

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**GIULIAN NEPOMUCENO DE MENEZES**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS EMULSIONADOS  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum* EM RELAÇÃO À  
PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE DILAPIOL**

**BRASÍLIA  
2018**

**GIULIAN NEPOMUCENO DE MENEZES**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS EMULSIONADOS  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum* EM RELAÇÃO À  
PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE DILAPIOL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tais Gratieri

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>Joyce Kelly R. da Silva

**BRASÍLIA**

**2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Giulian Nepomuceno de Menezes

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS EMULSIONADOS  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum* EM RELAÇÃO À  
PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE DILAPIOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 21 de maio de 2018.

### Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)  
Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Livia Cristina Lira de Sá Barreto  
Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Borin  
Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, família e amigos.

Aos meus pais, Sandra e Joaquim, por terem acreditado em mim mais do que eu mesma. Agradeço por todo incentivo e pelo amor incondicional.

Ao Ivo Neto, agradeço não apenas pelo auxílio na elaboração de gráficos e da estatística, mas também por estar sempre ao meu lado oferecendo todo apoio, paciência e carinho.

A todos os integrantes do Laboratório de tecnologia de medicamentos, alimentos e cosméticos (LTMAC), pelo suporte técnico e acolhimento durante esse tempo.

Aos amigos do laboratório, que tanto contribuíram com este trabalho através da troca de experiências. Em especial à Maíra Nunes e Ricardo Nunes que deram fundamental apoio na realização de experimentos na reta final.

Ao Prof. Dr. Guilherme Gelfuso pelo incentivo e toda disponibilidade em tirar dúvidas e sugerir correções. Ao Prof. Dr. Marcílio Cunha Filho pelas recomendações no desenvolvimento da pesquisa.

À minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joyce Kelly R. da Silva, da Universidade Federal do Pará, pelo envio de materiais.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tais Gratieri, por ter me concedido a oportunidade de realizar, crescer e aprender com esta pesquisa.

À Avifran e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Livia Barreto pelo auxílio na obtenção dos ovos de galinha utilizados no ensaio HET-CAM.

À Bonasa por fornecer as orelhas suínas, e em especial ao Roger pela recepção sempre cordial.

À Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado no país.

## RESUMO

MENEZES, Giulian Nepomuceno de. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas emulsionados contendo óleo essencial de *Piper aduncum* em relação à penetração cutânea de dilapiol**. Brasília, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

O óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPA) rico em dilapiol possui propriedades antifúngicas contra dermatófitos já descritas na literatura, o que o torna um bom candidato para o tratamento tópico de infecções. O objetivo do presente estudo foi desenvolver sistemas emulsionados para veiculação deste óleo essencial e avaliá-los quanto à penetração cutânea do seu componente majoritário. Foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificação do dilapiol por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV), no qual foi analisada seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limite de detecção e quantificação, segundo as diretrizes do *International Conference on Harmonization* (ICH). Em seguida, duas formas de apresentação farmacêutica para aplicação tópica foram desenvolvidas e caracterizadas: uma nanoemulsão e um emulgel polimérico de Pemulen<sup>®</sup>, ambos contendo 7,5% de OEPA. As formulações foram submetidas à avaliação das características organolépticas, tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta (quando aplicável), perfil de liberação, permeação cutânea *in vitro*, índice de irritabilidade (HET-CAM), viscosidade, espalhabilidade e estabilidade físico-química preliminar em distintas condições climáticas (40°C e 25°C). Os resultados indicaram que a nanoemulsão foi mais estável que o emulgel, apresentando menor decaimento no teor de dilapiol e menor variação de pH ao longo do tempo. Entretanto, o emulgel permitiu maior controle da liberação, com cinética de ordem zero e maior permeação cutânea do fitoativo (170,12 ± 19,26 µg/cm<sup>2</sup> após 6 horas de experimento) em relação à nanoemulsão, que apresentou liberação do ativo por difusão, de acordo com a cinética de Higuchi e permeação cutânea de 134,33 ± 25,02 µg/cm<sup>2</sup> em 6 horas de experimento. O emulgel apresentou ainda características reológicas em termos de viscosidade e espalhabilidade favoráveis à administração tópica mais cômoda e facilitada, em comparação à nanoemulsão. Todos os produtos desenvolvidos apresentaram bons índices de segurança (nanoemulsão pH 3,7 e emulgel classificados como “irritante leve”, e nanoemulsão pH 5,5 como “não irritante”). Além disso, concentrações de dilapiol acima da concentração inibitória mínima para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (CIM 500 µg/mL) foram observadas nos testes de permeação cutânea, sendo suficientes para o combate destes micro-organismos a partir de ambas as formulações, caracterizando, portanto, os sistemas emulsionados desenvolvidos como ferramentas promissoras no tratamento tópico de dermatofitoses com dilapiol.

**Palavras-Chave:** *Piper aduncum*, óleo essencial, dilapiol, nanoemulsão, emulgel, Pemulen.

## ABSTRACT

MENEZES, Giulian Nepomuceno de. **Development and evaluation of emulsified systems containing essential oil of *Piper aduncum* in relation to skin penetration of dillapiole**. Brasília, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

The essential oil of *Piper aduncum* (EOPA) rich in dillapiole has antifungal properties against dermatophytes, which enables it use to treat topical infections. The objective of the present study was to develop emulsified systems for the delivery of this essential oil and to evaluate them for skin penetration of its major component. An analytical method for the quantification of dilapiol by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) was developed and validated, in which the selectivity, linearity, precision, accuracy and limit of detection and quantification were analyzed according to International guidelines Conference on Harmonization (ICH). Then two forms of pharmaceutical presentation for topical application were developed and characterized: a nanoemulsion and a Pemulen<sup>®</sup> polymeric emulgel, both containing 7.5% EOPA. The formulations were submitted to evaluation of organoleptic characteristics, droplet size, polydispersity index and zeta potential (when applicable), release profile, *in vitro* skin permeation, irritability index (HET-CAM), viscosity, spreadability and preliminary physical-chemical stability under different climatic conditions (40°C and 25°C). The results indicated that the nanoemulsion was more stable than the emulgel, presenting less decay in the dillapiole content and lower pH variation over time. However, the emulgel allowed greater control of the release, with zero order kinetics and greater cutaneous permeation of the phytoactive ( $170.12 \pm 19.26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  after 6 hours of experiment) in relation to the nanoemulsion, which presented release of dillapiole by diffusion, according to the Higuchi kinetics and cutaneous permeation of  $134.33 \pm 25.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  in 6 hours of experiment. Emulgel also showed rheological characteristics in terms of viscosity and spreadability favorable to the more convenient and facilitated topical administration, compared to the nanoemulsion. All products developed showed good safety ratings (nanoemulsion pH 3.7 and emulgel classified as "slight irritant" and nanoemulsion pH 5.5 as "non-irritant"). Furthermore, concentrations dillapiole above the minimum inhibitory concentration for *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* (MIC 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were observed in the cutaneous permeation tests, sufficient to combat these microorganisms from both formulations, thus characterizing the emulsified systems developed as promising tools for the topical treatment of dermatophytosis with dillapiole.

**Key-words:** *Piper aduncum*, essential oil, dillapiole, nanoemulsion, emulgel, Pemulen.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Representação das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de <a href="http://defenderauto.info">http://defenderauto.info</a> ) .....	5
<b>Figura 2</b> Vias de permeação de fármacos pela pele: via intercelular, transcelular e transapendageal (adaptado de LANE, 2013) .....	7
<b>Figura 3</b> <i>Piper aduncum</i> (A) folhas da planta ( <a href="https://keyserver.lucidcentral.org/">https://keyserver.lucidcentral.org/</a> ); (B) estrutura química do componente majoritário dilapiol .....	10
<b>Figura 4</b> Diagrama esquemático de nanoemulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A), preparadas a partir de água, óleo e tensoativos. Os grupos polares dos tensoativos são representados por círculos e as caudas apolares são representadas por traços. (Fonte: própria autora).....	13
<b>Figura 5</b> Estrutura química do poli (ácido acrílico) Pemulen <sup>®</sup> .....	14
<b>Figura 6</b> Representação de emulgel polimérico formado por Pemulen <sup>®</sup> . (Fonte: própria autora).....	15
<b>Figura 7</b> Representação da remoção progressiva do estrato córneo pela técnica de <i>Tape Stripping</i> (adaptado de MOSER et al., 2001) .....	20
<b>Figura 8</b> Sequência de preparo da nanoemulsão contendo óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> . (Fonte: própria autora).....	24
<b>Figura 9</b> Representação esquemática do teste de membrana corioalantóide (HET-CAM) (adaptado de WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015) .....	26
<b>Figura 10</b> Fotografia ilustrativa do ensaio de viscosidade das formulações Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle (esquerda e direita, respectivamente) .....	28
<b>Figura 11</b> Fotografia ilustrativa da sequência realizada no ensaio de espalhabilidade (A) placa molde com orifício circular; (B) posicionamento da primeira placa sobre a amostra; (C) todas as 5 placas posicionadas sobre a amostra ao final do ensaio ....	29
<b>Figura 12</b> Modelo de célula de Franz vertical do tipo modificada .....	30
<b>Figura 13</b> Aplicação da técnica de <i>Tape Stripping</i> (A) aplicação da fita adesiva sobre a pele; (B) molde plástico utilizado para delimitar apenas a área difusional; (C) Estrato córneo removido pela fita.....	32
<b>Figura 14</b> Espectro de absorção na região do UV/VIS de uma solução metanólica de dilapiol a 50 µg/mL. Faixa de varredura: 190 a 800 nm .....	33

<b>Figura 15</b> Cromatograma em CLAE-UV representativo do dilapiol (solução metanólica a 20 µg/mL). Método: MeOH-H <sub>2</sub> O 75:25 (v/v); fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção 15 µL ; leitura em 290 nm. ....	35
<b>Figura 16</b> Cromatogramas em CLAE-UV. DIL=dilapiol; OEPA= óleo essencial de <i>P. aduncum</i> ; EC= estrato córneo; PR= pele remanescente; SDS= dodecil sulfato de sódio; TA= tensoativos (Span 80 <sup>®</sup> e Cremophor <sup>®</sup> ); PEM= Pemulen <sup>®</sup> .....	36
<b>Figura 17</b> Área do pico na quantificação do dilapiol (5 µg/mL) sozinho e adicionado aos extratos das camadas da pele. DIL= dilapiol; OEPA= óleo essencial de <i>P. aduncum</i> ; EC= estrato córneo; PR= pele remanescente; TA= tensoativos (Cremophor <sup>®</sup> e Span 80 <sup>®</sup> ); PEM= Pemulen <sup>®</sup> ; SDS= dodecil sulfato de sódio. Sem diferença estatisticamente significante entre os grupos. ....	37
<b>Figura 18</b> Linearidade (A) curva do dilapiol em metanol; (B) curva do dilapiol em SDS.....	38
<b>Figura 19</b> Gráfico pseudoternário de formulação composta por óleo (oleato de etila), mistura de tensoativos (Cremophor <sup>®</sup> e Span 80 <sup>®</sup> 4:1) dispersos em água em temperatura ambiente .....	42
<b>Figura 20</b> Fotografia ilustrativa do aspecto macroscópico da nanoemulsão contendo OEPA (Nano OEPA pH 3,7) .....	44
<b>Figura 21</b> Avaliação do tamanho de gotícula da Nano OEPA pH 3,7 e Nano Controle pH 3,7 ao longo de 90 dias, durante estudo de estabilidade preliminar .....	45
<b>Figura 22</b> Avaliação da irritabilidade de Nano OEPA pH 3,7 sobre a membrana corioalantóide dos ovos de galinha, em comparação com as soluções controle (solução fisiológica 0,9%, solução de NaOH 1M e solução tampão pH 3,7).....	49
<b>Figura 23</b> Avaliação da irritabilidade de Nano OEPA pH 5,5 e Pem OEPA sobre a membrana corioalantóide dos ovos de galinha, em comparação com as soluções controle (solução fisiológica 0,9%, solução de NaOH 1M e solução tampão pH 5,5) .....	51
<b>Figura 24</b> Fotografia ilustrativa do aspecto macroscópico do emulgel polimérico contendo OEPA (Pem OEPA).....	52
<b>Figura 25</b> Comportamento de expansão de Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle em função da massa aplicada.....	57
<b>Figura 26</b> Liberação de dilapiol através de membrana de acetato/nitrato de celulose ao longo de 24 horas, a partir de Nano OEPA pH 5,5 e Pem OEPA. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significante entre os grupos; p<0,05. (n=5) .....	58

- Figura 27** Dilapiol recuperado das camadas da pele nos testes de permeação *in vitro*; EC= estrato córneo e PR= pele remanescente.<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa entre os grupos;  $p < 0,05$ . (n=5) .....60
- Figura 28** Dilapiol quantificado no meio receptor ao longo de 6 horas (n=5). <sup>a</sup> Diferença estatística significativa entre os dois grupos ( $p < 0,05$ ). .....63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Composição do óleo de <i>P. aduncum</i> e sua fração rico em dilapiol (adaptada de FERREIRA et al., 2016) .....	17
<b>Tabela 2</b> Pontuação cumulativa para classificação das formulações quanto ao grau de irritabilidade (adaptada de LUEPKE, 1985).....	26
<b>Tabela 3</b> Modelos matemáticos aplicados ao estudo cinético de liberação.....	31
<b>Tabela 4</b> Otimização das condições cromatográficas para determinação do dilapiol. MeOH= metanol; H <sub>2</sub> O= água; ACN= acetonitrila; TR= tempo de retenção; VI= volume de injeção; N= pratos teóricos; T= fator de cauda .....	34
<b>Tabela 5</b> Precisão do método analítico. CV= coeficiente de variação .....	39
<b>Tabela 6</b> Exatidão do método analítico. CV= coeficiente de variação; R= recuperação .....	40
<b>Tabela 7</b> Tamanho (nm), PDI e potencial zeta da Nano OEPA pH 3,7 e Nano controle pH 3,7 .....	43
<b>Tabela 8</b> Tamanho (nm) e PDI da Nano OEPA pH 3,7 e Nano controle pH 3,7, armazenadas em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 90 dias.....	46
<b>Tabela 9</b> pH de Nano OEPA pH 3,7 armazenada em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 30 dias .....	47
<b>Tabela 10</b> Teor de dilapiol (%) em Nano OEPA pH 3,7, armazenada em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 30 dias .....	48
<b>Tabela 11</b> Tamanho (nm), PDI e potencial zeta da Nano OEPA pH 5,5 e Nano controle .....	50
<b>Tabela 12</b> pH de Pem OEPA armazenado em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 30 dias .....	53
<b>Tabela 13</b> Teor de dilapiol (%) em Pem OEPA armazenado em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 30 dias .....	54
<b>Tabela 14</b> Viscosidade mensurada para Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle .....	56
<b>Tabela 15</b> Espalhabilidade mensurada para a Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle .....	56
<b>Tabela 16</b> Valores dos fluxos de liberação do dilapiol a partir das formulações desenvolvidas e seus coeficientes lineares.....	59

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>A/O</b>	Água em óleo
<b>CG-DIC</b>	Cromatografia gasosa acoplada aos detectores de ionização de chamas
<b>CG-EM</b>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CLAE-UV</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DIL</b>	Dilapiol
<b>EC</b>	Etrato córneo
<b>EP</b>	Epiderme
<b>Eq</b>	Equação
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonization</i>
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>Nano Controle</b>	Nanoemulsão sem o óleo essencial utilizada como controle
<b>Nano OEPA</b>	Nanoemulsão contendo óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>
<b>O/A</b>	Óleo em água

<b>OEPA</b>	Óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>
<b>PDI</b>	Índice de polidispersão
<b>Pem</b>	Pemulen <sup>®</sup>
<b>Pem Controle</b>	Emulgel polimérico sem o óleo essencial utilizado como controle
<b>Pem OEPA</b>	Emulgel polimérico contendo óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PR</b>	Pele remanescente
<b>R</b>	Recuperação
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1 A PELE .....	4
3.2 PERMEAÇÃO CUTÂNEA .....	5
3.3 INFECÇÕES FÚNGICAS CUTÂNEAS .....	7
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	9
3.5 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper aduncum</i> .....	9
3.6 NANOEMULSÕES .....	11
3.7 EMULGÉIS DE ÁCIDO POLIACRÍLICO.....	13
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1 MATERIAL .....	16
4.1.1 Óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> e óleo de Dilapiol .....	16
4.1.2 Pele .....	17
4.2 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	18
4.2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do Dilapiol.....	18
4.2.2 Condições cromatográficas para quantificação do Dilapiol por CLAE.....	18
4.2.3 Validação do método analítico para quantificação do Dilapiol por CLAE com detecção no ultravioleta (UV) .....	19
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DILAPIOL NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper aduncum</i> .....	22
4.4 GARANTIA DA “CONDIÇÃO <i>SINK</i> ” .....	22
4.5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper aduncum</i> .....	23
4.5.1 Nanoemulsão .....	23
4.5.2 Emulgel polimérico .....	27
4.6 AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE E ESPALHABILIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS .....	28
4.7 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO DILAPIOL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS .....	30
4.8 AVALIAÇÃO PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO DILAPIOL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS .....	31

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
5.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	33
5.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do Dilapiol.....	33
5.1.2 Condições cromatográficas para quantificação do Dilapiol por CLAE-UV.....	33
5.1.3 Validação do método analítico para quantificação do Dilapiol por CLAE com detecção no ultravioleta (UV) .....	35
5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DILAPIOL NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper aduncum</i> .....	40
5.3 GARANTIA DA “CONDIÇÃO SINK” .....	40
5.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper aduncum</i> .....	41
5.4.1 Nanoemulsão .....	41
5.4.2 Nanoemulsão em pH 5,5.....	49
5.4.3 Emulgel polimérico .....	52
5.5 AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE E ESPALHABILIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS .....	55
5.6 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO DILAPIOL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS .....	57
5.7 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS .....	59
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A caracterização físico-química dos óleos essenciais provenientes de plantas aromáticas foi negligenciada até a metade do século XX (BILIA et al., 2014). No entanto, a medicina tradicional sempre utilizou essa fonte natural de substâncias terapêuticas de forma intuitiva para o tratamento de enfermidades usuais (VALE, 2002).

*Piper aduncum* L. (Piperaceae), popularmente conhecida como “pimenta-de-macaco” ou “aperta-ruão”, é um arbusto tropical que cresce naturalmente na Amazônia e na Mata Atlântica do Brasil (SANTOS et al., 2013). Seu óleo essencial é rico em dilapiol, um fenilpropanóide com propriedades anti-helmíntica, inseticida e antimicrobiana já bem descritas (BELZILE et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA; CARDOSO; JÚNIOR, 2013; POTZERNHEIM et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Destaca-se ainda a propriedade antifúngica do dilapiol contra *Aspergillus fumigatus* e algumas espécies dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (FERREIRA et al., 2016).

A via tópica de administração é reconhecida como uma excelente alternativa à terapia antifúngica oral de longa duração, por evitar tanto a irritação gástrica e o metabolismo de primeira passagem, quanto a ocorrência de outros efeitos tóxicos sistêmicos e interação com outros medicamentos (CHOUDHURY et al., 2017; SENGUPTA; CHATTERJEE, 2017). No entanto, a principal limitação da aplicação cutânea de substâncias é a baixa permeabilidade do estrato córneo, que dificulta a difusão dos fármacos através dele para as camadas mais profundas da pele (LOPES, 2014).

Tendo em vista as dificuldades no tratamento de dermatofitoses profundas e os desafios apresentados pela via tópica de administração de fármacos, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para aprimorar o tratamento de doenças dermatológicas causadas por fungos (SANTOS et al., 2013). Os nanossistemas fazem parte desta gama de estudos inovadores e destacam-se por serem mais estáveis que os sistemas convencionais, além de promoverem a proteção do ativo contra possíveis instabilidades ou interações com outras substâncias da formulação, e também possibilitar em certos casos a modulação da liberação de fármacos, diminuindo a dose terapêutica. Nesta esfera, podemos citar as nanoemulsões, que potencialmente favorecem a absorção cutânea de substâncias (LOPES, 2014), além

de serem sistemas homogêneos, translúcidos e de fácil preparação e alta espalhabilidade quando aplicadas na pele (CHOUDHURY et al., 2017).

Adicionalmente, os emulgéis são formulações mais simples que as nanoemulsões e apresentam maior estabilidade quanto comparados às formulações tópicas convencionais, sendo um tipo de veículo muito utilizado para formulações cosméticas (SHAHIN et al., 2011). Embora não sejam classificados usualmente como promotores de absorção cutânea, os polímeros utilizados na sua preparação podem influenciar na biodisponibilidade tópica dos fármacos incorporados na formulação, além do que conferem maior viscosidade e baixa irritabilidade ao produto final, o que viabiliza a aplicação sobre a pele. Ademais, a elevada viscosidade e as interações químicas e eletroestéricas dos polímeros com a fase oleosa da formulação podem contribuir para um maior controle da liberação de fármacos lipofílicos (KNÖÖS et al., 2013a; SHAHIN et al., 2011).

Considerando a eficácia do dilapiol para o combate de fungos dermatófitos e o uso negligenciado como produto tópico, este trabalho propôs o desenvolvimento de formulações para veicularem OEPA e possibilitarem sua aplicação cutânea, como uma nova estratégia para o tratamento de infecções fúngicas cutâneas.

## 2 OBJETIVOS

Desenvolver sistemas emulsionados para veiculação do óleo essencial de *Piper aduncum* e avaliá-los quanto à penetração cutânea do dilapiol.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

1. Padronizar e validar metodologia para quantificação do dilapiol em CLAE-UV;
2. Desenvolver e caracterizar sistemas emulsionados para incorporação do óleo essencial de *Piper aduncum*;
3. Estudar a estabilidade preliminar das formulações;
4. Avaliar o grau de irritabilidade das formulações;
5. Avaliar a viscosidade e espalhabilidade das formulações;
6. Caracterizar a cinética de liberação do dilapiol a partir das formulações desenvolvidas;
7. Avaliar a capacidade de penetração do dilapiol através da pele a partir de distintos sistemas emulsionados.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017; TONČIĆ et al., 2017), compreendendo cerca de 15% do peso total de um adulto (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017). É composta por três principais camadas anatomicamente distintas: a hipoderme, derme e epiderme (EP) (Figura 1) (BOUWSTRA et al., 2003). A pele proporciona uma barreira mecânica de proteção contra o ambiente externo, além de participar da termorregulação, metabolismo e regulação do equilíbrio de fluidos (TONČIĆ et al., 2017).

