

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DANILLO SANTOS NEGREIROS

**ESTUDOS DE PERMEACAO CUTÂNEA IN VITRO DE SISTEMAS
MICROEMULSIONADOS CONTENDO ALFA FELANDRENO
PARA APLICAÇÃO FARMACÊUTICA.**

**BRASÍLIA
2024**

DANILLO SANTOS NEGREIROS

**ESTUDOS DE PERMEACAO CUTÂNEA IN VITRO DE SISTEMAS
MICROEMULSIONADOS CONTENDO ALFA FELANDRENO
PARA APLICAÇÃO FARMACÊUTICA.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Tais Gratieri.

**BRASÍLIA
2024**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Danillo Santos Negreiros

TÍTULO: ESTUDOS DE PERMEACAO CUTÂNEA IN VITRO DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS CONTENDO ALFA FELANDRENO PARA APLICAÇÃO FARMACÊUTICA.

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.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tais Gratieri
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Náira da Silva Campos
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ricardo Ferreira Nunes
Centro Universitário IESB

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer à Deus, porque sem Ele eu não estaria aqui não seria capaz e por me mostrar esse caminho e me proporcionar a bênção de estar com saúde e cheio de vida para conseguir correr atrás dos meus sonhos e por me iluminar em todos os meus passos. Aos meus pais, por me proporcionar condições (emocionais e financeiras), apoio incondicional e incentivo aos estudos, especialmente minha mãe, obrigado pela força, pelo amor incondicional e pelo apoio e conselhos infinitos que trouxeram paz e leveza durante toda a trajetória. E falando em família, agradeço ainda, às minhas irmãs, meu sobrinho, à minha vó Marina e as minhas tias, em destaque Elda e Ressú, pelo amor, respeito e compreensão devido minhas ausências para estudos, vocês fazem parte disso tudo. Sou muito privilegiado por ter vocês na minha vida. Amo vocês e são a minha inspiração de vida!

Com o coração muito grato, gostaria de agradecer a **Universidade de Brasília (UnB)** pela oportunidade de aperfeiçoamento, continuidade nos estudos, por ser minha segunda casa, por ter sido o palco para meu desenvolvimento e por ainda resistir e mostrar que a ciência e a educação são importantes. Aos seus funcionários e docentes que colaboraram com o bom andamento de meu trabalho. Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)** por me permitir essa importante oportunidade que me fez crescer de uma maneira muito valiosa. Ao **Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC)**, onde conheci pessoas maravilhosas que me ajudaram, apoiaram, aconselharam, tiveram paciência e foram prestativos ao me ensinar as técnicas do laboratório compreendendo minhas limitações e que me salvaram em alguns (muitos) momentos dessa trajetória (especialmente aquele que fizeram muitas vezes plantão noturno comigo, depois de um dia de trabalho intenso e aqueles que iniciaram o dia bem cedo comigo no Lab), **Breno, Luma, Seila, Camila, Mari, Geisa, Manuel, Ana Clara**, eternamente grato por ter cada um de vocês em minha vida até mesmo fora do laboratório. Agradeço ainda aos professores responsáveis pelo Lab (**Dr. Guilherme Gelfuso** e **Dr. Marcílio Cunha**) e por nós alunos, em especial à minha orientadora **Dra. Taís Gratieri**, eterna gratidão por ter aberto as portas para que eu pudesse iniciar aqui minha carreira acadêmica profissional e por ter me acolhido, com toda competência, paciência e leveza durante toda a orientação, grande inspiração. Agradeço ainda aos amigos que encontrei em outros laboratórios de pesquisa. À **Via carnes indústria e comércio Eireli**, que nos recebeu na unidade e nos forneceu os mais diversos insumos para os estudos de permeação, sempre que necessitamos.

Em meio a tantas pessoas também quero agradecer esta conquista, a mim mesmo, por ser o grande responsável não apenas por ter conseguido realizar esse sonho, mas, principalmente, por eu ter tido a coragem de ir buscá-lo, trilhando um caminho novo e desconhecido e tantas vezes turbulento, porém, que só tem me dado alegrias e realizações.

Aos amigos que fiz na UnB, no trabalho e em Brasília, onde compartilhei angústias e alegrias, obrigado pela contribuição fundamental para conclusão deste trabalho. Aos meus amigos que trouxe comigo de Teresina até aqui, Audinei por ter me acolhido desde o primeiro momento, que me deu um teto, um lar e companhia dia e noite e muito apoio, Susana por se fazer presente em muitos momentos bons e ruins e ter compartilhado momentos de angústias, mas também de muitas alegrias. **Gratidão!**

“Fazer ciência é trabalhar simultaneamente com teoria, método e técnicas, numa perspectiva em que esse tripé se condicione mutuamente: o modo de fazer depende do que o objeto demanda, e a resposta ao objeto depende das perguntas, dos instrumentos e das estratégias utilizadas na coleta dos dados. À trilogia acrescento sempre que a qualidade de uma análise depende também da arte, da experiência e da capacidade de aprofundamento do investigador que dá o tom e o tempero do trabalho que elabora”

(MINAYO, 2012, p. 622).

RESUMO

Os óleos essenciais compreendem combinações complexas de compostos naturais voláteis sintetizados por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Uma substância abundante presente nos óleos voláteis é o α -felandreno (α -PHE), um monoterpene cíclico que apresenta propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes. Uma formulação cutânea utilizando este bioativo poderia proporcionar benefícios como tratamento alternativo para inflamação e cicatrização. Entretanto, ainda é necessário um método cromatográfico simples capaz de quantificar a α -PHE nas camadas da pele. Assim, o objetivo do estudo é desenvolver e validar um método analítico utilizando HPLC para quantificar α -PHE na pele. O método desenvolvido utiliza uma coluna C18 de fase reversa (15 cm \times 4,6 mm, 5 μ m) como fase estacionária e um gradiente de eluição de uma fase móvel constituída por 0,1 % de ácido fórmico em água e 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila a um caudal de 0,5 ml/min. α -PHE foi detectado em 263 nm. O método foi seletivo contra matrizes cutâneas e interferentes de formulação, linear ($r = 0,9995$) na faixa de concentração de 0,5–15,0 μ g/mL, preciso com coeficiente de variação global inferior a 5,5%, preciso obtendo recuperação da pele dentro de 92–102%, sensível para a aplicação proposta (limite de detecção = 0,05 μ g/mL, limite de quantificação = 0,14 μ g/mL) e robusto quanto aos parâmetros metodológicos. Foram desenvolvidas duas formulações, uma com Padrão α -PHE (1A) e outra com o óleo Breu Branco (1B). Após obtenção das formulações para produção do diagrama de fases, foram observadas as proporções de fase oleosa, tensoativos e fase aquosa e selecionadas duas das nove, onde estas possuíram características desejáveis e melhor formação. Foi realizada a caracterização das formulações desenvolvidas. O estudo de permeação *in vitro* foi realizado por um período de 12 horas com duas amostras: formulação 1A e 1B. Foi verificado o potencial irritante, empregando-se uma modificação do método proposto por Luepke (1985). As formulações apresentaram-se não irritante segundo a metodologia proposta, por não causar nenhum tipo de eventos como hiperemia, hemorragia ou coagulação após 5 min de contato com a CAM. Em suma, o método desenvolvido é adequado para analisar α -PHE na matriz da amostra de pele.

Palavras chaves: Óleo essencial; Alfa felandreno; Validação; Método analítico; HPLC-UV; Microemulsão; Aplicação tópica.

ABSTRACT

Essential oils comprise complex combinations of volatile natural compounds synthesized by aromatic plants as secondary metabolites. An abundant substance present in volatile oils is α -phellandrene (α -PHE), a cyclic monoterpene that exhibits anti-inflammatory and healing properties. A skin formulation using this bioactive could provide benefits as an alternative treatment for inflammation and scarring. However, a simple chromatographic method capable of quantifying α -PHE in the skin layers is still needed. Thus, the aim of the study is to develop and validate an analytical method using HPLC to quantify α -PHE in the skin. The developed method uses a reversed-phase C18 column (15 cm \times 4.6 mm, 5 μ m) as the stationary phase and a mobile phase elution gradient consisting of 0.1 % formic acid in water and 0.1 % formic acid in acetonitrile at a flow rate of 0.5 ml/min. α -PHE was detected at 263 nm. The method was selective against cutaneous matrices and formulation interferences, linear ($r = 0.9995$) in the concentration range of 0.5–15.0 μ g/mL, precise with an overall coefficient of variation of less than 5.5%, accurate obtaining skin recovery within 92–102%, sensitive to the proposed application (detection limit = 0.05 μ g/mL, quantification limit = 0.14 μ g/mL) and robust in methodological parameters. Two formulations were developed, one with α -PHE Standard (1A) and the other with Breu Branco oil (1B). After obtaining the formulations for the production of the phase diagram, the proportions of oil phase, surfactants and aqueous phase were observed and two of the nine were selected, where they had desirable characteristics and better formation. The characterization of the developed formulations was carried out. The *in vitro* permeation study was carried out over a period of 12 hours with two samples: formulation 1A and 1B. The irritant potential was verified using a modification of the method proposed by Luepke (1985). The formulations were non-irritating according to the proposed methodology, as they did not cause any type of events such as hyperemia, hemorrhage or coagulation after 5 min of contact with the CAM. In short, the developed method is suitable for analyzing α -PHE in the skin sample matrix.

Keywords: Essential oil; Alpha phellandrene; Validation; Analytical method; HPLC-UV; Microemulsion; Topical application.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes da planta <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand. (A) Tronco jovem, (B) Frutos maduros, (C) Resina aromática. Fonte: Pereira, 2017. (<i>Breu branco</i>)	17
Figura 2. Estrutura química de PHEs – Phellandrenes.....	19
Figura 3. Estrutura da microemulsão O/A e A/O (Gomes, 2009)	23
Figura 4. Representação esquemática dos SME, com o óleo representado em cinza e a água em branco.....	24
Figura 5. Figura ilustrativa da leitura de um diagrama de fases pseudoternário.....	24
Figura 6. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.....	27
Figura 7. Camadas da epiderme e estruturas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea.....	28
Figura 8. Ilustração dos níveis de queimaduras comparadas a pele intacta.....	29
Figura 9. Preparo das Microemulsões O/A.....	36
Figura 10. Células de difusão acopladas a um equipamento com sistema de aquecimento a seco Hanson [®]	40
Figura 11. Técnica do estudo de permeação <i>in vitro</i> com auxílio do equipamento Hanson [®] , realizado coleta do meio extrator, <i>tape stripping</i> e filtração após 24h para injeção no HPLC.....	40
Figura 12. Representação da remoção progressiva do estrato córneo pela técnica de Tape Stripping (adaptado de MOSER et al., 2001)	41
Figura 13. Aplicação da técnica de <i>Tape Stripping</i> (A) aplicação da fita adesiva sobre a pele; (B) pele sobreposta com auxílio de alfinetes para delimitar apenas a área difusional; (C) estrato córneo removido pela fita adesiva	41
Figura 14. Espectro de absorção na região UV/VIS do α -PHE a 100 $\mu\text{g/mL}$. Faixa de varredura: 200 a 800 nm	43
Figura 15. Seletividade do método na quantificação de α -PHE a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ com tempo de retenção de 8,10 minutos. Cromatogramas representativos de α -PHE e injeções em branco de óleo de breu, microemulsão e pele (A). Análise em termos de áreas de pico (B)	

e tempos de retenção (C) comparando os cromatogramas de α -PHE na presença de matrizes. α -PHE – alfa-felandreno; ME – microemulsão.....	45
Figura 16. Curva analítica obtida pela análise de concentrações na faixa de 0,5 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata; equação da reta: $y = 145445x - 3462,6$; $R^2 = 0,9991$	46
Figura 17. Diagrama pseudoternário de formulação composta por óleo e mistura de tensoativos (4:1) dispersos em água ultrapura em temperatura ambiente.....	50
Figura 18. Cálculos para obtenção das formulações (1A) e (1B), a partir da proporção de cada fase oleosa obtida inicialmente na preparação das formulações para obtenção do diagrama de fases.....	53
Figura 19. Aspecto macroscópicos das formulações 1A e 1B compostas por 47,37% de fase aquosa (água ultrapura), 31,58% de tensoativo (Labrasol® + Span 80® (4:1)) e 21,05% de fase oleosa (Kolliphor + Padrão α -PHE)	53
Figura 20. Valores correspondentes ao tamanho médio (nm), PDI e potencial zeta (mV) das formulações 1A e 1B (n = 3)	56
Figura 21. Resultados correspondente ao pH das formulações desenvolvidas no período de 30 dias de estabilidade a partir da média de 3 determinações e desvio padrão.....	58
Figura 22. Registro das formulações armazenadas em temperatura ambiente e de geladeira durante 30 dias (T_0 , T_1 , T_7 , T_{15} e T_{30})	59
Figura 23. Comparação do estudo de permeação entre as formulações 1A e 1B - estrato córneo (EC) e na pele remanescente (PR). *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos	60
Figura 24. HETCAM com a formulação do tipo microemulsão contendo padrão α -PHE (1A) e óleo de Breu Branco (1B), as imagens são representadas ao final do tempo de 5 minutos. No controle positivo (NaOH 1M) observa-se hemorragias e hiperemia, no controle negativo com soro fisiológico (NaCl) não se observa nenhum fenômeno que caracterize irritabilidade. Nas formulações em estudo não se observa nenhuma alteração nos fenômenos de hiperemia, hemorragia ou coagulação.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontuação (score) atribuído para o aparecimento de cada sinal indicativo de irritação em função do tempo no teste de irritação <i>in vitro</i> em modelo organotípico HET-CAM (LUEPKE, 1985).....	39
Tabela 2. Classificação das formulações quanto ao grau de irritação de acordo com a pontuação atribuída (P) para os sinais de irritação segundo o teste de irritação <i>in vitro</i> em modelo organotípico HET-CAM (LUEPKE, 1985).....	42
Tabela 3. Condições testadas no método isocrático.....	43
Tabela 4. Resultados de testes de precisão HPLC-UV para determinação de α -PHE em soluções padrão.....	47
Tabela 5. Resultados de testes de exatidão por HPLC-UV para determinação de α -PHE em soluções-padrão. α -PHE: alfa-felandreno.....	47
Tabela 6. Efeitos dos parâmetros analíticos sobre a área, tempo de retenção e fator de rejeitos do método desenvolvido para quantificação de α -PHE.....	49
Tabela 7. Proporção (%) de cada fase da formulação e suas características analisadas durante a preparação.....	52
Tabela 8. Resultados das análises de pH das formulações desenvolvidas a partir da média de 3 determinações e desvio padrão.....	54
Tabela 9. Valores correspondentes a análise do tamanho médio (nm), PDI e potencial zeta (mV) das microemulsões (n = 3) e desvio padrão	55

LISTA DE SIGLAS

HPLC	High performance liquid chromatography
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de variação
EC	Etrato córneo
PR	Pele Remanescente
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
ME	Microemulsão
R ²	Ceficiente de correlação linear
PHEs	Felandrenos
α -PHE	Alfa-felandreno
β -PHE	Beta-felandreno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO LITERÁRIA	17
2.1 <i>Protium heptaphyllum (Breu Branco)</i>	17
2.2 <i>Felandrenos</i>	18
2.4 <i>Óleos Essenciais e Alfa Felandreno (α-PHE)</i>	19
2.4 <i>Sistemas Nano e Microemulsionados</i>	21
2.5 <i>Pele e anexos cutâneos</i>	25
2.6 <i>Aplicabilidade do óleo</i>	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 <i>Objetivo geral</i>	31
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Material	32
4.1.1 <i>Produtos químicos e reagentes</i>	32
4.2 Métodos.....	32
4.2.1 <i>Preparação de extratos de pele</i>	32
4.2.2 <i>Preparação de soluções de estoque</i>	32
4.2.3 <i>Varredura</i>	33
4.2.4 <i>Aparelhos e condições cromatográficas</i>	33
4.2.5 <i>Desenvolvimento do Método Analítico</i>	33
4.2.6 <i>Seletividade</i>	33
4.2.7 <i>Linearidade</i>	34
4.2.8 <i>Limite de detecção e quantificação</i>	34
4.2.9 <i>Precisão</i>	34
4.2.10 <i>Exatidão</i>	35
4.2.11 <i>Robustez</i>	35
4.3 Preparo das Microemulsões	36
4.4 Caracterização das Formulações.....	37
4.4.1 <i>Análise de pH</i>	37
4.4.2 <i>Potencial zeta</i>	37
4.4.3 <i>Tamanho de gotícula e índice de polidispersão (PDI)</i>	37
4.5 Estudo de Estabilidade das microemulsões	37
4.6 Estudos de irritabilidade in vitro	38
4.7 Estudos de permeação in vitro.....	39
4.8 Análise Estatística dos Dados	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 <i>Determinação do comprimento de onda máximo de absorção do α-PHE</i>	43

5.2	<i>Desenvolvimento do método</i>	43
5.3	<i>Seletividade</i>	44
5.4	<i>Linearidade</i>	46
5.5	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	46
5.6	<i>Precisão</i>	46
5.7	<i>Exatidão</i>	47
5.8	<i>Recuperação</i>	48
5.9	<i>Robustez</i>	48
5.10	<i>Composição química</i>	49
5.11	<i>Diagrama de fases pseudoternário</i>	50
5.12	<i>Desenvolvimento da Formulação</i>	51
5.13	<i>Caracterização Das Formulações Desenvolvidas</i>	54
	5.13.1 <i>Análise de pH</i>	54
	5.13.2 <i>Tamanho das gotículas e Potencial Zeta</i>	54
5.14	<i>Estudo De Estabilidade Das Microemulsões</i>	55
	5.14.1 <i>Tamanho das gotículas e Potencial Zeta</i>	55
	5.14.2 <i>Análise de pH</i>	57
	5.14.3 <i>Características organolépticas das formulações</i>	58
5.15	<i>Estudos De Permeação Em Pele</i>	59
5.16	<i>Estudos de irritabilidade in vitro</i>	61
6	CONCLUSÃO	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas com base em extratos naturais desempenha um papel de destaque nos sistemas de saúde, conferindo valor à biodiversidade do país e impulsionando os avanços científicos e tecnológicos. Os óleos essenciais, derivados de fontes vegetais, representam uma significativa reserva de moléculas bioativas. Estes compostos englobam uma diversidade de estruturas químicas, incluindo hidrocarbonetos e seus derivados, tais como álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos, cetonas, aminas, compostos nitrogenados e sulfurados, terpenos oxigenados, hidrocarbonetos terpenoides e sesquiterpenos. (Baser, 1995; Guan et al., 2019). As espécies de Burseraceae são conhecidas pelas suas folhas, cascas e resinas que são ricas em óleos essenciais, triterpenos e outros constituintes. A família Burseraceae, por exemplo, de distribuição pantropical e composta por 18 gêneros e cerca de 700 espécies, possui representantes com a capacidade de exsudar resinas ricas em óleos essenciais, podendo conter até 30% de óleos na resina fresca, e vestígios de látex branco resinoso na casca, como é o caso de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (Rüdiger et al., 2007; Daly, 2022; Tostes, 2020).

O gênero *Protium* é o mais representativo no Brasil e a espécie *P. heptaphyllum*, conhecida popularmente como breu, breu-branco, amelcegueira-vermelha, amescla, amescla-mirim, é bastante famosa por suas resinas aromáticas. Dentre os diversos constituintes presentes nos óleos essenciais, destaca-se o alfa-felandreno (α -PHE), um monoterpene cíclico com duas ligações duplas em um anel heterocíclico (endocíclico), cuja presença é observada em diferentes concentrações em várias espécies vegetais. (Kim e Park, 2015). O alfa-felandreno possui uma estrutura cíclica com duas duplas ligações conjugadas, o que contribui para suas propriedades químicas e reatividade. A sua fórmula molecular é similar a outros monoterpenos, mas sua estrutura única confere-lhe características distintas.

Os monoterpenos, como o alfa-felandreno, são propensos à oxidação quando expostos ao ar, o que diminui sua concentração e eficácia ao longo do tempo. O alfa-felandreno é conhecido por ser quimicamente instável quando exposto a luz, calor e oxigênio. Essa instabilidade se deve à presença das duplas ligações conjugadas na sua estrutura, que são suscetíveis à oxidação. Em ambiente aberto, especialmente na presença de oxigênio, ele pode se degradar, formando compostos como peróxidos, que podem alterar suas propriedades e reduzir sua eficácia. A instabilidade do alfa-felandreno limita

sua aplicação em alguns produtos comerciais, exigindo cuidados especiais em sua formulação e armazenamento para preservar suas propriedades. E nesse contexto, temos os sistemas microemulsionados que estão sendo amplamente utilizados, devido as diversas vantagens, como permitindo a veiculação de compostos com características físico-químicas diferentes, são estáveis do ponto de vista termodinâmico, melhoram a estabilidade do princípio ativo quando veiculado na fase interna, e que pode ser utilizado em diversas vias: tópica, oral, parenteral, entre outras.

