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

POSTNIKOVA, Tatyana Y. et al. Delayed Impairment of Hippocampal Synaptic Plasticity after Pentylentetrazole-Induced Seizures in Young Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 13461, 2022.

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Epilepsia. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS**, 2019. Acesso em: 23/02/2023. Disponível em: <https://clnicos-e-diretrizes-terapeuticas>.

PUTRA, Marson et al. Fyn-tau ablation modifies PTZ-induced seizures and post-seizure hallmarks of early epileptogenesis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 14, p. 592374, 2020.

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

RAI, Vineet K.; SHARMA, Amit; THAKUR, Amisha. Quality control of nanoemulsion: by PDCA cycle and 7QC tools. **Current Drug Delivery**, v. 18, n. 9, p. 1244-1255, 2021.

RAMOS, Euller Massilon Costa et al. O canabidiol no tratamento da epilepsia: Cannabidiol in the treatment of epilepsy. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 70103-70118, 2022.

RAWAL, Shruti U.; PATEL, Bhoomika M.; PATEL, Mayur M. New drug delivery systems developed for brain targeting. **Drugs**, v. 82, n. 7, p. 749-792, 2022.

REN, Gaihuan et al. Preparation of polyoxypropylene surfactant-based nanoemulsions using phase inversion composition method and their application in oil recovery. **Journal of Molecular Liquids**, v. 342, p. 117469, 2021.

RIZWAN, Sabeena et al. Fatty acids and phenolic profiles of extravirgin olive oils from selected Italian cultivars introduced in Southwestern Province of Pakistan. **Journal of oleo science**, v.

68, n. 1, p. 33-43, 2019.

ROCHA, Luisa et al. Endocannabinoid system and cannabinoid 1 receptors in patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy and comorbid mood disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, p. 52, 2020.

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. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 3, p. 43, 2020.

ROMANI, Annalisa et al. Health effects of phenolic compounds found in extra-virgin olive oil, by-products, and leaf of Olea europaea L. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1776, 2019.

ROSAL, Maria Eduarda Prado Martins et al. EPILEPSIA DO TIPO AUSÊNCIA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 5, n. 5, p. e555237-e555237, 2024.

ROSAL, Maria Eduarda Prado Martins et al. EPILEPSIA DO TIPO AUSÊNCIA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 5, n. 5, p. e555237-e555237, 2024.

ROUSSEAU, Maria Cecilia et al. Fatty acid composition of olive oil in response to fruit canopy position and artificial shading. **Scientia Horticulturae**, v. 271, p. 109477, 2020.

SAKAR, El Hassan et al. Variations in physicochemical characteristics of olive oil (cv 'Moroccan Picholine') according to extraction technology as revealed by multivariate analysis. **AgriEngineering**, v. 4, n. 4, p. 922-938, 2022.

SALATA, Giovanna Cassone; LOPES, Luciana B. Phosphatidylcholine-based nanoemulsions for paclitaxel and a P-glycoprotein inhibitor delivery and breast cancer intraductal treatment. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1110, 2022.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Lucía et al. Quality attributes and fatty acid, volatile and sensory profiles of "Arbequina" hydrosustainable olive oil. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2148, 2019.

SANTOS, Aisel Santos; CHACÓN, Lilia María Morales; ROMANIDY, Manuel Ulises Dearriba. Update on the etiology of epilepsy. **Revista Cubana de Neurología y Neurocirugía**, v. 9, n. 2, p. 1-20, 2019.

SANTOS, Aline Matilde Ferreira dos et al. Investigação do potencial antiepiléptico de um óleo de extrato de Cannabis sativa rico em canabidiol: uma abordagem in sílico e in vivo. 2023.

SANTOS, Leticia Maria Simião. **Avaliação da Qualidade dos Ácidos Graxos dos Azeites Extravirgem Comercializados na Tríplice Fronteira**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso.

SARLO, Gabrielle L.; HOLTON, Kathleen F. Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review. **Seizure**, v. 91, p. 213.

SCHMIEDHOFER, Philip et al. Cys-loop receptors on cannabinoids: All high?. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 2349, 2022.