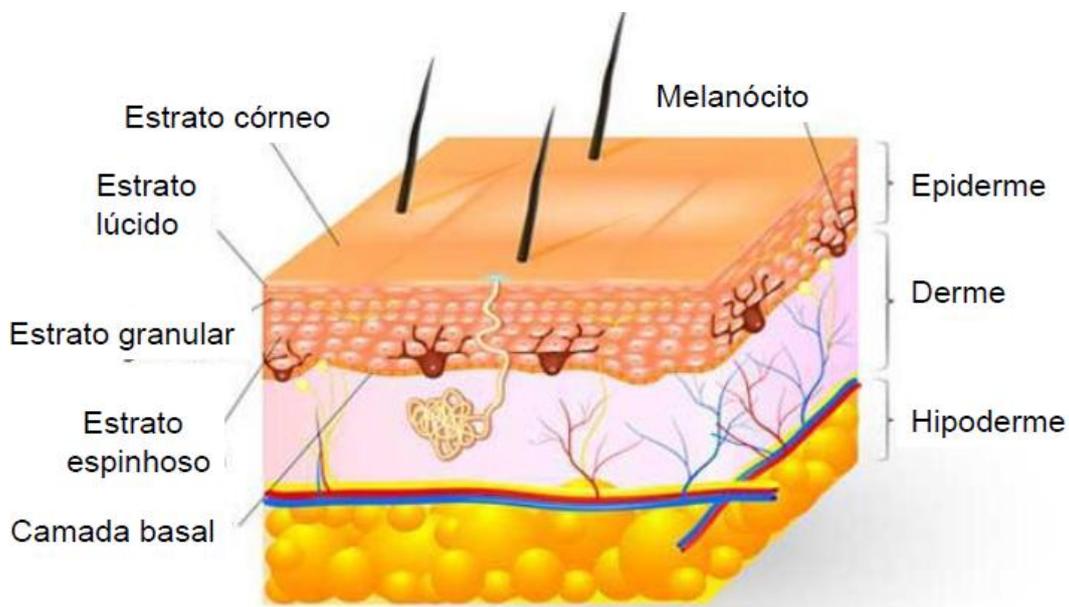
A hipoderme é a camada mais profunda da pele, constituída por lipócitos. Armazena cerca de 80% da gordura total do corpo humano, desempenhando um importante papel na função endócrina, em relação à produção de hormônios e energia metabólica (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017). Adicionalmente, a hipoderme possui a função de isolamento térmico, modelagem da superfície corporal, absorção de choques, bem como contribui para o preenchimento e fixação de órgãos (MCGRATH; UITTO, 2010).

A derme é a camada localizada acima da hipoderme, responsável por cerca de 90% da espessura cutânea. Possui uma espessura que varia entre 0,5-5 mm, dependendo da região do corpo. É rica em colágeno, elastina e outros elementos da matriz extracelular, que garantem elasticidade e proporciona suporte mecânico à pele (CRAIG; EIKENBERRY; PARRY, 1987; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017). Adicionalmente, contém glândulas sebáceas, sudoríparas, folículos pilosos, nervos e capilares que fornecerão nutrientes para a camada avascular adjacente (MOSER et al., 2001). Geralmente, divide-se a derme em duas subcamadas: derme papilar, onde está localizada a maior parte dos vasos sanguíneos e terminações nervosas sensoriais; e a derme reticular, que está em contato com a hipoderme (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

Por sua vez, a EP é um tecido auto-renovável, que descama suas células superficiais de acordo com o crescimento e diferenciação das camadas da EP basal. Sendo a camada mais externa da pele, a EP é sustentada pela derme, e se subdivide em duas principais camadas: o EC e a EP viável. Esta última tem uma espessura de cerca de 50-100 µm de epitélio estratificado constituído por

queratinócitos, que dependendo da sua morfologia e estado de diferenciação recebem diferentes classificações como camada basal, espinhosa ou granular. Ainda na EP, existe uma camada mais superficial (10-20  $\mu\text{m}$ ), que constitui a interface entre o corpo com o meio externo. Chamada de estrato córneo (EC), essa camada é composta por corneócitos que não possuem mais núcleo e organelas citoplasmáticas, ligados por estruturas protéicas denominadas desmossomas, que estão empacotadas por filamentos de queratina e são rodeadas por lipídios.

Os lipídios desempenham um papel chave na manutenção da pele humana e alterações destes significam modificações na estrutura do EC. A barreira epidérmica promove proteção através de mecanismos físicos, químicos e imunológicos. A barreira física é constituída pelos corneócitos do EC e filme acidificado presente na superfície cutânea. O baixo pH da camada mais externa da pele é importante para a regulação da atividade enzimática e inflamatória. Além disso, a barreira física previne a entrada de agentes patogênicos e modula a perda de água do organismo (JIA et al., 2017).



**Figura 1** Representação das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de <http://defenderauto.info>)

### 3.2 PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Para o desenvolvimento de uma formulação tópica eficaz, é necessário que o ativo seja capaz de penetrar e depositar-se no local de ação em concentração

terapêutica por determinado tempo. A pele em seu estado íntegro age como uma barreira natural, conferindo uma proteção física primária ao organismo (MCGRATH; UITTO, 2010). Devido à sua composição lipídica, o EC limita a perda de água transepidermal e a absorção de substâncias exógenas (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

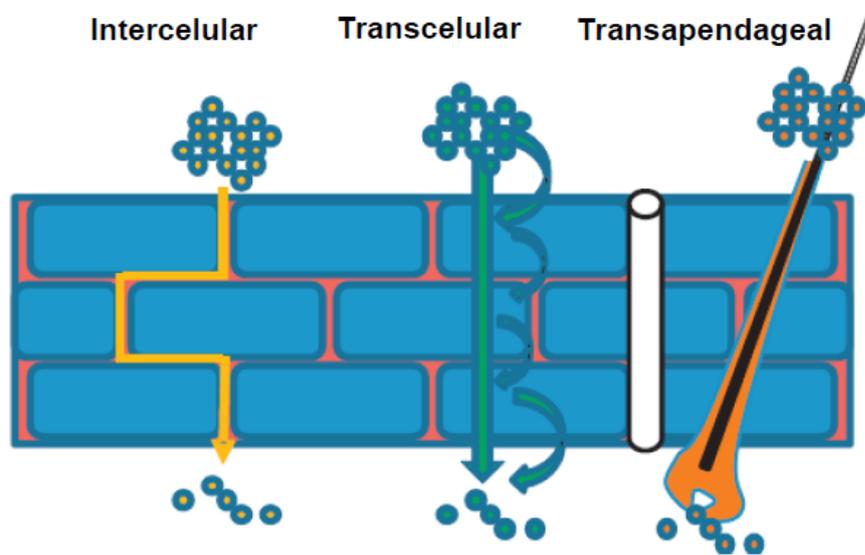
Existem duas principais vias de absorção de substâncias através da pele intacta: a via intercelular, na qual o permeante se difunde pelo espaço intercelular rico em lipídeos, e a via transcelular, onde a substância se difunde através dos corneócitos (Figura 2). Visto que em ambas as vias o agente permeante deverá percorrer o espaço entre as células, a matriz lipídica extracelular é considerada o maior determinante da taxa de transporte percutâneo (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008; MOSER et al., 2001). Desta forma, moléculas lipossolúveis apresentam maior facilidade para se difundir no EC, mas sua permeação através da região hidrofílica da bicamada pode ser prejudicada. Em consequência disso, para ter uma penetração satisfatória através desta camada da pele, a molécula precisa apresentar um balanço adequado entre as características lipofílicas e hidrofílicas (BOS; MEINARDI, 2000), massa molecular inferior a 0,6 kDa e um alto coeficiente de partição (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007).

Outra via possível para administração tópica de substâncias é através dos apêndices cutâneos, que compreendem apenas 0,1% da superfície da pele humana (MOSER et al., 2001). Assim, na administração tópica convencional, em áreas que não apresentem mais alta densidade folicular, esta via não representa uma rota significativa de permeação (LADEMANN et al., 2001).

A via tópica de administração de substâncias apresenta diversas vantagens, como a minimização da decomposição metabólica de fármacos, a eliminação da irritação gástrica e a possibilidade de controle do perfil de liberação de fármacos para a pele. Além disso, a capacidade de aplicação seletiva ao local desejado com redução de efeitos da toxicidade sistêmica tem despertado interesse para a utilização desta via não invasiva, não-dolorosa, não-irritante e de auto-aplicabilidade, sendo uma alternativa às vias oral e hipodérmica, tradicionalmente utilizadas (CHOUDHURY et al., 2017; SENGUPTA; CHATTERJEE, 2017).

No tratamento tópico de infecções fúngicas cutâneas a camada alvo do princípio ativo é a EP, uma vez que é nesta localidade que os dermatófitos se instalam. Desta forma, é necessário que o agente antifúngico consiga se difundir

pelo EC e transpassá-lo, sem que uma grande quantidade de ativo seja depositada na derme, de modo a evitar concentrações consideráveis de fármaco na circulação sistêmica e suas conseqüentes reações adversas (CRAWFORD; HOLLIS, 2007).



**Figura 2** Vias de permeação de fármacos pela pele: via intercelular, transcelular e transapendageal (adaptado de LANE, 2013)

### 3.3 INFECÇÕES FÚNGICAS CUTÂNEAS

As infecções fúngicas cutâneas são comuns em todo o mundo e atingem crianças, adolescentes e adultos de países com diferentes níveis de desenvolvimento. Com crescente incidência, afeta cerca de 20-25% da população mundial (AMEEN, 2010).

As infecções cutâneas são classificadas de acordo com o tecido inicialmente atingido, distinguidas entre superficiais ou profundas. As infecções fúngicas que acometem a EP e os apêndices cutâneos sem causar inflamação são caracterizadas como superficiais (HSU et al., 2012).

As dermatofitoses são infecções causadas por fungos dos gêneros *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton*, classificados como dermatófitos. Estes micro-organismos acometem cabelos, unhas e pele, nutrindo-se de tecidos queratinizados, uma vez que possuem a capacidade de digerir a queratina. Assim, não precisam necessariamente contaminar tecidos vivos mais profundos, embora possa ser observada a ocorrência de tal invasão. As infecções superficiais contidas

na camada mais externa da pele são mais comuns, ocorrendo nos cabelos, barba, unhas, virilha e na pele em geral (ALY, 1994; CRAWFORD; HOLLIS, 2007).

O *T. rubrum* é o agente etiológico mais comum para as tineas, seguido por *T. mentagrophytes*. Estes micro-organismos são também os principais causadores de uma condição mais incomum, conhecida como Granuloma de Majocchi, que é causada pela invasão profunda dos fungos na pele, levando a reação cutânea inflamatória (KANAAAN et al., 2015). A invasão do dermatófito neste caso se dá pela introdução passiva a partir de traumas físicos que induzem alterações foliculares (TIRADO-SÁNCHEZ; PONCE-OLIVERA; BONIFAZ, 2015).

Devido ao fato de colonizarem a EP, os dermatófitos são susceptíveis às terapias tópicas. Substâncias fungicidas ou fungistáticas que consigam penetrar ou transpassar o EC podem ser efetivas na erradicação dos fungos. Esta abordagem é utilizada como primeira linha no tratamento de dermatofitoses, e existem diversas classes de agentes antifúngicos utilizados atualmente, como as alilaminas, imidazóis, benzilaminas e azóis, que geralmente eliminam os micro-organismos sem necessidade de terapia sistêmica adicional. Apesar disso, a abordagem tópica para o tratamento de micoses pode apresentar alguns obstáculos. Dependendo da extensão da infecção, a terapia pode consistir na aplicação do medicamento por via cutânea por até 6 semanas, e em caso de infecções crônicas ou extenso acometimento do tecido, a terapia oral pode ser introduzida (BELL-SYER; KHAN; TORGERSON, 2014), acompanhada de efeitos adversos, eficácia limitada e alto custo (SANTOS et al., 2013). O tratamento prolongado pode comprometer a adesão do paciente, visto que em muitos casos o indivíduo cessa a aplicação da formulação após o desaparecimento dos sinais clínicos da infecção, aumentando a probabilidade de recidiva (BELL-SYER; KHAN; TORGERSON, 2014; KYLE; DAHL, 2004).

Apesar dos inconvenientes citados anteriormente, a via tópica para administração de substâncias antifúngicas apresenta mais vantagens que a terapia por via oral. No entanto, para que seja efetiva é necessário que a formulação tópica seja capaz de promover a permeação do ativo através do EC (CRAWFORD; HOLLIS, 2007).

### 3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

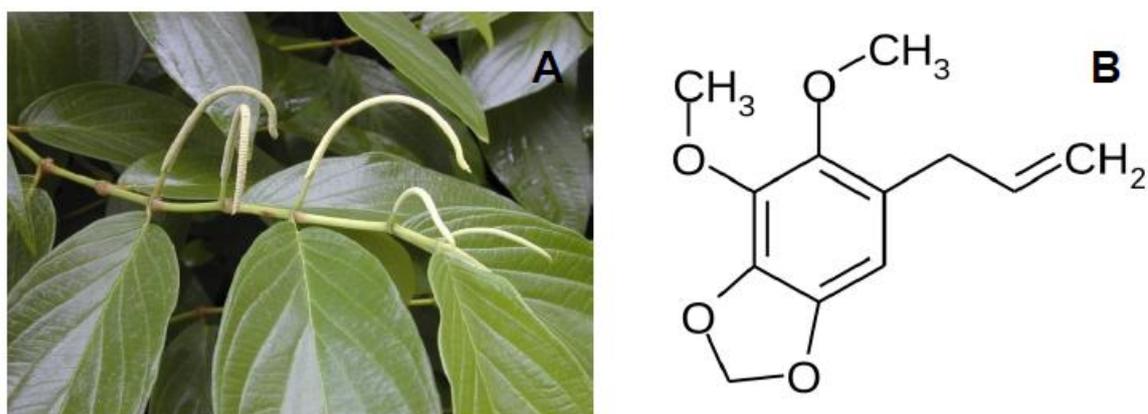
Os óleos essenciais (OE) são metabólitos secundários produzidos pelas plantas em resposta a fatores de estresse. Apresentam-se como misturas complexas de moléculas lipossolúveis e voláteis, que podem ser obtidos de uma planta ou partes dela, como caule, raízes, folhas, sementes e flores (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Geralmente são extraídos por hidrodestilação, destilação a vapor ou seca, bem como por processo mecânico (prensagem) (BAYALA et al., 2014; MIGUEL, 2010). Seus principais componentes são terpenóides e fenilpropanóides, além dos compostos aromáticos e alifáticos. No entanto, a composição e o rendimento dos OE podem ser afetados por condições externas como clima, solo, aporte de água, altitude e demais condições de crescimento (CALO et al., 2015).

As atividades biológicas dos OE geralmente são atribuídas aos seus componentes majoritários, mas em alguns casos, a atividade deve ser atribuída à combinação dos constituintes (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). No caso do óleo essencial de *Piper aduncum*, estima-se que a atividade biológica se dê pelo seu composto majoritário, o dilapiol (BRAZAO et al., 2014).

### 3.5 ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum*

*Piper aduncum* L. é um arbusto de até 8m de altura, com distribuição generalizada na América do Sul e Central, que cresce naturalmente na Amazônia e na Mata Atlântica do Brasil (SANTOS et al., 2013). É popularmente conhecida como “pimenta-de-macaco”, “aperta-ruão”, “jaborandi” ou “falso-jaborandi” (OLIVEIRA et al., 2013) e usado medicinalmente no tratamento de injúrias ginecológicas e intestinais. O óleo essencial de *P. aduncum* extraído das folhas da planta apresenta bom rendimento (2,0 – 3,5%), e é comumente caracterizado por altas concentrações do fenilpropanóide dilapiol (Figura 3), variando de 35 a 90% (DE ALMEIDA et al., 2009; MAIA et al., 1998; SOUSA et al., 2008).

O OE extraído de *P. aduncum* cultivada na parte mais ao norte do sudeste do Brasil, apresenta os fenilpropanóides asaricina e safrol como seus principais constituintes (até 80%), enquanto as plantas cultivadas em altitudes mais elevadas apresentam níveis muito mais baixos de fenilpropanóides, principalmente de asaricina, que representa no máximo 15% da composição total do OE (VAZ et al., 2016). Além disso, De Almeida et al. (2009) reportaram que o OE dos espécimes de *P. aduncum* cultivados no Nordeste e Sudeste do Brasil não apresentou o fenilpropanóide dilapiol em sua composição, trazendo terpenos como seus principais constituintes. Por fim, *P. aduncum* que cresce na Floresta Amazônica Brasileira produz OE rico em dilapiol (31-91%) (FERREIRA et al., 2016; MAIA et al., 1998), assim como os espécimes cultivados na Malásia (64%) (JANTAN et al., 1994), Cuba (82,2%) (PINO et al., 2004) e Costa Rica (37,1%) (CICCIÓ; BALLESTERO, 1997).



**Figura 3** *Piper aduncum* (A) folhas da planta (<https://keyserver.lucidcentral.org/>); (B) estrutura química do componente majoritário dilapiol

O dilapiol tem diversas atividades farmacológicas previamente descritas, como ação inseticida (DE ALMEIDA et al., 2009; VOLPE et al., 2016), larvicida (OLIVEIRA; CARDOSO; JÚNIOR, 2013), antiparasitária (GAÍNZA et al., 2016), antifúngica (DE ALMEIDA et al., 2009; FERREIRA et al., 2016), antiinflamatória (PARISE-FILHO et al., 2011) e genotóxica (ACIOLE et al., 2014). Além disso, o OEPA apresenta ainda algumas propriedades que não são necessariamente atribuídas ao dilapiol, e sim à combinação dos componentes presentes na mistura. Dentre alguns desses atributos está a ação antimicrobiana, como relatado por Brazão et al., (2014) no qual observaram valor de CIM do dilapiol maior que a CIM

do OEPA para o mesmo micro-organismo sob condições análogas, sugerindo uma ação sinérgica existente no óleo devido à presença de outros constituintes ativos.

### 3.6 NANOEMULSÕES

A técnica de emulsificação é largamente utilizada pela indústria farmacêutica, cosmética, agrícola e alimentar. As emulsões consistem em sistemas coloidais compostos pela dispersão de gotículas de um líquido imiscível em outro, como por exemplo, óleo em água. É imprescindível a presença de agentes tensoativos para diminuir a tensão interfacial e promover a formação de tais sistemas (CALLENDER et al., 2017).

Os tensoativos são compostos orgânicos que possuem grupos hidrofílicos (cabeças) e grupos hidrofóbicos (caudas). Também chamados de moléculas anfifílicas ou anfipáticas, os tensoativos são solúveis tanto em solventes polares quanto em apolares (CORAZZA et al., 2010). De forma geral, eles possuem a capacidade de emulsificar e estabilizar diversas formulações de aplicação tópica. Além disso, estas substâncias podem aumentar a permeabilidade de membranas biológicas como a pele (SARPOTDAR; ZATZ, 1986; SHOKRI et al., 2001), por meio da interação com os componentes lipídicos cutâneos (CORAZZA et al., 2010; ERDAL et al., 2016).

Estas substâncias que influenciam na superfície de contato podem ser classificadas quanto à carga elétrica existente em sua porção hidrofílica. Existem basicamente quatro grupos principais: aniônicos, catiônicos, anfotéricos e não-iônicos. Os catiônicos e anfotéricos apresentam um alto grau de citotoxicidade, enquanto os aniônicos e não-iônicos são considerados mais brandos neste quesito. Os agentes emulsionantes não-iônicos possuem carga elétrica neutra e são considerados os tensoativos menos irritantes para a pele (CORAZZA et al., 2010). Em especial, são muito utilizados em preparações de aplicação tópica porque além da sua baixa toxicidade apresentam maior capacidade de interagir com o colesterol e ácidos graxos da pele (CORAZZA et al., 2010; ERDAL et al., 2016).

Essas moléculas agem principalmente diminuindo a tensão interfacial entre o óleo e a água, promovendo a emulsificação do sistema através da formação de micelas (CORAZZA et al., 2010). As micelas consistem em agregados, onde a porção hidrofílica do tensoativo interage com a fase aquosa e sua cauda hidrofóbica

relaciona-se com a fase apolar, aprisionando gotículas de óleo em meio aquoso (óleo em água, O/A) ou gotículas de água em meio oleoso (água em óleo, A/O), promovendo a miscibilidade desses compostos (Figura 4). Essas propriedades tornam as micelas ferramentas úteis no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas (WONG et al., 2010).

Nanoemulsão é definida como dispersão coloidal cineticamente estável, que consiste na mistura de duas fases imiscíveis possibilitada pela ação de substâncias tensoativas (MCCLEMENTS, 2011; MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017). As nanoemulsões podem ser obtidas por meio de métodos diferentes, conforme o mecanismo físico-químico envolvido, que incluem os métodos de alta energia, baixa energia (CHOUDHURY et al., 2017; MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017), ou ainda, uma combinação deles (MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017; SINGH et al., 2017).

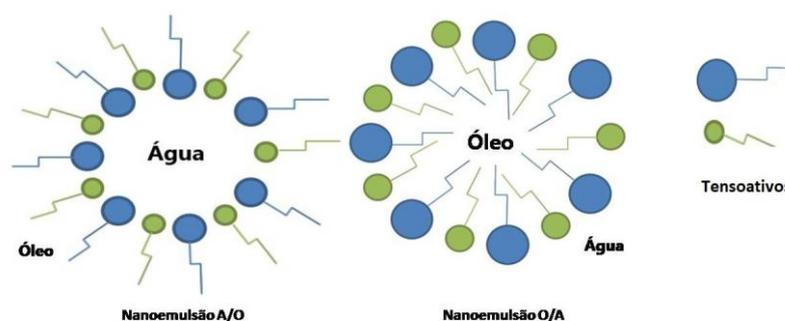
Os métodos de alta energia consistem basicamente na aplicação de pressão ou ondas ultrassônicas para romper a fase oleosa e formar gotículas nanométricas dispersas em água. Esta categoria é preferível na produção de escala industrial, trazendo como vantagens a otimização do tempo e do tamanho das gotículas formadas. Os exemplos mais comuns são microfluidização, homogeneização de alta pressão e homogeneização ultrassônica (CHOUDHURY et al., 2017; MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017).