Diversas técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna, cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), espectrometria de massa (MS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS) e cromatografia líquida/espectrometria de massa, têm sido empregadas na análise e identificação de constituintes presentes nos óleos essenciais. Destaca-se que, até o momento, existem poucos relatos na literatura técnicas utilizando HPLC como método cromatográfico para este composto em particular. Portanto, optou-se por empregar esta técnica na validação do método analítico, visto que tal técnica tem como vantagem sua simplicidade e menos oneroso o processo, assim visando futuros estudos que explorem sua aplicação como alternativa terapêutica para tratamento cutâneo.

A pele, como interface entre o organismo e o ambiente externo, exibe uma estrutura complexa que lhe confere múltiplas funções, incluindo proteção contra agentes patogênicos e regulação da homeostase hídrica e térmica do corpo. Apesar disso, a baixa permeabilidade do estrato córneo representa uma limitação significativa para a administração cutânea de substâncias terapêuticas, dificultando a penetração de fármacos até as camadas mais profundas da pele. (Lopes, 2014).

Portanto, o objetivo deste estudo consistiu no desenvolvimento de microemulsões contendo alfa felandreno (α -PHE) para aplicações tópicas.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1 *Protium heptaphyllum* (Breu Branco)

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Figura 1), conhecida popularmente como almecegueira, é encontrada em todo o Brasil, estão amplamente espalhadas por regiões tropicais e subtropicais, principalmente na Floresta Amazônica e em alguns estados nordestinos, como Bahia, Ceará, Piauí, assim como em outros países da América do Sul (Colômbia, Paraguai, Suriname e Venezuela) (Pontes et al., 2007; Mobin et al., 2016). Esta espécie exsuda uma resina oleosa e amorfa, cujas aplicações gerais vão desde a fabricação de vernizes e tintas, na calafetagem de embarcações, em cosméticos e como repelente de insetos. Apresenta alguns usos populares como cicatrizante, expectorante, antiulcerogênico e anti-inflamatório (Vieira-Júnior et al., 2005; Lorenzi, 2008). É uma planta popularmente conhecida como breu branco e é encontrada abundantemente na Amazônia (Silva et al., 2016). Na medicina popular, esta espécie é considerada como um importante agente terapêutico, sendo utilizada como anti-inflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante de feridas (Pessoa et al., 2002)



Figura 1. Partes da planta *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (A) Tronco jovem. (B) Frutos maduros. (C) Resina aromática. Fonte: Pereira, 2017. (*Breu branco*)

A planta pertencente ao gênero *Prótiun* da família Burseraceae, caracterizado por exsudar resinas que se encontram armazenadas em ductos ou cavidades (Lima, 2012), espécie perenifólia que atinge até 10 m de altura e 60 cm de diâmetro (Domente; Mattos, 2010), de casca vermelho-escura, rica em resina aromática. (Marinho, 2010).

A família Burseraceae, de distribuição pantropical e composta por 18 gêneros e cerca de 700 espécies, possui representantes com a capacidade de exsudar resinas ricas

em óleos essenciais, podendo conter até 30% de óleos na resina fresca, e vestígios de látex branco resinoso na casca, como é o caso de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (Rüdiger et al., 2007; Daly, 2022; Tostes, 2020). O gênero *Protium* é o mais representativo no Brasil e a espécie *P. heptaphyllum*.

As espécies de Burseraceae são conhecidas pelas suas folhas, cascas e resinas que são ricas em óleos essenciais, triterpenos e outros constituintes. Algumas espécies desta família produzem óleo essencial que possuem potenciais de aplicação na perfumaria e na medicina popular a enorme diversificação das espécies de plantas no Brasil e fornece grande viabilidade econômica (Rudiger et al., 2009; Siani et al., 2011).

A resina é indicada como contraceptivo, cicatrizante, expectorante, antisépticas, para doença de chagas, hemorragia, ansiedade, bronquite, sinusite, indigestão e cicatrização, também como emoliente, e ainda utilizada como analgésica, principalmente para dores de cabeça, por comunidades da região Amazônica (Mobin et al., 2016; Murthy et al., 2016; Silva et al., 2016a). A resina também é usada na reparação de canoas e para a produção de fumaça no ambiente, servindo como repelente (Silva et al., 2016a). Em adição, estudos recentes comprovaram a atividade fungicida, acaricida, antimicrobiana, bactericida e gastroprotetora de óleos voláteis de *P. heptaphyllum* (Pontes et al., 2007a; Mobin et al., 2016; Lima et al., 2016; Cabral et al., 2018; Araujo et al., 2011).

2.2 Felandrenos

Os felandrenos compreendem alfa-felandreno (α -PHE) e beta-felandreno (β -PHE) (figura 2), proeminentemente encontrados em espécies de plantas de eucalipto. Os PHE também estão presentes em outras plantas, como hortelã, pimenta-do-reino, salsa, canela, lavanda, pinheiro, capim-gengibre, erva-doce e endro (Trulieve, 2022). Os PHE são herbáceos com diferentes aromas, conhecidas por sua atividade antifúngica (Zhang, Sun, Chen, Zeng, & Wang, 2017), anti-inflamatória, anti-hiperalgésica, antidepressiva (Piccinelli et al., 2015), analgésica (Lima et al., 2012) e anticancerígena (Hsieh et al., 2014; Lin et al., 2016). Metabólitos secundários derivados de plantas compreendem diferentes componentes ativos, mais prevalentemente, terpenos, alcaloides e compostos fenólicos (Kennedy e Wightman, 2011). Os terpenos encontrados nas plantas são extraídos por vários métodos, os quais apresentam propriedades características, sendo voláteis e lipofílicos. (Bizzo, Hovell e Rezende, 2009; Lima et al., 2012).

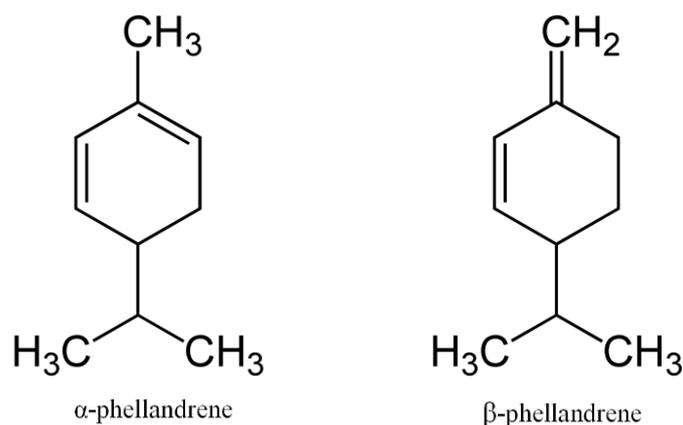


Figura 2. Estrutura química de PHEs – Phellandrenes.

2.3 Óleos Essenciais e Alfa Felandreno (α -PHE)

Os óleos essenciais 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 óleos essenciais 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 óleos essenciais geralmente são atribuídas aos seus componentes majoritários, mas em alguns casos, a atividade deve ser atribuída à combinação dos constituintes (Raut; Karuppayil, 2014). Hoje, os estudos em torno dessas misturas, buscam identificar compostos majoritários responsáveis pelas atividades biológicas, com alta potencialidade, biodisponibilidade e baixo perfil de toxicidade (SEVERINO, 2008).

Os consumidores de óleos essenciais no mundo crescem expressivamente, em razão de suas vastas propriedades terapêuticas, rentabilidade e principalmente pelo interesse em substituir substâncias sintéticas potencialmente tóxicas por compostos naturais, em que algumas já são conhecidas e consumidas pelo homem há muito tempo (Bizzo; Hovell; Rezende, 2009).

Assim, cresce a cada dia, o interesse e a busca por produtos naturais que possuam um alto poder antioxidante para serem usados de forma terapêutica. Muitos óleos essenciais e seus compostos majoritários chamaram atenção por demonstrarem atividades redox significativas, podendo se tornar importantes moduladores desse desequilíbrio oxidativo (Guimarães et al., 2010; Silva; Jasiulionis, 2014).

O óleo essencial pode ser extraído de parte de plantas como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais. São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas. Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (Filho, et al., 2016; Pereira, et al., 2018).

Os óleos são compostos por terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides entre outros, são de elevado interesse científico sendo de grande importância estudos relacionados às atividades biológicas (Filho e Yunes 1998; Stermitz, et al., 2000; Carini, et al., 2015; Marques et al., 2017). Os óleos essenciais são utilizados nas indústrias farmacêuticas para fabricação de cosméticos e perfumarias e farmacologicamente com fins medicinais e indústrias alimentícias como conservantes (Pereira, 2017). Peixinho et al. (2019) afirmam que o fato de serem naturais e biodegradáveis, geralmente apresentam baixa toxicidade à saúde pública, é uma opção o uso de óleos essenciais.

O composto α -PHE ($C_{10}H_{16}$) ou 2-metil-5-propanol-2-cicloexano-1,3-dieno é um monoterpeno cíclico encontrado em diversas plantas cujo potencial terapêutico foi relatado na literatura científica, tais como *Schinus molle* L. (aroreira-salso), *Monodora myristica* (noz-moscada jamaicana), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha), *Annona senegalensis* (maçã africana), entre outras (Chalchat et al., 1997; Lin et al., 2013; Da Silva et al., 2016).

O monoterpeno α -PHE é comumente utilizado em perfumarias e como aromatizante, sua fragrância se assemelha a pimenta preta e possui coloração levemente esverdeada (Cataldo; Keheyam; Baccaro, 2004; Işcan et al., 2012). Em temperatura ambiente se apresenta em forma de líquido, possui ponto de ebulição em 172°C e peso molecular 136,23g/mol, solúvel em éter e insolúvel em água (Pubchem, 2020).

Foi nomeado após *Eucalyptus phellandra* (*E. phellandra*), a planta de onde α -PHE foi isolado pela primeira vez. α -PHE é um composto natural derivado de plantas com várias propriedades medicinais, encontrado útil nas indústrias farmacêutica,

alimentícia, cosmética e de perfumaria (Bizzo, Hovell e Rezende, 2009; Iscan et al., 2012).

Apesar de não haver muitos estudos a respeito das atividades biológicas desse composto individualmente, seu potencial efeito terapêutico está relacionado a sua presença majoritária na composição de alguns óleos essenciais (Zhang et al., 2017).

É importante salientar que os felandrenos, especialmente o alfa, possui baixa estabilidade físico-química, pois quando exposto ao ar, sofre oxidação. Uma das formas de auxiliar na estabilidade e melhorar a atividade biológica seria incorporá-lo em uma formulação nanoestrutura, como as microemulsões.

2.4 Sistemas Nano e Microemulsionados

Formulações e sistemas que utilizam nanotecnologia apresentam inúmeras vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais. Nanopartículas poliméricas e nanocápsulas, lipossomas, nanoemulsões, entre outras, são tecnologias inovadoras capazes de promover o aumento da solubilidade e biodisponibilidade, redução da toxicidade, melhora da atividade farmacológica, aumento da estabilidade, liberação sustentada, proteção contra degradação física e química, entre outras (Chancal, Swarnlata, 2008; Ajazuddin, 2010; Ansari, Sameem, Islam, 2012).

Devido ao tamanho reduzido de gotículas, as nanoemulsões são formulações que apresentam excelente estabilidade e que permitem a distribuição de ativos de forma uniforme na pele (Bouchemal et al, 2004). As nanoemulsões podem ser obtidas conforme o mecanismo físico-químico envolvido, que incluem os métodos de alta energia, baixa energia ou uma combinação deles (Choudhury et al., 2017; Montes De Oca-Ávalos; Candal; Herrera, 2017).

Embora apresentem características de composição semelhantes às emulsões, as nanomulsões são sistemas coloidais líquidos, transparentes e translúcidos devido ao tamanho de gotículas estarem em escala nanométrica (normalmente entre 20 e 200 nm). Esses sistemas possuem maior estabilidade em relação às emulsões convencionais quanto à sedimentação e cremeação das fases, são transparentes e podem ter a espalhabilidade aumentada devido à baixa tensão interfacial que existe entre as fases, sendo ótimas escolhas para aplicação tópica (Fernandez, Rieger, Angelina, 2004; Solans et al, 2005).

As nanoemulsões são utilizadas para veicular ativos isolados ou extratos naturais, principalmente nas indústrias alimentícia (McClements, 2012; Donsì et al., 2012; Liang et al., 2012) e farmacêutica (Nuchuchua et al., 2009; EID et al., 2014). Nanoemulsões de

aplicação tópica podem atuar rompendo a camada bilipídica da pele e promovendo assim um aumento da permeabilidade de ativos. Os constituintes interagem com as camadas lipídicas do estrato córneo, alterando a estrutura dessa barreira sem a necessidade da inclusão de promotores de absorção na formulação (Aggarwal; Goindi; Khurana, 2013). Esses sistemas carreadores têm se mostrado mais eficientes na penetração transdérmica de fármacos do que os sistemas convencionais, apesar da baixa viscosidade e consequente dificuldade na aplicação devido o escoamento do produto (Fouad et al., 2013; Choudhury et al., 2017).

Além disso, apresentam baixa irritabilidade e toxicidade, possuem superfície de contato maior devido ao seu tamanho e conseqüentemente melhoram a penetração do fármaco, podem ser formulados em diversas formas farmacêuticas, podem incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos em uma mesma formulação e é eficiente para mascarar sabores desagradáveis quando administradas pela via oral (Jaiswal, Dudhe, Sharma, 2015).

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).

Microemulsão é um sistema interfacial formado pela auto-organização de moléculas tensoativas que formam microestruturas dispersas em um meio com três ou mais constituintes: tensoativo, óleo e água (Florence e Attwood, 2011). Apresentam-se como misturas isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas pela mistura de água e óleo estabilizada por um filme de compostos tensoativos e co-tensoativos. Além disso, estes sistemas apresentam capacidade de se formar espontaneamente, podendo existir sob várias formas estruturais: globular, bicontínuas, cúbicas ou lamelares (Silva et al., 2009). Esses sistemas apresentam como característica primordial a capacidade de formar uma emulsão muito fina por homogeneização suave com fase aquosa, cujas dimensões das gotículas da fase interna são da ordem de

nanômetros, além da capacidade de incorporar diferentes classes de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas. Devido sua estabilidade termodinâmica, apresentam tempo de vida útil superior quando comparado com suspensões e emulsões (Formariz et al., 2005).

Dependendo da polaridade da fase dispersa, a microemulsão pode ser classificada em óleo em água (O/A) ou direta e água em óleo (A/O) ou inversa, sendo água em óleo (A/O) aquela na qual as gotículas de água, envolvidas pelo tensoativo e co-tensoativo, encontram-se dispersas na fase externa constituída pelo óleo. Já em microemulsão óleo em água (O/A) a fase dispersa é composta pelas gotículas de óleo que estão solubilizadas na fase externa aquosa por ação dos tensoativo e co-tensoativo (Gomes, 2009). A figura 4 representa as estruturas de microemulsão óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).

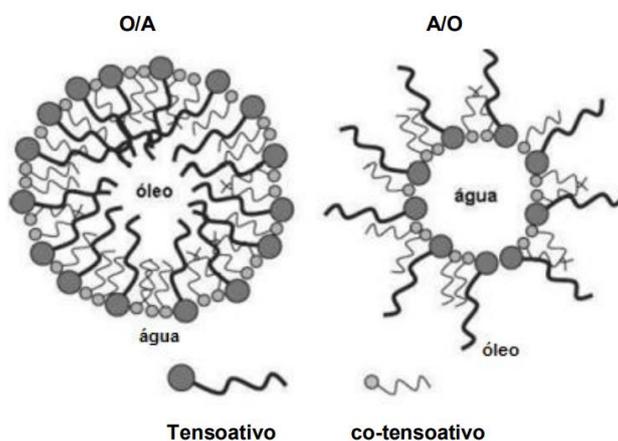


Figura 3. Estrutura da microemulsão O/A e A/O (Gomes, 2009)

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. 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).

Já na figura 5 mostra uma ilustração com as estruturas de sistemas microemulsionados (SME).

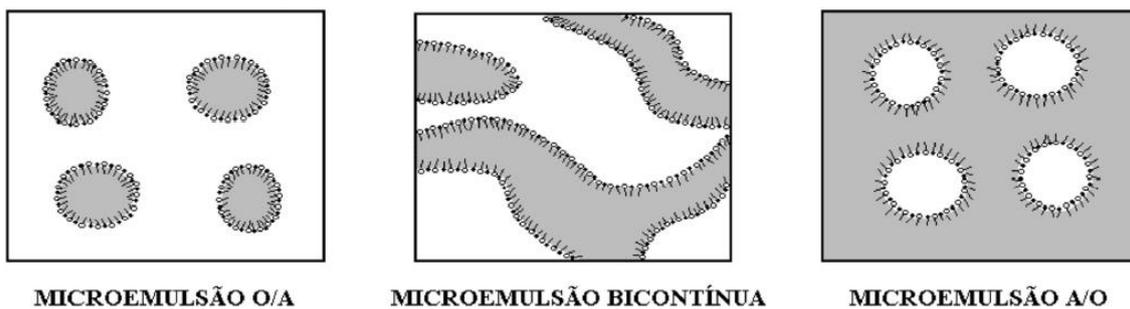


Figura 4 – Representação esquemática dos SME, com o óleo representado em cinza e a água em branco. (Damasceno et al., 2011).

Na maioria das vezes, um cotensoativo também é utilizado para auxiliar na formação da microemulsão, portanto diagramas pseudoternários são comumente utilizados para representar as faixas de composição da mistura de óleo, água e tensoativo/cotensoativo que formam uma microemulsão em uma temperatura e pressão definidos (Zhao et al., 2011). A figura 6 mostra como determinar a composição de um ponto qualquer do diagrama contendo água óleo e o sistema T/C (tensoativo/cotensoativo).

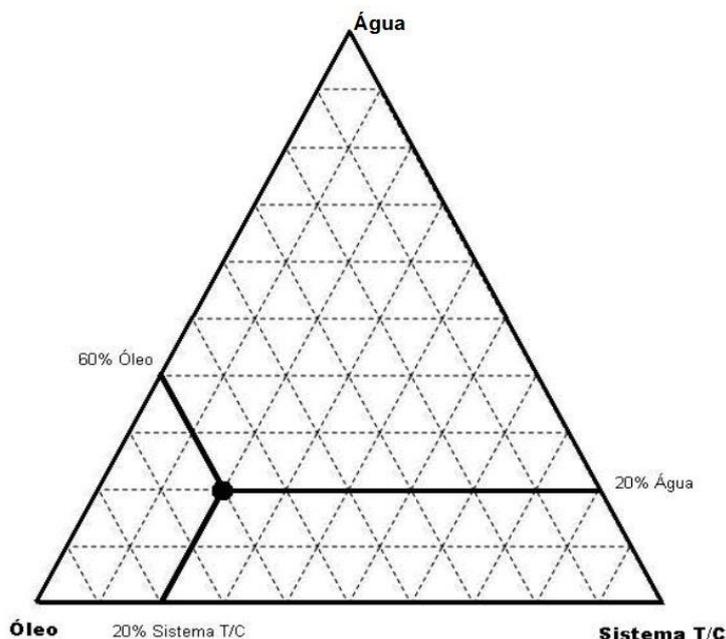


Figura 5 – Figura ilustrativa da leitura de um diagrama de fases pseudoternário. (Surman et al., 2009).

Normalmente, para determinar a região do diagrama em que há formação de microemulsão, são preparadas várias amostras com composições diferentes. Observam-

se as amostras que formam microemulsão e as que formam sistemas polifásicos. As amostras transparentes (microemulsões) são tituladas (com água ou com óleo) até se tornarem turvas. Assim obtêm-se vários pontos da curva que separa as regiões de formação e de não- formação de microemulsão (Schmidts et al., 2009; Zhao et al., 2011).

Equilíbrio hidrófilo – lipófilo (EHL) é um sistema de classificação, onde são dados aos tensoativos designações numéricas entre 1 e 20, dependendo da força das porções lipofílicas e lipofílicas da molécula (Ferreira, 2010). O valor de EHL aumenta proporcionalmente com a hidrofília da molécula, sendo assim, substâncias de EHL menor que três, são lipofílicas, apresentando apenas propriedades antiespumantes, já os tensoativos com EHL com valor de 3 a 6 apresentam propriedades emulsificantes e formam emulsão A/O, e emulsões O/A são formadas com o uso de tensoativos com EHL entre 8 e 18, sendo as substâncias com EHL entre 15 e 18 classificados como agentes solubilizantes.(Prista et al., 1995; Zanin et al., 2013).