SEN, Arjune et al. Epilepsy in older people. **The Lancet**, v. 395, n. 10225, p. 735-748, 2020.

SENN, Lara; CANNAZZA, Giuseppe; BIAGINI, Giuseppe. Receptors and channels possibly mediating the effects of phytocannabinoids on seizures and epilepsy. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 8, p. 174, 2020.

SILVA, Anaisa Vieira da. **Use medicinal of cannabinoids**. 2020. Tese de Doutorado.

SILVA, Isabela Louise Caldeira et al. Tratamento da epilepsia com canabidiol: uma revisão da literatura Tratamento da epilepsia com canabidiol: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Revisão de Saúde**, v. 4, não. 6, pág. 28352-28365, 2021.

SILVA, Nágila Monteiro da et al. Fatty Acid Amides Suppress Proliferation via Cannabinoid Receptors and Promote the Apoptosis of C6 Glioma Cells in Association with Akt Signaling Pathway Inhibition. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 7, p. 873, 2024.

SILVA, Thaís Alves et al. Avaliação da biodistribuição encefálica do 7-nitroindazol livre nanoemulsionado. 2022.

SMOLYAKOVA, Anna-Maria et al. The endocannabinoid system and synthetic cannabinoids in preclinical models of seizure and epilepsy. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 37, n. 1, p. 15-27, 2020.

SOUSA, Angela Maria; SLULLITEL, Alexandre; SERRA, Thiago Siqueira. As lacunas do nosso conhecimento e as pesquisas futuras sobre o sistema endocanabinoide e o fenômeno doloroso. **BrJP**, 2023.

SOUZA, Rafael Aparecido Carvalho et al. Estudos das superfícies de Hirshfeld, docking molecular e análise de parâmetros farmacocinéticos de ADME de complexos de Níquel (II) com tiossemicarbazonas. 2022.

SPERK, Günther et al. Increased expression of GABAA receptor subunits associated with tonic inhibition in patients with temporal lobe epilepsy. **Brain communications**, v. 3, n. 4, p. fcab239, 2021.

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.

THIJS, Roland D. et al. Epilepsy in adults. **The Lancet**, v. 393, n. 10172, p. 689-701, 2019.

VAN ERUM, Jan; VAN DAM, Debby; DE DEYN, Peter Paul. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. **Epilepsy & Behavior**, v. 95, p. 51-55, 2019.

VANTI, Giulia. Recent strategies in nanodelivery systems for natural products: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 4311-4326, 2021.

VESGA-JIMÉNEZ, Diego Julián et al. Fatty acids: an insight into the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic potential. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 5, p. 2577, 2022.

VIAU, Michelle; MEYNIER, Anne. Gas Chromatography Analysis of Fatty Acid Derivatives. In: **Multidimensional Characterization of Dietary Lipids**. New York, NY: Springer US, 2024. p. 67-76.

WANG, Xinyue et al. Updated insight into the characterization of nano-emulsions. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 20, n. 1, p. 93-114, 2023.

WEBLER, Emanuelle Menegazzo; DA ROSA, Maurício Ferreira. Tecnologia farmacêutica na melhoria da solubilidade de medicamentos para hipertensão pulmonar Pharmaceutical technology in the improvement of the solubility of pulmonary hypertension drugs. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 78293-78312, 2021.

YOO, Miyoung et al. Analysis of Vaccenic and Elaidic acid in foods using a silver ion cartridge applied to GC×GC-TOFMS. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, p. 1320550, 2024.

ZAMBERLETTI, Erica; RUBINO, Tiziana; PAROLARO, Daniela. Therapeutic potential of cannabidivarin for epilepsy and autism spectrum disorder. **Pharmacology & Therapeutics**, v.

226, p. 107878, 2021.

ZHAO, Ting et al. Oridonin exerts anticonvulsant profile and neuroprotective activity in epileptic mice by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis. **International Immunopharmacology**, v. 134, p. 112247, 2024.

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

ZHU, Shenlong et al. Genetic diversity analysis of olive germplasm (*Olea europaea* L.) with genotyping-by-sequencing technology. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 755, 2019.