Não obstante, no método de baixa energia, são as propriedades físico-químicas dos componentes da mistura que vão determinar a formação das gotículas, por isso a determinação da proporção ideal de cada elemento é imprescindível para a emulsificação espontânea do sistema. A principal desvantagem deste método é a exigência de uma quantidade maior de tensoativos (MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017). Adicionalmente, a ordem de adição dos constituintes à mistura e o pH do meio também vão interferir amplamente no processo (CHOUDHURY et al., 2017). As estratégias mais utilizadas são a composição de inversão de fases, temperatura de inversão de fases e emulsificação espontânea (MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017).

As nanoemulsões são utilizadas para veicular ativos isolados ou extratos naturais, principalmente nas indústrias alimentícia (DONSÌ et al., 2012; LIANG et al., 2012; MCCLEMENTS, 2011) e farmacêutica (EID et al., 2014; NUCHUCHUA et al., 2009; SAKULKU et al., 2009). Nanoemulsões de aplicação tópica podem atuar

rompendo a camada bilipídica da pele e promovendo assim um aumento da permeabilidade de ativos. Os constituintes dessas dispersões coloidais podem desempenhar tal função por meio da interação com as camadas lipídicas do EC, alterando a estrutura dessa barreira sem a necessidade da inclusão de promotores de absorção na formulação (AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013). Esses sistemas carreadores tem se mostrado mais eficientes na penetração transdérmica de drogas do que os sistemas convencionais (FOUAD et al., 2013; GE et al., 2014) e além de permitirem melhor solubilização de substâncias também promovem a rápida difusão dos mesmos (TEICHMANN et al., 2007).

Apesar disso, a aplicação tópica dessas formulações pode ser prejudicada por causa da sua baixa viscosidade, resultando no escoamento do produto (CHOUDHURY et al., 2017). No entanto, as nanoemulsões também podem ser desenvolvidas com caráter altamente viscoso ou com consistência similar aos géis (MCCLEMENTS, 2011), com ou sem a adição de agentes gelificantes (SOLIMAN et al., 2010), assim, promovendo alterações na espalhabilidade e facilitando a aplicação sobre a pele.



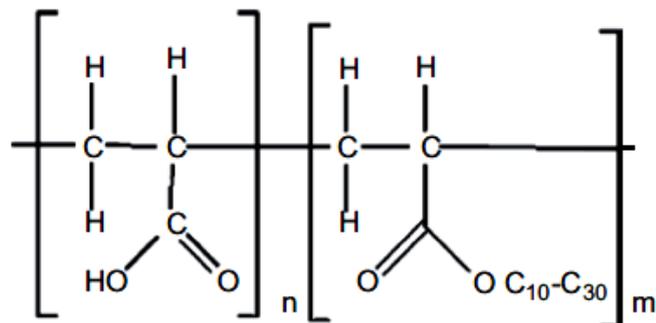
**Figura 4** Diagrama esquemático de nanoemulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A), preparadas a partir de água, óleo e tensoativos. Os grupos polares dos tensoativos são representados por círculos e as caudas apolares são representadas por traços. (Fonte: própria autora)

### 3.7 EMULGÉIS DE ÁCIDO POLIACRÍLICO

Uma alternativa para a produção de sistemas emulsionados é a utilização de polímeros com a habilidade de atuar como emulsificantes primários ou agentes espessantes. Existem duas classes de polímeros do ácido acrílico que vêm sendo largamente estudados na área farmacêutica (WAHLGREN et al., 2009). Uma delas

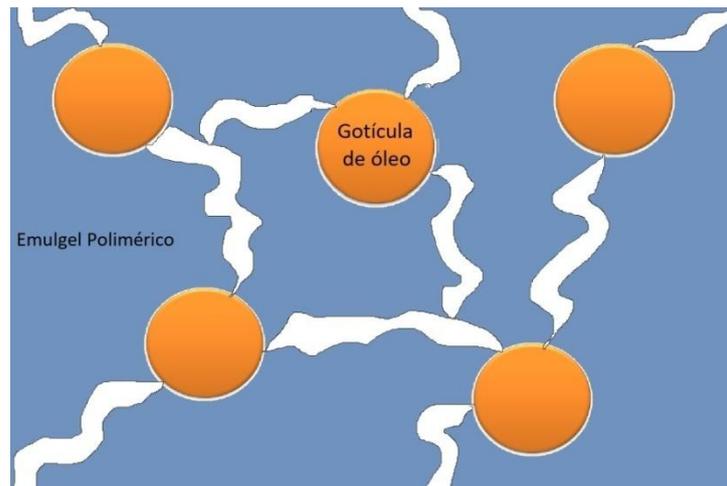
compreende derivado do ácido poli acrílico, comercialmente conhecido como Carbopol, que tem mostrado capacidade de formar géis bioadesivos (BARAKAT, 2010; KNÖÖS et al., 2013a).

A segunda categoria é compreendida pelos ácidos poli acrílicos reticulados e hidrofobicamente modificados, comercialmente disponíveis com o nome de Pemulen<sup>®</sup> (Figura 5) (KNÖÖS et al., 2013a). Existem dois tipos de Pemulen<sup>®</sup>: TR1 e TR2, sendo que a principal diferença entre eles é que o TR2 possui mais modificações hidrofóbicas, podendo emulsionar uma maior quantidade de óleo (SHAHIN et al., 2011). Os Pemulen<sup>®</sup> são polímeros com características emulsificantes óleo em água (O/A), que estabilizam as emulsões por mecanismo eletroestérico. As cadeias hidrofóbicas do poli (ácido acrílico) ancoram-se à superfície das gotículas de óleo e as cadeias hidrofílicas negativamente carregadas hidratam-se, formando um gel em torno das gotículas oleosas (Figura 6) (SHAHIN et al., 2011; SIMOVIC et al., 1999).



**Figura 5** Estrutura química do poli (ácido acrílico) Pemulen<sup>®</sup>

Os emulgéis formados por estes polímeros são sistemas óleo em água com uma dispersão coloidal consistente como sua fase externa. A utilização de poli (ácidos acrílicos) nessas formulações permite que baixas concentrações do polímero sejam incorporadas ao emulgel, trazendo um baixíssimo risco de toxicidade e irritação à pele (SHAHIN et al., 2011). Paulssin e Edsman (2001) demonstraram que o Pemulen<sup>®</sup> é capaz de controlar a liberação de substâncias ativas com elevados valores de logP. Além disso, estudos prévios reportaram que a combinação destes ácidos poli acrílicos com tensoativos não iônicos podem gerar formulações gelificadas com propriedades otimizadas em relação à viscosidade e liberação do ativo (KNÖÖS et al., 2013a, 2013b; SIMOVIC et al., 1999).



**Figura 6** Representação de emulgel polimérico formado por Pemulen®. (Fonte: própria autora)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Para o preparo das formulações foram utilizados os tensoativos Span 80<sup>®</sup> (monooleato de sorbitano) e Cremophor EL<sup>®</sup> (macrogolglicerol ricinoleato, PEG-35 castor oil, Kolliphor<sup>®</sup> EL ou Kolliphor<sup>®</sup> ELP), adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), oleato de etila da Merck (Darmstadt, Alemanha) e Pemulen<sup>®</sup> TR2 (Pem) obtido da Lubrizol (Ohio, EUA). O docecil sulfato de sódio (SDS) que compôs o meio receptor nos experimentos de permeação e liberação foi obtido da Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil). A membrana hidrofílica inerte de acetato/nitrato de celulose utilizada nos experimentos de liberação (poro de 0,45 µm) foi obtida da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha). O metanol e acetonitrila em grau CLAE foram adquiridos da JT. Baker (Pensilvânia, EUA). Uma fita adesiva Scotch no. 845, 3M (Minnesota, EUA) foi utilizada para executar a técnica de *Tape Stripping*. Água ultrapura utilizada nos ensaios foi obtida de um sistema Milli-Q Millipore (Illkirch-Graffenstaden, França).

#### 4.1.1 Óleo essencial de *Piper aduncum* e óleo de Dilapiol

O óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPA) foi extraído por hidrodestilação utilizando as partes aéreas da planta (folhas) pelo grupo de pesquisa “Plantas Aromáticas e Oleaginosas da Amazônia” coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joyce Kelly R. da Silva, da Universidade Federal do Pará. A planta coletada foi depositada no Herbário do Museu Emilio Goeldi, na cidade de Belém, no estado do Pará, Brasil, sob o número MG150678. Este mesmo grupo de pesquisa realizou a caracterização química do OEPA por cromatografia gasosa acoplada aos detectores de ionização a chama (GC-DIC) e espectrometria de massa (GC-EM) (Tabela 1), e também o isolamento do componente majoritário deste óleo essencial utilizando cromatografia em coluna de sílica-gel (FERREIRA et al., 2016). Assim, a fração rica em dilapiol (teor > 98%, pureza > 99%) foi utilizada como padrão analítico nos experimentos a seguir.

**Tabela 1** Composição do óleo de *P. aduncum* e sua fração rico em dilapiol (adaptada de FERREIRA et al., 2016)

Constituinte	Óleo Essencial (%)	Óleo de Dilapiol (%)
$\alpha$ -Pinoeno	0,5	
p-Cimeno	0,2	
(E)- $\beta$ -Ocimeno	0,2	
Ciclosativeno	0,1	
$\alpha$ -Copaeno	0,4	
$\beta$ -Elemeno	0,2	
(E)-Cariofileno	3,8	0,8
$\alpha$ -Humuleno	0,5	
alo-Aromadendreno	0,2	
Germacreno D	0,4	
$\beta$ -Selineno	0,4	
$\gamma$ -Cadineno	0,4	
Miristicina	1,5	0,2
$\alpha$ -Calacoreno	0,1	
Elemicino	0,2	
(E)-Nerolidol	0,3	
Espathulenol	0,3	
Cariofileno óxido	0,8	
Globulol	0,5	
Humulenoepóxido II	0,1	
<b>Dilapiol</b>	<b>85,9</b>	<b>98,4</b>
epi- $\alpha$ -Murolol	0,2	
$\alpha$ -Murolol	0,2	
Apiol	0,4	0,2
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>99,6</b>

#### 4.1.2 Pele

A pele da orelha de suínos foi gentilmente cedida pelo frigorífico Bonasa S/A (São Sebastião, Brasil). As orelhas foram retiradas dos porcos antes do processo de escalda, para não causar danos às estruturas cutâneas. A pele foi separada da orelha com o auxílio de bisturi e a gordura subcutânea foi removida do tecido com auxílio de tesouras cirúrgicas. Desta forma, para os experimentos de permeação foi

utilizada a pele limpa que continha apenas o estrato córneo e a pele remanescente, que foi mantida sob refrigeração por no máximo 60 dias, até o momento da montagem nas células de difusão verticais do tipo “Franz” modificada.

## 4.2 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

### 4.2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do Dilapiol

Para determinar o comprimento de onda de máxima absorção do dilapiol, foi realizada varredura em espectrofotômetro UV1800 (Shimadzu, Japão) entre 190-800 nm da solução do padrão de dilapiol, preparada em metanol em concentração de 50 µg/mL.

### 4.2.2 Condições cromatográficas para quantificação do Dilapiol por CLAE

O desenvolvimento inicial para quantificação do dilapiol nos estudos foi baseado em métodos previamente descritos (OLIVEIRA; MAUSE; NUNOMURA, 2005; WALIA; SAHA; PARMAR, 2004; ZHAO et al., 2015). No entanto, as condições cromatográficas foram amplamente modificadas para obter um pico de dilapiol adequado, seletivo para os marcadores em experimentos de permeação cutânea, visto que a descrição de método para análise do dilapiol na presença de contaminantes da pele não foi encontrada anteriormente na literatura.

Para o quantificação do dilapiol foi utilizado equipamento CLAE LC-20AT (Shimadzu, Japão) com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm, 5µm; Shim-pack) mantida a 40°C durante todas as análises. O software utilizado para as análises foi o LabSolution e todos os componentes do equipamento eram da marca Shimadzu (Kyoto, Japão). Diferentes proporções da fase móvel, taxas de vazão e volume de injeção foram testadas para a obtenção do pico de dilapiol otimizado quanto a alguns parâmetros analíticos, como a presença de interferentes, número de pratos teóricos, fator de cauda e forma do pico.

### 4.2.3 Validação do método analítico para quantificação do Dilapiol por CLAE com detecção no ultravioleta (UV)

O método estabelecido foi validado segundo as recomendações estabelecidas pelo *International Conference on Harmonization* (ICH) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo assim realizadas análises para a determinação da seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão do método.

#### 4.2.3.1 Seletividade

Para estudo da seletividade do método, os seguintes interferentes foram preparados:

*Pele*: Fragmentos de 1,5 cm<sup>2</sup> de pele foram presos sobre uma superfície e por meio da técnica de *Tape Stripping* utilizando 10 pedaços de fita adesiva, foi realizada a separação do EC das demais camadas da pele (Figura 7) (GRATIERI et al., 2012). Após esse processo, a pele remanescente (PR) foi reduzida a pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura e acondicionada separadamente em frascos, assim como as fitas contendo EC. Cinco mL de metanol foram adicionados a cada frasco, os quais foram devidamente vedados e deixados em agitação *overnight*. Após esse período, o conteúdo foi filtrado para a obtenção dos extratos das duas camadas da pele. 250 µL da solução padrão de dilapiol (100 µg/mL) e 250 µL do extrato de cada fração de pele foram pipetados em balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com metanol e posterior análise em CLAE foi realizada.

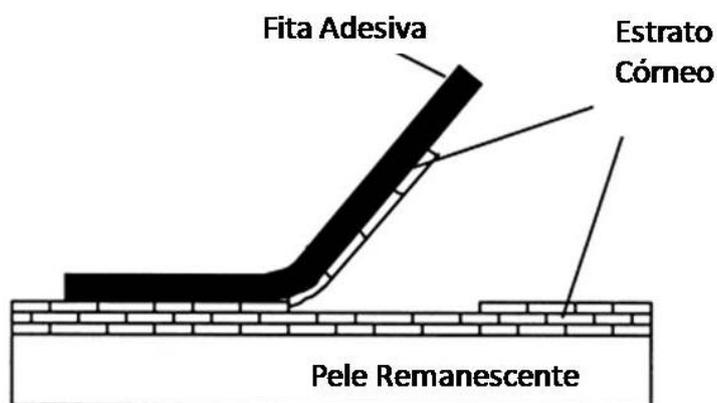
*OEPA*: Uma solução de OEPA a 15 µg/mL foi preparada em metanol e posterior análise em CLAE foi realizada.

*Tensoativos*: 250 µL da solução padrão de dilapiol e 100 µL de cada tensoativo (Span 80<sup>®</sup> e Cremophor<sup>®</sup>) foram pipetados em balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com metanol e posterior análise em CLAE foi realizada.

*Pemulen<sup>®</sup>*: Uma solução aquosa do polímero a 1% foi preparada. 250 µL da solução padrão de dilapiol foram adicionados em balão volumétrico de 5 mL, além de 250 µL da solução polimérica. O volume foi completado com metanol e posterior análise em CLAE foi realizada.

**SDS:** Uma solução metanólica de SDS a 0,25% foi preparada. 250 µL da solução padrão de dilapiol foram adicionados em balão volumétrico de 5 mL, e o volume foi completado com a solução de SDS a 0,25%. Posterior análise em CLAE foi realizada.

Os experimentos foram preparados em sextuplicata, com amostras preparadas de forma independente. Uma solução de dilapiol (5 µg/mL) livre de contaminantes foi analisada em CLAE e comparada com as contaminadas pelos interferentes supracitados, para assegurar que os compostos da pele, das formulações e o SDS não interferiram na análise do fármaco. Os resultados foram analisados considerando área de pico obtido e tempo de retenção (TR).



**Figura 7** Representação da remoção progressiva do estrato córneo pela técnica de *Tape Stripping* (adaptado de MOSER et al., 2001)

#### 4.2.3.2 Linearidade

Três soluções estoque de dilapiol foram preparadas na concentração de 100 µg/mL. Uma curva de calibração em metanol composta por sete pontos de concentração foi preparada a partir de cada solução estoque. Também foram preparadas curvas em SDS, da mesma forma. As concentrações consideradas para avaliação da linearidade foram 1,5; 2,0; 2,5; 5,0; 8,0; 15,0 e 20,0 µg/mL. Foi construída uma curva analítica relacionando a concentração de dilapiol com a área do pico mensurada pelo equipamento para cada diluição. Foi utilizada regressão linear para obtenção de uma reta no formato  $y = ax + b$ , onde (a) corresponde ao

coeficiente angular e (b) coeficiente linear, e posterior determinação do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ), com valor mínimo aceitável de 0,99 (BRASIL, 2017).

#### 4.2.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (Equação 1) e o limite de quantificação (Eq. 2) foram determinados para o dilapiol solubilizado tanto em metanol, quanto em solução aquosa de SDS 0,25%, com base no desvio padrão da resposta e inclinação (ICH, 2005), segundo as equações:

$$LD = 3,3 \sigma/S \quad (1)$$

$$LQ = 10 \sigma/S \quad (2)$$

onde,  $\sigma$  = desvio padrão da resposta e S = inclinação da curva de calibração.

#### 4.2.3.4 Precisão

Repetibilidade e precisão inter-dia foram os testes que compuseram a análise de precisão. A repetibilidade averigua as variações intra-ensaio. O experimento foi realizado verificando três concentrações de dilapiol (1,5; 5,0; 20,0  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo efetuadas cinco leituras consecutivas em CLAE/UV para cada concentração. Para a precisão inter-dia, foram preparadas diluições das soluções padrão de dilapiol em três concentrações (1,5; 5,0; 20,0  $\mu\text{g/mL}$ ), posteriormente submetidas à análise em CLAE/UV em dois dias diferentes. Os resultados de precisão foram expressos como coeficiente de variação (CV), calculado de acordo com a Eq. 3:

$$CV = (\text{Desvio padrão da média}/\text{Média}) \times 100 \quad (3)$$

#### 4.2.3.5 Exatidão

A exatidão foi reportada por meio da porcentagem de dilapiol recuperada das camadas da pele (ICH, 2005; GRATIERI et al., 2012). As camadas da pele foram separadas em EC e PR, como descrito anteriormente no item 4.2.3.1, e contaminadas com quantidades conhecidas de dilapiol. As amostras foram acondicionadas em frascos devidamente vedados para evitar a volatilização da

solução. Após 30 minutos de repouso, volumes adequados de metanol foram adicionados aos frascos de modo que a concentração final em cada um fosse de 1,5; 5,0 e 20,0 µg/mL. As amostras foram então submetidas à agitação magnética por 2 horas (300 rpm) à temperatura ambiente, filtradas e analisadas em CLAE. Os resultados foram determinados conforme a Eq. 4:

$$\text{Recuperação} = (\text{Concentração mensurada} / \text{Concentração teórica}) \times 100 \quad (4)$$

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DILAPIOL NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum*

Para determinar o teor de dilapiol contido no OEPA, uma solução metanólica com concentração de OEPA igual a 15 µg/mL foi preparada em triplicata. Tais soluções foram analisadas em CLAE para quantificação do dilapiol, para posterior cálculo da porcentagem do marcador no óleo vegetal.

#### 4.4 GARANTIA DA “CONDIÇÃO *SINK*”

Para garantir que o meio receptor utilizado nos experimentos de liberação e permeação cutânea não seria saturado, foi realizada a determinação da solubilidade de dilapiol contido no OEPA em uma solução aquosa de SDS a 0,25%, que será utilizada como meio receptor nas células de difusão. Para isso, em triplicata, 10 µL de OEPA foram adicionados para cada 1 mL da solução de SDS a 0,25%, e a dispersão foi mantida em agitação constante por 24 horas em temperatura ambiente, com posterior filtração, diluição da amostra em metanol (1:1000) e quantificação em CLAE-UV. A partir do dado de solubilidade obtido, avaliou-se se os experimentos de liberação e permeação estariam em “condição *sink*”, utilizando o meio proposto.

## 4.5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum*

### 4.5.1 Nanoemulsão

#### 4.5.1.1 Diagrama de fases

Para o desenvolvimento inicial da nanoemulsão, um diagrama de fases foi construído, em que as proporções de água, óleo e tensoativos foram sendo alteradas e cada sistema obtido foi observado visualmente. O oleato de etila compreendeu a fase oleosa, e Cremophor<sup>®</sup> e Span 80<sup>®</sup> na proporção (4:1 v/v) constituíram a fase tensoativa. Misturas de tensoativos e óleo em diferentes proporções foram então tituladas com água purificada sob agitação a 500 rpm por 10 minutos a cada adição de água no sistema. A titulação iniciou-se com 1 mL de água adicionado a 10 mL da mistura inicial a cada ciclo. Após completar 10 mL de água adicionados, volumes de 10 mL de água começaram a ser adicionados a cada ciclo. A rotação da chapa agitadora foi sendo aumentada conforme a consistência das formulações obtidas. Após análise de formação de sistema mono ou bifásico, turvo ou não, os dados foram plotados em um diagrama de fases pseudoternário.

As características visuais, consistência e desempenho após submissão à centrifugação foram observados, e estes foram os parâmetros utilizados para pré-selecionar os pontos que formaram nanoemulsão. Para a incorporação do OEPA na nanoemulsão, parte da fase oleosa compreendida por oleato de etila foi substituída pelo óleo essencial no momento do preparo (Figura 8).

#### 4.5.1.2 Caracterização

As formulações inicialmente classificadas como nanoemulsão por meio do diagrama de fase foram então caracterizadas. O odor e coloração foram observados no momento do preparo da formulação. Para avaliação do teor de dilapiol contido na formulação, foi preparada diluição dela em metanol (1:5000 p/v), com posterior análise em CLAE-UV. O tamanho de gotícula, potencial zeta e índice de polidispersão (PDI) foram analisados por meio do aparelho Zetasizer Nano ZS

(Malvern, EUA). Para tanto, foi preparada uma diluição em água a 1:100 (p/v) a fim de realizar a análise. O pH foi mensurado por inserção direta do eletrodo nas amostras, utilizando pHmetro DM-22 (Digimed, Brasil) acoplado a eletrodo tipo faca para semissólidos DME-CF1 (Digimed, Brasil).



**Figura 8** Sequência de preparo da nanoemulsão contendo óleo essencial de *Piper aduncum*. (Fonte: própria autora)

#### 4.5.1.3 Estabilidade preliminar

A fim de realizar um ensaio preliminar de estabilidade, a nanoemulsão foi submetida a duas condições climáticas diferentes: temperatura elevada ( $40 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e condição ambiente (aproximadamente  $25^\circ \text{C}$ ).