A proporção de tensoativos que deve ser utilizada na formulação é determinada através da verificação dos valores do EHL de cada surfactante e do óleo envolvido (Formariz et al., 2005, Oliveira et al., 2004, Zanin et al., 2013). Uma melhor solubilização de óleo e água é alcançada por meio de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo adequado (Mittal, 1999). O valor do EHL pode ser encontrado na literatura, e quando este valor ainda não é conhecido pode ser determinado através de equações baseadas na fórmula molecular da substância. Na prática, a determinação do EHL de uma substância baseia-se na avaliação de emulsões seriadas, onde o EHL ideal corresponde ao da emulsão que apresentou maior estabilidade (Zanin et al., 2003).

2.5 *Pele e anexos cutâneos*

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 15% do total do peso corporal de um adulto e possui uma área de superfície de aproximadamente 2 m². Suas principais funções são: regular a temperatura corporal, auxiliar o funcionamento do sistema nervoso, regular da quantidade de água corporal e proteger o organismo contra injúrias, microrganismos, substâncias externas e radiações presentes no ambiente, como a radiação ultravioleta (UV) (Lai-Cheong, Macgrath, 2013; Dabrowska, et al, 2016).

É formada por três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 7). A hipoderme é a camada mais interna da pele, situando-se abaixo da derme e acima do tecido muscular. É composta por adipócitos e se conecta a derme por meio de fibras de colágeno e elastina. Apresenta como função o isolamento térmico e reserva de energia,

sendo responsável por armazenar 80% da gordura corporal (Khavkin, Ellis, 2011; Lai-Cheong, Macgrath, 2013). A camada mais externa chamada epiderme é composta por células justapostas e queratinizadas altamente impermeáveis evitando perda de água para o ambiente e entrada de microrganismos indesejados. Nessa camada há o estrato córneo, com células altamente diferenciadas, os queratinócitos, que formam a principal barreira para administração dos fármacos. Há também melanócitos, células de Merkel, células de Langherhans intercaladas entre os queratinócitos formando a derme viável (Chorilli; Brizante, 2007).

A função de barreira é atribuída principalmente pelo estrato córneo, devido ao arranjo estrutural lipídico da matriz intercelular que fica ao redor das células denominadas corneócitos. Os lipídios que compõem a matriz intercelular são principalmente ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos graxos e uma pequena fração de sulfato de colesterol (Moser et al., 2001). Essa natureza obstrutiva do estrato córneo impede que algumas moléculas de fora penetrem diretamente na pele. Em contrapartida, permite a penetração de compostos lipossolúveis facilmente (Akhtar, 2014; Pouillot, 2008).

A epiderme é a primeira camada da pele e é subdividida em 4 camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea (Figura 8) (Khavkin; Ellis, 2011; Lai-Cheong, Macgrath, 2013). A derme é subdividida em derme papilar e reticular, estando localizada logo abaixo da epiderme e tendo como função a sua sustentação e nutrição. Essa camada é composta por fibras de colágeno e elastina, assim como por fibroblastos, mastócitos, células dendríticas vasos sanguíneos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas, músculo eretor de pelo e glândulas sudoríparas. A derme é a camada mais espessa (1 a 4 mm). É ela quem nutre e mantém as células da epiderme, até que estas terminem sua diferenciação e morram) (Lexander et al., 2012).

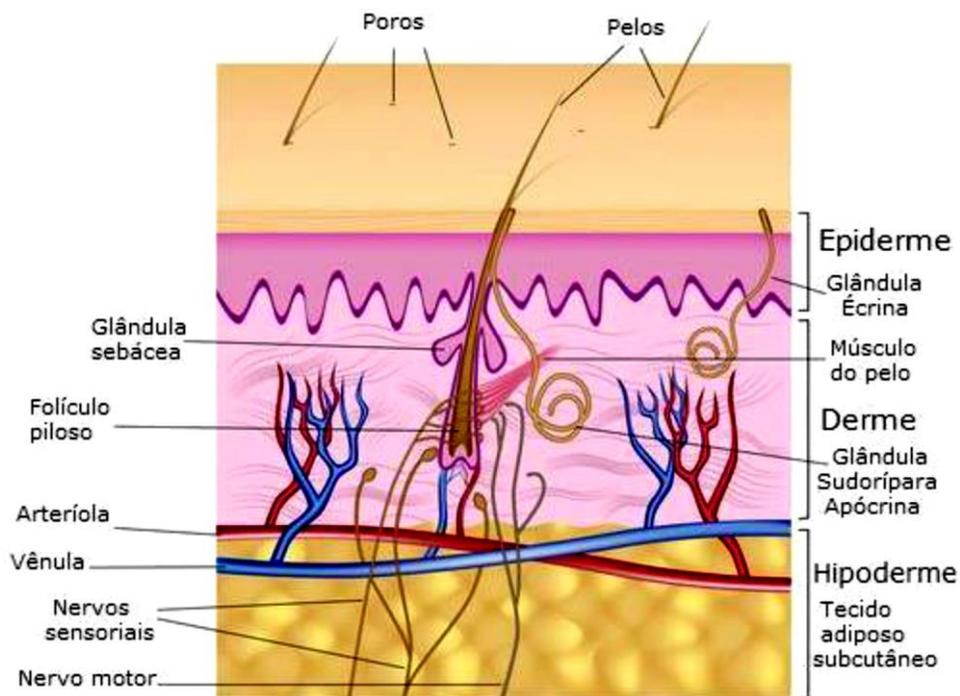


Figura 6. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme

Fonte: adaptado de <https://www.todamateria.com.br/pele-humana>.

A camada basal, também conhecida como estrato germinativo, é a mais profunda da epiderme e composta por células-tronco com núcleos mitóticos, que se diferenciam constantemente em queratinócitos. Nessa camada também se encontram os melanócitos, células produtoras de melanina responsáveis pelo pigmento da pele, olhos e cabelos, e as células de Merkel, responsáveis pela resposta sensorial.

Na camada espinhosa encontram-se as células de Langerhans, células apresentadoras de antígeno derivadas de medula óssea, além de grânulos de melanina (Khavkin; Ellis, 2011).

A camada granulosa é composta por células achatadas e grânulos queratohialina e lamelares. Os grânulos queratohialina possuem precursores de queratina e os lamelares realizam a síntese de fosfolipídeos, responsáveis pela manutenção da integridade da pele (Yousef, Alhajj, Sharma; 2019).

A camada córnea, ou estrato córneo, é a última e mais externa camada da epiderme, composta por queratinócitos achatados que perderam seu núcleo e organelas. É a primeira defesa imunológica do organismo, sendo a principal barreira à penetração de fármacos (Khavkin; Ellis, 2011; Yousef, Alhajj, Sharma; 2019).

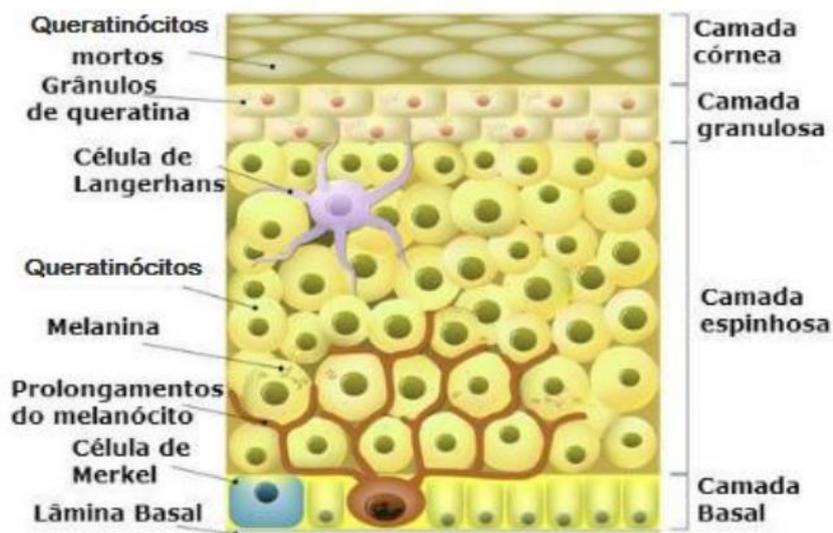


Figura 7. Camadas da epiderme e estruturas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea.

Fonte: Adaptado de <http://mimvet.blogspot.com.br/2015/10/mcac-ii-fisiologia-dapele.html>

Existem espaços no estrato córneo para que se mantenha o equilíbrio hídrico da pele, ocorra a secreção de suor e sebo para manutenção do organismo, assim é nesta região que poderá ocorrer a absorção transdérmica dos fármacos. De fato, a pele regula o fluxo de moléculas de água para o interior e exterior do organismo, permitindo também o influxo de pequenas moléculas lipofílicas e com baixo peso molecular (Karand; Mitragotri, 2009).

A permeação de fármacos através da pele ocorre por meio de três vias: via intercelular (pela matriz lipídica que circunda os corneócitos), via transcelular (atravessando os corneócitos e a matriz lipídica) e via apêndices (através dos folículos capilares e glândulas sudoríparas) (Moser et al., 2001). A penetração dos compostos aplicados por via tópica ocorre preferencialmente pela matriz intercelular passando pelos corneócitos de forma sinuosa. Os folículos pilosos possuem características distintas que favorecem a penetração ao apresentarem a parte inferior não queratinizada, porém os apêndices de pele e folículos pilosos compreendem apenas 0,1% do total da superfície da pele humana (Akhtar, 2014). A camada mais externa da epiderme, chamada de estrato córneo, possui uma espessura de 10 a 40 μm . Essa camada é a principal barreira para permeação de medicamentos por via tópica (Bartosova; Bajgar, 2012).

2.6 Aplicabilidade do óleo

Como primeira linha de defesa do organismo, a pele humana tem funções importantes, atuando como barreira física contra traumas, microrganismos e parasitas, entre outras funções vitais (Gurtner et al., 2008). Qualquer lesão que leve à descontinuidade da pele pode ser chamada de ferida e, geralmente, sofre cicatrização. O processo de cicatrização de feridas visa restringir o dano tecidual e permitir a restauração da integridade e funções dos tecidos afetados. Pode ser dividida em três fases sobrepostas, denominadas fases inflamatória, proliferativa e maturatória, e envolve componentes da matriz extracelular, células residentes e leucócitos, além de mediadores lipídicos e proteínas (Gurtner et al., 2008; Barrientos et al., 2008; Schreml et al., 2010).

As lesões por queimadura podem provocar respostas locais e sistêmicas dependendo do nível que elas atingem. Esses níveis podem ser classificados em queimaduras de 1° (quando se tem eritema envolvendo apenas a epiderme e são geralmente secas e dolorosas, normalmente causadas pelo sol), queimaduras de 2° (apresentando queimaduras superficiais de espessura parcial envolvendo a epiderme e a derme superior geralmente são úmidas e dolorosas, típicas de lesão por escaldadura e objetos quentes), queimaduras de 3° (envolve queimaduras de espessura total envolvendo a epiderme e a derme e lesões nos apêndices, sendo secas e insensíveis, normalmente causadas por fogo) e queimaduras de 4° (já envolvem o tecido subcutâneo subjacente, tendões ou ossos, na maioria das vezes causadas por lesão elétrica de alta voltagem) (Figura 9) (BMJ, 2017).

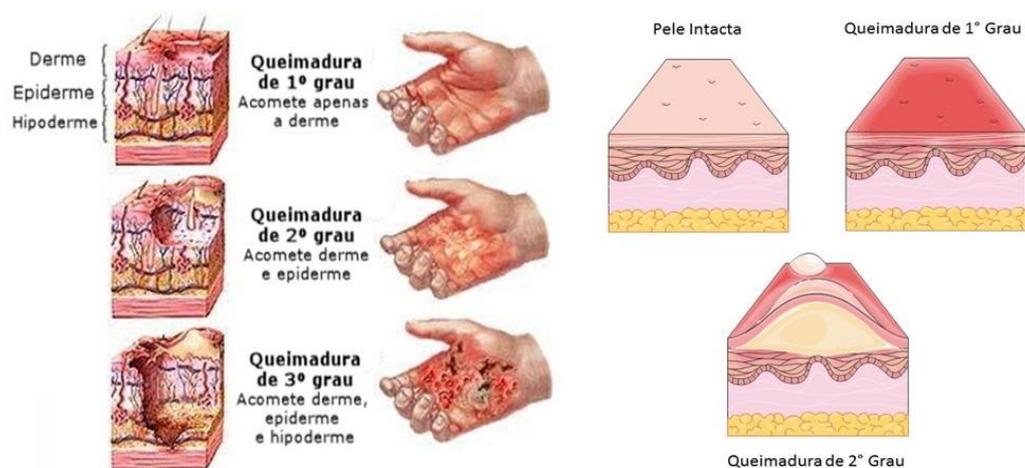


Figura 8. Ilustração dos níveis de queimaduras comparadas a pele intacta.

A cicatrização das lesões epiteliais depende desse conjunto dinâmico de alterações teciduais importantes na manutenção da integridade do organismo, que envolve inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação, remodelação, síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como o colágeno, elastina e fibras reticulares (Takeo; Lee; Ito, 2015).

Diante do citado, temos a espécie *Protium heptaphyllum* March (Burseraeae), conhecida popularmente como almecegueira, é encontrada em todo o Brasil, apresenta alguns usos populares como cicatrizante, expectorante, antiulcerogênico e antiinflamatório (Vieira-Júnior et al., 2005; Lorenzi, 2008). O seu óleo essencial é utilizado na medicina popular como um anti-inflamatório, analgésico, cicatrização de feridas e agente estimulador, e para o tratamento de inúmeras doenças (Araújo et al., 2011; Lima et al., 2016). As folhas e casca são utilizadas como hemostático, cicatrizante, anti-inflamatória e descongestionante nasal. A resina é indicada como contraceptivo, cicatrizante, expectorante, antisépticas, para doença de chagas, hemorragia, ansiedade, bronquite, sinusite, indigestão e cicatrização, também como emoliente, e ainda utilizada como analgésica, principalmente para dores de cabeça, por comunidades da região Amazônica (Mobin et al., 2016; Murthy et al., 2016; Silva et al., 2016a).

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral:*

- Desenvolver sistemas microemulsionados contendo óleo de Protium heptaphyllum (Aubl.) Marchand e avaliar o perfil de penetração/permeação cutânea *in vitro* em modelo de pele de suíno.

3.2 *Objetivos específicos:*

- Desenvolver um método analítico por HPLC para quantificação do alfa felandreno em estudo de permeação cutânea *in vitro*;
- Obter microemulsões contendo padrão alfa felandreno e óleo Breu branco;
- Caracterizar as microemulsões obtidas quanto ao tamanho da gotícula, potencial zeta, viscosidade, pH;
- Avaliar a estabilidade das formulações em temperatura ambiente e em geladeira;
- Avaliar o potencial de irritabilidade da formulação através do teste de HET CAM;
- Realizar estudos de permeação *in vitro* através da pele de suínos intacta;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Produtos químicos e reagentes

O padrão α -PHE (>88%) utilizado neste estudo foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich® (Steinhiem, Alemanha) e o óleo essencial da planta Breu Branco (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand) foi fornecido pela Universidade Federal do Pará (UFPA). Etanol e acetonitrila grau HPLC foram adquiridos da Dinâmica-Química contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil), todas as preparações e análises foram realizadas com água ultrapura (Millipore, Illkirch Graffenstaden, França). Span® 80 e kolliphor EL® foram obtidos de Sigma-Aldrich (Steinhiem, Alemanha), e Labrasol® foi obtido de Gattefossé (França). A fita Scotch® 845 (3 M, St Paul, MN, EUA) foi utilizada para realizar a retirada do estrato córneo. A pele utilizada nos experimentos de permeação e recuperação foi proveniente de orelhas de suínos, obtidas de um abatedouro local (Via Carnes, Formosa, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação de extratos de pele

A técnica de *tap stripping* foi utilizada para separar o estrato córneo do restante da pele suína. Para isso, toda a pele foi colocada sobre um suporte, o estrato córneo foi removido com o auxílio de 15 pedaços de fita adesiva 3M e o restante da pele foi cortado em pequenos pedaços. Em seguida, cada amostra da camada de pele (estrato córneo e pele remanescente) foi colocada em frascos de vidro fechados individuais com 5 mL de etanol para extração de α -PHE (estrato de pele e estrato córneo). As amostras foram mantidas sob agitação magnética (300 rpm) durante 24 horas à temperatura ambiente. O solvente foi então filtrado através de um filtro de membrana de 0,45 μ m.

4.2.2 Preparação de soluções de estoque

A solução-estoque (20,645 μ g/mL) foi preparada diluindo-se 13,8 μ L de α -PHE em 25 mL de etanol. Em seguida, 500 μ L dessa solução foram transferidos para um frasco de 10 mL, completado o volume com etanol e armazenado em refrigerador (2° – 8 °C) para posterior utilização na validação do método analítico. Três soluções de estoque foram preparadas. Curvas analíticas foram preparadas a partir dessas soluções, variando a concentração de 0,5 – 15,0 μ g/mL.

4.2.3 Varredura

Inicialmente, a seleção do comprimento de onda máximo de absorção do α -PHE foi realizada com base em varreduras espectrofotométricas utilizando um equipamento espectrofotométrico UV (Lambda Bio Model, PerkinElmer, Reino Unido).

4.2.4 Aparelhos e condições cromatográficas

A análise quantitativa do α -PHE foi realizada com cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), utilizando-se equipamento Shimadzu LC 20-AD, equipado com detector DAD (SPD-20A), bomba (LC-20D), degaseificador (DGU-20A3), injetor automático (modelo 9SIL-20AD), forno (modelo CTO-20AS) e computador equipado com o software de análise Shimadzu LC. A coluna de fase reversa C18 Discovery HPLC Supelco Sigma-Aldrich (15 cm \times 4,6 mm, 5 μ m) foi usada como fase estacionária. A fase móvel consistiu de uma mistura de 0,1 % de ácido fórmico em água (fase A) e 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila (fase B). Um sistema de eluição em gradiente foi usado variando a concentração de fase (A/B %) ao longo dos 40 min de tempo de execução, conforme descrito: 15/85 (0,01–10 min), 0/100 (10,1–20 min) e 15/85 (20,1–40 min). Aplicado a uma vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção de 50 μ L em cada análise e o forno de coluna regulado para uma temperatura de 45 °C. A detecção foi realizada em 263 nm, representando o comprimento de onda máximo de absorção no espectro UV para α -PHE.

4.2.5 Desenvolvimento do Método Analítico

A validação do método cromatográfico proposto estava de acordo com as diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) e **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Diferentes condições cromatográficas foram testadas, como composição de fase móvel, vazão e volume de injeção, a fim de obter picos cromatográficos de α -PHE com desempenho analítico aceitável, considerando os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente), precisão, exatidão e robustez, de acordo com as diretrizes.

4.2.6 Seletividade

Solução padrão de α -PHE (5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi avaliada na ausência (solução em branco) e na presença de pele e formulação (microemulsão). Os ensaios foram preparados a partir de seis fontes independentes de cada matriz, a matriz cutânea foi preparada conforme descrito anteriormente na Seção 4.4.2. Os resultados foram examinados comparando-se o tempo de retenção e a área de pico. Além disso, o óleo essencial extraído da *Protium heptaphyllum* foi avaliado na ausência de α -PHE. Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (Boston, MA, EUA).

4.2.7 Linearidade

Para determinar a linearidade do método, foram realizadas seis diluições (0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em triplicata de cada concentração, a partir da solução estoque com concentração de 20,645 $\mu\text{g}/\text{mL}$, utilizando-se etanol solvente como diluente das soluções. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear, coeficiente angular de significância e testes de proporcionalidade pelo teste t de Student ($p = 0,05$). Os fatores de resposta foram calculados considerando a razão entre a área do pico e a concentração do analito (Angelo et al., 2016; Cardoso, Uwai, Gratieri, Cunha-Filho, & Gelfuso, 2023; Pereira, Matos, Gratieri, Cunha-Filho, & Gelfuso, 2018; Quintão, Ferreira-Nunes, Gratieri, Cunha-Filho, & Gelfuso, 2022).

4.2.8 Limite de detecção e quantificação

As concentrações mínimas de α -PHE a serem detectadas e também quantificadas (LD e LQ, respectivamente) foram calculadas com base no desvio padrão (σ) e inclinação (S) das três curvas de calibração de acordo com as seguintes Equações (1 e 2):

$$LD = \frac{(3,3 \times \sigma)}{S} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{(10 \times \sigma)}{S} \quad (2)$$

4.2.9 Precisão

A precisão foi analisada em relação aos estudos de repetibilidade e precisão intermediária. Para os testes de repetibilidade (intraensaio), as amostras foram preparadas em três diferentes concentrações da curva de calibração (0,5; 5,0 e 15,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e analisadas em triplicata para cada amostra. Para a análise de precisão intermediária

(interensaio), amostras em três diferentes concentrações (0,5; 5,0 e 15,0 µg/mL) foram analisadas em triplicata para cada concentração em CLAE, em dias diferentes, por dois analistas diferentes. Os resultados de precisão foram expressos como coeficiente de variação (CV), calculado de acordo com a Equação (3), utilizando-se o desvio padrão da média (σ) e a concentração média:

$$CV (\%) = \left(\frac{\sigma}{\text{Concentração média}} \right) \times 100 \quad (3)$$

4.2.10 Exatidão

A exatidão foi determinada com base na porcentagem de α -PHE recuperada de cada camada da pele (estrato córneo e pele remanescente). Primeiro, as camadas da pele foram separadas por fita adesiva (descrita na seção 4.4.1). Em seguida, diferentes volumes conhecidos da solução de etanol α -PHE foram adicionados a cada camada de pele separada para obter 0,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 15,0 µg/mL ($n = 3$ para cada concentração) considerando o volume final (5 mL). Após a evaporação total do solvente, 5 mL de etanol foram adicionados a cada frasco, e as amostras foram deixadas sob agitação constante por 24 h para extração de α -PHE. Finalmente, as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm e analisadas pelo método desenvolvido em HPLC descrito acima. A recuperação do α -PHE foi determinada de acordo com a quantidade extraída das camadas da pele em relação à quantidade calculada adicionada.

A exatidão foi expressa pela razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a Equação (4):

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{Concentração mensurada}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100 \quad (4)$$

4.2.11 Robustez

Três parâmetros analíticos foram selecionados para avaliar a robustez do método: temperatura do forno (OT), vazão (FR) e fase móvel (W), os quais foram avaliados de acordo com um planejamento fatorial, conforme apresentado na Tabela 6 (Cerqueira e Silva et al., 2014; Angelo et al., 2016). A variação dos níveis foi $\pm 5,0\%$ em relação ao método desenvolvido: OT = 45 °C, FR = 0,5 mL/min e W = 85/15% (v/v). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Uma equação de predição foi proposta para cada

resposta (ou seja, área de pico, tempo de retenção e resolução) usando a análise de regressões múltiplas passo a passo. O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 0,05. Todos os cálculos estatísticos foram realizados por meio do software Design-Expert, versão 9.

4.3 Preparo das Microemulsões

Para a obtenção do diagrama de fases, utilizou-se como fase aquosa água ultrapura. A fase oleosa foi composta por Kolliphor, padrão α -PHE e pelo óleo Breu Branco e os tensoativos empregados foram o Labrasol® e Span® 80 na proporção de 4:1 (p/p), para ambas as formulações em diferentes proporções. No diagrama são produzidos tanto microemulsões O/A como A/O, além de nano e emulsões. A mistura de fase oleosa com os tensoativos foi previamente realizada nas proporções de (1:9), (2:8), (3:7), (4:6), (5:5), (6:4), (7:3), (8:2) e (9:1) p/p, respectivamente. As titulações foram feitas com volumes pré-definidos de fase aquosa, adicionado em titulação gota a gota, em temperatura ambiente e sob agitação à 300 rpm durante 10 minutos e repouso durante 5 minutos entre adição de cada volume para observação visual do aspecto do tipo de formulação em desenvolvimento (Figura 10). Os sistemas formados foram classificados como: SF (separação de fases), LT (leitoso), TV (turvo), FL (floculação) e microemulsão (microemulsão).

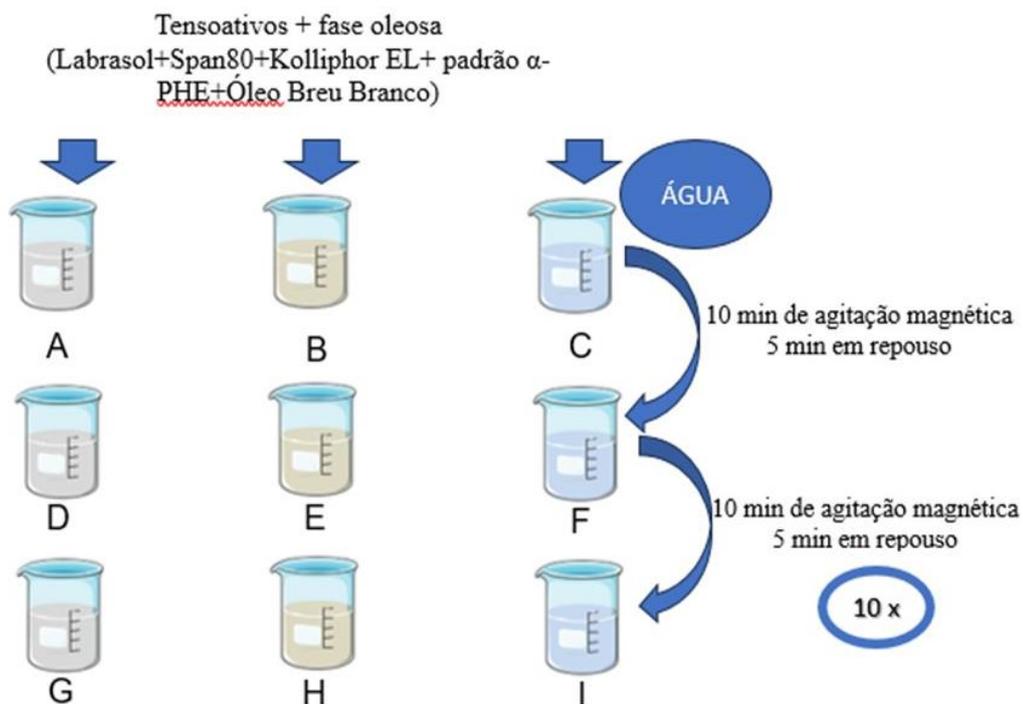


Figura 9. Preparo das Microemulsões O/A.

Considerando-se as proporções dos componentes (fase aquosa, fase oleosa e tensoativos), após as titulações, plotou-se os dados em que os sistemas observados visualmente encontravam-se opticamente translúcidos ou transparentes, utilizando o programa Origin Pro® 8.0 (OriginLab Corporation, USA) para a obtenção do diagrama de fases do tipo pseudoternário.

4.4 Caracterização das Formulações

Após o desenvolvimento das microemulsões (ME), foi realizada a caracterização quanto a pH, potencial zeta, tamanho de gotícula, índice de polidispersividade (PDI). Foram analisados por espalhamento de luz dinâmica de 1 mL das amostras em um equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

4.4.1 Análise de pH

Para a determinação do pH das formulações, foi utilizado um pHmetro digital da marca Digimed, modelo DM-22, previamente calibrado com as soluções tampão pH 4,01 e 6,86 à temperatura ambiente. Para a mensuração do pH, o eletrodo acoplado a eletrodo tipo faca para semissólidos DME-CF1 (Digimed, Brasil) foi inserido diretamente nas amostras.

4.4.2 Potencial zeta

O potencial zeta das formulações, contendo o padrão alfa e o óleo breu branco, foi analisado por mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Antes da leitura, as amostras foram diluídas em água MilliQ para assegurar valores de condutividade de aproximadamente 2 mS cm⁻¹.

4.4.3 Tamanho de gotícula e índice de polidispersão (PDI)

O diâmetro hidrodinâmico das gotículas e o PDI foram mensurados por meio do espalhamento de luz dinâmico. Foi preparada uma diluição das microemulsões O/A em água MilliQ (10 µL da formulação e 990 µL de água ultrapura). Em seguida, a análise foi realizada pelo equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA).

4.5 Estudo de Estabilidade das microemulsões

Estudos de estabilidade preliminares foram realizados com as formulações desenvolvidas. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro hermeticamente

fechados e submetidas à temperatura ambiente e da geladeira. O estudo foi realizado durante 30 dias, em triplicata para cada amostra, com análises nos intervalos de 0, 1, 7, 15 e 30 dias. Para este ensaio, foram analisados os parâmetros: características organolépticas (aspecto, cor, odor e sensação de tato), pH, potencial zeta, tamanho de gotícula e PDI.

4.6 Estudos de irritabilidade *in vitro*

O grau de irritabilidade das formulações foi realizado pelo teste HET-CAM, na qual foram avaliadas *in vitro* utilizando a membrana corioalantoide (CAM) do ovo de galinha como modelo experimental. Os ovos de galinha embrionados foram cuidadosamente colocados na posição vertical sob um suporte, de forma que a parte mais larga e plana ficasse voltada para cima, onde encontra-se a câmara de ar. Com o auxílio de uma pinça, foi realizado um pequeno furo no centro da parte superior da casca de modo a expor a CAM, a qual é caracterizada por sua transparência e pela presença de vasos sanguíneos. Em seguida, essa membrana foi hidratada com solução salina e retirado o excesso, e então 100 µL da formulação a ser testada foram aplicados diretamente sobre a CAM. Após 20 segundos da aplicação, as CAM foram lavadas com solução salina, pH 7,4, para retirada do excesso da formulação, e foram analisadas visualmente durante 5 minutos.

Nesse tempo, foram analisados os sinais de irritação, como hiperemia, hemorragia e coagulação sanguínea, com base nos seguintes critérios:

- *Hiperemia*: relacionada com o aparecimento de capilares que não eram visíveis anteriormente, ou com o aumento da intensidade de cor daqueles que já eram visíveis;
- *Hemorragia*: relacionada com o claro extravasamento de sangue no meio;
- *Coagulação sanguínea*: é detectada pela agregação de plaquetas que formam uma espécie de mancha rosada sob a membrana, ou pela agregação de proteínas que confere à amostra um aspecto esbranquiçado.

Cada formulação foi testada em triplicata. Uma solução NaOH 1M utilizada como controle positivo de irritação e a própria solução salina, pH 7,4, foi utilizada como controle negativo.

Uma pontuação (score) em função do tempo de aparecimento de cada um dos sinais de irritação foi estabelecida (Tabela 1). A partir dessa pontuação, determinou-se a

categoria em que se inseriu cada uma das formulações, segundo a classificação indicada na Tabela 2.

Tabela 1. Pontuação (score) atribuído para o aparecimento de cada sinal indicativo de irritação em função do tempo no teste de irritação *in vitro* em modelo organotípico HET-CAM (Luepke, 1985).

Fenômeno	Tempo (t)		
	t < 30 s	30 s ≤ t ≤ 2 min	2 min < t ≤ 5 min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Tabela 2. Classificação das formulações quanto ao grau de irritação de acordo com a pontuação atribuída (P) para os sinais de irritação segundo o teste de irritação *in vitro* em modelo organotípico HET-CAM (Luepke, 1985).

Pontuação atribuída à amostra	Classificação quanto ao grau de irritação
$P \leq 1$	Praticamente não irritante
$1 < P \leq 5$	Ligeiramente irritante
$5 < P \leq 9$	Moderadamente irritante
$P > 9$	Irritante

4.7 Estudos de permeação *in vitro*

Para realização de estudos de permeação cutânea de fármaco *in vitro* são utilizadas células de difusão acopladas a um equipamento com sistema de aquecimento a seco chamado Hanson® (Figura 11). Elas são compostas por dois compartimentos, o doador, onde é colocado a formulação, e o receptor, onde é colocado o fluido que simula o meio fisiológico. Uma amostra de pele é colocada entre os dois compartimentos. A mensuração da taxa de permeação do fármaco do meio doador para o meio receptor através da pele é

realizada por um método analítico, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Moser et al., 2001).



Figura 10. Células de difusão acopladas a um equipamento com sistema de aquecimento a seco, Hanson®

O meio receptor é composto por tampão fosfato e tween 80. A temperatura na superfície da pele na célula de difusão deve ser mantida de acordo com a temperatura da pele in vivo de 37 ± 1 °C e 300 rpm. Para que isso ocorra, o sistema é aquecido, a fim de simular a temperatura corporal (Bartosova; Bajgar, 2012). A permeação teve duração de 12 horas (figura 12)



Figura 11. Técnica do estudo de permeação in vitro com auxílio do equipamento Hanson[®], realizado coleta do meio extrator, *tape stripping* e filtração após 24h para injeção no HPLC.

Para extração e posterior quantificação do fármaco após os ensaios de permeação, é utilizada a técnica de “*tape stripping*” (Figura 12) e o α -PHE foi extraído conforme o método validado nesse trabalho.

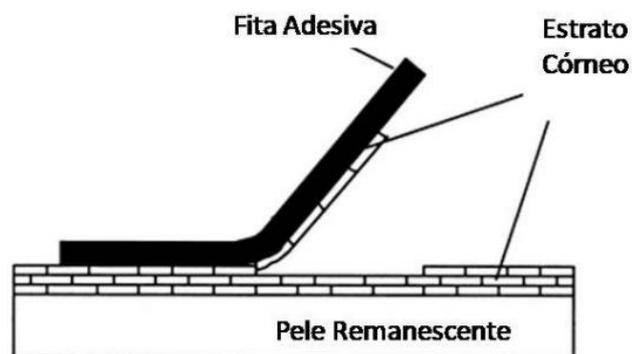


Figura 12. Representação da remoção progressiva do estrato córneo pela técnica de *Tape Stripping* (adaptado de Moser et al., 2001)

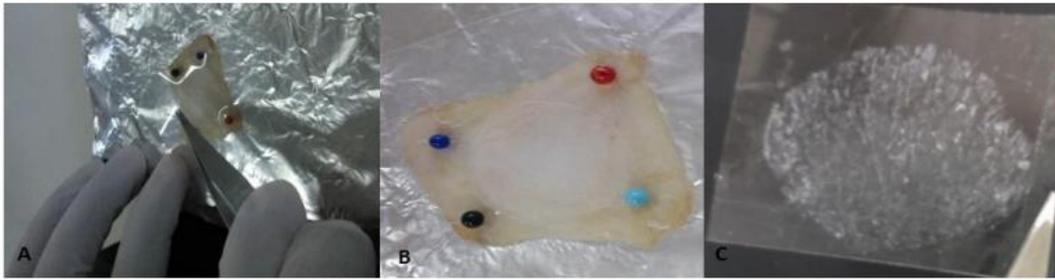


Figura 13. Aplicação da técnica de *Tape Stripping* (A) aplicação da fita adesiva sobre a pele; (B) pele sobreposta com auxílio de alfinetes para delimitar apenas a área difusional; (C) estrato córneo removido pela fita adesiva.

4.8 Análise Estatística dos Dados

Os dados quantitativos estão apresentados nas Tabelas e Figuras como média \pm desvio padrão da média. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism 6.0. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram verificadas por análise de variância one way, seguido de teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi aceito como ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do comprimento de onda máximo de absorção do α -PHE

O espectro obtido a partir da varredura do espectrofotômetro UV/VIS do α -PHE em etanol na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ é mostrado na figura 14. O comprimento de onda de 263 nm representou a absorção máxima.

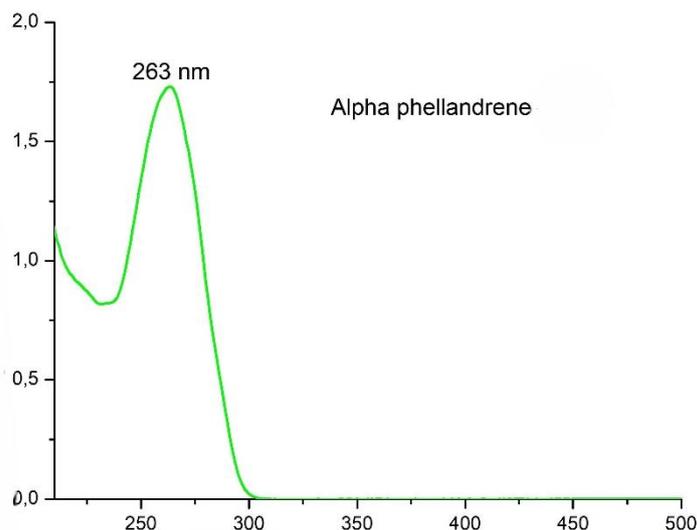


Figura 14. Espectro de absorção na região UV/VIS do α -PHE a 100 $\mu\text{g/mL}$. Faixa de varredura: 200 a 800 nm.

5.2 Desenvolvimento do método

A fim de identificar a região do pico e quantificar o α -PHE na pele e nas formulações desenvolvidas, diferentes condições cromatográficas foram investigadas para verificar a melhor condição analítica para separar o analito de interesse de possíveis interferentes das camadas cutâneas.

Resumidamente, diferentes tipos de fase móvel (água, acetonitrila, metanol e etanol) foram testados, com ou sem aditivo (ácido), em diferentes proporções e formas de eluição (isocrática e por gradiente de concentração), bem como fases estacionárias com diferentes características (Tabela 3). No entanto, os picos observados foram muito precoces e apresentaram resolução muito pobre de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo FDA (FDA, 1994) e pela diretriz Q2 (R2) do ICH (ICH, 2005).

Vale ressaltar que o tempo de corrida inicialmente nas tentativas foi insuficiente (15 – 20min) nas tentativas 1-4, de modo que a corrida foi estendida para 40min para

melhorar a resolução do pico e eliminar todos os interferentes lipofílicos durante a corrida.

Tabela 3. Condições testadas no método isocrático.

Teste	Fase móvel (v/v)	Vazão (mL/min)	Temperatura (°C)	Tempo de retenção (min)	Fator de rejeitos	Pratos teóricas	Características do pico
1	A:B (60:40)	0.8	45	8.5	1.046	6434	Pico adequado
2	A:B (80:20)	0.8	45	6.3	0.856	7252	Pico com ombro
3	A:B (80:20)	0.5	45	10.1	0.860	6809	Pico adequado
4	A:B (85:15)	0.5	45	8.2	0.878	8900	Pico adequado

Fase móvel: (A) acetonitrila; (B) água.

O método que apresentou melhor eficácia foi o método gradiente, escolhido para o desenvolvimento deste estudo. A fase móvel foi obtida utilizando-se mistura de água/acetonitrila com ácido fórmico, aplicada por gradiente com vazão de 0,5 mL/min. O cromatograma obtido a partir do método desenvolvido está representado na figura 15A, na qual α -PHE apareceu aos 8,10 min. O pico do analito mostrou pratos teóricos de 1288 ($N > 2000$), e o fator de rejeitos estava dentro do limite de $T < 2,0$ (0,9).

5.3 Seletividade

Cada cromatograma das matrizes isoladas foi comparado com o da α -PHE (fig. 15A), não sendo detectados picos interferentes no mesmo tempo de retenção. O óleo de breu extraído apresentou o biomarcador α -PHE com o percentual estimado de 24,3%. Essa informação é importante, pois a microemulsão foi produzida com o padrão alfa e o óleo da planta.

Além disso, áreas de pico e tempo de retenção de α -PHE na presença de cada interferente foram analisados para garantir que as impurezas e matrizes biológicas não interferissem na quantificação do fármaco (fig. 15B e 15C). Os resultados mostraram que o tempo de retenção do pico do fármaco não foi alterado na presença da matriz biológica (pele) e da formulação (microemulsão), $p > 0,05$.

Ainda dentro da tolerância das diretrizes do ICH (ICH, 2005), os resultados indicam que o método desenvolvido é seletivo contra os interferentes analisados.