Parâmetros como tamanho médio das gotículas, PDI e potencial zeta foram analisados durante 90 dias, enquanto pH, teor de dilapiol e características organolépticas foram averiguados no dia de sua preparação (T0), após 7 dias (T7), 15 dias (T15) e 30 dias (T30). O pH das formulações foi mensurado utilizando um pHmetro previamente calibrado, com a inserção direta do eletrodo na amostra à temperatura ambiente. O teor de dilapiol das formulações foi averiguado por doseamento em CLAE-UV (diluição em metanol 1:5000 p/v). Tamanho médio das gotículas, PDI e potencial zeta foram analisados por Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA) após diluição aquosa das amostras em proporção 1:100 (p/v). O aspecto visual foi observado a olho nu, com auxílio da incidência de luz, quando necessário. A formulação foi acondicionada em frasco eppendorf de 2 mL, sendo preenchido até o máximo de sua capacidade e vedado com auxílio de parafilme.

#### 4.5.1.4 Ensaio de irritabilidade HET-CAM

O nível de irritação das formulações foi avaliado utilizando uma versão modificada do teste de ovos da galinha, Hühner-Embryonen-Test (HET) ou ainda teste de membrana corioalantóide (HET-CAM) descrito por Luepke (1985). HET-CAM é um teste de toxicidade rápido e de baixo custo, fornecendo informações sobre o potencial irritativo de substâncias químicas em mucosas. Os ovos de galinha no seu 10º dia de fertilização foram cedidos pela Avifran (Planaltina, Brasil), e os ensaios foram realizados neste mesmo dia. A membrana corioalantóide (CAM) foi exposta por meio da remoção de uma pequena porção da casca do ovo. Após esse procedimento, foi utilizado soro fisiológico para hidratação e cuidadosa remoção das membranas internas do ovo. Cada formulação foi testada em triplicata, onde 300 µL de uma das seguintes substâncias foram pipetados sobre a membrana exposta: 1. Nano OEPA pH 3,7 (diluição em água 1:1), 2. Solução tampão pH 3,7 0,2 mol/L, 3. Solução de hidróxido de sódio 1 mol/L (controle positivo), 4. Soro fisiológico (controle negativo). A nanoemulsão foi testada em sua forma diluída para viabilizar a aplicação da formulação sobre a membrana. Após 20 segundos de exposição à substância teste, a CAM foi cuidadosamente enxaguada com solução salina fisiológica e visualmente avaliada quanto à ocorrência de fenômenos como hiperemia, hemorragia e coagulação, nos tempos 20 segundos, 2 e 5 minutos (Figura 9). O tempo necessário para a ocorrência destas reações foi registrado (em segundos) e o cálculo do índice de irritabilidade foi realizado conforme a Eq. 5 (VINARDELL; MACIÁN, 1994):

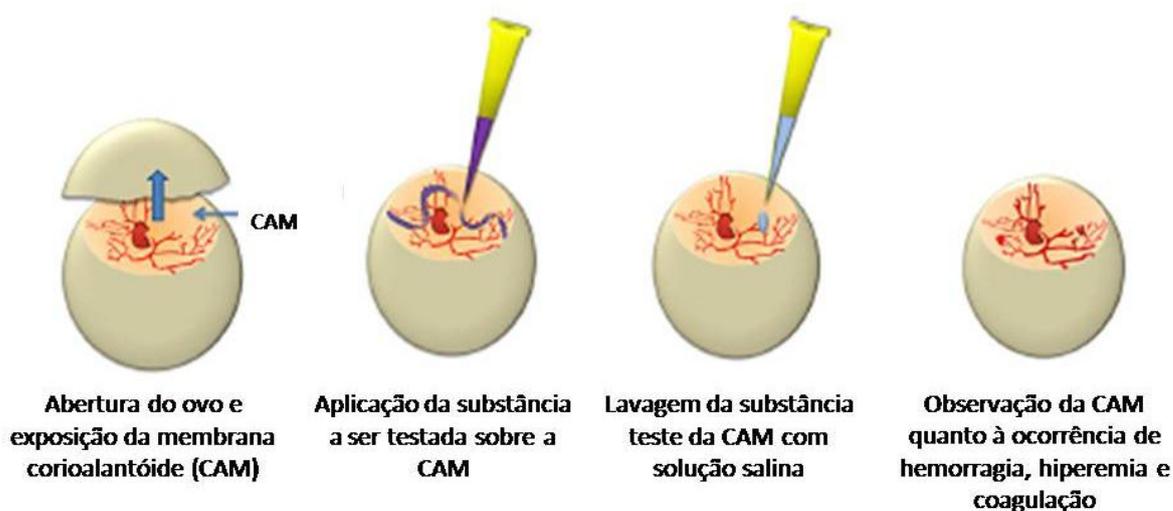
$$II = \frac{(301-HE) \times 5}{300} + \frac{(301-HP) \times 7}{300} + \frac{(301-CO) \times 9}{300} \quad (5)$$

onde, II= índice de irritabilidade; HE= tempo para ocorrência de hemorragia; HP= tempo para ocorrência de hiperemia e CO= tempo para ocorrência de coagulação/opacidade.

A classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM foi realizada conforme descrição apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2** Pontuação cumulativa para classificação das formulações quanto ao grau de irritabilidade (adaptada de LUEPKE, 1985)

Índice de Irritabilidade	Classificação
0,0 – 0,9	Não irritante (NI)
1,0 – 4,9	Irritante leve (IL)
5,0 – 8,9	Irritante moderado (IM)
9,0 – 21,0	Irritante severo (IS)



**Figura 9** Representação esquemática do teste de membrana corioalantóide (HET-CAM) (adaptado de WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015)

#### 4.5.1.5 Correção de pH da nanoemulsão

Após realização dos testes descritos anteriormente com a nanoemulsão selecionada observou-se que ela possuía um grau de irritabilidade significativo. A formulação foi então preparada novamente nas mesmas proporções descritas no item 4.5.1.1, tendo como modificação apenas a composição da fase aquosa, que foi compreendida por solução tampão fosfato pH 5,5, de modo a verificar-se se não seria o pH ácido que influenciaria negativamente neste parâmetro.

Assim, após o preparo da formulação em pH 5,5, a aparência, cor, odor, consistência, tamanho de gotícula, PDI, potencia zeta e pH foram analisados novamente conforme descrito no item 4.5.1.2.

O ensaio HET-CAM também foi realizado novamente conforme descrito no item 4.5.1.4, sendo agora testadas as seguintes formulações: 1. Nano OEPA pH 5,5

(diluição em água 1:1), 2. Solução tampão pH 5,5 0,2 mol/L, 3. Solução de hidróxido de sódio 1 mol/L (controle positivo), 4. Soro fisiológico (controle negativo).

#### **4.5.2 Emulgel polimérico**

##### *4.5.2.1 Desenvolvimento e caracterização*

Para o preparo da formulação Pem OEPA, foi realizada uma dispersão aquosa do Pemulen<sup>®</sup> a 1%. Após completa homogeneização do polímero em água, o OEPA foi incorporado à mistura sob agitação, a fim de obter uma concentração final de OEPA de 7,5%.

A caracterização de Pem OEPA se deu pela observação do odor e coloração no ato de seu preparo, além da medida de pH e teor de dilapiol, conforme descrito anteriormente do item 4.5.1.2. O ajuste de pH para 5,5 foi realizado com a adição de uma pequena alíquota de uma solução de hidróxido de sódio a 1 mol/L.

##### *4.5.2.2 Estabilidade preliminar*

A fim de realizar um ensaio preliminar de estabilidade, Pem OEPA foi submetida a duas condições climáticas diferentes durante 30 dias: temperatura elevada ( $40 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e condição ambiente (aproximadamente  $25^\circ \text{C}$ ).

O pH da formulação foi mensurado utilizando um pHmetro previamente calibrado, com a inserção direta do eletrodo na amostra em temperatura ambiente. O teor de dilapiol do emulgel polimérico foi averiguado por doseamento em CLAE-UV (diluição em metanol 1:5000 p/v). O aspecto visual foi observado a olho nu, com auxílio da incidência de luz, quando necessário. Todos os parâmetros anteriormente citados foram observados durante 30 dias. A formulação foi acondicionada em frasco eppendorf de 2 mL, sendo preenchido até o máximo de sua capacidade e vedado com auxílio de parafilme.

##### *4.5.2.3 Ensaio de irritabilidade HET-CAM*

O ensaio HET-CAM foi realizado conforme descrito no item 4.5.1.4, tendo sido testadas as seguintes formulações: 1. Pem OEPA (diluição em água 1:1), 2. Solução

tampão pH 5,5 0,2 mol/L, 3. Solução de hidróxido de sódio 1 mol/L (controle positivo), 4. Soro fisiológico (controle negativo).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE E ESPALHABILIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Para a avaliação da viscosidade dos sistemas desenvolvidos, foram submetidas à análise as formulações controle (sem adição do OEPA), devido à escassez do material. Desta forma, Nano Controle compreende a nanoemulsão contendo em sua fase oleosa apenas oleato de etila. Pem Controle se refere ao emulgel polimérico com a fase oleosa também compreendida por oleato de etila.

Um viscosímetro digital Brookfield RVDVE (Middleboro, EUA) foi utilizado para mensurar a viscosidade das formulações (em cP). O *spindle* foi escolhido de modo que o torque fosse mantido entre 10-100%, e foi submerso em apenas um ponto da amostra. Para a análise da nanoemulsão, o *spindle* nº 07 (RV7) foi o mais adequado, enquanto para o emulgel polimérico foi escolhido o *spindle* nº 05 (RV5), ambos com rotação configurada em 30 rpm (Figura 10). As formulações foram analisadas em temperatura ambiente, em triplicata.



**Figura 10** Fotografia ilustrativa do ensaio de viscosidade das formulações Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle (esquerda e direita, respectivamente)

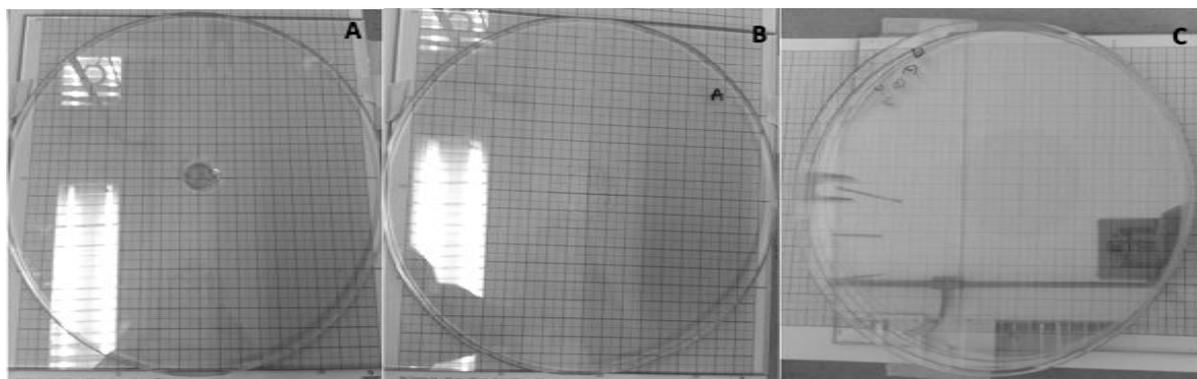
O ensaio de espalhabilidade foi também realizado utilizando como amostras a Nano Controle e Pem Controle (ambas as formulações sem adição do OEPA). Uma placa molde circular de vidro com 0,38 cm de espessura, possuindo orifício circular com diâmetro de 1,27 cm, foi colocada sobre outra placa de suporte. Abaixo dessas placas foi posicionada uma folha de papel milimetrado. A amostra a ser analisada foi acondicionada no orifício da placa, tendo sua superfície nivelada com o auxílio de uma espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada, de modo que não acontecesse deslocamento da amostra sobre a superfície. Uma placa de vidro com peso determinado foi alocada sobre a amostra, e após um minuto, foi calculado o diâmetro médio de espalhamento da formulação. Esse processo foi repetido mais quatro vezes, colocando-se placas com peso pré-determinado, uma sobre as outras, respeitando o intervalo de um minuto para determinação da superfície abrangida (Figura 11).

A espalhabilidade ( $E_i$ ), em temperatura ambiente, foi calculada através da Eq. 6:

$$E_i = d^2 x \frac{\pi}{4} \quad (6)$$

onde:  $E_i$  = espalhabilidade da amostra para o peso  $i$  ( $\text{mm}^2$ );  $d$  = diâmetro médio (mm) calculado a partir dos diâmetros horizontal e vertical obtidos a cada aferição.

As cinco placas utilizadas no ensaio tinham peso variável entre 299,95 g e 336,68 g, somando um total de 1555,86 g ao final do ensaio.



**Figura 11** Fotografia ilustrativa da sequência realizada no ensaio de espalhabilidade (A) placa molde com orifício circular; (B) posicionamento da primeira placa sobre a amostra; (C) todas as 5 placas posicionadas sobre a amostra ao final do ensaio

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO DILAPIOL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Para o estudo de liberação do dilapiol a partir das formulações desenvolvidas com OEPA, foram utilizadas células do tipo “Franz” modificadas e uma membrana hidrofílica, que foi acondicionada entre os dois compartimentos da célula de difusão, conforme ilustrado na Figura 12. O compartimento doador foi preenchido com 0,3 g de cada formulação (n=5). Foram realizadas coletas de 1 mL do meio receptor a cada 1 hora (e imediata reposição deste volume de solução aquosa de SDS a 0,25%), por um período de 6 horas. Ademais, foram realizadas coletas no tempo 12h e 24h do experimento. A solução receptora foi mantida sob agitação magnética a 500 rpm e a célula difusora foi mantida em banho a  $32 \pm 2$  °C. As amostras coletadas foram analisadas em CLAE para a determinação do perfil cinético de liberação do componente majoritário do OEPA.

A cinética de liberação do dilapiol a partir das formulações foi analisada segundo os modelos matemáticos de ordem zero, modelo de Higuchi e modelo de primeira ordem, segundo as equações descritas na Tabela 3. Para a escolha do modelo mais adequado para descrever a cinética de liberação, foi levado em consideração o coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) que mais se aproximou do valor 1 (VALENTE et al., 2013).



**Figura 12** Modelo de célula de Franz vertical do tipo modificada

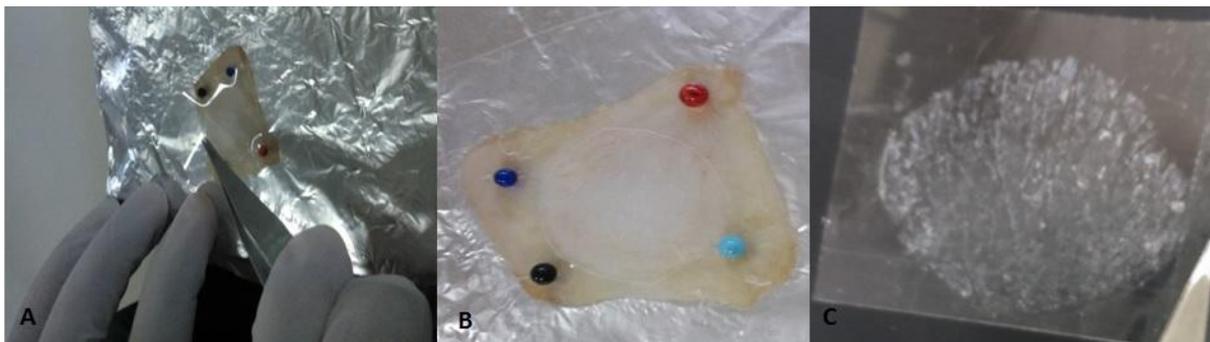
**Tabela 3** Modelos matemáticos aplicados ao estudo cinético de liberação

Modelo matemático	Fórmula
Ordem Zero	$Q_t = Q_0 + K_0t$
Modelo de Higuchi	$f_t = K_H t^{1/2}$
Primeira Ordem	$\ln Q = \ln Q_0 - k_1 t$

$Q_t$  é a quantidade de fármaco liberado ao tempo  $t$ ;  $Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco no tempo zero;  $K_0$  é a constante de liberação de ordem zero;  $f_t$  é a quantidade de fármaco cedida no tempo  $t$  por unidade de superfície;  $K_H$  é a constante de liberação de Higuchi;  $K_1$  é a constante de liberação de primeira ordem e  $t$  é o tempo do ensaio.

#### 4.8 AVALIAÇÃO PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO DILAPIOL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Os estudos de permeação cutânea foram realizados em células do tipo “Franz” modificadas, onde a pele retirada da orelha de suínos foi colocada entre os dois compartimentos da célula difusora (Figura 12), com o EC voltado para cima. As células difusoras foram mantidas em banho a  $32 \pm 2$  °C. As formulações contendo OEPA foram acondicionadas sobre a pele (0,3g). A metade inferior da célula foi preenchida com 15 mL de solução aquosa de SDS a 0,25%, mantida sob agitação magnética de 500 rpm. Tal compartimento possui braços que permitem a coleta desta solução, que foi realizada a cada hora, durante 6 horas de experimento. Posteriormente, as amostras foram analisadas em CLAE/UV para determinação do dilapiol ( $n=5$ ). A quantificação desta substância também foi realizada nas diferentes camadas da pele após aplicação da técnica de *Tape Stripping*, como descrito anteriormente no item 4.2.3.1, para separação do EC e PR (Figura 13). Ambas as frações cutâneas foram separadamente submetidas a uma etapa de extração por solvente previamente validada, a fim de recuperar o dilapiol retido nas diferentes camadas da pele.



**Figura 13** Aplicação da técnica de *Tape Stripping* **(A)** aplicação da fita adesiva sobre a pele; **(B)** molde plástico utilizado para delimitar apenas a área difusional; **(C)** Estrato córneo removido pela fita

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

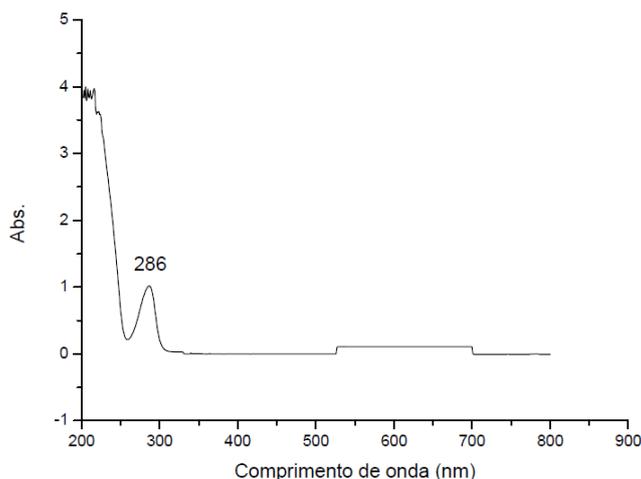
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). A normalidade dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal. ANOVA one-way foi aplicado para análise dos resultados de seletividade. A ANOVA two-way foi utilizada para comparar a permeação do dilapiol nas camadas da pele a partir das diferentes formulações. Para avaliação do perfil de liberação do dilapiol a partir de Nano OEPA pH 5,5 e Pem OEPA, foi utilizado o teste ANOVA two-way de medidas repetidas. Ademais, este mesmo teste foi aplicado para avaliar os diferentes parâmetros de estabilidade das formulações ao longo do tempo. Quando foi detectada uma diferença significativa, o teste post hoc de Tukey foi aplicado para identificar onde ocorreram. O nível de significância foi fixado sendo  $p \leq 0,05$ . O software GraphPadPrism 6.0 (San Diego, Califórnia) foi utilizado para a análise estatística e elaboração dos gráficos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

#### 5.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do Dilapiol

Para dar suporte aos experimentos que demandaram a quantificação do dilapiol, foi realizada a padronização e validação de método analítico em CLAE-UV. A primeira etapa para esta padronização compreendeu a varredura de uma solução de dilapiol preparada em metanol a 50 µg/mL. O espectro UV/VIS resultante está representado na Figura 14. O dilapiol apresentou absorção máxima no comprimento de onda igual a 286 nm. No entanto, 290 nm foi selecionado como o comprimento de onda ideal para as análises, pois em 286 nm o método apresentou picos do fármaco menos adequados em termos de especificidade, fator de cauda e resolução.



**Figura 14** Espectro de absorção na região do UV/VIS de uma solução metanólica de dilapiol a 50 µg/mL. Faixa de varredura: 190 a 800 nm

#### 5.1.2 Condições cromatográficas para quantificação do Dilapiol por CLAE-UV

Partindo-se de uma coluna de fase reversa RP-C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) como fase estacionária, temperatura do forno ajustada a 40°C e comprimento de onda configurado em 290 nm, algumas diferentes composições de fase móvel foram testadas a fim de se obter uma melhor separação de dilapiol dos contaminantes de pele e qualidade do pico obtido em termos de pratos teóricos e fator de cauda. Os

principais testes realizados para selecionar a fase móvel do método estão resumidos na Tabela 4.