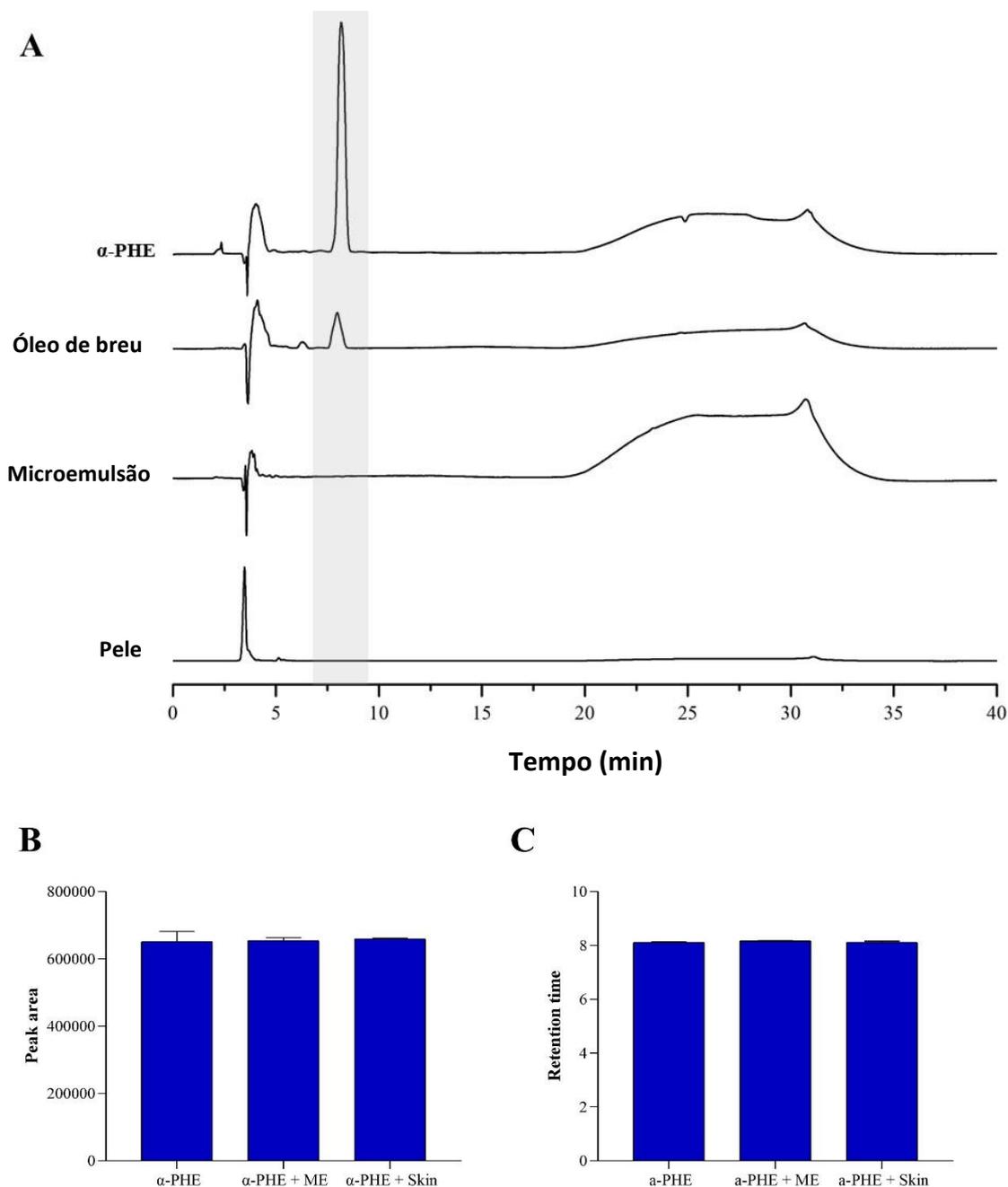


Figura 15. Seletividade do método na quantificação de α -PHE a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ com tempo de retenção de 8,10 minutos. Cromatogramas representativos de α -PHE e injeções em branco de óleo de breu, microemulsão e pele (A). Análise em termos de áreas de pico (B) e tempos de retenção (C) comparando os cromatogramas de α -PHE na presença de matrizes. Análise estatística por ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey; $p > 0,05$. α -PHE – alfa-felandreno; ME – microemulsão.

5.4 Linearidade

O cálculo de regressão linear da curva para α -PHE resultou na equação $y = 145445x - 3462,6$, na qual y representa a área do pico e x a concentração do fármaco em $\mu\text{g/mL}$. Essa regressão linear mostrou alta probabilidade de correlação, com valor de coeficiente de correlação de 0,9991, correspondendo aos limites acima dos requisitos regulatórios estabelecidos pelas diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005), como demonstrado na figura 16.

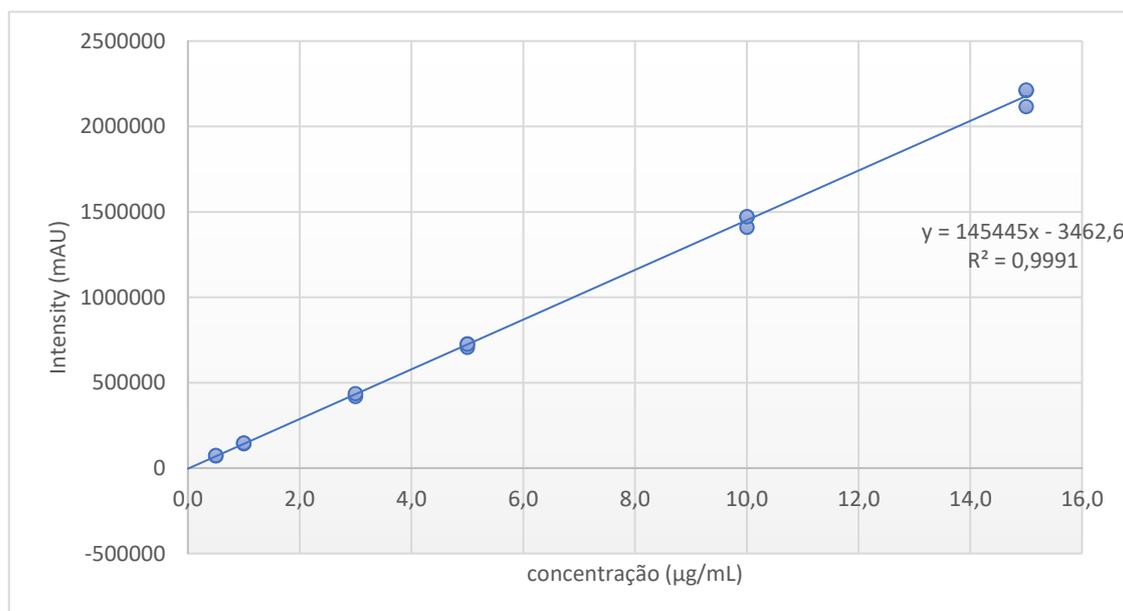


Figura 16. Curva analítica obtida pela análise de concentrações na faixa de 0,5 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata; equação da reta: $y = 145445x - 3462,6$; $R^2 = 0,9991$.

5.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites calculados foram 0,05 e 0,14, respectivamente. Esses baixos valores estabelecidos devem ser suficientes para quantificar de forma confiável a α -PHE em estudos de permeação cutânea. Esta hipótese será posteriormente avaliada durante a aplicação da metodologia em um ensaio de permeação *in vitro*.

5.6 Precisão

O coeficiente de variação dos valores determinados durante o teste de repetibilidade empregando três concentrações de α -PHE foi inferior a 3% (Tabela 4). Da mesma forma, em termos de precisão intermediária (precisão inter-dia), os valores variaram de 0,3% a 5,5% (Tabela 4). Esses resultados sugerem que o método mantém respostas consistentes apesar das variações operacionais.

Tabela 4. Resultados de testes de precisão HPLC-UV para determinação de α -PHE em soluções padrão.

Repetibilidade				
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)		
1.0	1.13 \pm 0.1	1.21		
5.0	5.68 \pm 0.5	1.58		
15.0	15.36 \pm 0.6	2.53		
Precisão intermediária				
	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	
Analista 1	Dia 1	1.0	0.94 \pm 0.1	0.9
		5.0	4.95 \pm 0.3	0.3
		15.0	15.40 \pm 0.2	3.9
Analista 1	Dia 2	1.0	1.03 \pm 0.3	3.7
		5.0	4.83 \pm 0.1	3.4
		15.0	14.69 \pm 0.8	5.5
Analista 2	Dia 1	1.0	0.79 \pm 0.2	0.8
		5.0	4.13 \pm 0.1	3.3
		15.0	13.15 \pm 0.6	5.0
Analista 2	Dia 2	1.0	0.92 \pm 0.2	5.0
		5.0	4.95 \pm 0.1	3.6
		15.0	15.23 \pm 0.7	5.0

CV – Coeficiente de variação.

5.7 Exatidão

Para ensaios bioanalíticos, é permitido um intervalo limite de 15% (85% a 115%) nos valores obtidos (ICH, 2019). Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que todos os percentuais de recuperação para α -PHE na pele foram superiores a 85%, com coeficientes de variação inferiores a 5%. Essa alta recuperabilidade permite a eliminação de um fator de correção em estudos de permeação, o que é aceito na literatura para valores acima de 70% (P. M. Oliveira et al., 2020).

Tabela 5. Resultados de testes de exatidão por HPLC-UV para determinação de α -PHE em soluções-padrão. α -PHE: alfa-felandreno.

Matriz Biológica	α-PHE teórico ($\mu\text{g/mL}$)	α-PHE experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
Pele	1.0	0.92 \pm 0.1	92.3 \pm 0.1
	5.0	4.96 \pm 0.1	99.2 \pm 0.2
	15.0	15.23 \pm 0.7	101.6 \pm 0.7

5.8 Recuperação

O estudo de recuperação do alfa felandreno foi realizado para verificar a capacidade extratora do solvente selecionado, e validar o processo de extração, tornando adequada a metodologia de quantificação do alfa felandreno nos estudos de penetração através da pele suína. Os resultados de recuperação, em pele, extraídos com 5,0 mL do solvente selecionado (EtOh), demonstra que o processo de extração mostrou-se eficiente na quantificação nas concentrações analisadas.

5.9 Robustez

A robustez do método foi estudada por meio da avaliação de modificações intencionais nos parâmetros de OT, FR e W, que foi estudada por meio de um planejamento fatorial (Tabela 6).

A área do pico foi significativamente influenciada pelo fluxo da fase móvel ($p < 0,05$). Ficou evidente que, à medida que o fluxo aumentava, havia uma diminuição acentuada na área do pico. O tempo de retenção foi significativamente afetado pelas três variáveis testadas ($p < 0,05$). As mudanças na temperatura e na vazão do solvente foram inversamente proporcionais ao tempo de retenção; assim, o aumento desses parâmetros resultou em menores tempos de retenção. Além disso, modificações na fase móvel também resultam em alterações do tempo de retenção, o aumento da fase orgânica (acetonitrila) e a redução da fase aquosa resultaram em uma diminuição esperada no tempo de retenção, considerando as características lipofílicas do α -PHE. Finalmente, a resposta do fator de rejeitos também foi significativamente modificada pelas três variáveis testadas ($p < 0,05$). Com o aumento da temperatura, vazão e fase móvel (acetonitrila), foi possível observar um aumento no fator de rejeito. No entanto, de acordo com as diretrizes da FDA, o fator rejeitos esteve dentro do limite de $T < 2,0$ em todos os ensaios realizados, variando entre 0,780 e 0,829.

Tabela 6. Efeitos dos parâmetros analíticos sobre a área, tempo de retenção e fator de rejeitos do método desenvolvido para quantificação de α -PHE.

		Trial							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Variáveis independentes	OT	44	44	44	44	46	46	46	46
	FR	0,4	0,4	0,6	0,6	0,4	0,4	0,6	0,6
	W	84	86	84	86	84	86	84	86
		Área			Tempo de retenção		Fator de rejeitos		
Variáveis independentes	OT	-9023.3			-0.1583*		0,0071*		
	FR	-236041*			-1.66*		0,0054*		
	W	-898.67			-0.6483*		0,0299*		

OT (°C): Temperatura do forno; FR (mL/min): Vazão; W (%): percentual de acetonitrila na fase móvel. * $p < 0.05$.

5.10 Composição química

A verificação da composição química do óleo Breu branco extraído da planta foi realizada por HPLC. O alfa felandreno (α -PHE) foi quantificado no óleo Breu Branco com o teor de 24,33 % do total dos compostos, esse achado pode ser observado no cromatograma expresso na figura 15. Com isso, utilizou-se o alfa felandreno como marcador dos estudos de quantificação em HPLC para seguir os estudos.

O α -PHE também faz parte dos constituintes químicos dos óleos essenciais de diversas espécies vegetais que apresentam propriedades analgésicas e antiinflamatórias ações, incluindo *Matricaria chamomilla* L. (Vitalini, 2009) e *Zingiber officinale* Roscoe. (Vendruscolo et al., 2006). Assim, é muito importante estudar este composto e sua contribuição para o seu perfil farmacológico, uma vez que espécimes ricos neste monoterpeno apresentam efeitos analgésicos e anti-inflamatórios.

Estudos químicos realizados com *Protium* mostram uma alta variedade de substâncias, com dominância de terpenos nos óleos essenciais das espécies, sendo as atividades biológicas atribuídas, principalmente, aos monoterpenos e sesquiterpenos, porém também é possível verificar a presença de fenilpropanóides com importantes atividades (Lima et al., 2016; Oliveira et al., 2018).

As substâncias majoritárias encontradas nos óleos essenciais de *P. heptaphyllum* foram os monoterpenos pcimeno (maior concentração), α -terpineol, α -pineno e α -felandreno (Silva et al., 2016a).

Entretanto, o método de extração também é importante na obtenção dos óleos voláteis, como hidroddestilação e headspace dinâmico, que utilizados na extração do óleo de *P. heptaphyllum* proporcionaram uma diferença na constituição química e nos compostos majoritários da espécie (Citó et al, 2006). Visto que o óleo de estudo foi extraído por um outro grupo de pesquisadores, foram utilizados diferentes meios de extração e isso pode influenciar.

5.11 Diagrama de fases pseudoternário

A melhor maneira de se desenvolver formulações através da mistura de tensoativos/co-tensoativos, água e óleo é por meio de um diagrama de fases pseudoternário. A fase aquosa, fase oleosa e a mistura de tensoativo/co-tensoativo são representadas em sua totalidade nos vértices de um triângulo equilátero, no qual podemos identificar várias regiões onde se formam microemulsões e as proporções das fases que as compõe (Oliveira et al, 2004; Vazifehasl, Dizaj, 2018). O diagrama de fases pseudoternário obtido nesse estudo está representado na Figura 21.

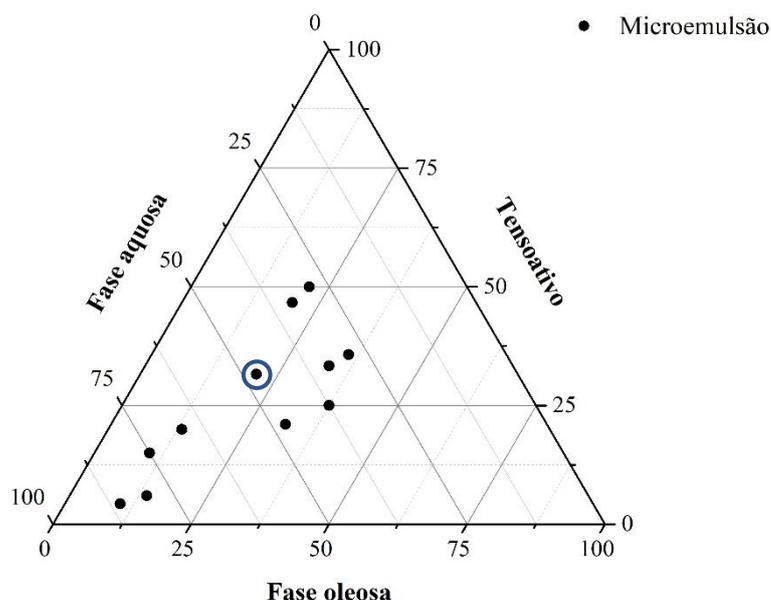


Figura 17. Diagrama pseudoternário de formulação composta por óleo e mistura de tensoativos (4:1) dispersos em água ultrapura em temperatura ambiente.

A escolha dos constituintes da formulação se deu devido as suas características de baixa irritabilidade, atoxidade, não serem alérgenos e serem farmacologicamente inertes (HE, HE, GO, 2010). Span 80® é um tensoativo não-iônicos, possuindo baixa toxicidade e irritabilidade quando comparados aos tensoativos iônicos (Lémery et al, 2015). O

Labrasol® é um tensoativo e potente solubilizante, que contribui para a solubilização de ativos e formação de espuma. Forma microemulsão, sendo possível a obtenção de microemulsão em espuma em combinação com outros ingredientes. Também vem sendo extensivamente explorado para aumentar a solubilidade e permeabilidade intestinal e biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água, apresentando-se como um líquido transparente e com valor de EHL de 14 (Karatas et al., 2005; Koga et al., 2006).

O diagrama de fases, pode ser classificado em ternário, quartenário e pseudoternário, variando de acordo com a natureza química e com a quantidade de constituintes do sistema. O diagrama de fases descreve em que condição experimental é possível se obter microemulsões e as regiões limites de transição entre emulsões, fases separadas e microemulsões O/A e A/O. O diagrama permite identificar as diferentes regiões formadas bem como apontar aquela que representa a melhor combinação dos componentes da formulação e suas respectivas quantidades (SILVA et al., 2009).

5.12 Desenvolvimento da Formulação

Foram desenvolvidas duas formulações, afim de comparação entre elas, sendo uma com Padrão α -PHE (1A) e outra com o óleo Breu Branco (1B). Após desenvolvimento do diagrama de fases, foram selecionadas, baseando-se em sua aparência, textura e característica transparente, considerada a melhor entre os parâmetros observados. A proporção para cada fase está representada na tabela 7.

A ideia de desenvolver um produto de uso tópico se torna interessante por muitos motivos. 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 autoaplicabilidade, sendo uma alternativa às vias oral e hipodérmica, tradicionalmente utilizadas (Choudhury et al., 2017; Sengupta; Chatterjee, 2017).

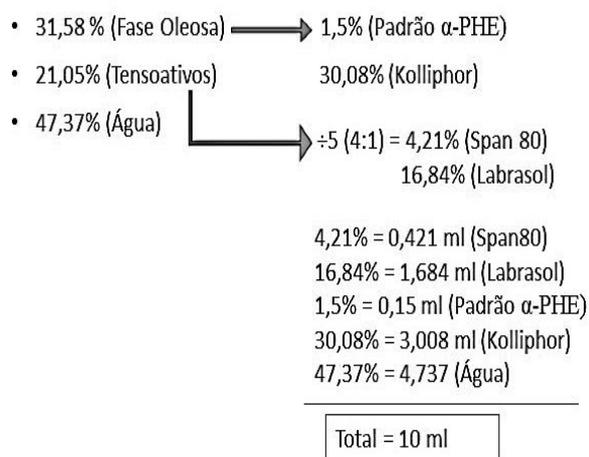
O desenvolvimento de um produto farmacêutico baseado em um extrato natural agrega valor aos produtos da biodiversidade do país e auxilia no encontro de um modelo de desenvolvimento econômico que favoreça o desenvolvimento regional e a conservação da sua biodiversidade, com influência direta na melhoria da qualidade de vida das populações e contribuindo ainda para o desenvolvimento científico e tecnológico.

Tabela 7. Proporção (%) de cada fase da formulação e suas características analisadas durante a preparação.

AMOSTRA	FORMULAÇÃO			Volume Total (ml)	Proporção após titulação (%)				
	Fase Oleosa (O) (ml)	Tensoativos (T) (ml)	Fase aquosa (A) (ml)		O	T	A		
C14	0,7	0,3	4	4,6	15,22	6,52	86,96	microemulsao	liquida
C16	0,7	0,3	6	7	10,00	4,29	85,71	microemulsao	Liquida
D6	0,6	0,4	0,6	1,6	37,50	25,00	37,50	microemulsao	Liquida
D9	0,6	0,4	0,9	1,9	31,58	21,05	47,37	microemulsao	Liquida
E4	0,5	0,5	0,4	1,4	35,71	35,71	28,57	microemulsao	Liquida
E5	0,5	0,5	0,5	1,5	33,33	33,33	33,33	microemulsao	Liquida
F9	0,4	0,6	0,9	1,9	21,05	31,58	47,37	microemulsao	Liquida
F11	0,4	0,6	2	3	13,33	20,00	66,67	microemulsao	Liquida
F12	0,4	0,6	3	4	10,00	15,00	75,00	microemulsao	Liquida

Dois pontos de melhor formação, foram escolhidos e a partir destes, foi calculado a quantidade exata para fase, levando em consideração o padrão α -PHE e o óleo Breu Branco como constituintes da fase oleosa, dessa forma a partir de cada proporção (%), podemos observar na figura 18 o volume para cada fase.

Formulação 1A



Formulação 1B

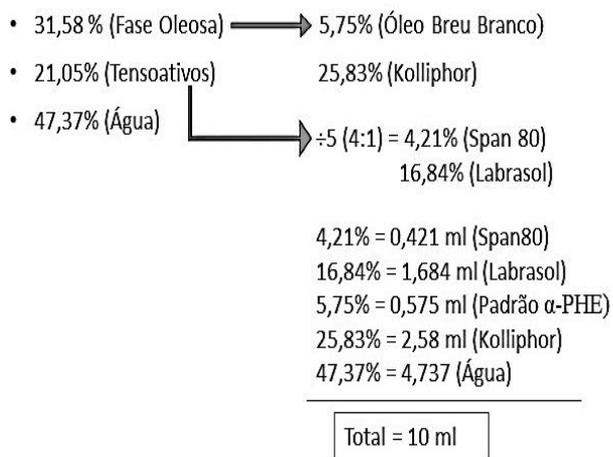


Figura 18. Cálculos para obtenção das formulações (1A) e (1B), a partir da proporção de cada fase oleosa obtida inicialmente na preparação das formulações para obtenção do diagrama de fases.