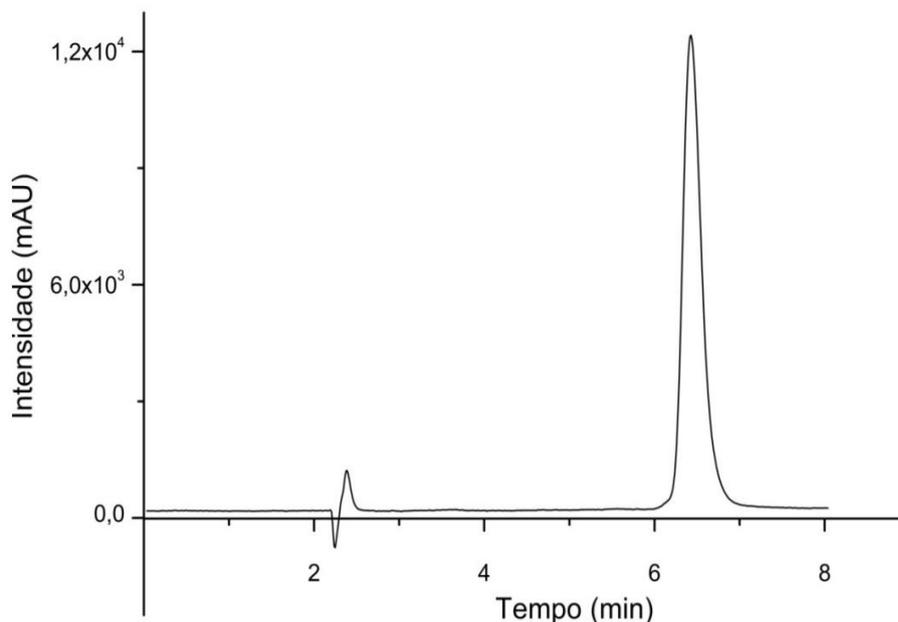
**Tabela 4** Otimização das condições cromatográficas para determinação do dilapiol. MeOH= metanol; H<sub>2</sub>O= água; ACN= acetonitrila; TR= tempo de retenção; VI= volume de injeção; N= pratos teóricos; T= fator de cauda

Teste	Fase Móvel	Proporção (v/v)	TR (min)	Fluxo (mL/min)	VI (µL)	N	T	Característica do pico
1	MeOH - H <sub>2</sub> O	53-47	16,72	1,50	25	5429,00	1,08	Picos sobrepostos
2	MeOH - H <sub>2</sub> O	55-45	10,78	1,20	25	4871,00	1,11	Picos sobrepostos
3	MeOH - H <sub>2</sub> O	60-40	15,40	1,00	10	3718,03	1,09	Picos sobrepostos
4	MeOH - H <sub>2</sub> O- ACN	60-35-5	8,19	1,20	10	2996,72	1,08	Picos sobrepostos
5	MeOH - H <sub>2</sub> O	70-30	7,36	1,00	10	4319,73	1,13	Pico largo
6	MeOH - H <sub>2</sub> O	75-25	6,38	0,80	25	2891,00	1,14	Pico largo
7	MeOH - H <sub>2</sub> O	75-25	6,41	0,80	5	4991,00	1,25	Pico largo
8	MeOH - H <sub>2</sub> O	75-25	6,47	0,80	10	4683,00	1,24	Pico adequado
9	MeOH - H <sub>2</sub> O	75-25	6,19	0,80	15	3823,00	1,22	Pico adequado

Os testes iniciais foram realizados utilizando apenas metanol e água como fase móvel. Nas proporções testadas nos ensaios 1 a 3, o pico do dilapiol apresentou-se assimétrico, sobrepondo-se com interferentes da pele. Desta forma, o ensaio de número 4 consistiu da adição de acetonitrila na fase móvel previamente testada, na tentativa de melhorar as características do pico. O tempo médio de análise diminuiu de 13 para 8 minutos, mas o pico de dilapiol continuou a eluir sobreposto com interferências cutâneas. No teste de número 5, a fase móvel foi novamente constituída apenas por metanol e água, mas agora com uma proporção de 70% de metanol, em que o pico de interesse apresentou melhores características do que quando a acetonitrila foi adicionada, mas ainda com largura e simetria inadequadas. A partir deste ponto, foi realizada mais uma pequena modificação na proporção da fase móvel (75% de metanol) e a taxa de fluxo foi ajustada em 0,8 mL/min. Neste ensaio o pico de dilapiol não demonstrou sobreposição com interferentes, mas a largura do pico ainda não foi satisfatória. Na tentativa de melhorar esta característica, o volume de injeção foi alterado nos testes 6 a 9. O ensaio 9 compreendeu fase móvel constituída por metanol e água na proporção 75:25 (v/v), volume de injeção ajustado em 15 µL e vazão igual a 0,8 mL/min. Os pratos teóricos foram 3,823 (N > 2,000) e o pico mostrou simetria apropriada com fator de causa de 1,22 (T < 2), atendendo às recomendações do ICH (ICH, 2005).

Além disso, o tempo de retenção do dilapiol nesta tentativa foi de 6,19 minutos, sendo o menor tempo alcançado durante todos os testes. Portanto, essa configuração foi a que resultou em um pico mais apropriado, e esse método foi escolhido para prosseguir com a validação.

A utilização de tal método gerou um pico com características satisfatórias, que pode ser observado na Figura 15.



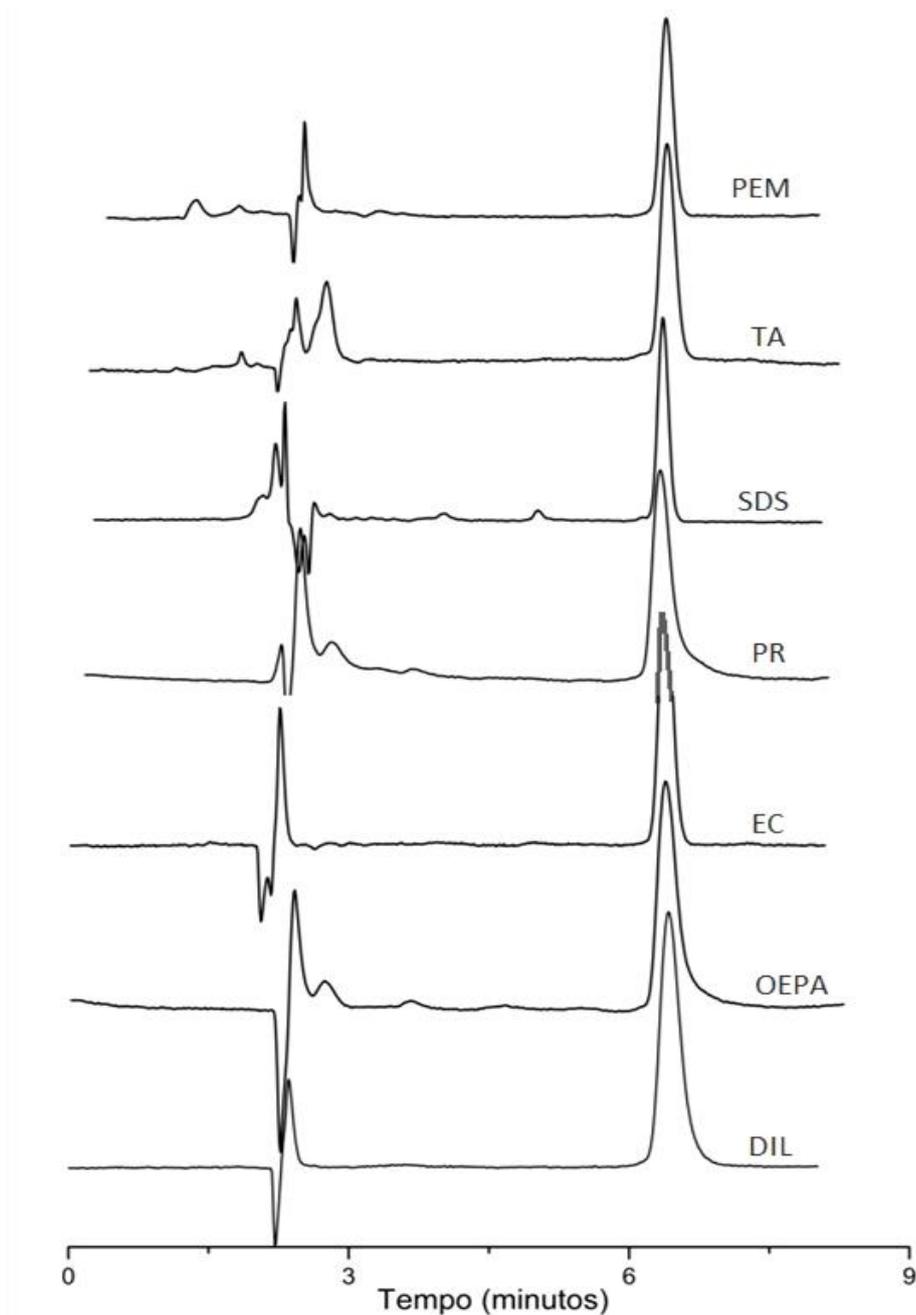
**Figura 15** Cromatograma em CLAE-UV representativo do dilapiol (solução metanólica a 20 µg/mL). Método: MeOH-H<sub>2</sub>O 75:25 (v/v); fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção 15 µL ; leitura em 290 nm.

### 5.1.3 Validação do método analítico para quantificação do Dilapiol por CLAE com detecção no ultravioleta (UV)

#### 5.1.3.1 Seletividade

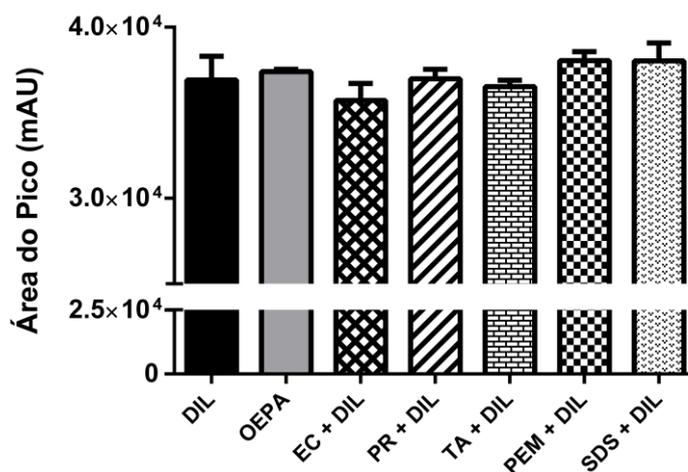
A solução de dilapiol (5 µg/mL) contaminada separadamente com extratos de pele (EC e PR), OEPA, tensoativos (TA), Pemulen<sup>®</sup> (PEM) e dodecil sulfato de sódio (SDS) teve seu tempo de retenção analisado. Observou-se em todos os ensaios que a maioria dos contaminantes são eluídos nos primeiros 5 minutos de corrida. A Figura 16 mostra que o pico do dilapiol é detectado após 6 minutos, livre das possíveis interferências. As amostras contaminadas com OEPA, TA e PEM não apresentam eluição de interferentes próxima ao pico de interesse, confirmando que o método escolhido é seletivo para quantificação do dilapiol a partir das formulações

propostas. Além disso, pode-se observar também que esta quantificação não é prejudicada pela presença de contaminantes provenientes da pele, tornando o método minimamente adequado para determinação do componente majoritário do OEPA em testes de permeação cutânea. O cromatograma representado na Figura 16 revela ainda a seletividade do método quanto à presença de SDS nas amostras, atestando a adequação da utilização deste composto no meio receptor dos testes de permeação e liberação.



**Figura 16** Cromatogramas em CLAE-UV. DIL=dilapiol; OEPA= óleo essencial de *P. aduncum*; EC= estrato córneo; PR= pele remanescente; SDS= dodecil sulfato de sódio; TA= tensoativos (Span 80<sup>®</sup> e Cremophor<sup>®</sup>); PEM= Pemulen<sup>®</sup>

Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes nas áreas do pico de dilapiol na ausência e na presença dos possíveis interferentes analisados ( $p > 0,05$ ) (Figura 17), nem ocorreram alterações relevantes no tempo de retenção do fármaco nestas condições (tempo de retenção variou entre 6,2 e 6,3 minutos). O método mostrou-se, portanto, seletivo para todos os ensaios a que se destina.

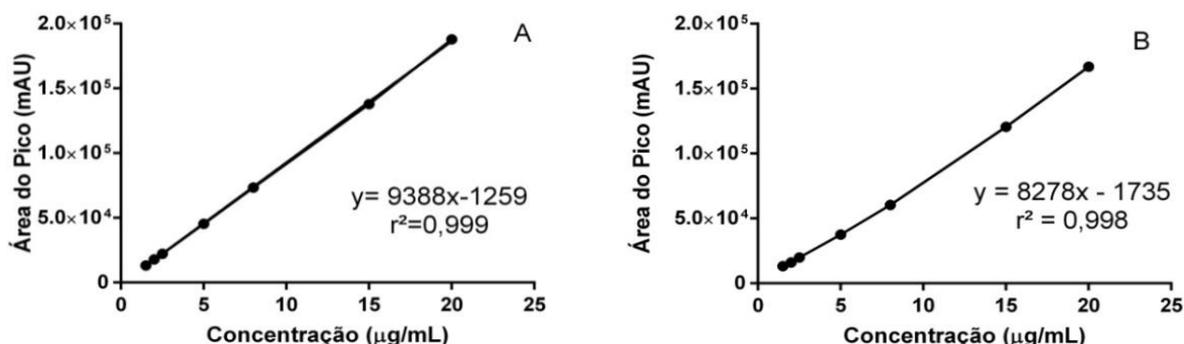


**Figura 17** Área do pico na quantificação do dilapiol (5 µg/mL) sozinho e adicionado aos extratos das camadas da pele. DIL= dilapiol; OEPA= óleo essencial de *P. aduncum*; EC= extrato córneo; PR= pele remanescente; TA= tensoativos (Cremophor<sup>®</sup> e Span 80<sup>®</sup>); PEM= Pemulen<sup>®</sup>; SDS= dodecil sulfato de sódio. Sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

### 5.1.3.2 Linearidade

A regressão linear da curva de calibração em metanol resultou na seguinte equação:  $y = 9388x - 1259$ . O coeficiente de correlação obtido ( $r^2$ ) foi de 0,999 (Figura 18). Este valor de  $r^2$  está de acordo com as recomendações estabelecidas para este parâmetro, assim como o coeficiente de variação das concentrações mensuradas, que se manteve abaixo dos 5%, confirmando a linearidade do método. Da mesma forma, a curva de calibração em SDS a 0,25% mostrou-se adequada, uma vez que atendeu às exigências mínimas estabelecidas pelo ICH (ICH, 2005).

O coeficiente de correlação apresentou valor de 0,998 e a equação da reta obtida foi  $y = 8278x - 1735$ . Ambas as curvas apresentam altos valores numéricos de coeficiente angular (9388 e 8278, respectivamente), indicando resposta apropriada do método contra mudanças na concentração.



**Figura 18** Linearidade **(A)** curva do dilapiol em metanol; **(B)** curva do dilapiol em SDS

#### 5.1.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram 0,11 µg/mL e 0,34 µg/mL, respectivamente, para as diluições realizadas em metanol; 0,27 µg/mL e 0,83µg/mL, na devida ordem, para as diluições em SDS 0,25%. Estes valores intuem que a relação sinal-ruído é minimamente adequada, possibilitando a determinação de baixas concentrações que são normalmente obtidas nos estudos de cinética de liberação e permeação de fármacos na pele.

#### 5.1.3.4 Precisão

Os estudos de precisão foram divididos em dois níveis, a fim de averiguar a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições. O primeiro deles foi a repetibilidade, que apresentou coeficiente de variação abaixo de 1,2%, que assim como a precisão inter-dia, não ultrapassou o limite máximo de 15% (Tabela 5) recomendado para métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012). O método, portanto, foi considerado preciso.

**Tabela 5** Precisão do método analítico. CV= coeficiente de variação

		Concentração Teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média	CV (%)
<b>Repetibilidade</b>		1,50	1,58 $\pm$ 0,02	1,04
		5,00	5,07 $\pm$ 0,04	0,85
		20,00	20,59 $\pm$ 0,07	0,34
<b>Precisão</b>	<b>Dia 1</b>	1,50	1,56 $\pm$ 0,03	1,62
		5,00	5,00 $\pm$ 0,07	1,36
		20,00	20,45 $\pm$ 0,15	0,72
	<b>Dia 2</b>	1,50	1,55 $\pm$ 0,02	1,28
		5,00	4,85 $\pm$ 0,17	3,51
		20,00	19,99 $\pm$ 0,13	0,66

Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP.

Repetibilidade (n=5).

Precisão inter-dia (n=3).

#### 5.1.3.5 Exatidão

No processo de contaminação da pele com dilapiol para mensuração da exatidão em termos de recuperação, não foi realizada a etapa de secagem do solvente comumente utilizada (ANGELO et al., 2016; FERREIRA-NUNES et al., 2018), a fim de evitar a volatilização do ativo. A recuperação do dilapiol das frações de pele apresentou valores acima de 90% para as três concentrações testadas (1,5; 5,0 e 20,0  $\mu\text{g/mL}$ ), assim como nas duas frações de pele analisadas (EC e PR). Os dados de recuperação estão expostos na Tabela 6. O método possui exatidão adequada para ser utilizado inclusive em ensaios de permeação cutânea, uma vez que de acordo com a literatura, valores de recuperação acima de 70% são considerados aceitáveis (DE JALÓN et al., 2001; FERREIRA et al., 2004; VÁVROVÁ et al., 2007). Os valores de recuperação simulada obtidos neste estudo foram elevados, o que pode não corresponder à recuperação real do fármaco. Ainda assim, o objetivo dos experimentos aqui realizados não foi estabelecer valores absolutos de permeação, visto se tratar de um estudo *in vitro*, e não de biodisponibilidade *in vivo*. As concentrações recuperadas não foram em várias ordens de magnitude discrepantes entre si, apresentando praticamente a mesma porcentagem de recuperação, o que, portanto, valida a comparação entre elas.

**Tabela 6** Exatidão do método analítico. CV= coeficiente de variação; R= recuperação

Concentração Teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Estrato Córneo			Pele Remanescente		
	Concentração			Concentração		
	Experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	R (%)	Experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	R (%)
1,50	1,36 $\pm$ 0,06	4,32	90,97	1,56 $\pm$ 0,05	3,37	104,08
5,00	4,59 $\pm$ 0,30	6,58	91,81	5,22 $\pm$ 0,29	5,49	104,42
20,00	18,41 $\pm$ 0,34	1,86	92,07	18,42 $\pm$ 0,29	1,57	92,08

Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP (n=3).

## 5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DILAPIOL NO ÓLEO ESSENCIAL DE *PIPER ADUNCUM*

A análise da solução metanólica de OEPA resultou na concentração de 14,34  $\pm$  0,05  $\mu\text{g/mL}$  de dilapiol. Essa averiguação foi realizada como forma de controle interno do teor de dilapiol contido no óleo essencial. O valor mensurado difere do descrito na Tabela 1 (FERREIRA et al., 2016), sendo encontrado teor superior do componente majoritário, revelando que 95,6% do OEPA é composto por dilapiol.

## 5.3 GARANTIA DA “CONDIÇÃO SINK”

A determinação da quantidade máxima de dilapiol que pode ser solubilizada na solução receptora dos ensaios de liberação e permeação é de fundamental importância para garantir a condição *sink* nesses testes. Segundo a Farmacopeia Europeia (2010), para certificar-se desta condição é necessário que a concentração máxima do fármaco no meio receptor não ultrapasse 1/3 (33,33%) da solubilidade desta molécula neste meio. Não assegurar esta condição implica na diminuição do gradiente de difusão do fármaco no meio receptor devido à saturação do meio, atrapalhando o fluxo da molécula através da membrana/pele. Desta forma, os resultados obtidos poderiam não refletir a realidade, dando origem a dados não confiáveis e interpretações errôneas. Após análise em CLAE-UV, a concentração máxima de dilapiol mensurada em solução de SDS 0,25% foi de 4859  $\pm$  517  $\mu\text{g/mL}$ . Considerando-se que nos ensaios de liberação e permeação o volume do meio receptor é 15 mL e que a quantidade de formulação utilizada é de 0,3 g (21510  $\mu\text{g}$

de dilapiol), a concentração máxima de dilapiol permeada seria 1434 µg/mL, que corresponde a 29,51 % da solubilidade no meio. Assim, os experimentos estarão em condição *sink*.

## 5.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum*

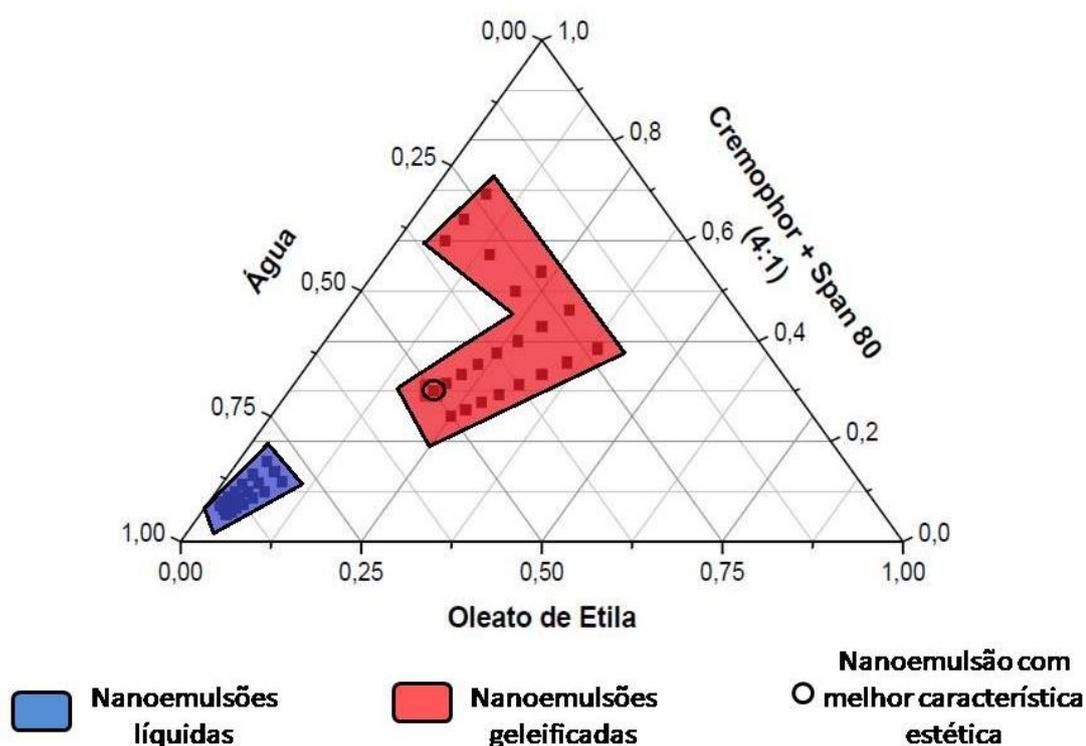
### 5.4.1 Nanoemulsão

#### 5.4.1.1 Diagrama de fases

Span 80<sup>®</sup> e Cremophor<sup>®</sup> são tensoativos não-iônicos (ALAM et al., 2013) de baixa toxicidade e irritabilidade cutânea, quando comparado aos iônicos. Cremophor<sup>®</sup> é muito utilizado para preparação de soluções aquosas de fármacos hidrofóbicos, e pode facilmente estabilizar a mistura de óleos essenciais em água (GULYAKIN; OBOROTOVA; PECHENNIKOV, 1995). A somatória de tais características destes tensoativos justifica sua utilização em combinação para a emulsificação de sistemas coloidais de aplicação tópica.

O método de preparo escolhido para a nanoemulsão contendo OEPA (Nano OEPA) foi a emulsificação espontânea, que consistiu em misturar a fase a ser dispersa (óleo) com os tensoativos, e depois adicionar aos poucos a fase contínua (aquosa), mantendo a mistura sob agitação.

A Figura 19 mostra o diagrama pseudoternário com diferentes proporções de água, óleo e mistura de tensoativos.



**Figura 19** Gráfico pseudoternário de formulação composta por óleo (oleato de etila), mistura de tensoativos (Cremophor<sup>®</sup> e Span 80<sup>®</sup> 4:1) dispersos em água em temperatura ambiente

A área destacada em vermelho no diagrama representa a região onde foi observada a ocorrência de formulações geleificadas, em que podem ser observadas proporções de tensoativos entre 25% a 69%. Já a região destacada em azul corresponde à região onde formaram-se nanoemulsões líquidas, que são constituídas por uma menor porcentagem de tensoativos e maior conteúdo aquoso.

Entre os pontos que originaram nanoemulsões geleificadas, a proporção que consiste em 50% água – 30% Cremophor<sup>®</sup> + Span 80<sup>®</sup> (4:1) – 20% fase oleosa foi escolhida baseado em sua aparência, consistência e manutenção de suas características após teste em centrífuga (destaque na Figura 19). A elevada consistência observada na formulação em questão fez com que esta fosse considerada uma nanoemulgel. Vale ressaltar que os resultados do presente estudo estão de acordo com Moysan et al. (2014), que descreveram a ocorrência de geleificação espontânea no preparo de nanocápsulas lipídicas pelo processo de baixa energia, utilizando como tensoativos uma combinação de Span 80<sup>®</sup> e Cremophor<sup>®</sup>.

#### 5.4.1.2 Caracterização

A Nano OEPA foi composta por 50% fase aquosa, 30% tensoativos, 12,5% oleato de etila e 7,5% OEPA (contendo 95,6% de dilapiol). A nanoemulsão apresentou um valor de pH de  $3,75 \pm 0,02$  no ato de seu preparo. A combinação do oleato de etila (ácido graxo) com o OEPA contendo dilapiol, que possui caráter ácido, provavelmente são os componentes que conferem pH mais baixo à formulação. Nano OEPA pH 3,7 apresenta-se como um semissólido transparente de coloração levemente amarelada (Figura 20) e cheiro característico de OEPA, com concentração de 71,7 mg de dilapiol por grama de formulação. A elevada viscosidade destaca-se positivamente no desenvolvimento de uma formulação para aplicação tópica, uma vez que a consistência de gel impede desperdício durante a aplicação sobre a pele, assim como sua permanência sobre ela. Ademais, nanoemulgéis apresentam características desejáveis como boa espalhabilidade, aspecto não gorduroso e fácil remoção, além de agradável aspecto visual e sensorial (EID et al., 2014).

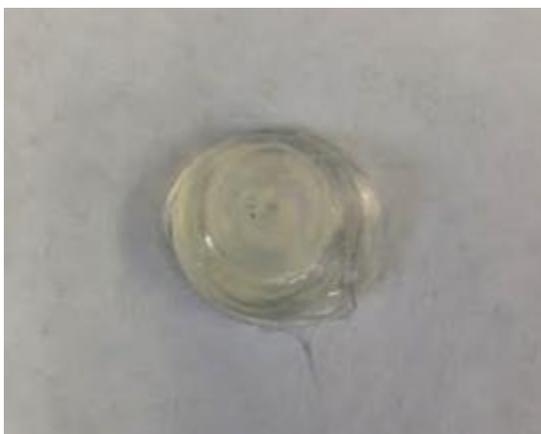
O tamanho de gotícula encaixa-se em escala nanométrica, com uma média de  $37,74 \pm 0,67$  nm e índice de polidispersão abaixo de 0,27 (Tabela 7), refletindo a homogeneidade na distribuição do tamanho das gotículas. O tamanho médio de gotícula apresentado pela nanoemulsão controle sem adição do OEPA (Nano Controle) em pH 3,7, foi similar a Nano OEPA pH 3,7, demonstrando que o óleo essencial nessa proporção não interferiu no tamanho das gotículas formadas. Este tamanho reduzido deve ser responsável pelo desenvolvimento de movimento browniano e redução dos efeitos da gravidade sobre as gotículas, resultando em sistemas mais estáveis com menor probabilidade de separação de fases, quando comparado às emulsões comuns (GHARENAGHADEH et al., 2017).

**Tabela 7** Tamanho (nm), PDI e potencial zeta da Nano OEPA pH 3,7 e Nano controle pH 3,7

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
<b>Nano Controle pH 3,7</b>	$37,52 \pm 0,14$	$0,16 \pm 0,01$	$-9,97 \pm 2,42$
<b>Nano OEPA pH 3,7</b>	$37,74 \pm 0,67$	$0,26 \pm 0,01$	$-12,13 \pm 0,35$

Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP(n=3). Sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos;  $p > 0,05$

Os valores médios de potencial zeta das nanogotículas estão apresentados na Tabela 7, em que se observa que a adição de OEPA às formulações promoveu um aumento sem significância estatística da carga superficial negativa (cerca de -12 mV com OEPA, e -9 mV sem incorporação do óleo essencial). Valores baixos em módulo foram encontrados, devido à utilização de tensoativos não iônico no preparo da formulação, mas estes valores parecem ter sido suficientes para evitar a coalescência das gotículas. Em geral, altos valores em módulo de potencial zeta são desejáveis, pois a presença de carga elétrica positiva ou negativa na superfície das gotículas de nanoemulsões promove a repulsão entre elas, evitando a tendência de agregação, aumentando a estabilidade da preparação coloidal (HONARY; ZAHIR, 2013).



**Figura 20** Fotografia ilustrativa do aspecto macroscópico da nanoemulsão contendo OEPA (Nano OEPA pH 3,7)

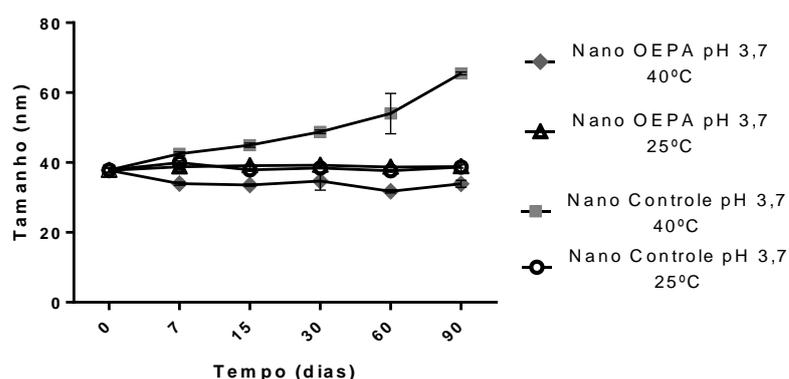
#### *5.4.1.3 Estabilidade preliminar*

##### **5.4.1.3.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS**

Após 30 dias de análise, não foram observadas alterações nas características organolépticas das formulações submetidas a armazenamento em 40°C ou 25°C. A aparência de Nano OEPA pH 3,7 permaneceu como um gel transparente amarelado e o odor característico de OEPA manteve-se presente na formulação.

#### 5.4.1.3.2 TAMANHO MÉDIO DE GOTÍCULA E PDI

Os resultados de tamanho de gotícula estão apresentados na Tabela 8 e Figura 21. Nota-se que a Nano Controle pH 3,7 e Nano OEPA pH 3,7 armazenadas a 25°C não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tempos ( $p > 0,05$ ). No entanto, o tamanho da gotícula aumentou em Nano OEPA pH 3,7 e Nano controle pH 3,7 armazenadas a 40°C após 90 dias, quando comparado aos tempos anteriores ( $p < 0,05$ ). Nano Controle pH 3,7 armazenada em 40°C apresentou significativo aumento do tamanho de gotícula quando comparada a Nano Controle pH 3,7 armazenada em temperatura ambiente, exceto no tempo 7 dias. Este fenômeno provavelmente ocorre devido à condição de armazenamento das formulações em estufa ser mais desafiadora, pelo estresse térmico.



**Figura 21** Avaliação do tamanho de gotícula da Nano OEPA pH 3,7 e Nano Controle pH 3,7 ao longo de 90 dias, durante estudo de estabilidade preliminar

Quando comparadas as duas temperaturas para Nano OEPA pH 3,7, as amostras que foram submetidas ao regime de aquecimento apresentaram maior diâmetro das gotículas em todos os tempos. Esses dados sugerem que a nanoemulsão desenvolvida tende a manter homogênea distribuição do tamanho das gotículas em temperatura ambiente. Além disso, pode-se observar que quando o OEPA está incorporado à formulação sujeita ao aumento de temperatura, existe uma menor flutuação nos valores de tamanho médio (Figura 21).

Os dados de PDI também estão descritos na Tabela 8, onde estão apresentados valores menores que 0,28. Os resultados obtidos para este parâmetro refletem a manutenção da homogeneidade na distribuição do tamanho de gotícula da nanoemulsão.

**Tabela 8** Tamanho (nm) e PDI da Nano OEPA pH 3,7 e Nano controle pH 3,7, armazenadas em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 90 dias

Dias	Nano OEPA pH 3,7				Nano Controle pH 3,7			
	40°C		25°C		40°C		25°C	
	Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	PDI
T0	37,74 ± 0,67	0,27 ± 0,01	37,74 ± 0,67	0,27 ± 0,01	37,85 ± 0,67	0,16 ± 0,01	37,85 ± 0,67	0,16 ± 0,01
T7	33,94 ± 0,46 <sup>†</sup>	0,10 ± 0,02	38,79 ± 0,42 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,01	42,51 ± 0,51 <sup>†ab</sup>	0,12 ± 0,01	39,93 ± 0,57 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,02
T15	33,54 ± 0,30 <sup>†</sup>	0,06 ± 0,02	39,09 ± 0,88 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01	44,97 ± 0,58 <sup>†ab</sup>	0,12 ± 0,01	37,91 ± 0,40 <sup>ac</sup>	0,14 ± 0,01
T30	34,67 ± 2,54	0,10 ± 0,09	39,25 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01	48,79 ± 0,50 <sup>†ab</sup>	0,13 ± 0,00	38,41 ± 0,10 <sup>ac</sup>	0,13 ± 0,02
T60	31,75 ± 0,46 <sup>†</sup>	0,04 ± 0,01	38,68 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01	54,02 ± 5,76 <sup>†ab</sup>	0,21 ± 0,02	37,6 ± 0,37 <sup>ac</sup>	0,14 ± 0,02
T90	33,69 ± 0,86 <sup>†</sup>	0,05 ± 0,01	38,84 ± 0,43 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01	65,49 ± 0,39 <sup>†ab</sup>	0,21 ± 0,02	38,7 ± 1,40 <sup>ac</sup>	0,12 ± 0,00

Os valores são apresentados como médias ± DP (n=3). IDP= Índice de polidispersão. Diferença estatisticamente significativa em comparação com: <sup>†</sup> T0 na mesma formulação, <sup>a</sup> Nano OEPA pH 3,7 40°C no mesmo momento, <sup>b</sup> Nano OEPA pH 3,7 25°C no mesmo momento, <sup>c</sup> Nano controle pH 3,7 40°C no mesmo momento; p<0,05.

#### 5.4.1.3.3 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

A Nano OEPA apresentou um valor de pH de 3,7 ± 0,1 no momento de seu preparo (Tabela 9). O pH desta nanoemulsão armazenada em 40°C modificou-se mais rapidamente que a amostra armazenada a 25°C, apresentando diferença estatística entre as duas condições no tempo final das análises (p<0,05). A ocorrência de degradação de constituintes do óleo essencial por calor pode provocar modificações no pH da formulação, o que pode explicar em parte a alteração mais acentuada deste parâmetro nas amostras submetidas ao aumento de temperatura.

**Tabela 9** pH de Nano OEPA pH 3,7 armazenada em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 30 dias

Tempo (dias)	40°C	25°C
T 0	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,1
T 7	3,5 ± 0,1 <sup>†</sup>	3,6 ± 0,1 <sup>†a</sup>
T 15	3,6 ± 0,1 <sup>†</sup>	3,7 ± 0,1
T 30	3,5 ± 0,1 <sup>†</sup>	3,6 ± 0,0 <sup>†a</sup>

Os valores são apresentados como médias ± DP (n=3). Diferença estatisticamente significativa em comparação com: <sup>†</sup> T0 na mesma formulação, <sup>a</sup>Nano OEPA pH 3,7 40°C no mesmo momento; p<0,05

#### 5.4.1.3.4 TEOR DE DILAPIOL

O teor de dilapiol presente na nanoemulsão foi analisado em CLAE-UV. A concentração mensurada no tempo 0 foi considerada para calcular a porcentagem do decaimento de dilapiol ao longo do tempo. Todas as amostras apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o tempo inicial e final (p<0,05). A formulação Nano OEPA pH 3,7 armazenada a 40°C apresentou queda de cerca de 8% do dilapiol em apenas 7 dias. Dentro de 30 dias a formulação havia perdido mais de 20% do seu teor. Em contrapartida, a nanoemulsão armazenada a 25°C apresentou decaimento maior que 11% nos primeiros 7 dias, e 23% ao final dos 30 dias (Tabela 10). Este decaimento pode ter ocorrido devido à volatilização do ativo ao longo do tempo, visto que as amostras estavam acondicionadas em frascos fechados, mas não hermeticos. Além disso, o recipiente utilizado pode ter permitido a entrada de oxigênio e a saída de vapores dos componentes do óleo essencial e de água. A perda do teor de dilapiol também pode ter ocorrido devido à degradação desta molécula, sendo o pH do meio uma variável importante a ser considerada. Apesar disso, não são encontrados na literatura dados a respeito da estabilidade do dilapiol em diferentes pHs. Devido à pequena quantidade deste composto disponível para este estudo, não foi possível realizar experimentos que esclarecessem esta questão. Desta forma, a mensuração do teor de dilapiol ao longo de 30 dias nestas condições torna-se inconclusiva, uma vez que existem variáveis não isoladas envolvidas neste processo.

Apesar das limitações das condições desta análise, ao observar os dados fica evidente o rápido decaimento do teor do ativo em um curto período de tempo. Ademais, em conjunto, os dados da estabilidade preliminar sugerem o

armazenamento sob refrigeração, principalmente devido ao decaimento do fitoativo sob estresse térmico. Desta maneira, seria necessário promover aprimoramento do sistema para incorporação do OEPA, de modo a evitar a volatilização ou degradação do óleo essencial. Uma possível alternativa, seria a complexação do OEPA com ciclodextrina (PONCE CEVALLOS; BUERA; ELIZALDE, 2010), para posterior incorporação nos géis desenvolvidos, na tentativa de promover proteção ao ativo contra instabilidades.

**Tabela 10** Teor de dilapiol (%) em Nano OEPA pH 3,7, armazenada em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 30 dias

Tempo (dias)	40°C	25°C
T 0	100 ± 0,13	100 ± 0,13
T 7	91,32 ± 2,10 <sup>†</sup>	88,49 ± 4,30 <sup>†</sup>
T 15	78,66 ± 8,36 <sup>†</sup>	72,56 ± 3,51 <sup>†</sup>
T 30	78,18 ± 2,21 <sup>†</sup>	76,31 ± 8,50 <sup>†</sup>

Os valores são apresentados como médias ± DP (n=3). Diferença estatisticamente significativa em comparação com: <sup>†</sup> T0 na mesma formulação

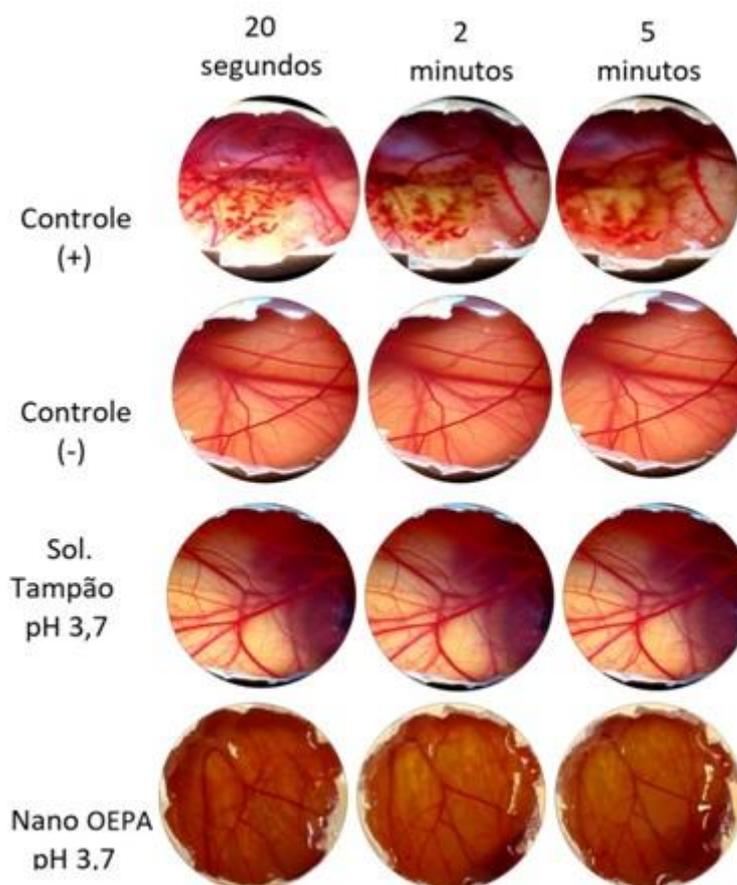
#### 5.4.1.4 Ensaio de irritabilidade HET CAM

A Nano OEPA pH 3,7 causou leve hiperemia na CAM após 2 minutos de exposição, além de hemorragia que se apresentou próxima aos 4 minutos (Figura 22). Desta forma, Nano OEPA pH 3,7 encaixa-se no escore referente a categoria “irritante leve (IL)” (II= 4,0), conforme a pontuação acumulada descrita por Luepke (1985) (Tabela 2).

A solução tampão pH 3,7 foi utilizadas como parâmetro comparativo, sendo então o controle para Nano OEPA pH 3,7 a fim de averiguar a influência do pH sobre o potencial irritativo da formulação.

Procedendo a observação da reação causada pela solução tampão testada, observa-se que provavelmente o baixo pH da formulação Nano OEPA pH 3,7 seja em maior parte o responsável pela capacidade irritativa desta nanoemulsão (solução tampão pH 3,7 com II= 3,34). Além do potencial hidrogeniônico, existem outros fatores que podem causar sinais de irritabilidade sobre a membrana. A presença de tensoativos na composição das nanoemulsões pode ser um elemento a ser considerado, apesar de serem componentes com baixa predisposição a causar

irritações em pele e mucosa (CORAZZA et al., 2010; ERDAL et al., 2016). O OEPA inserido nas preparações pode também contribuir para o aparecimento de eventos vasculares na CAM, uma vez que possui caráter ácido. Além disso, os óleos essenciais concentrados podem causar reações na pele devido à presença de alguns alérgenos terpenóides que podem estar contidos em sua composição (SOUTHWELL; FREEMAN; RUBEL, 1997).



**Figura 22** Avaliação da irritabilidade de Nano OEPA pH 3,7 sobre a membrana corioalantóide dos ovos de galinha, em comparação com as soluções controle (solução fisiológica 0,9%, solução de NaOH 1M e solução tampão pH 3,7)

#### 5.4.2 Nanoemulsão em pH 5,5

##### 5.4.2.1 Desenvolvimento e caracterização

Na tentativa de manejar os possíveis componentes irritantes, com o intuito de reduzir ainda mais a capacidade irritativa da nanoemulsão, o pH desta formulação

foi ajustado para 5,5, visto que este valor de pH é aceitável para evitar risco de irritação sobre a pele (PATEL et al., 2011).

O pH da nanoemulsão foi ajustado para 5,5 com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L, quando necessário. Não foram observadas alterações na cor, odor e consistência, quando comparada a Nano OEPA pH 3,7, apresentando também a mesma concentração descrita no item 5.4.1.2.

O tamanho de gotícula mensurado apresentou valor de  $37,12 \pm 0,29$  nm e PDI de  $0,14 \pm 0,02$  (Tabela 11). Estes parâmetros demonstram-se adequados, uma vez que o diâmetro hidrodinâmico condiz com a escala nanométrica e o baixo valor de PDI indica apropriada homogeneidade na distribuição do tamanho das gotículas. Quando analisados os parâmetros de tamanho médio e potencial zeta, observa-se que a modificação do pH da formulação Nano OEPA pH 5,5 não alterou significativamente estes quesitos, quando comparados à Nano controle e Nano OEPA pH 3,7 ( $p > 0,05$ ), que continuam apresentando valores que tendem a proporcionar maior estabilidade ao sistema.

**Tabela 11** Tamanho (nm), PDI e potencial zeta da Nano OEPA pH 5,5 e Nano controle

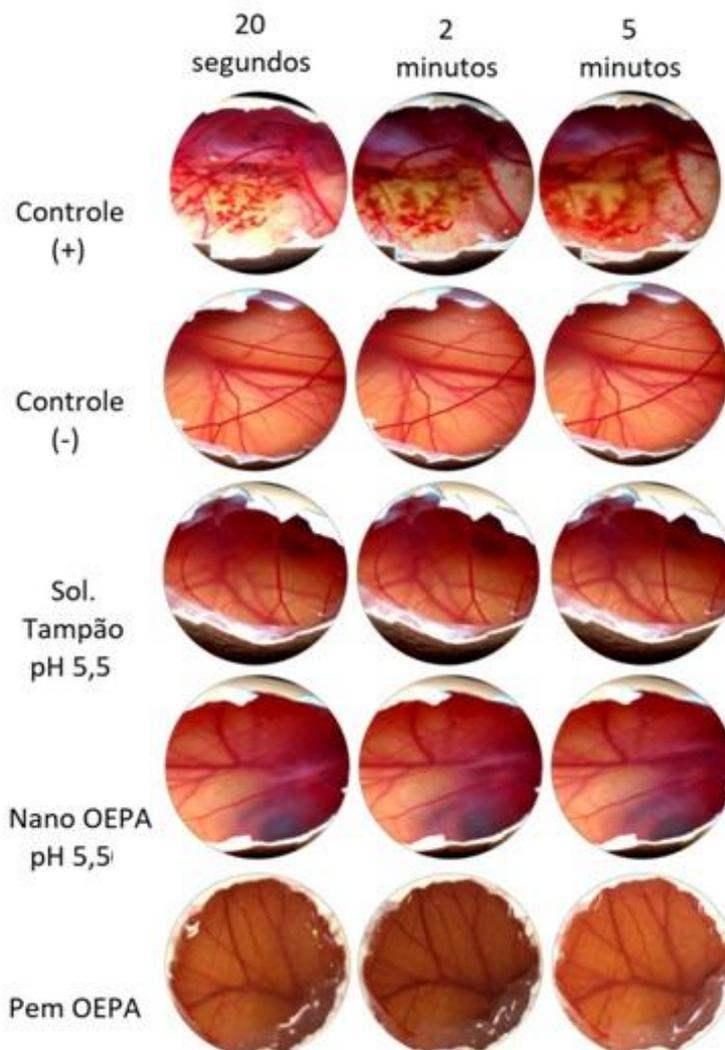
Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Nano Controle	$37,52 \pm 0,14$	$0,16 \pm 0,01$	$-9,97 \pm 2,42$
Nano OEPA pH 5,5	$37,12 \pm 0,29$	$0,14 \pm 0,02$	$-12,97 \pm 1,64$

Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP(n=3). Sem diferenças estatisticamente significativas;  $p > 0,05$

#### 5.4.2.2 Ensaio de irritabilidade HET-CAM

A Nano OEPA pH 5,5 causou apenas leve hiperemia após 3 minutos de contato (Figura 23), sendo classificada como “não irritante (NI)” (II= 0,83), conforme a pontuação acumulada descrita por Luepke (1985) (Tabela 2).