As formulações escolhidas foram devidas suas características macroscópicas para posterior utilização nos estudos de estabilidade e permeação. O aspecto macroscópico das microemulsões podem ser observados na Figura 20.

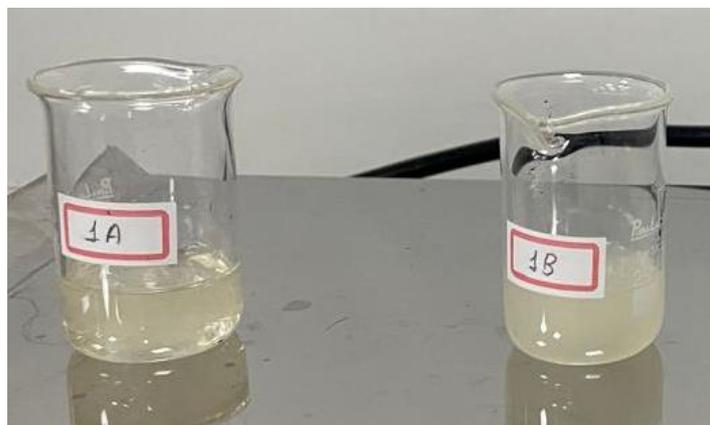


Figura 19. Aspecto macroscópicos das formulações 1A e 1B compostas por 47,37% de fase aquosa (água ultrapura), 21,05% de tensoativo (Labrasol® + Span 80® (4:1)) e 31,58% de fase oleosa (Kolliphor + Padrão α -PHE).

A presença de tensoativos e co-tensoativos favorece a formação de microemulsões devido sua dispersão e dissolução na fase contínua, diminuindo a tensão interfacial (Peng et al, 2010).

5.13 Caracterização Das Formulações Desenvolvidas

5.13.1 Análise de pH

O pH das formulações desenvolvidas foi analisado e está descrito na tabela 7.

Tabela 8. Resultados das análises de pH das formulações desenvolvidas a partir da média de 3 determinações e desvio padrão.

Formulação	pH
1A (Padrão α -PHE)	6,33 \pm 0,67
1B (óleo Breu Branco)	5,87 \pm 0,80

Todas as formulações apresentaram pH próximo ao da pele (pH 5.0), assim essa faixa de pH mensurada nas formulações foi aceitável e adequada.

5.13.2 Tamanho das gotículas e Potencial Zeta

As microemulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial zeta. As microemulsões desenvolvidas se mostraram com tamanho, PDI e potencial zeta adequado para tal processo. Quando o potencial zeta negativo ou positivo está mais elevado a repulsão das partículas são favorecidas e quando mais baixos pode ocorrer agregação ou floculação, assim a magnitude do potencial zeta indica a estabilidade do sistema coloidal (Bhattacharjee, 2016a).

O potencial zeta das partículas das microemulsões obtidas é caracteristicamente negativo devido as cargas superficiais dos componentes da amostra, nesse sistema o potencial zeta variou de -24,5 a -24,9 mV, mostrando uma estabilidade adequada.

A tabela 8 mostra os resultados de tamanho de gotícula, potencial zeta e PDI das microemulsões 1A e 1B.

Tabela 9. Valores correspondentes a análise do tamanho médio (nm), PDI e potencial zeta (mV) das microemulsões (n = 3) e desvio padrão.

	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (+mV)
Formulação 1A (Padrão α-PHE)	15,37 \pm 0,68	0,093 \pm 0,05	-24,9 \pm 0,28
Formulação 1B (óleo Breu Branco)	250,7 \pm 6,85	0,165 \pm 0,09	-24,5 \pm 0,24

O tamanho de gotícula das microemulsões desenvolvidas está em escala nanométrica (10-100 nm). O potencial zeta de ambas as formulações foram negativos. Os valores negativos de potencial zeta estão em concordância com o esperado ao utilizar Span® 80 como tensoativo (Kong, Park, 2011). O índice de polidispersão (PDI) demonstra a homogeneidade da distribuição das gotículas, sendo esperados entre 0 e 1,0. Quanto mais próximo de 0, as gotículas estão mais monodispersas e com menor variação de tamanho (Moghimpour, Salimi, Eftekhari, 2013). O ideal para sistemas microemulsionados é que o PDI se mantenha entre 0,1 a 0,4 (Bhattacharjee, 2016a), mantendo-se características monodispersas.

5.14 Estudo De Estabilidade Das Microemulsões

5.14.1 Tamanho das gotículas e Potencial Zeta

O PDI variou entre 0,042 – 0,153 em temperatura ambiente para formulação 1A e de 0,030 – 0,089 para formulação 1A sob refrigeração, mostrando estarem monodispersas durante o período analisado nas duas condições. Para formulação 1B o PDI ficou entre 0,27 – 1,00 em temperatura ambiente, e de 0,19 – 0,93 sob refrigeração. O potencial zeta e o pH foram semelhantes nas duas condições analisadas. As duas formulações indicaram tamanho entre 15,20 e 278,10 nm, demonstrando tamanho bem variável, sendo a formulação 1A apresentando mais aceitável.

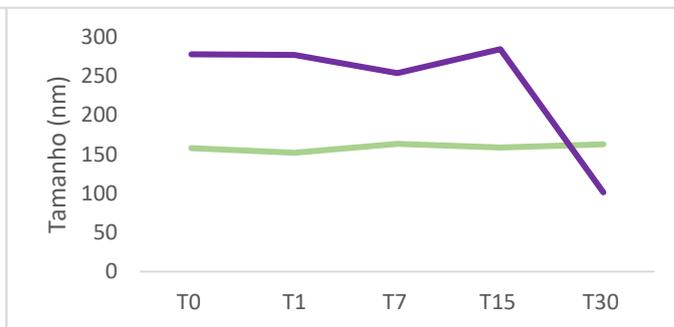
Logo, observa-se nos gráficos da figura 21 que as formulações se apresentam estáveis nas diferentes condições de temperatura ambiente e de geladeira. Para melhor controle dessas formulações pode ser indicado que o armazenamento em geladeira seja mais adequado, diminuindo assim fatores externos não controláveis que podem desestabilizar a formulação.

Tamanho das gotículas

Temperatura (25°C)



Temperatura (4°C)



Potencial zeta

Temperatura (25°C)

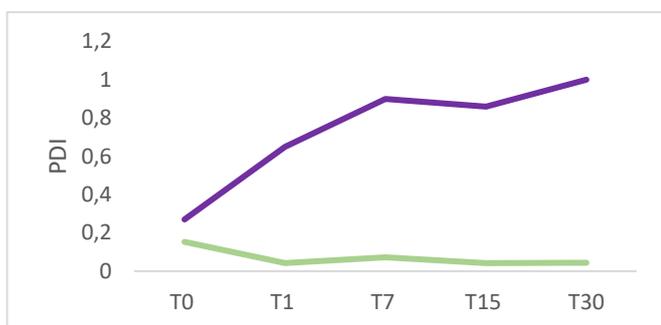


Temperatura (4°C)



PDI

Temperatura



Temperatura

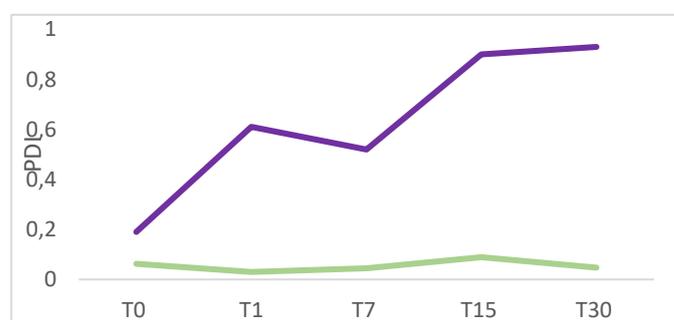
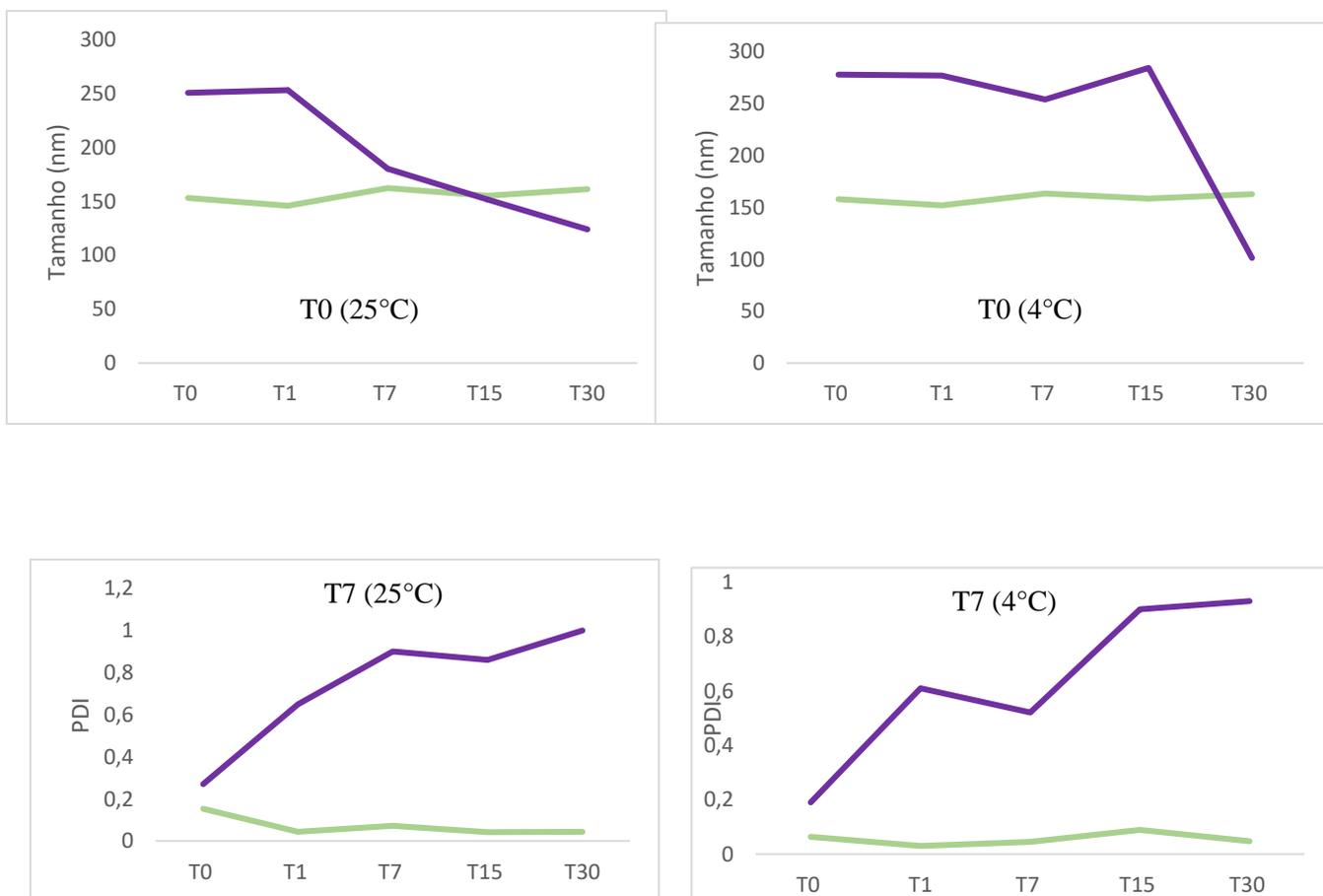


Figura 20. Valores correspondentes ao tamanho médio (nm), PDI e potencial zeta (mV) das formulações 1A e 1B (n = 3).

O potencial zeta pode mudar com a variação do pH e torna-se mais positivo e negativo em magnitude com pH baixo e alto, respectivamente (Bhattacharjee, 2016b). Todas as microemulsões mantiveram valores de PDI adequados, mesmo após a estabilidade, tanto em geladeira quando temperatura ambiente, não apresentando grande alteração nos parâmetros analisados.

5.14.2 Análise de pH

Foram analisados o pH das formulações, sendo analisados nos tempos 0 dia, 1 dia, 7 dias, 15 dias e 30 dias. A manutenção do pH de uma formulação é indicativo de estabilidade do sistema. A redução do pH após um período de estocagem pode ser devido a presença de ácidos graxos livres provenientes da hidrólise do tensoativo ou da fase oleosa utilizada (Bruxel et al, 2012). O pH das formulações se manteve entre 5,5 e 6,5, tanto para 1A (Padrão α -PHE) quanto para 1B (Óleo Breu Branco), estando dentro da faixa aceitável e próximo ao da pele. Os valores de pH obtidos durante o estudo de estabilidade estão indicados nos gráficos da Tabela 10.



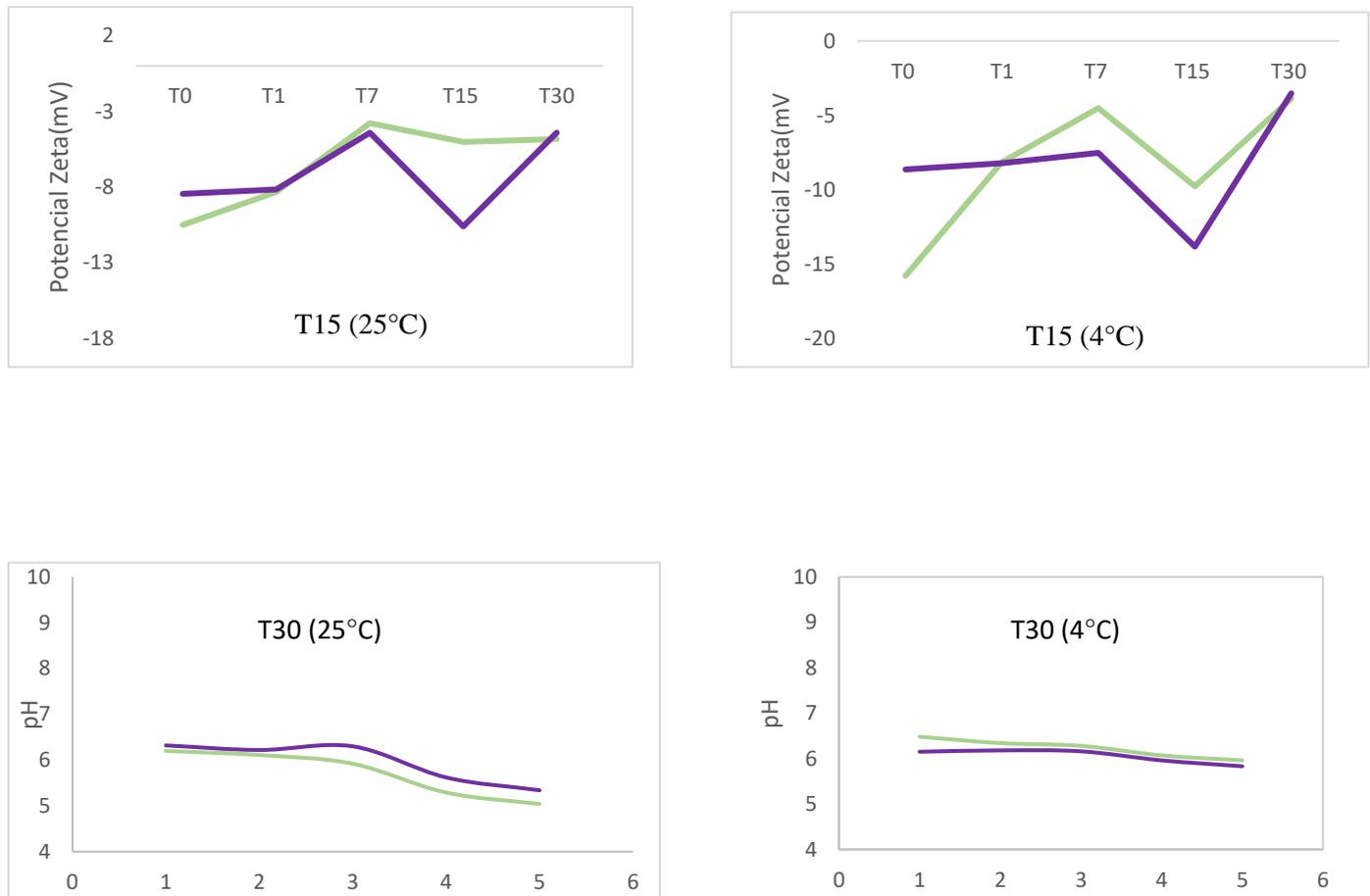


Figura 21. Resultados correspondente ao pH das formulações desenvolvidas no período de 30 dias de estabilidade a partir da média de 3 determinações e desvio padrão.

Os valores de pH variaram para a microemulsão 1A $5,34 \pm 0,43$ a $6,48 \pm 0,37$ e para a microemulsão 1B entre $5,04 \pm 0,55$ e $6,20 \pm 0,40$, não havendo diferença estatística.

Em relação ao pH da formulação 1B em temperatura ambiente se tornou mais baixo (5,04) após análise de 30 dias. Apesar do decaimento de pH das formulações 1B, os valores obtidos ainda estão dentro da faixa de estabilidade esperado (Santos et al, 2015). Esses sistemas em temperatura ambiente apresentaram-se semelhantes quanto as condições analisadas e tendo mais variações do pH da formulação, o que pode estar relacionado com a constante mudança de temperatura do local.

5.14.3 Características organolépticas das formulações

Foram avaliadas as características organolépticas das formulações quanto ao aspecto, cor, odor e sensação de tato. Em todas as formulações o aspecto foi considerado

homogêneo e transparente, não havendo alteração em nenhuma delas durante os 30 dias em que ficaram mantidas em temperatura ambiente e de geladeira.

Tanto a formulação que continha o padrão α -PHE (1A) quanto a que continha o óleo Breu Branco (1B), apresentaram odor característico.

Todas as formulações foram caracterizadas com sensação de tato lisa e assim se mantiveram durante toda a análise. Não houve alteração da coloração em nenhuma das formulações, sendo mantida a coloração transparente, sendo a que continha o óleo levemente amarelada translúcida.

As características organolépticas como cor e aspecto nos diferentes tempos analisados podem ser observadas na Figura 22.

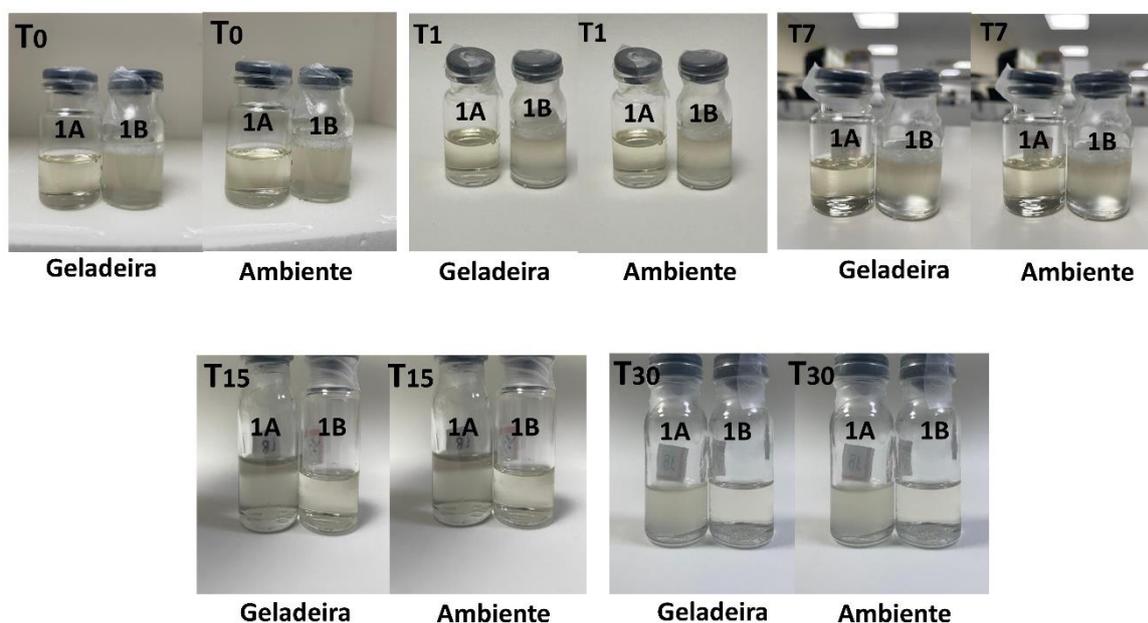


Figura 22. Registro das formulações armazenadas em temperatura ambiente e de geladeira durante 30 dias (T₀, T₁, T₇, T₁₅ e T₃₀).