A solução tampão pH 5,5 foi utilizada como parâmetro comparativo, sendo então considerada um controle para a Nano OEPA pH 5,5, a fim de averiguar a influência do pH sobre o potencial irritativo desta formulação.



**Figura 23** Avaliação da irritabilidade de Nano OEPA pH 5,5 e Pem OEPA sobre a membrana corioalantóide dos ovos de galinha, em comparação com as soluções controle (solução fisiológica 0,9%, solução de NaOH 1M e solução tampão pH 5,5)

A Nano OEPA pH 5,5 apresenta índice de irritabilidade muito baixo, assim como a solução tampão pH 5,5, sugerindo que esta faixa de pH não é demasiadamente irritativa para a CAM (solução tampão pH 5,5 com  $II = 1,87$ ). A Nano OEPA pH 5,5 possui a mesma composição que Nano OEPA pH 3,7 em relação aos tensoativos e concentração de OEPA, diferindo apenas em termos de pH. Observa-se que a nanoemulsão em pH 5,5 (classificada como “não irritante”) foi menos irritante que a formulação com pH 3,7 (“irritante leve”), indicando que neste caso, o potencial hidrogeniônico foi o maior causador de sinais de irritação na CAM. Por este motivo, a Nano OEPA pH 5,5 foi escolhida para dar prosseguimento aos demais experimentos e esse pH foi mantido também para o emulgel polimérico (Pem OEPA).

### 5.4.3 Emulgel polimérico

#### 5.4.3.1 Desenvolvimento e caracterização

O Pem OEPA desenvolvido continha 71,7 mg de dilapiol por grama de formulação e apresentou-se como um emulgel consistente de coloração esbranquiçada (Figura 24) e odor característico do OEPA. No ato de seu preparo, Pem OEPA mostrou maior fluidez devido ao pH mensurado próximo a 3, o que era esperado visto que este polímero geleifica na faixa de pH entre 4-9 (TEGELI et al., 2011). Quando o pH foi ajustado para 5,5, de fato observou-se um gradativo aumento na consistência da formulação.



**Figura 24** Fotografia ilustrativa do aspecto macroscópico do emulgel polimérico contendo OEPA (Pem OEPA)

#### 5.4.3.2 Estabilidade preliminar

##### 5.4.3.2.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Após 30 dias de análise, não foram observadas alterações nas características organolépticas das formulações submetidas a armazenamento em 40°C ou 25°C. A aparência de Pem OEPA permaneceu como um semissólido leitoso com coloração esbranquiçada, sem alterações na consistência, coloração e odor.

#### 5.4.3.2.2 POTENCIAL DE HIDROGÊNIO (pH)

Pem OEPA armazenada a 40°C demonstrou maior modificação dos valores de pH ao longo do tempo quando comparado aos resultados da formulação armazenada em temperatura ambiente. No tempo 7 e 15, o gel polimérico submetido aos dois regimes de temperatura apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. No entanto, o valor de p encontrado no tempo final das análises destas formulações foi maior que 0,05, demonstrando que não houve diferença estatisticamente significativa no tempo 30, entre Pem OEPA submetida à 40°C e temperatura ambiente (Tabela 12). As modificações de pH de Pem OEPA na condição de aumento de temperatura pode se dar pelos mesmos motivos discutidos no item 5.4.1.4. O polímero utilizado dificilmente sofreria alterações na faixa de temperatura de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  (TEGELI et al., 2011). Apesar disso, existe ainda a hipótese de o óleo essencial sofrer degradação nessas condições, além da possibilidade não esclarecida do dilapiol sofrer ataques nesta faixa de pH, disponibilizando no meio produtos de degradação com grupos funcionais que alterem o pH da formulação.

**Tabela 12** pH de Pem OEPA armazenado em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 30 dias

Tempo (dias)	40°C	25°C
T 0	5,5 ± 0,0	5,5 ± 0,0
T 7	5,1 ± 0,0 <sup>†</sup>	4,5 ± 0,0 <sup>†a</sup>
T 15	5,0 ± 0,0 <sup>†</sup>	5,4 ± 0,0 <sup>a</sup>
T 30	5,3 ± 0,1 <sup>†</sup>	5,3 ± 0,0 <sup>†</sup>

Os valores são apresentados como médias ± DP (n=3). Diferença estatisticamente significativa em comparação com: <sup>†</sup> T0 na mesma formulação, <sup>a</sup>Pem OEPA 40°C no mesmo momento; p<0,05

#### 5.4.3.2.3 TEOR DE DILAPIOL

O teor de dilapiol presente nas formulações foi analisado em CLAE-UV. Assim como para Nano OEPA, a concentração mensurada no início do estudo (tempo 0) foi considerada para calcular a porcentagem do decaimento de dilapiol ao longo do tempo. Pem OEPA armazenada a 40°C promoveu a redução de sua concentração de dilapiol em velocidade considerável, com decaimento de 24,63% no tempo 7 e

39,23% no tempo 30 (Tabela 13). Assim como mencionado no item 5.4.1.3.4, deve-se levar em consideração a possibilidade da ocorrência da volatilização do ativo ao longo do tempo. Além disso, a questão ainda não esclarecida a respeito da estabilidade do dilapiol em diferentes pHs deve ser investigada mais profundamente, com a exposição às condições ácidas e básicas para elucidar seu pH de máxima estabilidade. Apesar dos resultados inconclusivos deste experimento, os dados sugerem alguns cuidados no armazenamento e envase do produto, com o isolamento de variáveis que possibilitem a volatilização do ativo, com uso de refrigeração e envases herméticos para possibilitar a manutenção do teor durante todo o prazo de validade.

Quando o teor de dilapiol em Pem OEPA é observado ao longo do tempo, percebe-se que acontece um importante decaimento do teor do ativo na primeira semana. Quando estes resultados são comparados aos descritos no item 5.4.1.3.4, constata-se que a perda de teor que ocorre na nanoemulsão é menor do que para o emulgel polimérico. Uma das hipóteses que podem explicar o decaimento mais lento no teor de dilapiol apresentado pela Nano OEPA é a encapsulação do óleo essencial em nanogotículas, que pode conferir algum tipo de proteção contra a volatilização do ativo, como demonstrado por Flores et al. (2011).

Assim como a respeito da nanoemulsão, são necessárias modificações no sistema contendo Pemulen<sup>®</sup>, com finalidade de evitar a volatilização do óleo essencial para aumentar a estabilidade da formulação, além da sugestão de armazenamento sob refrigeração, devido às características de instabilidade em aumento de temperatura.

**Tabela 13** Teor de dilapiol (%) em Pem OEPA armazenado em 40°C e temperatura ambiente ao longo de 30 dias

Tempo (dias)	40°C	25°C
T 0	100 ± 0,27	100 ± 0,27
T 7	75,37 ± 0,52 <sup>†</sup>	80,70 ± 0,91 <sup>†</sup>
T 15	70,68 ± 1,09 <sup>†</sup>	68,13 ± 2,66 <sup>†</sup>
T 30	60,77 ± 0,02 <sup>†</sup>	42,92 ± 0,05 <sup>†</sup>

Os valores são apresentados como médias ± DP (n=3). Diferença estatisticamente significativa em comparação com: <sup>†</sup> T0 na mesma formulação; p<0,05.

#### 5.4.3.3 Ensaio de irritabilidade HET-CAM

Pem OEPA estimulou o aparecimento de discreta hiperemia e hemorragia aos 2 e 3 minutos de avaliação, respectivamente (Figura 23). Após os 5 minutos de observação, o escore final da amostra testada foi de 2,8 sendo desta forma considerada como “irritante leve (IL)”, conforme a pontuação acumulada descrita por Luepke (1985) (Tabela 2). Como mencionado anteriormente no item 5.4.2.2, a solução tampão pH 5,5 apresentou índice de irritabilidade muito baixo ( $II = 1,87$ ), descartando o pH da formulação como o principal agente causador dos sinais de irritação na CAM. O polímero Pemulen<sup>®</sup> contido no emulgel, é descrito na literatura como insumo de baixa capacidade irritativa à pele (SHAHIN et al., 2011), sendo por este motivo muito utilizado em formulações cosméticas de aplicação cutânea. O OEPA presente na composição da formulação pode ser o causador de eventos vasculares observados na CAM, uma vez que seu potencial irritativo já foi discutido no item 5.4.1.4.

### 5.5 AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE E ESPALHABILIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Nano Controle pH 5,5 apresentou viscosidade de  $54033 \pm 1686$  cP, utilizando *spindle* nº 07 em 30 rpm. No entanto, Pem Controle apresentou valor de  $10540 \pm 440$  cP utilizando *spindle* nº 05 sob as mesmas condições configuradas para a nanoemulsão (Tabela 14). Desta forma, pode-se observar que Nano Controle pH 5,5 é uma formulação mais viscosa que o emulgel polimérico. A consistência de formulações tópicas é de fundamental importância no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos, e este parâmetro deve estar adequado à finalidade pretendida (BARRY; MEYER, 1973; LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2001). No caso de formulações para aplicação na pele, é desejável que esta possua viscosidade elevada para que não escoe devido à sua fluidez (EID et al., 2014; MOU et al., 2008; SENGUPTA; CHATTERJEE, 2017). Apesar disso, a viscosidade do produto final não pode ser tão acentuada, visto que isso pode comprometer a espalhabilidade e aplicação tópica das formulações (BARRY; MEYER, 1973).

Quando comparadas às nanoemulsões comuns, que em geral apresentam-se como formulações líquidas e de baixa viscosidade (SHAKEEL et al., 2007;

SHAKEEL; RAMADAN; AHMED, 2009), a nanoemulsão desenvolvida neste trabalho apresenta valores muito maiores para este parâmetro. Em contraste aos valores mensurados por Shakeel et al. (2007) (92,20 – 125,30 cP), observa-se uma diferença que alcança magnitude de até 400 vezes. Neste estudo especificamente, o impacto de uma formulação mais viscosa que a outra pode estar no retardo da liberação, uma vez que alta viscosidade pode controlar a difusão de fármacos para fora da formulação (PATEL et al., 2011; PRAKASH; RAO; SOUJANYA, 2010; SENGUPTA; CHATTERJEE, 2017).

**Tabela 14** Viscosidade mensurada para Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle

Formulação	Spindle	Rotação (rpm)	Torque (%)	Viscosidade (cP)
Nano Controle pH 5,5	07	30	40,40	54033 ± 1686
Pem Controle	05	30	78,96	10540 ± 440

Os valores são apresentados como médias ± DP (n=3)

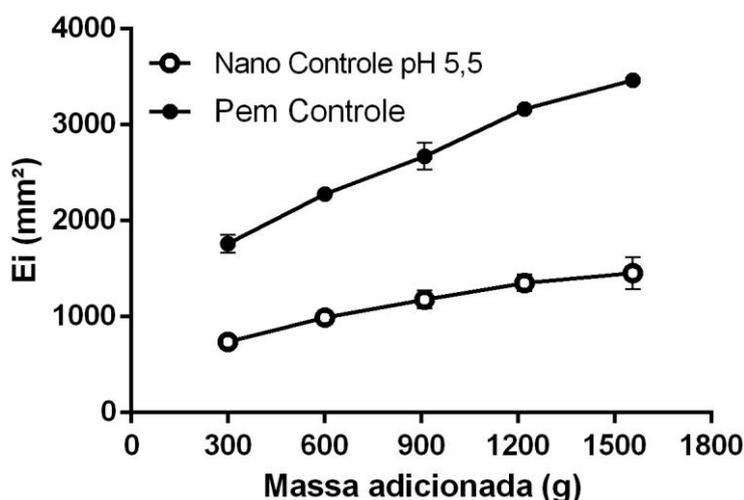
O teste de espalhabilidade também foi realizado para as formulações sem OEPA (Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle). Considerando que no teste quanto maior for o diâmetro atingido pela formulação, maior é a espalhabilidade da amostra, Nano Controle pH 5,5 apresentou diâmetro de espalhabilidade de 42,98 ± 2,25 mm após aplicação da última placa (peso total de 1555,86 g). Em contrapartida, Pem Controle apresentou espalhabilidade com diâmetro de 66,45 ± 0,90 mm, nas mesmas condições (Tabela 15 e Figura 25). Quando esses resultados são analisados em conjunto com os dados de viscosidade, percebe-se que existe uma relação inversamente proporcional entre esses dois parâmetros.

**Tabela 15** Espalhabilidade mensurada para a Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle

Placas		Nano Controle pH 5,5			Pem Controle		
Ordem	Peso (g)	Diâmetro (mm)	CV %	Ei (mm <sup>2</sup> )	Diâmetro (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
1	299,95	30,67 ± 1,03	3,37	738,25	47,37 ± 1,36	2,87	1761,23
2	301,02	35,53 ± 1,03	2,91	991,15	53,87 ± 1,06	1,97	2367,43
3	308,79	38,75 ± 1,51	3,89	1178,73	58,33 ± 1,37	2,34	2873,30
4	309,42	41,50 ± 1,22	2,95	1351,97	63,50 ± 0,84	1,32	3265,80
5	336,68	42,98 ± 2,25	5,24	1450,34	66,45 ± 0,90	1,36	3457,56

Os valores são apresentados como médias ± DP (n=3). CV = coeficiente de variação; Ei = espalhabilidade para o peso i (mm<sup>2</sup>)

A espalhabilidade é um importante parâmetro a ser considerado no desenvolvimento de formulações para aplicação tópica. Na maioria dos casos, a consistência e espalhabilidade desempenham importante papel na homogênea distribuição do produto, com conseqüente melhora nos índices de aceitação por parte do consumidor final (BARAKAT, 2010; BARRY; MEYER, 1973). O emulgel polimérico é identificado como “gel semifluido” e a nanoemulsão como “gel rígido”, conforme a classificação utilizada por Lardy et al. (2000). Isso sugere que a utilização do emulgel sobre a pele seja mais facilitada, conferindo conforto durante a aplicação, enquanto a nanoemulsão pode oferecer alguma resistência quanto ao espalhamento sobre o local desejado, apesar de não causar incomodo devido ao toque suave e elegância da formulação.



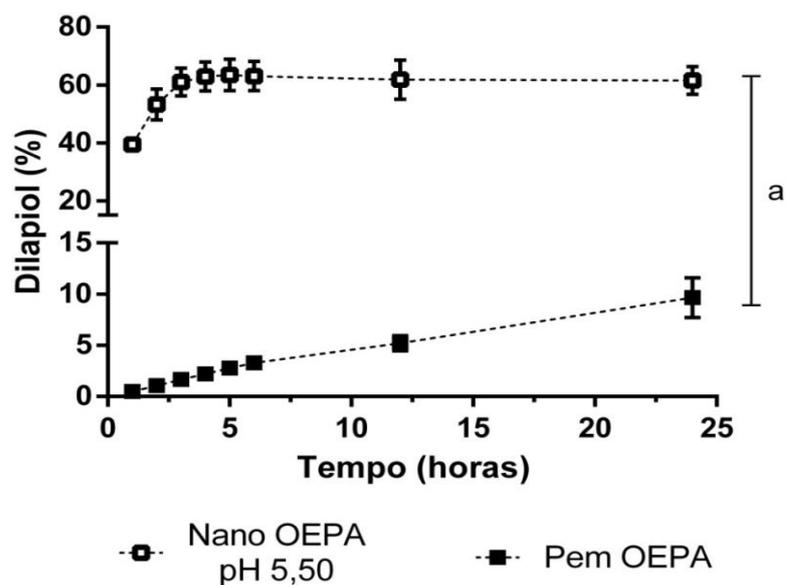
**Figura 25** Comportamento de expansão de Nano Controle pH 5,5 e Pem Controle em função da massa aplicada

## 5.6 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO DILAPIOL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Para avaliar o fluxo da liberação do dilapiol através de uma membrana inerte, que mostra a liberação do fármaco a partir das formulações, foram realizadas coletas do meio receptor da célula de difusão a cada hora. O emulgel preparado com polímero liberou  $1881,95 \pm 377,80 \mu\text{g}$  de dilapiol ao longo de 24 horas, correspondendo a aproximadamente 9,65% do conteúdo total no ativo contido no gel. Já a nanoemulsão liberou  $11997,45 \pm 939,93 \mu\text{g}$ , equivalendo a 61,52% do dilapiol incorporado na formulação, já nas primeiras 5 horas de experimento (Figura

26). Isso indica que Nano OEPA liberou 6 vezes mais dilapiol quando comparado ao emulgel polimérico e em um intervalo de tempo muito menor.

Analisando-se as viscosidades das formulações, essa liberação mais rápida a partir da Nano OEPA em relação a Pem OEPA não era esperada, visto que a nanoemulsão tinha viscosidade superior (Tabela 14) e, além disso, poderia-se levar em consideração que o dilapiol do OEPA que compõe a fase interna da nanoemulsão óleo-em-água poderia demorar para se difundir para fora do sistema. No entanto, parece que o polímero acrílico que compõe o Pem OEPA interage de alguma forma com o dilapiol, controlando sua liberação. Wahlgren et al. (2009) já reportaram que formulações preparadas com géis poli (ácido acrílicos) de fato podem controlar a liberação de substâncias lipofílicas, justificando a expressiva diferença entre os perfis de liberação obtidos para os géis testados no presente estudo. Desta forma, parece que a presença do polímero é fato decisivo para retenção da liberação do dilapiol contido nos géis de Pem OEPA.



**Figura 26** Liberação de dilapiol através de membrana de acetato/nitrato de celulose ao longo de 24 horas, a partir de Nano OEPA pH 5,5 e Pem OEPA.<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa entre os grupos;  $p < 0,05$ . (n=5)

A melhor correlação linear para a liberação de dilapiol da Nano OEPA pH 5,5 nas primeiras 5 horas de experimento foi obtido segundo a relação da concentração  $\times \sqrt{\text{tempo}}$ , correspondendo ao modelo de Higuchi (Tabela 16). Neste caso, a liberação representa um processo de difusão baseado na lei de Fick, sendo este

modelo muito utilizado para descrever a liberação de fármacos a partir de diversos tipos de formas farmacêuticas (COSTA, 2002; VALENTE et al., 2013). Já para Pem OEPA, o  $r^2$  mais próximo da perfeita linearidade foi obtido a partir da correlação entre a concentração x tempo (Tabela 16). Neste modelo de ordem zero, a difusão independe da concentração de fármaco no meio doador, liberando a mesma quantidade por unidade de tempo (GUY; HADGRAFT, 1990; VALENTE et al., 2013).

**Tabela 16** Valores dos fluxos de liberação do dilapiol a partir das formulações desenvolvidas e seus coeficientes lineares

Formulação	J	Modelo Cinético	$r^2$
<b>Nano OEPA pH 5,5</b>	17,681 ± 7,310 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{1/2}$	Higuchi	0,87
<b>Pem OEPA</b>	0,328 ± 0,061 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$	Ordem zero	0,97

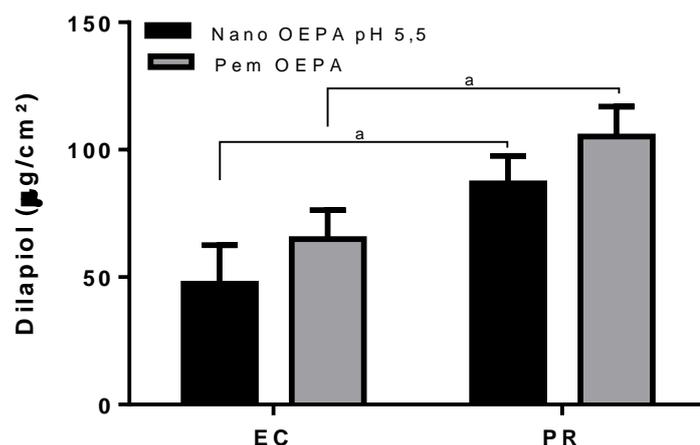
Os valores são apresentados como médias ± DP (n=5). J= fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de liberação ("steady state");  $r^2$ = coeficiente de correlação linear

## 5.7 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Moléculas que removem ou modificam reversivelmente a função de barreira do EC são chamadas de promotores de permeação (BARRY, 1987). Diversas formulações para aplicação tópica contêm esses materiais para melhorar a permeação de fármacos na pele. Uns dos mais aplicados são os tensoativos, alcoóis, glicóis, ácidos graxos e os óleos essenciais (WILLIAMS; BARRY, 2012). A nanoemulsão aqui desenvolvida apresenta em sua composição três dessas classes anteriormente citadas. O Span 80<sup>®</sup> e Cremophor<sup>®</sup> são tensoativos não iônicos largamente aplicados em formulações farmacêuticas e cosméticas. Aqui, eles são responsáveis pela formação das nanogotículas na Nano OEPA. Esses tensoativos podem desestruturar a organização dos lipídios do EC, aumentando sua permeabilidade (CORAZZA et al., 2010; LANE, 2013; WILLIAMS; BARRY, 2012).

O oleato de etila presente na Nano OEPA também tem sido descrito como promotor de absorção, e está presente em diversas formulações no mercado farmacêutico (LANE, 2013). Além disso, o próprio OEPA presente tanto na Nano OEPA quanto na Pem OEPA pode promover a absorção do ativo, uma vez que os terpenos presentes na constituição dos óleos essenciais também podem modificar a estrutura do EC.

Assim, estudos de permeação foram realizados *in vitro* de forma passiva durante 6 horas, para as duas formulações desenvolvidas para comparar o efeito das diferenças físico-química delas sobre a permeação do ativo através da pele. Os resultados são apresentados na Figura 27.