5.15 Estudos De Permeação Em Pele

Os porcos possuem muitas semelhanças anatômicas, genéticas e fisiológicas com os humanos e, por isso, são excelentes modelos animais para algumas investigações (Meurens et al., 2012; Praça et al., 2018). O estrato córneo da pele de porco possui espessura de 30 a 140 μm , enquanto que a espessura do estrato córneo da pele humana varia de 50 a 120 μm (Summerfield; Meurens; Ricklin, 2015), isso faz com que os

resultados de estudos de permeação/penetração em peles suínas e humanas sejam similares (Barbero; Frasch, 2009).

O resultado comparando-se entre as formulações é demonstrada no gráfico da figura 24.

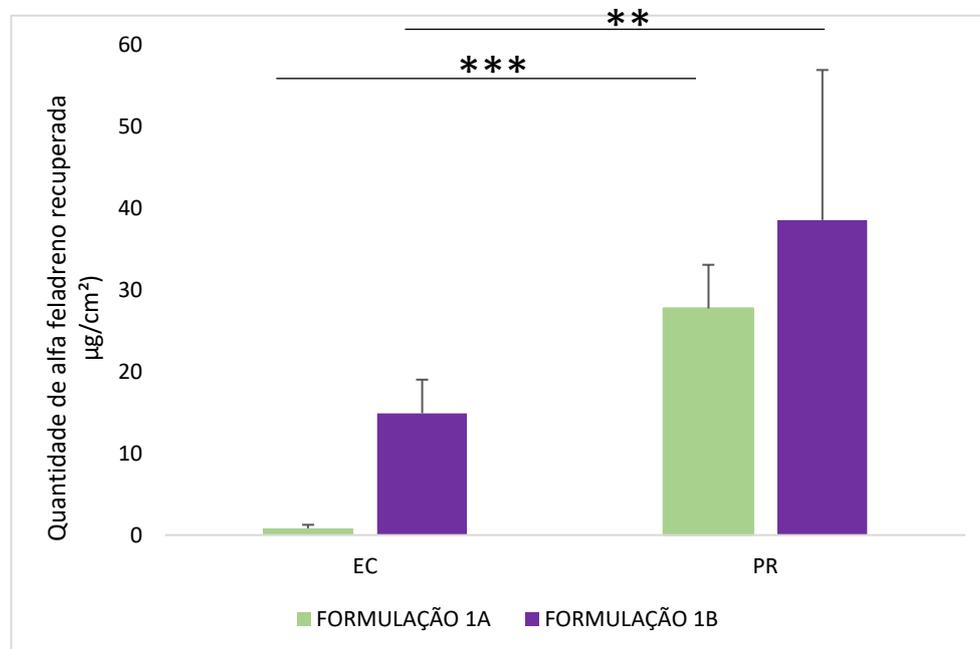


Figura 23. Comparação do estudo de permeação entre as formulações 1A e 1B - estrato córneo (EC) e na pele remanescente (PR). *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A formulação 1B penetrou facilmente tanto na pele remanescente quanto no estrato córneo. Isso ocorre por causa da alta lipofilicidade do óleo Breu Branco resultando em alta afinidade com as camadas da pele (Chen et al., 2016). A formulação 1A penetrou mais facilmente na pele remanescente, demonstrando que o Padrão α -PHE tem maior afinidade e facilidade de penetração na pele remanescente.

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 transepidérmica e a absorção de substâncias exógenas (Gratieri; Gelfuso; Lopez, 2008).

A formulação 1A apresentou uma penetração de $0,836 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no estrato córneo, e de $27,74 \pm 5,32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na pele remanescente. Já a formulação 1B apresentou

uma penetração de $14,91 \pm 4,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no estrato córneo e de $38,55 \pm 18,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na pele remanescente.

A penetração já era esperada para as duas amostras, visto que os terpenos por si só são promotores de permeação cutânea, juntamente com os tensoativos na formulação, no entanto a formulação com o óleo na pele remanescente mesmo já esperada, penetrou significativamente, visto que quando aplicadas topicamente, as NE têm mostrado atuar como promotores de permeação cutânea de fármacos, ou seja, são capazes de aumentar a quantidade de fármacos liberados no interior da pele, já que o estrato córneo (EC) funciona como uma eficiente barreira para a entrada de qualquer substância exógena no tecido cutâneo. (YINGNGAM et al., 2019)

Não foi quantificado presença de padrão alfa felandreno e óleo Breu Branco no meio extrator (tampão fosfato + tween 80), o que já era esperado, visto que, a presença do ativo nesse meio não é desejável em uma formulação de uso tópico.

5.16 Estudos de irritabilidade in vitro

O HET-CAM vem sendo estudado desde 1988 como método alternativo ao teste de irritação ocular em coelhos (Worth, A. P & Balls, 2001; Worth, A. P. & Cronin, 2001). Atualmente, em alguns países membros da Comunidade Europeia, por exemplo: França e Alemanha, o teste HET-CAM já é aceito pelas autoridades regulatórias como método usado no desenvolvimento de produtos cosméticos (Liebsch; Spielmann, 2002).

As formulações do tipo microemulsão contendo o alfa felandreno e o óleo Breu Branco foram preparadas no mesmo dia do teste, para verificar o potencial irritante, empregando-se uma modificação do método proposto por Luepke (1985), que é aceito hoje pela legislação europeia e indicado pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária, Brasil) para avaliação de segurança de produtos farmacêuticos e cosméticos (Vinardell; García, 2000). Apesar de se tratar de um método apenas qualitativo para medir o poder irritante de formulações e com baixa sensibilidade para classificar produtos moderadamente irritantes (Debbasch et al., 2005), este tipo de ensaio vem sendo bastante utilizado por ser de simples execução e uma alternativa para ensaios de irritação tópica *in vivo* utilizando modelos vivos, bastante condenado atualmente pela comunidade científica.

Como se pode observar na figura 25, as microemulsões, tanto com o padrão alfa felandreno e o óleo Breu Branco, apresentou-se não irritante segundo a metodologia

proposta, por não causar nenhum tipo de eventos como hiperemia, hemorragia ou coagulação após 5 min de contato com a CAM e de acordo com o score calculado. A única alteração que se observou após uma das três aplicações da formulação 1B, foi uma leve hiperemia após 2 minutos de contato com a CAM. Acredita-se que esta leve hiperemia seja devido ao pH da formulação aproximadamente 5,87, mas podendo ser também pela alta concentração de tensoativos na formulação, no entanto sendo classificada como não irritante, o que, no entanto, não compromete o seu uso *in vivo*.

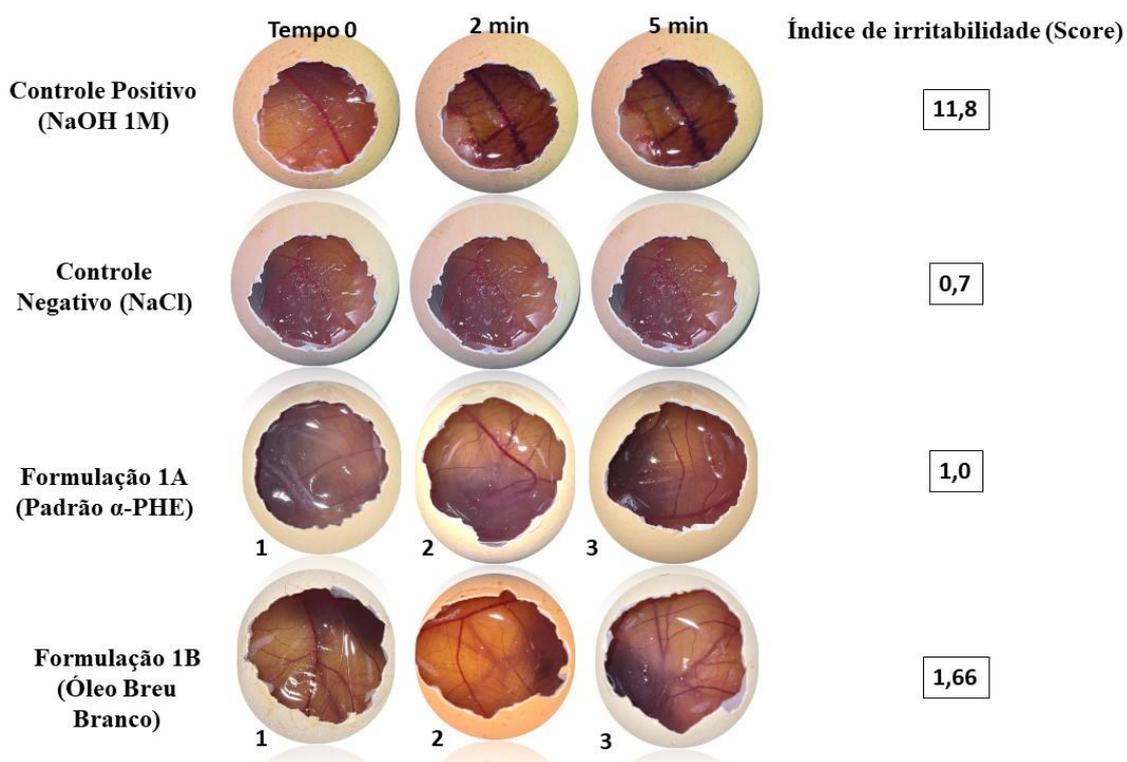


Figura 24. HETCAN com a formulação do tipo microemulsão contendo padrão α -PHE (1A) e óleo de Breu Branco (1B), as imagens são representadas ao final do tempo de 5 minutos. No controle positivo (NaOH 1M) observa-se hemorragias e hiperemia, no controle negativo com soro fisiológico (NaCl) não se observa nenhum fenômeno que caracterize irritabilidade. Nas formulações em estudo não se observa nenhuma alteração nos fenômenos de hiperemia, hemorragia ou coagulação.

6 CONCLUSÃO

O método desenvolvido é adequado para analisar α -PHE na matriz da amostra de pele. Embora vários estudos tenham detalhado as atividades farmacológicas da α -PHE, as atividades biológicas da α -PHE ainda precisam ser estudadas mais em detalhes. As formulações desenvolvidas neste trabalho, apresentaram-se estáveis por pelo menos 30 dias, do ponto de vista físico, quando estocadas em temperatura ambiente e geladeira, caracterizando-se como promissores sistemas de entrega de fármacos em terapias tópicas. A formulação 1A também demonstrou ser a formulação menos irritante nos testes *in vitro* HetCam. Como a concentração de alfa felandreno é equivalente, em cada formulação, e não foi alterada a quantidade de tensoativos, portanto não foi modificada a permeação, demonstrando capacidade da formulação de promover a penetração do alfa, em camadas mais profundas e manter a quantidade de alfa necessária. Todos esses fatores podem ser associados positivamente para utilização de uma formulação mais eficiente.

7 REFERÊNCIAS

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (United Kingdom)*, v. 41, n. 6, p. 317–320, 2013. Disponível em: .

DABROWSKA, A.K. et al. Materials used to simulate physical properties of human skin. *Skin Research and Technology*, v. 22, n. 1, p. 3–14, 2016.

PESSOA, Otília Desdênia Loióla; TREVISAN, Maria Tereza Salles; LEMOS, Telma Leda Gomes; BANDEIRA, Paulo Nogueira. Metabólitos Secundários de *Protium heptaphyllum* MARCH. *Quim. Nova*, v. 25, n. 6, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/9jPDwmTtkWJbddJqMZWw9ML/?format=pdf&lang=pt>

CHEN, Jun; JIANG, Qiu-Dong; CHAI, Ya-Ping; ZHANG, Hui; PENG, Pei; YANG, XiXiong. Natural Terpenes as Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Molecules*, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 1709, 2016. DOI: 10.3390/molecules21121709. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/12/1709>.

DOMENTE , Vitor Dressano; MATTOS, Patrícia Póvoa. Crescimento de *Protium heptaphyllum* no Pantanal da Nhecolândia, Mato. [S. l: s. n.], 2010. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/869564/1/019R.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2022

LIMA, Suelen Cristina de Sousa. Propagação Vegetativa do *Protium* spp: *Protium heptaphyllum*, *Protium*. [S. l: s. n.], 2012. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/952515/1/2934.pdf>. Acesso em: 07 maio 2022

DALY, D C. Burseraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB68>. Acesso em: 20 jun. 2022.

Karatas A, Yüksel N, Baykara T. Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol. *II Farm*. 2005;60(9):777–82.

Koga K, Kusawake Y, Ito Y, Sugioka N, Shibata N, Takada K. Enhancing mechanism of Labrasol on intestinal membrane permeability of the hydrophilic drug gentamicin sulfate. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;64:82–91.

Baser, K.H.C. Analysis, and Assessment of Essential Oils. In A Manual on the Essential Oil Industry; De Silva, K.T., Ed.; United Nations Industrial Development Organization: Vienna, Austria, 1995; pp. 155–178.

Guan, X.; Ge, D.; Li, S.; Huang, K.; Liu, J.; Li, F. Chemical composition and antimicrobial activities of *Artemisia argyi* Levl. et Vant essential oils extracted by simultaneous distillation-extraction, subcritical extraction and hydrodistillation. *Molecules* 2019, 24, 483. [CrossRef] [PubMed]

Kim, H.; Park, J. A density functional theory study on the reaction mechanism of α -Phellandrene with NO₃. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2015, 36, 2139–2142. [CrossRef]

PEREIRA, G. G.; GUTERRES, S. S.; BALDUCCI, A. G.; COLOMBO, P.; SONVICO, F. Polymeric Films Loaded with Vitamin E and Aloe vera for Topical Application in the Treatment of Burn Wounds. *BioMed Research Internation*, v. 2014, p. 1–9, 2014.

LEE, S. G.; JEONG, J. H.; LEE, K. M.; JEONG, K. H.; YANG, H.; KIM, M.; JUNG, H.; LEE, S. G.; CHOI, Y. W.; LEE, S. G.; CHOI, Y. W. Nanostructured lipid carrier-loaded hyaluronic acid microneedles for controlled dermal delivery of a lipophilic molecule. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 289–299, 2014.

LOPEZ, R. F. V; SETO, J. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. *Biomaterials*, v. 32, n. 3, p. 933–941, 2011.

Vieira-Júnior, G.M.; Souza, C.M.L; Chaves, M.H. (2005). Resina de *Protium heptaphyllum*: Isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Quimica Nova* 28: 183-187.

Silva, E.R.D., Oliveira, D.R.D., Melo, M.D.F.F., Bizzo, H.R., Leitão, S.G., 2016. Report on the Malungo expedition to the Erepecuru river, Oriximiná, Brazil. Part I: is there a difference between black and white breu? *Rev. Bras* 26, 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.003>

Silva, E. R., Oliveira, D. R., Melo, M. F. G, Bizzo, H. R. & Leitão, S. G. (2016a). Report on the Malungo expedition to the Erepecuru river, Oriximiná, Brazil. Part I: is there a difference between black and white breu? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26 (5), 647-656. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.003>.

Lorenzi, H. (2007). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 05. ed. Nova Odessa - SP: Plantarum, 2008.

PESSOA, Otília Desdênia Loióla; TREVISAN, Maria Tereza Salles; LEMOS, Telma Leda Gomes; BANDEIRA, Paulo Nogueira. Metabólitos Secundários de *Protium heptaphyllum* MARCH. *Quim. Nova*, v. 25, n. 6, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/9jPDwmTtkWJbddJqMZWw9ML/?format=pdf&lang=pt>

PEREIRA, A.I.S. Atividade antibacteriana e caracterização físicoquímica de óleos essenciais extraídos das plantas medicinais comumente utilizadas pela população de São Luís do Maranhão. 2017, 104f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2017.

PEREIRA, B.A.S. Árvores do bioma cerrado. Disponível em: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/03/30/protium-heptaphyllumaubl-marchand-subesp-heptaphyllum>.

DOMENTE, Vitor Dressano; MATTOS, Patrícia Póvoa. Crescimento de *Protium heptaphyllum* no Pantanal da Nhecolândia, Mato. [S. l: s. n.], 2010. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/869564/1/019R.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2022.

LIMA, Suelen Cristina de Sousa. Propagação Vegetativa do *Protium* spp: *Protium heptaphyllum*, *Protium*. [S. l: s. n.], 2012. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/952515/1/2934.pdf>. Acesso em: 07 maio 2022

FUNDAÇÃO ROBERTO MARINHO. Um pé de quê?. [S. l: s. n.], 2010. Disponível em: <http://www.umpedeque.com.br/arvore.php?id=659#:~:text=Caracter%C3%ADsticas%20omorfol%C3%B3gicas%3A,escura%2C%20rica%20em%20resina%20arom%C3%A1tica>. Acesso em: 19 jun. 2022.

PONTES, W.J.T.; OLIVEIRA, J.C.G.; CÂMARA, C.A.G.; LOPES, A.C.H.R.; GONDIM JÚNIOR, M.G.C.; OLIVEIRA, J.V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M.O.E. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium*

heptaphyllum (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Revista Acta Amazonica*, v. 37, n. 1, p. 103-110, 2007

MOBIN, M.; DE LIMA, S.G.; ALMEIDA, L.T.G.; TAKAHASHI, J.P.; TELES, J.B.; SZESZS, M.W.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, A.A.; MELHEM, M.S.C. MDGCMS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* specie. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.18, n.2, p.531-538, 2016.

ARAUJO, D.A.; TAKAYAMA, C., FARIA, F.M.; SOCCA, E.A.; DUNDER, R.; MANZO, L.P. Efeitos gastroprotetores do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* em modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.21, n.4, p.721-729, 2011.

LIMA, E.M.; CAZELLI, D.S.P.;PINTO, F.E.;MAZUCO, R.A.;KALIL, I.C.;LENZ, D.;SCHERER, R.;ANDRADE, T.U.;ENDRINGER, D.C. Óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum*: composição química, citotoxicidade, atividade antimicrobiana e antimutagenicidade. *Revista Farmacognosia*, v.12, n.1, 2016.

Rüdiger, A. L., Siani, A. C. & Veiga Junior, V. F. (2007). The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1), 93-104.

Daly, D. C., Perdiz, R. O., Fine, P. V. A., Damasco, G., Martínez-Habibe, M. C. & Calvillo-Canadell, L. (2022). A review of Neotropical Burseraceae. *Brazilian Journal of Botany*, 45, 103–137. <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00765-1>.

Tostes, L. C. L., Gonçalves, J. F. C., Lins, A. L. F. A., Costa Neto, S. V., Ferreira, A. M. S., Castelo, A. & Dias, M. R. L. (2020). Identification of the secretory structures present in the trunk of *Protium* Burm. f. (Burseraceae) exuding oil-resin. *Brazilian Applied Science Review*, 4 (3), 1860-1872. <http://dx.doi.org/10.34115/basrv4n3-090>

ARAUJO, D.A.O.V. Avaliação da gastroproteção do óleo essencial do *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos em modelos de úlcera gástrica em ratos. 2012, 127f. Dissertação (mestrado em Farmacologia) apresentada Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

RÜDIGER, A.L.; SILVA, C.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. EDXRF analysis of Amazonian Burseraceae oleoresins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 6, p. 1077-1081, 2009

SIANI, A.C.; NAKAMURA, M.J.; TAPPIN, M.R.R.; MONTEIRO, S.S.; GUIMARÃES, A.C.; RAMOS, M.F.S. Chemical Composition of South American Burseraceae Non-volatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. *Phytochemical Analysis*, v. 23, p. 529-539, 2011

Murthy, K.S.R., Reddy, M.C., Rani, S.S., Pullaiah, T. (2016). Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae: a review. *J Pharmacogn Phytochem.*, 5, 247-258.

Cabral, R. S. C., Alves, C. C. F., Batista, H. R. F., Sousa, W. C., Abrahão, I. S., Crotti, A. E. M., Santiago, M. B., Martins, C. H. G. & Miranda, M. L. D. (2018). Chemical composition of essential oils from different parts of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand and their in vitro antibacterial activity. *Natural Product Research*, 34 (16), p.2378-2383. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2018.1536659>.

Lorenzi, H. (2007). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 05. ed. Nova Odessa - SP: Plantarum, 2008.

Daly, D. C. (2009). Burseraceae. In: Giuletta, A.M.; Rapini, A.; Andrade, M.J.G.; Queiroz, L.P. De; Silva, J.M.C.D. (eds.). *Plantas raras do Brasil*. Belo Horizonte: Conservação Internacional, Universidade Estadual de Feira de Santana, 116-117.

Daly, D. C. (2015). Burseraceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6593>>

Palermo, F. H., Nicolai, J. N., Seixas, D. P. S., Silva, S. C. M. & Rodrigues, T. M. (2017). Distribuição, morfologia e histoquímica do sistema secretor em raízes de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Holos Environment*, 37- 44.

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.

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.

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

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.

BIZZO, H.R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v.32, n.3, p.588-594, 2009.

Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*. 2015;54:111-119. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040

Bizzo, H.R., Hovell, A.M.C. and Rezende, C.M. (2009) óleos Essenciais No Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento E Perspectivas. *Química Nova*, 32, 588-594. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>

GUIMARÃES, A.G. et al. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 107, n.6, p. 949-957, 2010.

SILVA, C.T., JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. *Ciência e Cultura*, v. 66, n.1, 2014 .

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.

WOLFFENBÜTTEL, Adriana Nunes. *Bases químicas dos óleos essenciais e aroaterapia: abordagem técnica e científica*. Belo Horizonte: Editora Laszlo, 2016. 440 p

Taiz L, Zeiger E. 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5th. edn. Porto Alegre, Artmed.

Ribeiro, S. M., Bonilla, O. H., & Lucena, E. M. P. (2018). Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de

<i>Croton spp.</i> da Caatinga. *Iheringia, Série Botânica.*, 73(1), 31–38. Recuperado de <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/371>

PEREIRA, M.N.; CONCEIÇÃO, R.B.; CRUZ, J.C.S.; ANDRADE, M.C.N. Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, v.14, n.3, p.513-521, 2018.

FILHO, J.E.G.; PÁDUA, L.E.M.; PESSOA, E.F.; SILVA, P.R.R. Antibiosis and antixenosis of lima bean to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 83, p. 1-6, 2016.

FILHO, C.V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

STERMITZ, F.R.; LORENZ, P.; TAWARA, J.N.; ZENEWICZ, L.A.; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 4, p. 1433-1437, 2000.

CARINI, J. P.; LEITAO, G. G.; SCHNEIDER, P. H.; SANTOS, C. C.; COSTA, F. N.; HOLZSCHUH, M. H.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. Isolation of achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by high-speed countercurrent chromatography. *Current pharmaceutical biotechnology*, v.16, n.1, p.66-71, 2015.

MARQUES, A.M.; FINGOLO, C.E.; KAPLAN, M.A. HSCCC separation and enantiomeric distribution of key volatile constituents of *Piper caussenianum* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). *Food Chemical Toxicology*. p. 1-7, 2017.

PEIXINHO, G.S.; RIBEIRO, V.G.; AMORIM, E.P.R.; MELO, M.A.C. Ação do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon nardus* L) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. *Summa Phytopathol*, v.45, n.4, p.428-431, 2019.

Trulieve. Available online: <https://www.trulieve.com/discover/blog/everything-you-need-to-know-about-a-phellandreneand-its-benefits> (accessed on 20 July 2022).

- Zhang, J.H.; Sun, H.L.; Chen, S.Y.; Wang, T.T. Anti-fungal activity, mechanism studies on α -Phellandrene and nonanal against *Penicillium cyclopium*. *Bot. Stud.* 2017, 58, 13. [CrossRef]
- Piccinelli, A.C.; Santos, J.A.; Konkiewitz, E.C.; Oesterreich, S.A.; Formagio, A.S.; Croda, J.H.; Ziff, E.B.; Kassuya, C.A. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutr. Neurosci.* 2015, 18, 217–224. [CrossRef]
- Lima, D.F.; Brandão, M.S.; Moura, J.B.; Leitão, J.M.; Carvalho, F.A.; Miúra, L.M.; Leite, J.R.; Sousa, D.P.; Almeida, F.R. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: Possible mechanisms of action. *J. Pharm. Pharmacol.* 2012, 64, 283–292. [CrossRef] [PubMed]
- Hsieh, S.L.; Li, Y.C.; Chang, W.C.; Chung, J.G.; Hsieh, L.C.; Wu, C.C. Induction of necrosis in human liver tumor cells by α -phellandrene. *Nutr. Cancer* 2014, 66, 970–979. [CrossRef] [PubMed]
- Lin, J.J.; Hsu, S.C.; Lu, K.W.; Ma, Y.S.; Wu, C.C.; Lu, H.F.; Chen, J.C.; Lin, J.G.; Wu, P.P.; Chung, J.G. Alpha-phellandrene-induced apoptosis in mice leukemia WEHI-3 cells in vitro. *Environ. Toxicol.* 2016, 31, 1640–1651. [CrossRef] [PubMed]
- Kennedy, D.O.; Wightman, E.L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain function. *Adv. Nutr.* 2011, 2, 32–50. [CrossRef] [PubMed]
- Bizzo, R.H.; Hovell, A.M.C.; Rezende, C.M. Brazilian essential oil: General view, developments, and perspectives. *Quim. Nova* 2009, 3, 588–594. [CrossRef]
- Iscan, G.; Kirimer, N.; Demirci, F.; Demirci, B.; Noma, Y.; Başer, K.H. Biotransformation of (–)-(R)- α -phellandrene: Antimicrobial activity of its major metabolite. *Chem. Biodivers.* 2012, 9, 1525–1532. [CrossRef]
- Gaich, T.; Mulzer, J. Chiral Pool Synthesis: Starting from Terpenes. In *Comprehensive Chirality*, 1st ed.; Carreira, E.M., Yamamoto, H., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Volume 2, pp. 163–206.

New Directions Aromatics. Available online: <https://www.newdirectionsaromatics.com/tags/phellandrene/essential-oils/> (accessed on 13 June 2022).

BARRY, B.W. Transdermal drugs delivery. *Dermatological Formulations. Percutaneous absorption*. New York, p. 1-233, 351-407, 1983.

SAINI, S. Synthesis and QSAR studies of some Quinazoline derivatives: an approach towards development of antimicrobial formulation. *Pharmaceutical Sciences*, 2010.

BRASIL. Ministério da saúde, agência nacional de vigilância sanitária. *Farmacopéia Brasileira*, 5 ed. Brasília, Anvisa: 546 p., volume 1, 2010.

CHANCHAL, D.; SWARNLATA, S. Novel approaches in herbal cosmetics. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 7, n. 2, p. 89–95, 2008.

AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia* 81, v. 81, n. 7, p. 680–689, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.001>>

ANSARI, S.; SAMEEM, M.; ISLAM F. Influence of nanotechnology on herbal drugs: A Review. *J Adv Pharm Technol Res.*;3(3):142, 2012.

BOUCHEMAL K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm.*;280(1–2):241–51, 2004

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.

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.

FERNANDEZ, P., RIEGER J., ANGELIKA, K. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* 251:53–8, 2004.

SOLANS C., et al. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 10, n. 3–4, p. 102- 110, 10// 2005.

MCCLEMENTS, D.J., Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*. 8: 1719-1729, 2012.

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.

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.

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.

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

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.

JAISWAL, M., DUDHE, R., SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.

CALLENDER, S.P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multidrug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 526, n. 1–2, p. 425–442, 2011.

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.

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.

DAMASCENO, B.P.G.L. *et al.* Microemulsão: um Promissor Carreador para Moléculas Insolúveis. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32, 9-18, 2011.

ZHAO, Y. G. *et al.* Preparation of a bis-demethoxy curcumin microemulsion based on pseudo- ternary phase diagrams and an orthogonal test analysis. *Journal of Pesticide Science*, 36, 248-251, 2011.

SURMAN, L. L. Potencialidades de Veículos Microemulsionados para Fotoprotetores Físicos. *Latin America Journal of Pharmacy*, 28, 133-140, 2009.

SCHMIDTS, T. *et al.* Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 340, 187-192, 2009.

FERREIRA, A.O. Guia prático da farmácia magistral. 4ª Ed., v.1. São Paulo: Pharmabooks, 2010, 736 págiãos.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. Princípios físico-químicos em farmácia. 2ª Ed., São Paulo: Pharmabooks, 2011, 690 páginas.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; OKUYAMA, S. S. K.; OLIVEIRA, A. B.; ARAUJO, V. L. Proposta de diferentes padrões de avaliação para determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (ehl) de produtos gordurosos semi-sólidos (sebo de carneiro)- *Visão Acadêmica*, v. 4, n. 1, p. 25 - 29, 2003.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; JUNIOR, A.A.S.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.31, n. 3, p. 301-313, jul./set. 2005.

GOMES, D.A.A. Aplicação de Microemulsões na Solubilização de Frações Pesadas de Petróleo. Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte para obtenção do título de Mestre, 2009.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quimica.Nova*, v.27, p.131-138, 2004.

MITTAL, L.K. Handbook of microemulsion science and technology. New York: Promod Kumar, 1999.

PRISTA, L.V.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. Tecnologia Farmacêutica. 5ªed. Editora Fundação Calouste Gulbernkian, Lisboa, 1995.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.;CHIMELLI,M.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. <http://www.visaoacademica.ufpr.br/v3n1/hidrofilo.htm> - acesso em 07/04/13.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (United Kingdom)*, v. 41, n. 6, p. 317–320, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.04.017>>.

DABROWSKA, A.K. et al. Materials used to simulate physical properties of human skin. *Skin Research and Technology*, v. 22, n. 1, p. 3–14, 2016.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D.A.F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>>.

BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal Drug Delivery in vitro using diffusion cells. *Current medicinal chemistry*, v. 19, n. 27, p. 4671–4677, 2012.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, n. 2, p. 103–112, 2001.

AKHTAR, N. Vesicles: a recently developed novel carrier for enhanced topical drug delivery. *Current drug delivery*, v. 11, n. 1, p. 87–97, 2014.

YOUSEF H, ALHAJJ M, SHARMA S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. [Updated 2019 Jun 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

Gurtner G, Werner S, Barrandon Y, Longaker M. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;453:314–21. <https://doi.org/10.1038/nature07039>.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585–601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>.

Schreml S, Szeimies R-M, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:866–81. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.10.048>.

BMJ. Queimaduras cutâneas. **BJM Best Practice**, 2017.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound healing and skin regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2015.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like *Quimica Nova*, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

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

CAUSSIN, J. et al. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1778, n. 6, p. 1472–1482, 2008.

FLATEN, G. E. et al. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 75, p. 10–24, 2015.

Vitalini S. Traditional uses of medicinal plants in Valvestino (Italy). *J Ethnopharmacol* 2009; 121: 106–116.

Vendruscolo A et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil in experimental animal models. *Indian J Pharmacol* 2006; 38: 58–59.

Citó, A.M.G.L; Costa, F.B; Lopes, J.A.D; Oliveira, V.M.M; Chaves, M.H. (2006). Identificação de conteúdo voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl. (March.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 8:4-7.

Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30 (2), 374-381. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.

Martins, M. L. L. (2012). Fitofisionomia das formações vegetais da Restinga da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaibim, Valença, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 10 (1), 66-73.

PENG, L. C. et al. Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 370, n. 1–3, p. 136–142, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.08.060>>

DE OLIVEIRA, A.G. et al. Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 131–138, 2004.

VAZIFEHASL, Z.; DIZAJ, S. M. The importance of phase diagrams for drug delivery systems. *Journal of advanced chemical and pharmaceutical materials (JACPM)*, v. 1, n. 1, p. 16–19, 2018. Disponível em: <http://advchempharm.ir/journal/index.php/JACPM/article/view/14>>.

LÉMERY, E. et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 469, p. 166–179, 2015

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>.

HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 2003.

KONG, M.; PARK, H.J. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers*, v.83, p.1303-1310, 2011.

MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A.; EFTEKHARI, S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 3, n. 1, p. 63–71, 2013.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ; J. L. VILA-JATO; ALONSO, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan – Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125–132, 1997.

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

SANTOS, R. V. S et al. Avaliação do radical n,n-dietil-1,4-fenilenodiamino (depd·+) como sonda espectrofotométrica para determinação da capacidade antioxidante em bebidas. *Química Nova*, v. XY, n. 00, p. 1–9, 2015.

PRAÇA, Fabíola Silva Garcia; MEDINA, Wanessa Silva Garcia; ELOY, Josimar O.; PETRILLI, Raquel; CAMPOS, Patrícia Mazureki; ASCENSO, Andreia; BENTLEY, Maria Vitória L. B. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, [S. l.], v. 111, n. April 2017, p. 121–132, 2018. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.034. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.034>.

SUMMERFIELD, Artur; MEURENS, François; RICKLIN, Meret E. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 14–21, 2015. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.10.023.

BARBERO, Ana M.; FRASCH, H. Frederick. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicology in Vitro*, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 1–13, 2009. DOI: 10.1016/j.tiv.2008.10.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2008.10.008>.

CHEN, Jun; JIANG, Qiu-Dong; CHAI, Ya-Ping; ZHANG, Hui; PENG, Pei; YANG, XiXiong. Natural Terpenes as Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Molecules*, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 1709, 2016. DOI: 10.3390/molecules21121709. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/12/1709>.

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

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

WORTH, A. P. & CRONIN, M. T. D. Prediction models for eye irritation potential based on endpoints of HET-CAM and Neutral Red Uptake test. **In Vitro & Molecular Toxicology**, v. 14, p. 143–156, 2001.

WORTH, A. P & BALLS, M. The importance of the prediction model in the validation of alternative test. *Alternative Laboratory Animal*. **Alternative Laboratory Animal**, v. 29, p. 135–143, 2001.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 127–134, 2002.

VINARDELL, M. P.; GARCÍA, L. The quantitative chloroalloin membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 551–555, 2000.

DEBBASCH, C.; EBENHAHN, C.; DAMI, N.; PERICOI, M.; VAN DEN BERGHE, C.; COTTIN, M.; NOHYNEK, G. J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: Correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 155–165, 2005.

Siqueira HDS, Neto BS, Sousa DP, Gomes BS, da Silva FV, Cunha FVM, et al. α Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. *Life Sci* 2016;160:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.07.008>.

Cabral C, Poças J, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Salgueiro L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: a source of safe antioxidant and antiinflammatory essential oil. *Ind Crops Prod* 2015;65:56–61. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.041>.

Lima DF, Brandã MS, Moura JB, Leitão JMRS, Carvalho FAA, Miúra LMCV, et al. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. *J Pharm Pharmacol* 2012;64:283–92. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01401.x>.

Lin J, Hsu S, KW L, YS M, CC W, HF L, et al. Alpha-phellandrene-induced apoptosis in mice leukemia WEHI-3 cells in vitro. *Environ Toxicol* 2016;31:1640–51. <https://doi.org/10.1002/tox.22168>.

Angelo, T, Barbalho, G. N., Gelfuso, G. M., & Gratieri, T. (2016). Minoxidil topical treatment may be more efficient if applied on damp scalp in comparison with dry scalp. *Dermatologic Therapy*, 29, 330–333.

Angelo, Tamara, Pires, F. Q., Gelfuso, G. M., da Silva, J. K. R., Gratieri, T., & Cunha-Filho, M. S. S. (2016). 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, 1022, 81–86.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.011>

Bandeira, P. N., Machado, M. I. L., Cavalcanti, F. S., & Lemos, T. L. G. (2001). Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Essential Oil Research*, 13(1), 33–34. <https://doi.org/10.1080/10412905.2001.9699597>

Barbosa, R. de S., de Matos Rodrigues, J. I., de Oliveira, V. P., Martins, W. B. R., Coelho, C. A. C., do Carmo, W. F. S., ... de São Paulo Aguiar, E. A. L. (2023). Restoration of riparian ecosystems posterior to tin mining in the Central Amazon: Restoration indicators and selection of suitable species for planting. *Ecological Engineering*, 193(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2023.107007>

Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, 180(January). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>

Cardoso, C. O., Uwai, T. Y., Gratieri, T., Cunha-Filho, M., & Gelfuso, G. M. (2023). Chromatographic method for dacarbazine quantification in skin permeation experiments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 234, 115593. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115593>

Chen, Y. C., Gad, S. F., Chobisa, D., Li, Y., & Yeo, Y. (2021). Local drug delivery systems for inflammatory diseases: Status quo, challenges, and opportunities. *Journal of Controlled Release*, 330(December 2020), 438–460. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.025>

Cheng, Z., Jiang, J., Yang, X., Chu, H., Jin, M., Li, Y., ... Wei, X. (2017). The research of genetic toxicity of β -phellandrene. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 54(June), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.011>

FDA, (CDER). (1994). *Reviewer guidance - Validation of chromatographic methods*. Rockville, United States of America. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820675-1.00027-7>

ICH. (2005). *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1)*.

ICH. (2019). *ICH Harmonised Guideline - Bioanalytical Method Validation - M10*.

- Mendes, J. L., Araújo, T. F., Carvalho, M. G., Júnior, F. E. A. C., & Costa, R. A. (2019). Chemical Composition and Mechanism of Vibriocidal Action of Essential Oil from Resin of *Protium heptaphyllum*. *Scientific World Journal*, 2019(April 2018). <https://doi.org/10.1155/2019/9563213>
- Mohammed, H. A., Sulaiman, G. M., Khan, R. A., Al-Saffar, A. Z., Mohsin, M. H., Albukhaty, S., & Ismail, A. (2024). Essential oils pharmacological activity: Chemical markers, biogenesis, plant sources, and commercial products. *Process Biochemistry*, 144(May), 112–132. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.05.021>
- Oliveira, M. S. de, Almeida, M. M., Salazar, M. de L. A. R., Pires, F. C. S., Bezerra, F. W. F., Cunha, V. M. B., ... Junior, R. N. de C. (2018). Potential of Medicinal Use of Essential Oils from Aromatic Plants. *Potential of Essential Oils*, 1–20. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78002>
- Oliveira, P. M., Sampaio, T. R., França, L. C. F., Gratieri, T., Cunha-Filho, M., & Gelfuso, G. M. (2020). LC–MS bioanalytical method for simultaneous determination of latanoprost and minoxidil in the skin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113373. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113373>
- Pereira, M. N., Matos, B. N., Gratieri, T., Cunha-Filho, M., & Gelfuso, G. M. (2018). Development and validation of a simple chromatographic method for simultaneous determination of clindamycin phosphate and rifampicin in skin permeation studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 159, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.007>
- Piva, L. R. d. O., Jardine, K. J., Gimenez, B. O., de Oliveira Perdiz, R., Menezes, V. S., Durgante, F. M., ... Chambers, J. Q. (2019). Volatile monoterpene ‘fingerprints’ of resinous *Protium* tree species in the Amazon rainforest. *Phytochemistry*, 160(July 2018), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.01.014>
- Quintão, W. S. C., Ferreira-Nunes, R., Gratieri, T., Cunha-Filho, M., & Gelfuso, G. M. (2022). Validation of a simple chromatographic method for naringenin quantification in skin permeation experiments. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1201–1202(May). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123291>

Radice, M., Durofil, A., Buzzi, R., Baldini, E., Martínez, A. P., Scalvenzi, L., & Manfredini, S. (2022). Alpha-Phellandrene and Alpha-Phellandrene-Rich Essential Oils: A Systematic Review of Biological Activities, Pharmaceutical and Food Applications. *Life*, 12(10), 1–18. <https://doi.org/10.3390/life12101602>

Salas-oropeza, J., Jimenez-estrada, M., Perez-torres, A., Castell-rodriguez, A. E., Becerril-millan, R., Rodriguez-monroy, M. A., ... Canales-martinez, M. M. (2021). *Wound Healing Activity of α -Pinene and α -Phellandrene*.

Scherer, M. M. de C., Marques, F. M., Figueira, M. M., Peisino, M. C. O., Schmitt, E. F. P., Kondratyuk, T. P., ... Fronza, M. (2019). Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress in vitro. *Journal of Tissue Viability*, 28(2), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.02.003>

Silva, E. R., Oliveira, D. R., Melo, M. F. F., Bizzo, H. R., & Leitão, S. G. (2016). Report on the Malungo expedition to the Erepecuru river, Oriximiná, Brazil. Part I: Is there a difference between black and white Breu? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(5), 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.003>

Siqueira, H. D. A. S., Neto, B. S., Sousa, D. P., Gomes, B. S., da Silva, F. V., Cunha, F. V. M., ... Oliveira, F. A. (2016). α -Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. *Life Sciences*, 160, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.07.008>

Thangaleela, S., Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., Tiyajamorn, T., Bharathi, M., & Chaiyasut, C. (2022). A Narrative Review on the Bioactivity and Health Benefits of Alpha-Phellandrene. *Scientia Pharmaceutica*, 90(4). <https://doi.org/10.3390/scipharm90040057>

YINGNGAM, Banha; CHIANGSOM, Abhiruj; PHARIKARN, Paranda; VONGANAKASAME, Kantaphong; KANOKNITTHIRAN, Virawanan; RUNGSEEVIJITPRAPA, Wandee; PRASITPURIPRECHA, Chutinun. Optimization of menthol-loaded nanocapsules for skin application using the response surface methodology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, [S. l.], v. 53, n. July, p. 101138, 2019. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.101138. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101138>