**Figura 27** Dilapiol recuperado das camadas da pele nos testes de permeação *in vitro*; EC= estrato córneo e PR= pele remanescente.<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa entre os grupos;  $p < 0,05$ . (n=5)

A formulação Pem OEPA conferiu uma penetração de  $64,91 \pm 11,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de dilapiol no EC e  $105,20 \pm 11,74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  na PR (pele total  $170,12 \pm 19,26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Por outro lado, Nano OEPA apresentou valores de penetração de dilapiol de  $47,50 \pm 15,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  no EC e  $86,83 \pm 10,74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  na PR (pele total  $134,33 \pm 25,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Era esperado que a nanoemulsão tanto por ter controlado menos a liberação do dilapiol, quanto por conter diversos promotores de absorção cutânea em sua composição, que reconhecidamente alteram temporariamente a estrutura e função de barreira do EC (KOGAN; GARTI, 2006), iria propiciar uma maior absorção cutânea do ativo. Apesar disso, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores de dilapiol permeado a partir de ambas as formulações desenvolvidas.

É estabelecido que a porção hidrofílica do Pemulen<sup>®</sup> tende a intumescer imediatamente quando em contato com a superfície cutânea e com os sais contidos na pele, promovendo uma rápida liberação do conteúdo oleoso do emulgel (TEGELI et al., 2011). Esse fenômeno pode fazer com que Pem OEPA apresente um

comportamento diferente de liberação do OEPA em contato com a pele, quando comparado ao perfil exibido nos testes realizados com membranas inertes. Desta forma, a rápida liberação do óleo em consequência da interação da formulação com a pele deve possibilitar que uma maior quantidade de OEPA esteja disponível para permeação. Tal fenômeno pode ser o responsável por promover uma considerável permeação do dilapiol a partir do emulgel polimérico, tornando sua capacidade de promover deposição de dilapiol nas camadas da pele semelhante ao conferido pela nanoemulsão.

Assim, surpreendentemente, esse trabalho indica que uma formulação de obtenção mais simples, como o emulgel de Pemulen<sup>®</sup>, pode conferir efeitos semelhantes em termos de promoção de liberação de ativos para os tecidos cutâneos, quando comparada à uma formulação um pouco mais complexa, cara e de difícil transposição de escala, como é uma nanoemulsão. Seria, portanto, uma alternativa relativamente simples para o estabelecimento de uma alternativa farmacêutica utilizando o OEPA.

Entre as diversas propriedades do OEPA e dilapiol, pode-se destacar a atividade antifúngica destes compostos. O direcionamento preferencial do dilapiol para camadas mais profundas da pele, conferido pelas duas formulações sugere a utilização de ambas para o tratamento de doenças que acometam a EP, como as infecções fúngicas superficiais.

Ferreira et al. (2016) avaliou a atividade antifúngica do dilapiol isolado e OEPA com a mesma composição do que foi utilizado no presente estudo, contra fungos dermatófitos. O valor de CIM determinado para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* foi de 500 µg/mL, tanto para o OEPA quanto para o dilapiol isolado. Considerando os valores estabelecidos por Holetz et al. (2002), o OEPA é classificado com atividade antimicrobiana moderada contra estes micro-organismos.

Para possibilitar a correlação entre a CIM e a concentração de dilapiol depositada no tecido cutâneo, foi realizada uma extrapolação dos dados de permeação. Considerando que a área difusional da célula de Franz utilizada é circular (1,5 cm<sup>2</sup>), o volume da pele que esteve em contato com a formulação foi estimado. Para isso, foi considerada a espessura da pele de aproximadamente 0,1 cm. Desta forma, foram obtidos resultados expressos em µg/cm<sup>3</sup>, sendo equivalentes a µg/mL.

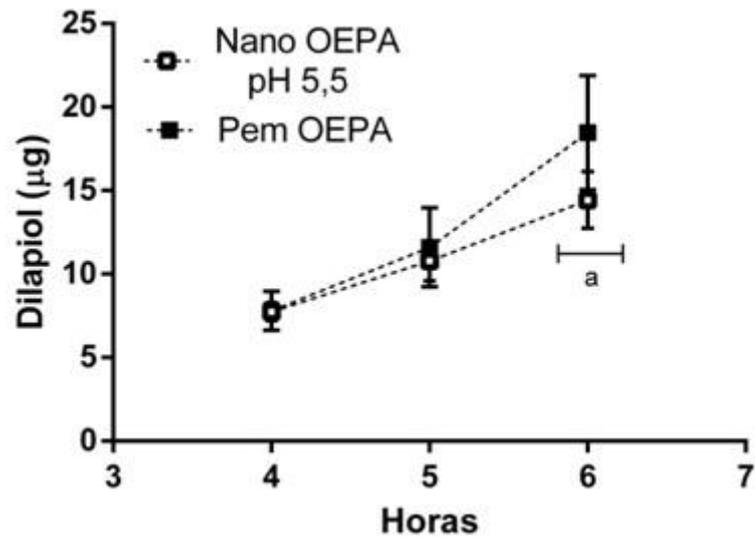
A partir dessa correlação, Nano OEPA acumula na pele uma concentração de  $1343,30 \pm 250,20 \mu\text{g/mL}$  de dilapiol, enquanto Pem OEPA apresenta acúmulo de  $1701,21 \pm 192,58 \mu\text{g/mL}$ . Comparando com a CIM determinada por Ferreira et al. (2016), as formulações desenvolvidas seriam eficientes contra *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, uma vez que Pem OEPA proporciona uma quantidade de dilapiol quase 3,5 vezes maior que a CIM necessária para os fungos citados, e Nano OEPA acumula mais que duas vezes o mínimo necessário.

Essa correlação realizada não é exata e não pode ser considerada absoluta, visto que a pele pode apresentar variações em sua espessura. Além disso, os valores de permeação *in vivo* podem diferir dos valores obtidos *in vitro*, não havendo dados suficientes para estabelecer uma correta correlação. Ainda assim, este cálculo fornece dados que contribuiriam para um melhor direcionamento de futuros estudos que proponham o combate desses micro-organismos por via tópica. *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* são fungos dermatófitos conhecidos por serem causadores de infecções cutâneas, incluindo o Granuloma de Majocchi. A terapia desta patologia inclui altas doses de agentes antifúngicos sistêmicos por longos períodos (TIRADO-SÁNCHEZ; PONCE-OLIVERA; BONIFAZ, 2015), o que pode levar a uma série de reações adversas aos esquemas farmacoterapêuticos, prejudicando a adesão do paciente ao tratamento.

A terapia antifúngica por via tópica associada aos esquemas tradicionais de tratamento pode viabilizar um melhor manejo da terapia, uma vez que surge a possibilidade de redução da dose dos antifúngicos sistêmicos necessária para a erradicação do agente causador da doença. Essa estratégia propicia a redução da ocorrência de reações adversas relacionadas ao medicamento, otimizando a terapia e aumentando a aceitação do paciente (CRAWFORD; HOLLIS, 2007).

Para avaliação do dilapiol contido no meio receptor, alíquotas foram coletadas a cada hora, durante 6 horas. Os dados obtidos estão expostos na Figura 28, onde observa-se que apenas a partir da hora 4 foi possível quantificar o marcador em todas as replicatas por meio de CLAE-UV. O dilapiol não foi identificado em todas as amostras nos momentos hora 1, 2 e 3. Nos momentos 4 e 5 horas, não houve diferença estatisticamente significativa entre Nano OEPA pH 5,5 e Pem OEPA (Figura 28). Apenas para os dados coletados na sexta hora foi encontrado valor de  $p < 0,05$ , indicando diferença estatística entre os grupos ( $14,43 \pm 1,70 \mu\text{g}$  e  $18,47 \pm 3,42 \mu\text{g}$ , na devida ordem), indicando que Pem OEPA foi capaz de promover maior

quantidade de dilapiol ao meio receptor da célula de Franz e o resultado está de acordo com o observado anteriormente em termos de retenção cutânea de dilapiol a partir das duas formulações desenvolvidas.



**Figura 28** Dilapiol quantificado no meio receptor ao longo de 6 horas (n=5). <sup>a</sup> Diferença estatística significativa entre os dois grupos (p<0,05).

## 6 CONCLUSÃO

As formulações desenvolvidas apresentam-se como potenciais candidatos para veiculação do óleo essencial de *Piper aduncum* no que diz respeito à permeação cutânea do dilapiol, visto que foram capazes de liberar concentrações adequadas do ativo até o seu local de ação. Além disso, as formulações são constituídas por componentes de baixa toxicidade para a pele, viabilizando a aplicação tópica dos produtos desenvolvidos.

A nanoemulsão apresentou-se menos instável que o emulgel. Os resultados obtidos nos estudos de estabilidade preliminar sugerem mudanças nos envases primários, com a utilização de embalagens herméticas ou que utilizem vácuo. Também sugerem alterações nas condições climáticas de armazenamento, como o uso de refrigeração. Essas medidas poderiam solucionar problemas observados, mais especificamente quanto ao decaimento do fitoativo dilapiol e alterações de pH das formulações elaboradas.

Por fim, o estudo indicou que uma formulação mais simples, como é o caso do emulgel de Pemulen<sup>®</sup>, por apresentar mecanismos de interação ainda pouco explorados, pode conferir efeitos semelhantes em termos de promoção de permeação de ativos para os tecidos cutâneos, quando comparada a uma formulação um pouco mais complexa, de tecnologia mais cara e de difícil transposição de escala, como é uma nanoemulsão, o que é positivo na viabilização econômica do uso do óleo essencial de *Piper aduncum* no tratamento de dermatofitoses.

## REFERÊNCIAS

- ACIOLE, E. H. P. et al. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 4, p. 559–565, 2014.
- AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, Characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 158–166, 2013.
- ALAM, M. et al. Development, characterization and efficacy of niosomal diallyl disulfide in treatment of disseminated murine candidiasis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, n. 2, p. 247–256, 2013.
- ALY, R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3, p. S21–S25, 1994.
- AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 197–201, 2010.
- ANGELO, T. et al. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1022, p. 81–86, 2016.
- BARAKAT, N. S. Evaluation of Glycofurol-Based Gel as a New Vehicle for Topical Application of Naproxen. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 11, n. 3, p. 1138–1146, 2010.
- BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, n. 1, p. 85–97, 1987.
- BARRY, B. W.; MEYER, M. C. Sensory Assessment of Spreadability of Hydrophilic Topical Preparations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 8, p. 1349–1354, 1973.
- BAYALA, B. et al. Anticancer activity of essential oils and their chemical components -a review. **American journal of cancer research**, v. 4, n. 6, p. 591–607, 2014.
- BELL-SYER, S. E. M.; KHAN, S. M.; TORGERSON, D. J. Oral treatments for fungal infections of the skin of the foot. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 132, n. 2, p. 127,

2014.

BELZILE, A.-S. et al. Dillapiol Derivatives as Synergists: Structure–Activity Relationship Analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 66, n. 1, p. 33–40, 2000.

BILIA, A. R. et al. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

BOS, J. D.; MEINARDI, M. M. H. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 3, p. 165–169, 2000.

BOUWSTRA, J. A. et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 1, p. 1–36, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.** Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre validação de métodos analíticos.** Brasília, DF, 2017.

BRAZAO, M. A. et al. Antibacterial activity of the Piper aduncum oil and dillapiole , its main constituent , against multidrug-resistant strains. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, p. 517–526, 2014.

CALLENDER, S. P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 425–442, 2017.

CHOUDHURY, H. et al. Recent Update on Nanoemulgel as Topical Drug Delivery System. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 7, p. 1736–1751, 2017.

CICCIÓ, J. F.; BALLESTERO, C. M. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de Piper aduncum (Piperaceae) de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 45, n. 2, p. 783–790, 1997.

CORAZZA, M. et al. Surfactants, skin cleansing protagonists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 1, p. 1–6, 2010.

COSTA, P. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n.2, p. 141-153, 2002.

CRAIG, A. S.; EIKENBERRY, E. F.; PARRY, D. A. D. Ultrastructural organization of skin: Classification on the basis of mechanical role. **Connective Tissue Research**, v. 16, n. 3, p. 213–223, 1987.

CRAWFORD, F.; HOLLIS, S. Topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the foot. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, 2007.

DE ALMEIDA, R. R. P. et al. Chemical variation in Piper aduncum and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 9, p. 1427–1434, 2009.

DE JALÓN, E. G. et al. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: Quantification of the drug in porcine skin layers. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 1–2, p. 191–197, 2001.

DONSÌ, F. et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342–350, 2012.

EID, A. M. et al. Preparation, Characterization and Anti-Inflammatory Activity of Swietenia macrophylla Nanoemulgel. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 5, n. 2, 2014.

ERDAL, M. S. et al. Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine: Characterization studies and in vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1027–1037, 2016.

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE. **European Pharmacopoeia**, 8<sup>a</sup> Ed., 2010

FERREIRA-NUNES, R. et al. Versatile chromatographic method for catechin determination in development of topical formulations containing natural extracts. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 2, p. e4062, 2018.

FERREIRA, L. S. et al. In Vitro Skin Permeation and Retention of Paromomycin from Liposomes for Topical Treatment of the Cutaneous Leishmaniasis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 3, p. 289–296, 2004.

FERREIRA, R. et al. Antifungal Action of the Dillapiole-rich Oil of Piper aduncum

against Dermatomycoses Caused by Filamentous Fungi. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 15, n. 12, p. 1–10, 2016.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.

FOUAD, S. A. et al. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: In vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 569–578, 2013.

GAÍNZA, Y. A. et al. Piper aduncum against Haemonchus contortus isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 383–393, 2016.

GE, S. et al. Percutaneous delivery of econazole using microemulsion as vehicle: Formulation, evaluation and vesicle-skin interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465, n. 1–2, p. 120–131, 2014.

GHARENAGHADEH, S. et al. Application of salvia multicaulis essential oil-containing nanoemulsion against food-borne pathogens. **Food Bioscience**, v. 19, n. July, p. 128–133, 2017.

GRATIERI, T. et al. Development and validation of a HPAE-PAD method for the quantification of CGP69669A, a sialyl Lewis x mimetic, in skin permeation studies. **Biomedical Chromatography**, v. 2011, 2011, p. 507–511, 2012.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

GULYAKIN, I. D.; OBOROTOVA, N. A.; PECHENNIKOV, V. M. Drug Synthesis Methods and Manufacturing Technology. **Current Science**, v. 68, n. 7, p. 715–725, 1995.

GUY, R. H.; HADGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. R1-R3, 1990.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutic al Research**, v. 12, n. 2, p. 265–273, 2013.

HSU, L. Y. et al. Tropical Fungal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 497–512, 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. January, p. 1–24, 2012.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Disponível em: <<http://goo.gl/7C3uXj>>. Acesso em: 23 dez. 2017.

JANTAN, I. et al. Comparative Study of the Essential Oils of Five Piper Species from Peninsular Malaysia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 9, p. 339–342, 1994.

JIA, Y. et al. The mechanism of skin lipids influencing skin status. **Journal of Dermatological Science**, 2017.

KANAAN, I. C. S. et al. Majocchi's granuloma - Case report. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 2, p. 251–253, 2015.

KNÖÖS, P. et al. Surfactants modify the release from tablets made of hydrophobically modified poly (acrylic acid). **Results in Pharma Sciences**, v. 3, n. 1, p. 7–14, 2013a.

KNÖÖS, P. et al. Using NMR chemical shift imaging to monitor swelling and molecular transport in drug-loaded tablets of hydrophobically modified poly(acrylic acid): Methodology and effects of polymer (in)solubility. **Langmuir**, v. 29, n. 45, p. 13898–13908, 2013b.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 126, p. 369–385, 2006.

KYLE, A. A.; DAHL, M. V. Topical Therapy for Fungal Infections. **American Journal Clinical Dermatology**, v. 5, n. 6, p. 443–451, 2004.

LADEMANN, J. et al. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 14, n. SUPPL. 1, p. 17–22, 2001.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails.

**Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 6, p. 347–351, 2017.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 12–21, 2013.

LARDY, F. et al. Functionalization of hydrocolloids: Principal component analysis applied to the study of correlations between parameters describing the consistency of hydrogels. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 26, n. 7, p. 715-721, 2000.

LIANG, R. et al. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7548–7555, 2012.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, n. 1, p. 9–12, 2001.

LOPES, L. Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions. **Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 52–77, 2014.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287–291, 1985.

MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 269–272, 1998.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 2011.

MCGRATH, J. A.; UITTO, J. Anatomy and organization of human skin. **Rook's Textbook of Dermatology, Seventh Edition**, p. 45-128, 2010.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, p. 9252–9287, 2010.

MONTES DE OCA-ÁVALOS, J. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, 2017.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103–

112, 2001.

MOU, D. et al. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1–2, p. 270–276, 2008.

MOYSAN, E. et al. An innovative hydrogel of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules: when the drug is a key player of the nanomedicine structure. **Soft Matter**, v. 10, n. 11, p. 1767, 2014.

NUCHUCHUA, O. et al. In vitro characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. **American Association of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 1234–1242, 2009.

OLIVEIRA, G. L. et al. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 288–292, 2014.

OLIVEIRA, G. L.; CARDOSO, S. K.; JÚNIOR, C. R. L. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 85, p. 1227–1234, 2013.

OLIVEIRA, L. C. P.; MAUSE, R.; NUNOMURA, S. M. Quantitative HPLC analysis of some marker compounds of hydroalcoholic extracts of *Piper aduncum* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1439–1442, 2005.

PARISE-FILHO, R. et al. The anti-inflammatory activity of dillapiole and some semisynthetic analogues. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 11, p. 1173–1179, 2011.

PATEL, J. et al. Formulation And Evaluation of Topical Aceclofenac Gel Using Different Gelling Agent. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3, n. 1, p. 156–165, 2011.

PAULSSON, M.; EDSMAN, K. Controlled drug release from gels using surfactant aggregates. II. Vesicles formed from mixtures of amphiphilic drugs and oppositely charged surfactants. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 11, p. 1586–1592, 2001.

PINO, J. A. et al. Essential oils of *piper peltata* (L.) miq. and *piper aduncum* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 2, p. 124–126, 2004.

PONCE CEVALLOS, P. A.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E. Encapsulation of

cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in  $\beta$ -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 1, p. 70–75, 2010.

POTZERNHEIM, M. C. L. et al. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 25–31, 2012.

PRAKASH, P. R.; RAO, N. G. R.; SOUJANYA, C. Formulation, evaluation and antiinflammatory activity of topical etoricoxib gel. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 3, n. 2, p. 126–129, 2010.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

SAKULKU, U. et al. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International journal of pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 105-111, 2009.

SANTOS, M. L. et al. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1275–8, 2013.

SARPOTDAR, P. P.; ZATZ, J. L. Evaluation of penetration enhancement of lidocaine by nonionic surfactants through hairless mouse skin in vitro. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 2, p. 176–181, 1986.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427–443, 2007.

SENGUPTA, P.; CHATTERJEE, B. Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 353–365, 2017.

SHAHIN, M. et al. Optimized formulation for topical administration of clotrimazole using Pemulen polymeric emulsifier. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 37, n. 5, p. 559–568, 2011.

SHAKEEL, F. et al. Nanoemulsions as Vehicles For Transdermal Delivery

Ofaceclofenac. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8, n. 4, p. 104, 2007.

SHAKEEL, F.; RAMADAN, W.; AHMED, M. A. Investigation of true nanoemulsions for transdermal potential of indomethacin: Characterization, rheological characteristics, and ex vivo skin permeation studies Investigation of true nanoemulsions. **Journal of Drug Targeting**, v. 17, n. 6, p. 435–441, 2009.

SHOKRI, J. et al. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 99–107, 2001.

SIMOVIC, S. et al. An investigation into interactions between polyacrylic polymers and a non-ionic surfactant: An emulsion preformulation study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 184, n. 2, p. 207–217, 1999.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SOLIMAN, S. M. et al. Formulation of microemulsion gel systems for transdermal delivery of celecoxib: In vitro permeation, anti-inflammatory activity and skin irritation tests. **Drug Discoveries and Therapeutics**, v. 4, n. 6, p. 459–471, 2010.

SOUSA, P. J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de Piper aduncum L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 217–221, 2008.

SOUTHWELL, I. A.; FREEMAN, S.; RUBEL, D. Skin irritancy of tea tree oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 1, p. 47–52, 1997.

TEGELI, V. S. et al. Pemulen as a Versatile Emulsifier. **International Journal of Drug Formulation & Research**, v. 2, n. 1, p. 52–63, 2011.

TEICHMANN, A. et al. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 699–706, 2007.

TIRADO-SÁNCHEZ, A.; PONCE-OLIVERA, R. M.; BONIFAZ, A. Majocchi's Granuloma (Dermatophytic Granuloma): Updated Therapeutic Options. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 4, p. 204–212, 2015.

TONČIĆ, R. J. et al. Skin Barrier and Dry Skin in the Mature Patient. **Clinics in Dermatology**, 2017.

VALE, N. B. DO. A Farmacobotânica, Ainda tem Lugar na Moderna Anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368–380, 2002.

VALENTE, B. R. et al. Estudo comparativo dos perfis de dissolução de cápsulas de cloridrato de fluoxetina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. X, n. 3, p. 1–10, 2013.

VÁVROVÁ, K. et al. HPLC method for determination of in vitro delivery through and into porcine skin of adefovir (PMEA). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 853, n. 1–2, p. 198–203, 2007.

VAZ, C. et al. The chemical composition and antibacterial activity of eleven Piper species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. **Industrial Crops & Products**, v. 94, p. 528–539, 2016.

VINARDELL, M. P.; MACIÁN, M. Comparative study of the HET-CAM test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential. **Toxicology in Vitro**, v. 8, n. 3, p. 467–470, 1994.

VOLPE, H. X. et al. Efficacy of essential oil of Piper aduncum against nymphs and adults of Diaphorina citri. **Pest Management Science**, v. 72, n. 6, p. 1242–1249, 2016.

WAHLGREN, M. et al. Oral-based controlled release formulations using poly(acrylic acid) microgels. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 8, p. 922–929, 2009.

WALIA, S.; SAHA, S.; PARMAR, B. Liquid chromatographic method for the analysis of two plant based insecticide synergists dillapiole and dihydrodillapiole. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, n. 2, p. 229–233, 2004.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 128–137, 2012.

WILSON, S. L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, v. 327, p. 32–46, 2015.

WONG, H. L. et al. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 503–517, 2010.

ZHAO, B. T. et al. Quality evaluation of Perillae Folium by HPLC/PDA. **Archives of**

**Pharmacal Research**, v. 38, n. 8, p. 1521–1529, 2015.